

Érica Filipa Pinto de Almeida

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O INFILTRADO LINFOIDE E EXPRESSÃO DE KI-67
COM DIVERSOS FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS
EM CANCRO DA MAMA LUMINAL**



Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas

2023

Érica Filipa Pinto De Almeida

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O INFILTRADO LINFOIDE E EXPRESSÃO DE KI-67
COM DIVERSOS FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS
EM CANCRO DA MAMA LUMINAL**

Mestrado em Oncobiologia- Mecanismos Moleculares do Cancro

Este trabalho foi realizado sob supervisão de:

Professora Doutora Paula Borralho
Professor Doutor Álvaro Tavares



Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas

2023

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O INFILTRADO LINFOIDE E EXPRESSÃO DE KI-67
COM DIVERSOS FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS
EM CANCRO DA MAMA LUMINAL**

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Érica Almeida

Copyright © 2023 Érica Filipa Pinto de Almeida

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

*“Aprendi através da experiência amarga a suprema lição:
controlar minha ira e torná-la como o calor que é convertido em energia.
Nossa ira controlada pode ser convertida numa força capaz de mover o mundo.”*

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Durante o caminho para a realização do presente projeto, muitos foram os desafios que encontrei. Infelizmente, por não estarem reunidas as condições necessárias para a realização de um primeiro estudo, necessitei de idealizar e recomeçar um novo projeto, a cerca de 4 meses do fim do mesmo. No entanto, durante esta longa caminhada, não caminhei a solo e por esse motivo, gostaria de prestar os meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora Professora Doutora Paula Borralho, que me acompanhou desde o início do primeiro projeto, prestou auxílio nos momentos em que mais precisei e sobretudo, por todo o apoio fornecido. Sem a sua ajuda, não seria possível realizar todo este percurso.

Aos anatomopatologistas, internas e técnicos de laboratório do Hospital CUF Descobertas, por todo o apoio e por todo o conhecimento partilhado.

Ao coordenador de mestrado e co-orientador Professor Doutor Álvaro, pelo auxílio prestado.

À *Madame* Élizabeth, por todas as conversas e conselhos que me forneceu, por toda a força e coragem prestadas, pelas palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e irmãos, que caminharam comigo durante este árduo percurso e que me encorajaram a continuar, apesar de todas as dificuldades. Por todo o acompanhamento durante o meu percurso académico e pela motivação.

RESUMO

Atualmente o cancro da mama continua a ter uma grande importância a nível mundial, particularmente no que respeita à sua incidência e mortalidade. Neste contexto, o diagnóstico correto e precoce apresentam um valor imensurável, contribuindo assim para a cura deste tumor. Muitos são os estudos realizados que procuram encontrar fatores preditivos e de prognóstico, de modo a auxiliar a tarefa árdua de diagnosticar, orientar a terapêutica e avaliar o prognóstico do cancro da mama. No entanto, atualmente este tema ainda carece de respostas para muitas questões.

Com o intuito de encontrar algumas respostas, no presente estudo foram analisadas correlações entre várias variáveis clínicas, histológicas e biológicas, a fim de validar determinados biomarcadores, como fatores preditivos e de prognóstico. Neste projeto, foi nosso objetivo comparar duas coortes de carcinoma da mama de tipos histológicos diferentes (carcinoma lobular invasivo e carcinoma sem tipo especial), mas com grau de diferenciação e estádios clínicos e patológicos sobreponíveis. Foram selecionados 60 casos de carcinoma da mama, dos quais 30 carcinomas lobulares e 30 carcinomas de tipo NST e foram recolhidas as características específicas de cada tipo de tumor, bem como os dados clínicos relevantes. Foram comparadas variáveis clínicas (idade, a presença ou ausência de metástases, recidiva e por fim, seguimento) e variáveis histológicas e biológicas (expressão de recetores hormonais, amplificação de HER2, expressão de Ki-67 e densidade da infiltração linfocitária) entre as duas coortes e correlacionadas estas variáveis entre si e com os dados de seguimento. Um total de 8 correlações foram identificadas, em ambos os carcinomas, entre os vários parâmetros de interesse. Evidencia-se a correlação da expressão de Ki-67 com a infiltração linfocitária peritumoral e intratumoral, que revelaram relações ligeiramente superiores às restantes correlações efetuadas.

Palavras-chave: carcinoma lobular da mama, carcinoma NST da mama, Ki-67, infiltração linfocitária, anatomia patológica, parâmetros clínicos

ABSTRACT

Currently, breast cancer continues to be of great importance worldwide, particularly with regard to its incidence and mortality. In this context, correct and early diagnosis has immeasurable value, thus contributing to the cure of this tumor. There are many studies carried out that seek to find predictive and prognostic factors, in order to assist in the arduous task of diagnosing, guiding therapy and evaluating the prognosis of breast cancer. However, this topic still lacks answers to many questions.

In order to find some answers, in the present study correlations between several clinical, histological and biological variables were analyzed, in order to validate certain biomarkers, such as predictive and prognostic factors. In this project, our objective was to compare two cohorts of breast carcinoma of different histological types (invasive lobular carcinoma and carcinoma without special type), but with overlapping degree of differentiation and clinical and pathological stages. 60 cases of breast carcinoma were selected, including 30 lobular carcinomas and 30 NST-type carcinomas, and the specific characteristics of each type of tumor were collected, as well as relevant clinical data. Clinical variables (age, presence or absence of metastases, recurrence and, finally, follow-up) and histological and biological variables (expression of hormone receptors, amplification of HER2, expression of Ki-67 and density of lymphocytic infiltration) were compared between the two cohorts and correlated these variables with each other and with follow-up data. A total of 8 correlations were identified, in both carcinomas, between the various parameters of interest. The correlation of Ki-67 expression with peritumoral and intratumoral lymphocytic infiltration is evident, which revealed slightly higher relationships than the other correlations carried out.

Keywords: lobular breast carcinoma, NST breast carcinoma, Ki-67, lymphocytic infiltration, pathological anatomy, clinical parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Marcadores de cancro.	3
Figura 2: Taxa bruta de mortalidade, em cancro da mama a nível mundial.	5
Figura 3: Representação do número de casos de diversos tipos de cancro, em Portugal.....	5
Figura 4: Representação das teorias que explicam a origem e a progressão do cancro da mama.	6
Figura 5: Representação da contagem de células que expressem Ki-67.....	20
Figura 6: Inflamação em carcinoma in situ e em carcinoma invasivo.	22
Figura 7: Sistema de arrefecimento de blocos de parafina.....	33
Figura 8: Micrótopo Leica do modelo RM2255.	34
Figura 9: Estação de trabalho Leica do modelo HistoCore SPECTRA CV.....	35
Figura 10: Blocos de parafina com as respetivas lâminas histológicas.....	37
Figura 11: Representação de carcinoma lobular em infiltração.	43
Figura 12: Representação de células cancerígenas.	44
Figura 13: Figura representativa de tumor de tipo lobular.....	45
Figura 14: Registo fotográfico de carcinoma lobular.....	46
Figura 15: Representação de carcinoma lobular.	47
Figura 16: Representação de tumor de tipo lobular.	48
Figura 17: Representação de carcinoma lobular.	49
Figura 18: Representação de um carcinoma de tipo NST.....	50
Figura 19: Representação de tumor de tipo NST.	51
Figura 20: Representação de área tumoral, de carcinoma de tipo NST.	52
Figura 21: Registo fotográfico de carcinoma de tipo NST.	53
Figura 22: Carcinoma NST com infiltração linfocitária moderada.....	54
Figura 23: Representação de carcinoma de tipo NST, com infiltração moderada.....	55
Figura 24: Gráfico representativo da expressão de RH dos 30 carcinomas lobulares.	56
Figura 25: Gráfico representativo da expressão de RH dos 30 carcinomas de tipo NST. .	57
Figura 26: Relação entre a infiltração peritumoral e a idade nos 60 carcinomas.....	59
Figura 27: Relação entre a infiltração peritumoral e o estado de recidiva nos 60 carcinomas.	59
Figura 28: Relação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, em 60 carcinomas.	60
Figura 29: Relação entre a infiltração intratumoral e a idade, em 60 carcinomas.	61
Figura 30: Relação entre a infiltração intratumoral e a recidiva, nos 60 carcinomas.	61
Figura 31: Relação entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH, nos 60 carcinomas.	62
Figura 32: Relação entre a expressão de Ki-67 e a idade das 60 participantes.....	62
Figura 33: Relação entre a expressão de Ki-67 e a recidiva, dos 60 carcinomas.....	63
Figura 34: Relação da expressão de Ki-67 e a infiltração peritumoral, dos 60 carcinomas.	63
Figura 35: Relação entre a expressão de Ki-67 e infiltração intratumoral, dos 60 carcinomas.	64

Figura 36: Relação entre a expressão de Ki-67 e a expressão de RH, dos 60 carcinomas.	65
Figura 37: Relação entre a infiltração peritumoral e a idade em carcinomas lobulares.....	66
Figura 38: Relação entre a infiltração peritumoral e a idade, em tumores de tipo NST....	67
Figura 39: Relação entre a infiltração peritumoral e a recidiva, em tumores lobulares.....	68
Figura 40: Relação entre a infiltração peritumoral e a recidiva, em tumores de tipo NST.	69
Figura 41: Relação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, em tumores lobulares.	70
Figura 42: Relação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, em tumores de tipo NST.	71
Figura 43: Relação entre a infiltração intratumoral e a idade, em tumores lobulares.....	72
Figura 44: Relação entre a infiltração intratumoral e a idade, em tumores de tipo NST...	73
Figura 45: Relação entre a infiltração intratumoral e recidiva, em tumores lobulares.	74
Figura 46: Relação entre a infiltração intratumoral e recidiva, em tumores de tipo NST.	75
Figura 47: Relação entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH, em tumores lobulares.	76
Figura 48: Relação entre infiltração intratumoral e a expressão de RH, em tumores de tipo NST.	77
Figura 49: Relação entre a expressão de Ki-67 e a idade, em carcinomas de tipo lobular.	79
Figura 50: Relação entre a expressão de Ki-67 e a idade, em tumores de tipo NST.	80
Figura 51: Associação entre a expressão do biomarcador de expressão do KI-67 (em %) e a infiltração peritumoral, em 30 pacientes com carcinoma lobular.	81
Figura 52: Relação entre a expressão de Ki-67 e a infiltração peritumoral, em tumores de NST.	82
Figura 53: Associação entre a expressão do Ki-67 (em %) e a infiltração linfocitária intratumoral, em 30 pacientes com carcinoma do tipo lobular.	83
Figura 54: Relação entre a expressão de Ki-67 e infiltração intratumoral, em tumores de tipo NST.	84
Figura 55: Relação entre a expressão de Ki-67 e recidiva, em tumores malignos lobulares.	85
Figura 56: Relação entre a expressão de Ki-67 e recidiva, em 30 pacientes com carcinoma NST.	86
Figura 57: Relação entre a expressão de Ki-67 e expressão de RH, em tumores lobulares.	87
Figura 58: Relação entre a expressão de Ki-67 e expressão de RH, em tumores NST.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela OMS.....	16
Tabela A.1: Análise dos 30 carcinomas lobulares.....	130
Tabela A.2: Análise dos 30 carcinomas NST.....	132
Tabela B.1: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas lobulares, entre a infiltração peritumoral e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração.	134
Tabela B.2: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas NST, entre a infiltração peritumoral e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração intratumoral e expressão de Ki-67.	136
Tabela C.1: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas lobulares, entre a infiltração intratumoral e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração peritumoral e expressão de Ki-67.	138
Tabela C.2: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas NST, entre a infiltração intratumoral e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração peritumoral e expressão de Ki-67.....	140
Tabela D.1: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas lobulares, entre a expressão de Ki-67 e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração peritumoral, infiltração intratumoral e expressão de Ki-67.....	142
Tabela D.2: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas NST, entre a expressão de Ki-67 e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração peritumoral, infiltração intratumoral e expressão de Ki-67.	144

LISTA DE ABREVIATURAS

A

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AJCC	American Joint Commite on Cancer- Comité Conjunto Americano do Cancro

B

BRCA	<i>Breast cancer gene</i> -gene cancro da mama
-------------	--

C

CCND1	<i>Cyclin D1</i> -ciclina D1
--------------	------------------------------

F

FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor</i> -recetor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
--------------	---

G

GATA3	<i>GATA binding protein 3</i> - proteína de ligação ao <i>GATA3</i>
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i> -observatório global do cancro

H

HE	Hematoxilina-eosina
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> - Recetor de crescimento epidérmico humano 2

I

IARC	International Agency for Research on Cancer- agência internacional de pesquisa do cancro
IRM	Imagem de ressonância magnética
LITs	Linfócitos infiltrantes de tumor

N

NK	<i>Natural killer</i>
NST	<i>No special type</i> - sem tipo específico

O

OMS Organização Mundial da Saúde

P

PALB2 *Partner and localizer of BRCA2*- Parceiro e localizador de *BRCA2*

PTEN *Phosphatase and tensin homolog* -fosfatase hómologa à tensina

PIK3CA *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha* –
subunidade catalítica α do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase

R

RE Recetor de estrogénio

RH Recetores Hormonais

RP Recetor de progesterona

RT-PCR *Real Time-Polymerase Reaction*- Polimerase em Cadeia de Reação

T

TE Terapia endócrina

TNC *Triple-negative breast cancer*- cancro da mama triplo negativo

TP53 *Tumor protein 53*- Proteína tumoral 53

U

UV Ultravioleta

ÍNDICE

<i>Agradecimentos</i>	<i>viii</i>
<i>Resumo</i>	<i>ix</i>
<i>Abstract</i>	<i>x</i>
<i>Lista de figuras</i>	<i>xi</i>
<i>Lista de tabelas</i>	<i>xiii</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>xiv</i>
1 <i>Introdução</i>	2
1.1 Cancro	2
1.2 Cancro da mama	6
1.2.1 Epidemiologia	7
1.2.2 Diagnóstico Clínico.....	7
1.2.3 Etiopatogenia.....	9
1.2.4 Classificação molecular.....	10
1.2.4.1 RH.....	11
1.2.4.2 Outros genes importantes	12
1.2.4.3 <i>HER2</i>	13
1.2.5 Classificação Histológica	14
1.2.5.1 Ki-67.....	16
1.2.6 Grau de diferenciação.....	20
1.3 Infiltração de linfócitos	21
1.4 Papel da anatomia patológica no cancro da mama	25
2 <i>Objetivo</i>	28
3 <i>Materiais e métodos</i>	30
3.1 Seleção das amostras	30
3.1.1 Seleção de dados clínicos	30
3.2 Tecidos fixados em formalina e embebidas em parafina	31
3.3 Visualização de lâminas ao microscópio	35
3.4 Extração das amostras	36
3.5 Linguagem R	37
3.5.1 Análise dos dados através da linguagem R	38
4 <i>Resultados</i>	42

4.1	Características histológicas.....	42
4.1.1	Estudo histológico de carcinomas lobulares	42
4.1.1.1	Estudo histológico de carcinomas lobulares sem existência de infiltração linfocitária	42
4.1.1.2	Estudo histológico de carcinoma de tipo lobular, com infiltração ligeira	45
4.1.1.3	Estudo histológico de carcinoma de tipo lobular, contendo infiltração moderada	47
4.1.2	Estudo histológico de carcinomas de tipo NST sem infiltração linfocitária	49
4.1.3	Estudo histológico de carcinomas de tipo NST com infiltração linfocitária ligeira	51
4.1.4	Estudo histológico de carcinomas de tipo NST com infiltração linfocitária moderada	53
4.2	Análise estatística dos parâmetros clínicos de carcinomas de tipo lobular e de tipo NST.....	55
4.2.1	Avaliação geral da infiltração peritumoral e intratumoral e níveis de expressão de Ki-67, entre carcinomas lobulares e carcinomas de tipo NST	57
4.3	Avaliação geral das associações entre o biomarcador Ki-67 e LITs, com os restantes parâmetros clínicos nos 60 carcinomas	58
4.3.1	Avaliação dos dados relativos à análise da infiltração peritumoral com os restantes parâmetros clínicos, nos 60 carcinomas.....	58
4.3.1.1	Associação da infiltração peritumoral e intratumoral e expressão de Ki-67 com os restantes parâmetros clínicos, em tumores lobulares e de tipo NST	65
4.3.1.2	Associação da Infiltração peritumoral com os restantes dados clínicos em carcinomas lobulares e em carcinomas de tipo NST.....	65
4.3.1.3	Associação da Infiltração intratumoral com os restantes dados clínicos em carcinomas lobulares e carcinomas NST.....	72
4.3.1.4	Associação da expressão do Ki-67 com as restantes variáveis, em carcinomas lobulares e carcinomas de tipo NST	78
	Avaliação da expressão de HER2, em carcinomas de tipo lobular e de tipo NST	88
4.4.....		88
5	Discussão	91
5.1	Recolha de informação clínica.....	92
5.2	Extração de amostras	93
5.3	Observação de lâminas histológicas.....	94
5.4	Avaliação dos achados das imagens microscópicas de carcinomas lobulares e NST	94

5.5	Avaliação das associações estabelecidas entre a expressão de Ki-67 e LITs, com os restantes parâmetros clínicos.....	95
5.5.1	Avaliação geral das associações entre o biomarcador Ki-67 e LITs, com os restantes parâmetros clínicos nos 60 carcinomas.....	96
5.5.2	Avaliação geral das associações entre o biomarcador Ki-67 e LITs, com os restantes parâmetros clínicos em carcinomas lobulares e de tipo NST	97
5.5.3	Avaliação dos dados relativos à análise da infiltração peritumoral com os restantes parâmetros clínicos, em carcinomas lobulares e carcinomas de tipo NST	100
5.5.4	Avaliação dos dados relativos à análise da inflamação intratumoral com os restantes parâmetros clínicos, em carcinomas lobulares e carcinomas de tipo NST	102
5.5.5	Avaliação dos dados relativos à análise da expressão de Ki-67 e os restantes parâmetros clínicos, em carcinomas lobulares e carcinomas de tipo NST	104
6	<i>Conclusões e perspectivas futuras</i>.....	111
7	<i>Referências</i>	116
8	<i>Anexos</i>.....	130

Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 CANCRO

Na literatura, o cancro é maioritariamente descrito como um crescimento irregular e descontrolado das células, conduzindo à formação de células carcinogénicas. As células passam a possuir a capacidade de adquirir novas características, sendo que estas conferem diversas vantagens. Entre as vantagens adquiridas, é possível incluir a manutenção da sinalização proliferativa, escape aos mecanismos de supressão de crescimento, aptidão para evitar o processo de apoptose, capacidade de potencial replicativo ilimitado, angiogénese sustentada, invasão de tecido e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000). Em 2011, Hanahan e Weinberg, acrescentaram novas características adquiridas pelas células cancerígenas das quais: instabilidade genómica, reprogramação da energia metabólica, competência para evitar destruição imunológica e por fim, inflamação (Hanahan & Weinberg, 2011). No entanto, a descoberta de novas características das células cancerígenas não ficou por aí. Mais recentemente, em 2022, foram acrescentadas às 10 características já existentes, mais 4 novos atributos das células com propriedades carcinogénicas. Desta forma, é possível incluir o desbloqueamento da plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e células senescentes, como se verifica na figura 1 (Hanahan, 2022). É pertinente salientar, que o cancro representa um processo com múltiplas etapas, denominado tumorigénese ou carcinogénese. De certa forma, através das etapas anteriormente referidas, as células normais após modificações convertem-se em células malignas (Hanahan & Weinberg, 2011).

São inúmeros os tipos de neoplasias definidos na atualidade, com base nos diversos tipos celulares e na capacidade de proliferação celular, podendo estas ser classificadas como benignas ou malignas (Cooper GM., 2000). Como benigna, define-se qualquer proliferação circunscrita à sua localização de origem, ou seja, sem capacidade de invasão de outros tecidos a si próximos. Por outro lado, um tumor maligno é definido como uma proliferação que não é circunscrita ao seu local de origem, tendo a possibilidade de se propagar para outros tecidos (Patel, 2020). Dos tipos de neoplasia anteriormente referidos, o tumor maligno é comumente designado como cancro, devido à sua malignidade resultante da sua competência para invadir e metastizar, isto é, ser capaz de aceder a outros tecidos através da circulação sanguínea e dar origem a novos tumores (Fares et al., 2020). A metastização confere a capacidade para a formação de uma

“colônia” metastática, sendo uma das etapas mais adversas na progressão do tumor (Lambert et al., 2017). De acordo com a origem do cancro, podemos classificá-lo em numerosos subtipos de acordo com a célula original (carcinomas, sarcomas, neoplasias hematopoiéticas, tumores neuroectodérmicos) (Suresh, 2007). Segundo o National Cancer Institute, existem mais de 100 tipos de cancro, sendo a sua denominação dependente do órgão de origem, bem como do tipo celular. Deste modo, o carcinoma é dos tipos de cancro mais frequente e tem a sua origem a partir de células do tipo epitelial (*Types of Cancer*, 2022). Dependendo do tipo de célula epitelial, a denominação é adaptada, por exemplo um adenocarcinoma é correspondente a um cancro com origem em células epiteliais glandulares, como é o caso de alguns tipos de cancro da mama, próstata e cólon (Mullangi & Lekkala, 2023).

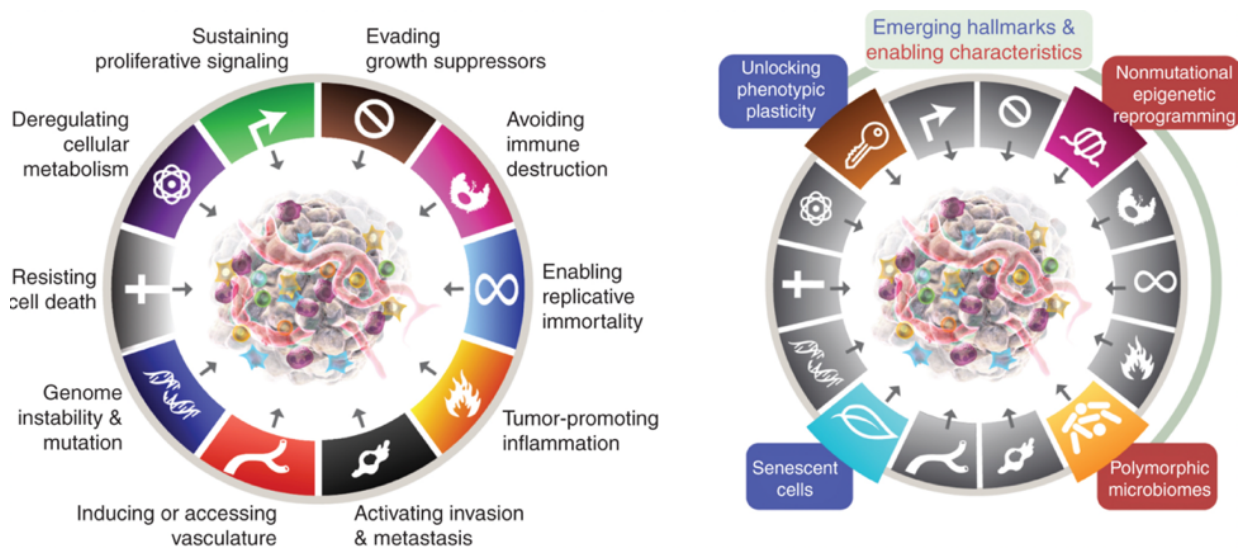


Figura 1: Marcadores de cancro. Esquematização à esquerda, das características das células carcinogénicas descobertas até ao ano de 2011. Por complemento, à direita encontram-se representadas as novas propriedades adquiridas pelas células, que auxiliam na progressão tumoral. À esquerda, encontram-se representadas as 10 marcas do cancro, até ao ano de 2011 e à direita as 4 novas características adicionadas no ano de 2022 (Adaptado de (Hanahan, 2022)).

No que concerne ao desenvolvimento de tumores, são inúmeros os fatores de risco que contribuem para a sua evolução. Nos fatores biológicos, inserem-se os compostos com características mutagénicas e carcinogénicas (Lewandowska et al., 2019). Da mesma forma, alguns compostos químicos como por exemplo as nitrosaminas são descritos como substâncias que possuem propriedades carcinogénicas (K. Li et al., 2021). Estas substâncias podem ser

facilmente encontradas em determinados produtos alimentares, tais como carnes de conserva ou peixe submetidos a processos de defumação, que por sua vez aumentam o risco de cancro do estômago. Pelo contrário, as frutas e vegetais revelam ser fatores protetores (González & Agudo, 2012). Pode-se ainda incluir os químicos utilizados recorrentemente na agricultura ou na indústria, que conduzem a alterações genéticas com elevada importância no momento de desenvolvimento do cancro (Lewandowska et al., 2019).

É de notar que uma dieta pouco cuidada, assim como a falta de prática de exercício físico também aumentam o risco de desenvolver cancro, visto aumentarem a circulação de estrogénios, androgénios e insulina (Vahid et al., 2023). Como fatores físicos, são apresentadas a exposição a campos eletromagnéticos assim como radiação ionizante e radiação ultravioleta (UV), em que as duas primeiras aumentam o risco do desenvolvimento de leucemia (Mohr et al., 2011). A radiação UV é responsável pelo desenvolvimento de cancros cutâneos (ex. melanomas), devido à acumulação de erros no ácido desoxirribonucleico (ADN) (Hyeraci et al., 2023). Para além de todos os fatores já mencionados, o fumo do tabaco exige destaque, visto possuir inúmeras substâncias que contribuem para a formação do cancro, particularmente do pulmão (Lewandowska et al., 2019).

O cancro provoca atualmente um elevado número de mortes a nível mundial (Siegel et al., 2023). Em 2020, segundo o observatório global do cancro (*Global Cancer Observatory, GLOBOCAN*), foram estimados 19,3 milhões de novos casos de cancro a nível global (figura 2), sendo que segundo as estimativas, este número poderá atingir os 30,2 milhões de casos em 2040. Como resultado da elevada taxa de incidência de cancro a nível global, nesse mesmo ano foram registadas 10 milhões de mortes. Numa perspetiva futura, estima-se que em 2040 o número de casos possa ultrapassar os 16 milhões de óbitos. Após a observação dos dados disponibilizados, é possível destacar os tumores que atualmente demonstram ser os mais frequentes. Assim, neste grande grupo podem-se inserir o cancro da mama (em mulheres), o cancro do pulmão, o cancro da próstata e o cancro do cólon (*CANCER TODAY Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020*, 2020).

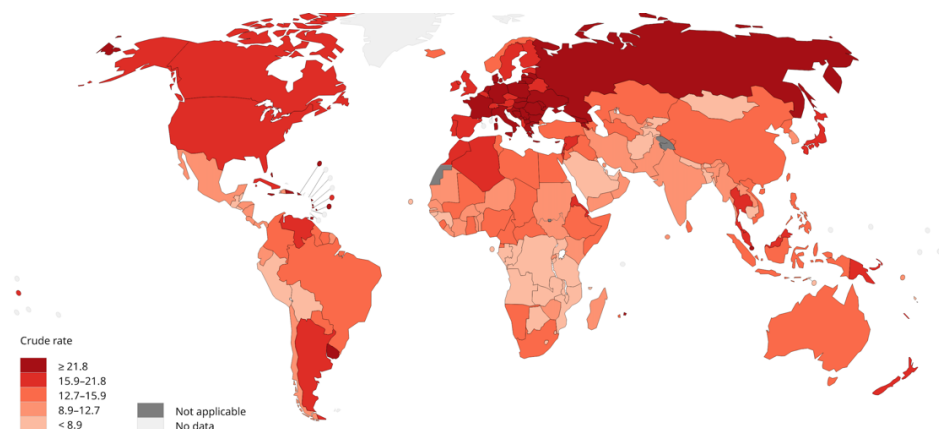


Figura 2: Taxa bruta de mortalidade, em cancro da mama a nível mundial. (Adaptado de: (CANCER TODAY Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020, 2020)).

Em Portugal, a incidência de casos de cancro em 2020 alcançava os 60 467 casos. Por intermédio da análise da figura 3, é possível identificar os tipos de cancro mais comuns a nível nacional, no ano de 2020. Deste modo, o cancro colorretal foi o cancro com maior frequência em Portugal, apresentando uma taxa de 17,4%. É possível ainda analisar a incidência dos restantes tumores, como é o caso do cancro da próstata, pulmão e estômago, com incidências igualmente significativas. No entanto, era o cancro da mama com 7041 casos, que ocupava o segundo lugar de número de casos de cancro em Portugal em 2020 (CANCER TODAY Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020, 2020).

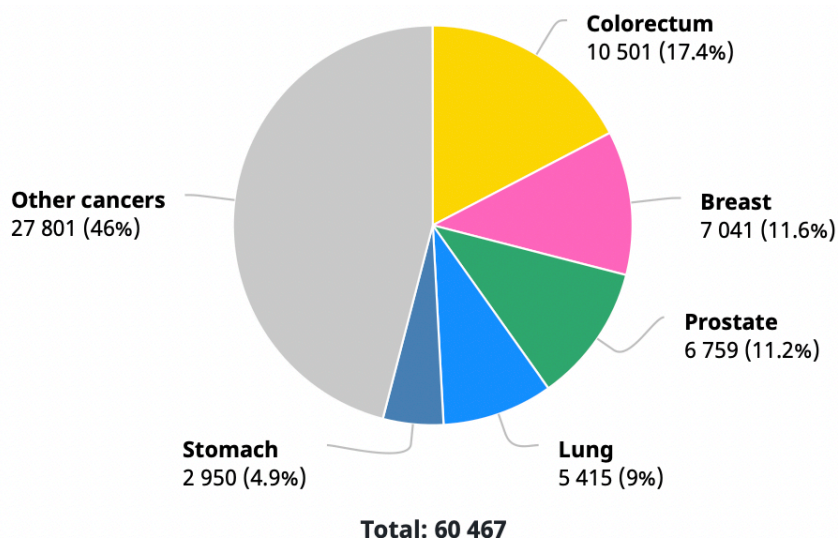


Figura 3: Representação do número de casos de diversos tipos de cancro, em Portugal. Encontram-se representados os seguintes tumores malignos: colorretal, mama, próstata, pulmão, gástrico e outros, observados em Portugal no ano de 2020. Dados referentes a ambos os sexos, de todas as idades. (Adaptado de: GLOBOCAN)).

1.2 CANCRO DA MAMA

Apesar das numerosas pesquisas relacionadas com o cancro da mama, o mecanismo exato que dá origem a este tipo de tumor ainda é uma incógnita. Este tipo de tumor maligno tem origem maioritariamente nas células do revestimento interno dos ductos ou lóbulos produtores de leite (Feng et al., 2018).

Com o intuito de explicar a iniciação e a respetiva progressão do cancro da mama, foram formuladas duas teorias representadas na figura 4: a teoria baseada nas células tronco indica que a origem da totalidade dos diversos subtipos de tumores deriva das mesmas células, ou seja, das células tronco (Sun et al., 2017); com outro ponto de vista, a teoria denominada estocástica, defende que cada subtipo de tumor tem uma origem diferente, isto é, têm início somente a partir de um tipo de célula e estas células podem ser células tronco, células progenitoras ou mesmo células diferenciadas (Idikio, 2011).

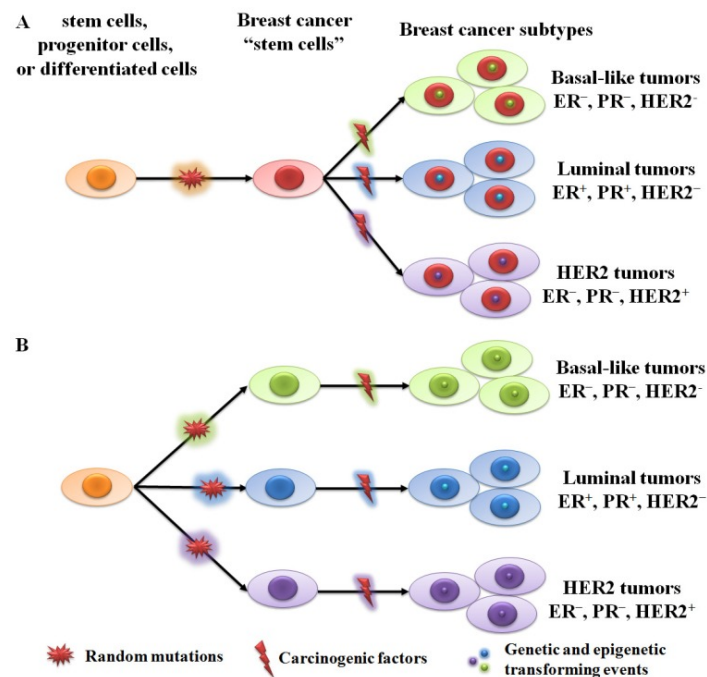


Figura 4: Representação das teorias que explicam a origem e a progressão do cancro da mama. Segundo a figura apresentada, a origem e a progressão do cancro depende do tipo de célula de origem (Adaptado de (SUN ET AL., 2017)).

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA

O cancro da mama continua nos dias de hoje a ser um dos cancros mais comum a nível global. Ademais, em mulheres, este tipo de cancro apresenta-se como um dos principais responsáveis pela mortalidade associada a cancro (Torre et al., 2017). Segundo os dados fornecidos pela GLOBOCAN, em 2020, foram identificados 2 261 419 casos de cancro mamário no mundo, ocupando assim o segundo lugar dos tumores com maior frequência. Em termos de mortalidade, nesse mesmo ano, registaram-se 684 996 mortes ocupando assim o sexto lugar dos tumores mais letais. No género feminino, o cancro da mama lidera o segundo lugar dos tumores mais frequentes, tendo um valor de 2 261 419 casos, no ano de 2020. No que concerne à mortalidade, foram registadas 684 996 mortes (International Agency for Research on Cancer, 2022). De acordo com estudos anteriores, a incidência do cancro nas mulheres acaba por ser mais elevada em países em desenvolvimento e mais reduzida em países desenvolvidos, muito devido aos programas de rastreio (Unger-Saldaña, 2014). É descrito ainda, que desde 2005 se tem notado uma diminuição da incidência em vários países pertencentes à Europa e Estados Unidos, estando esta hipoteticamente correlacionada com a diminuição do uso de terapia hormonal de substituição (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012). No entanto, se detetado precocemente, este tipo de cancro demonstra possuir um bom prognóstico, sendo que o aumento da taxa de sobrevivência que se tem verificado se deve a melhoria das técnicas de diagnóstico mas também ao desenvolvimento de novas terapias (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012; Wang, 2017). Ademais, conhecem-se hoje vários fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do cancro da mama, que sendo evitados, diminuem a probabilidade do mesmo (Youn & Han, 2020).

1.2.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

A marcha de diagnóstico do cancro da mama inclui várias etapas de avaliação até chegar à fase final de tratamento. São vários os dados clínicos e patológicos utilizados para diagnóstico, correta classificação do tipo de tumor mamário e prognóstico (Wang, 2017). Como forma de diagnóstico é importante o exame clínico para deteção de massas palpáveis e a utilização de técnicas de imagem. De entre as técnicas imageológicas, dá-se destaque à mamografia (Jafari et al., 2018). A mamografia tem elevada sensibilidade e especificidade e apresenta um custo reduzido, pelo que tem sido utilizada em programas de rastreio permitindo diagnóstico precoce

e a redução da mortalidade em pacientes com cancro da mama (Thomas et al., 2019; Wellings et al., 2016). A ecografia é outra das técnicas que poderá auxiliar, particularmente em casos de mamas densas ou em casos de doentes com idades inferiores aos 40 anos de idade (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012). Para além das técnicas anteriormente referidas, a ressonância magnética (IRM) é uma técnica também muito utilizada, principalmente em casos de maior risco e em idades mais jovens, visto ter em geral maior sensibilidade (Sudhir et al., 2021). No entanto, a sensibilidade da técnica é dependente das características do tumor e da densidade mamária. A combinação de duas técnicas acaba por trazer maiores benefícios para pacientes de alto risco (Wellings et al., 2016). A IRM é também utilizada no estadiamento, particularmente em pacientes sintomáticos para avaliar imagens cerebrais suspeitas, de modo a detetar possíveis metástases cerebrais (Gennari et al., 2021).

Quando é identificada uma lesão suspeita, quer através do exame clínico quer através da realização de um exame de imagem, deve ser realizada uma biópsia, habitualmente com controlo imageológico (Park & Hong, 2014). Esta biópsia vai permitir um diagnóstico, bem como a correta classificação do tumor e a avaliação de fatores preditivos de resposta à terapêutica (Freitas et al., 2022).

Após o diagnóstico e correta caracterização da neoplasia em biópsia cada caso deve ser discutido numa reunião multidisciplinar para decidir a terapêutica (De Rose et al., 2022), que poderá ser cirúrgica (localizada) ou sistémica. Na sequência da terapêutica cirúrgica, obtém-se uma peça operatória que é enviada para a unidade de anatomia patológica. Aqui a peça operatória é analisada macroscopicamente, e são selecionados os fragmentos para exame histológico, que são processados e incluídos em blocos de parafina, a partir dos quais se procede à execução de lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE) que é complementada com a execução de estudos imunohistoquímicos (Leong & Zhuang, 2011). As amostras anteriormente referidas são então analisadas por anatomopatologistas. De acordo com a observação do anatomopatologista é realizado um relatório anatomopatológico que inclui numerosos dados acerca do tumor (dimensão, existência de invasões vasculares, presença de metástases ganglionares, avaliação da margem cirúrgica). Este relatório deverá ser discutido novamente em reunião multidisciplinar para posterior orientação terapêutica, que poderá incluir eventualmente a terapêutica sistémica mais eficaz de acordo com o tipo de tumor identificado (De Rose et al., 2022; Pruneri et al., 2023).

1.2.3 ETIOPATOGENIA

São diversos os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do cancro da mama. Destaca-se o facto de mulheres nulíparas ou mulheres em que as primeiras gestações ocorreram em idades mais avançadas, estarem mais suscetíveis a desenvolverem cancro (Dawson & Thompson, 1990; Fioretti et al., 1999). Outro dos fatores associados ao cancro da mama é a prática de amamentar: mulheres que amamentaram têm menor probabilidade de desenvolver cancro da mama, comparativamente a mulheres que nunca amamentaram (Dawson & Thompson, 1990).

A predisposição genética tem um papel muito importante. No caso de cancro da mama hereditário, há determinados aspetos a ter em consideração. Mulheres com descendência judaica, história familiar de cancro da mama antes dos 50 anos de idade e por exemplo, ter idade igual ou inferior a 40 anos de idade, são alguns desses fatores (Brewer et al., 2017). É de extrema importância avaliar o risco de desenvolver cancro da mama nestes casos, e há diversos parâmetros que devem ser avaliados. O tamanho do tumor, assim como a idade dos familiares que desenvolveram este tipo de tumor, aparentam ser alguns dos parâmetros importantes para calcular o risco de desenvolver cancro da mama hereditário (Culver et al., 2009). Nestes casos, a realização de testes genéticos que permitem avaliar a suscetibilidade de desenvolver cancro da mama revela-se indispensável. Este tipo de avaliação possibilita um diagnóstico mais preciso e posteriormente uma terapia mais adequada (Pujol et al., 2021). Cerca de 10% de mulheres que desenvolvem cancro da mama aos 30 anos de idade, têm mutação nos genes *BRCA1* (*Breast cancer gene*) e *BRCA2*. Nestes casos de cancro hereditário, a idade observada foi inferior aos 35 anos, enquanto que no caso de cancros esporádicos a idade era superior aos 46 anos. Em concordância, a mutação no gene *BRCA1* demonstra ser mais prevalente em mulheres com idades mais jovens, do que em mulheres com idades mais avançadas (Antoniou et al., 2004).

Seguir um estilo de vida saudável, na qual a dieta rica em frutas e vegetais se insere e deve ser predominante, diminuir o consumo de álcool e gorduras, e evitar a obesidade e alterações de peso, são alguns aspetos que parecem diminuir o risco de desenvolver cancro da mama (Tice & Kerlikowske, 2009). No que concerne ao tecido adiposo e ao risco de desenvolver cancro da mama, esta relação está dependente do estado menopáusico. Assim, os valores de adiposidade, estabelecem uma relação inversa com o risco de desenvolver cancro da mama, em mulheres em períodos pré-menopáusicos. Este achado, não se verifica em mulheres pós-menopáusicas, visto

que o aumento de adiposidade aumenta a suscetibilidade de desenvolver cancro da mama (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012). De forma preventiva, recomenda-se ainda a prática de exercício físico de uma forma regular (Tice & Kerlikowske, 2009). É de salientar que foi estabelecida uma relação entre as concentrações de estrogénio e progesterona presentes na corrente sanguínea em mulheres pós-menopáusicas e o eventual risco de desenvolver cancro da mama. Por outro lado, mulheres que utilizaram métodos contraceptivos orais, aumentaram o risco de vir a desenvolver cancro da mama, comparativamente a mulheres que nunca usaram este tipo de método contraceptivo (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012). Este fator de risco revela ser de extrema importância, devido à classificação do estrogénio e progesterona como potenciais carcinogénicos da classe 1, pela agência internacional de pesquisa do cancro, (*International Agency for Research on Cancer*, IARC).

A origem do cancro da mama, quer seja por influência de fatores de risco, quer seja por fatores hereditários, vai determinar subtipos diferentes de tumores e para classificá-los de forma correta sentiu-se a necessidade de criar parâmetros de avaliação no que concerne à classificação morfológica, bem como molecular (Rakha et al., 2010).

1.2.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR

Atualmente, é possível mapear a informação genética através de diversas técnicas, permitindo assim obter um melhor conhecimento do padrão molecular de cada tumor. Deste modo, torna-se possível realizar uma classificação do tipo de cancro com mais especificidade e orientar o paciente para a devida terapia (Allison et al., 2020). A diversidade fenotípica do cancro da mama encontra-se relacionada à diversidade dos padrões de expressão génica. Assim, recorrendo às análises do perfil de expressão genética é possível dividir o cancro da mama em vários tipos. A expressão dos recetores hormonais (RH) e, ou a origem das células epiteliais, são fatores a considerar nessa identificação (Kohler et al., 2015). Em 2000, através da análise genética, a definição da classificação intrínseca de Perou e Sorlie, permitiu distinguir quatro subtipos de cancro da mama, sendo eles: RE⁺ (Recetor de estrogénio) ou epitelial luminal, *basal-like*, HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*,) e *normal-breast-like* (Perou et al., 2000). No momento presente, encontra-se em vigor uma classificação mais específica, em que se classifica o cancro em 5 diferentes subtipos de acordo com as suas características moleculares e histológicas (Sharma et al., 2010). Desta forma, na presença de tumores que

expressam RE e/ou recetor de progesterona (RP), é possível classificá-los como tumores da mama positivos para RH. De uma forma mais pormenorizada, o subtipo luminal A expressa o RE e/ou RP, no entanto não expressa *HER2* e possui uma baixa taxa de proliferação celular (que é avaliada habitualmente através da expressão da proteína Ki-67). Por outro lado, o subtipo luminal B expressa RE e/ou RP e tal como o luminal A, não expressa *HER2*, mas possui uma alta taxa de proliferação celular (Harbeck & Gnant, 2017). Já nos tumores que não expressam RE, nem RP ou mesmo *HER2*, são classificados como tumores da triplo negativo (*triple-negative breast cancer*, TNC) (Kurbel et al., 2017, p. 67). Apesar de muitos autores igualarem o tumor de tipo basal ao tumor TNC, existem opiniões distintas que referem que os tumores anteriormente referidos diferem em termos biológicos. Embora existam semelhanças entre os dois tumores, o tumor de subtipo basal apresenta diferenças no que respeita a expressão de alguns marcadores (Alluri & Newman, 2014). Assim, este subtipo de tumor representa 12 a 25% da totalidade de tumores malignos da mama, sendo um dos tumores com maior agressividade (Zhang et al., 2015). Finalmente, cerca de 15 a 20% dos tumores malignos da mama, revelam expressões elevadas de *HER2*, recebendo assim uma denominação de *HER2+* (Howlader et al., 2014). Neste subtipo de tumores bastante agressivo é bastante frequente as pacientes desenvolverem metástases cerebrais, o que conduz a uma reduzida sobrevida (Leone & Lin, 2019). O subtipo luminal (RH⁺), é o mais frequente de entre todos os subtipos de cancro da mama, com uma taxa de incidência de cerca de 80%. Destes, o luminal A demonstra ter a maior predominância e o subtipo luminal B revela ter uma maior agressividade (El Ghamrasni et al., 2022).

1.2.4.1 RH

Relativamente à expressão do RE, pacientes com idades mais jovens, desenvolvem mais frequentemente cancros RE negativos, enquanto pacientes mais velhas desenvolvem mais frequentemente tumores que expressam RE. No que concerne à expressão de RP, a relação estabelecida anteriormente para RE não é neste caso aplicável, pois esta mantém-se estável em todas as idades de um modo geral (Yip & Rhodes, 2014).

Os RH têm um papel fundamental em relação ao risco de cancro esporádico da mama. As hormonas encontram-se ligadas a diversos processos, quer seja durante a puberdade no desenvolvimento normal do organismo, quer seja no desenvolvimento de determinados órgãos em específico, mais concretamente a mama (Ritte et al., 2013). Em ciclos menstruais e durante

a gestação são fundamentais, permitindo a regulação do funcionamento do organismo e desenvolvimento do feto. Durante a fase do ciclo menstrual, a proliferação celular só é possível devido à regulação das hormonas estrogénio e progesterona. Deste modo, caso haja desequilíbrio destas hormonas e se ocorrer algum erro no sistema de reparação, este pode proporcionar mutações que permitirão a formação de células malignas (Harbeck et al., 2019). Ademais, o estrogénio possui a capacidade de se ligar aos RE e como muitos outros recetores, este acaba por ser um fator de transcrição que permanece ativo após a ligação de um ligando. Desta forma, o estrogénio contribui para o crescimento das células malignas que têm estes recetores, promovendo o crescimento do cancro da mama RE+ (Levin & Pietras, 2008). Em referência ao RP, este faz parte do numeroso grupo dos recetores de esteróides, que tal como RE, para estar no seu modo ativo necessita de um ligando, neste caso a progesterona. Assim, quando ligado à progesterona, o RP adquire a capacidade de regular a expressão genética, envolvida em várias fases de proliferação de tecidos e dos tumores (Proietti et al., 2018). De forma generalizada, a avaliação do estado dos RH é fundamental para o prognóstico mas também orientação terapêutica (Schnitt, 2010).

1.2.4.2 OUTROS GENES IMPORTANTES

De acordo com a análise molecular de diversos cancros da mama, foram identificados os genes mutados e, ou amplificados com maior frequência. Neste grupo, é assim possível inserir a proteína tumoral 53 (*tumor protein*, TP53), descrita na literatura com uma frequência de 41% e a subunidade catalítica A do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*, PIK3CA) com uma frequência de 30%. Com frequências mais reduzidas, inserem-se o gene MYC em 20% dos tumores, em 16% dos tumores a fosfatase homóloga à tensina (*phosphatase and tensin homolog*, PTEN) e a ciclina D1 (*Cyclin D1*, CCND1). É possível ainda acrescentar a este grupo o HER2 com uma frequência de 13%, seguido do recetor 1 do fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor receptor 1*, FGFR1) em 11% dos tumores e por fim, a proteína de ligação ao GATA3, (*GATA binding protein 3*, GATA3) com uma percentagem de 10% (Nik-Zainal et al., 2016). Os genes anteriormente referidos, desempenham funções de elevada importância no ciclo celular, pois codificam genes moduladores que podem ser reprimidos ou ativados. Dos genes supramencionados, destaca-se o PIK3CA com uma frequência de mutação de 49% em tumores luminais A. De outra forma, o TP53 demonstra ser o líder das mutações em 84% dos

tumores basais (De Mattos-Arruda, 2020; Harbeck et al., 2019). Para além dos genes supramencionados, deve-se ainda incluir o gene do cancro da mama *BRCA* (Huang et al., 2021). Apresentado como gene supressor de tumor, o *BRCA* é codificante para proteínas de elevada importância na reparação de quebras de ADN. Caso estes erros não sejam devidamente reparados, existe o risco de ocorrer perda da estabilidade genómica e consequentemente, desenvolvimento de cancro (Tan et al., 2020). No cancro da mama hereditário os genes *BRCA1* e *BRCA2* são os mais frequentemente mutados, sendo que esta mutação pode ter origem esporádica ou hereditária. Tanto nas mutações hereditárias, como nas mutações esporádicas, as mutações nos genes da classe *BRCA* aumentam devido à elevada taxa de proliferação provocada pelos estrogénios, (Winters et al., 2017). Para além da análise do gene *BRCA*, tem-se vindo a avaliar o gene *PALB2* (*Partner and localizer of BRCA2- PALB2*), sendo referido como um gene importante de predisposição (*Breast Tumours, WHO Classification of Tumours*, 2019). O gene *PALB2* é descrito como parceiro e localizador do gene *BRCA2*, e por esse motivo, caso ocorram mutações de perda de função da linha germinal, o *PALB2*, aumenta a predisposição para desenvolver cancro da mama hereditário (Antoniou et al., 2014). Os genes no cancro da mama podem ser hipometilados de uma forma geral, o que por sua vez pode promover instabilidade cromossómica. A hipermetilação focal também é possível e pode proporcionar instabilidade genética proveniente do silenciamento dos genes reparadores de ADN (Harbeck et al., 2019).

1.2.4.3 *HER2*

O *HER2* define-se como um oncogene com bastante relevância, localizado no cromossoma 17 (17q12), sendo este um recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (Sun et al., 2017). A família do *HER2* é composta por vários genes, tendo estes um papel fundamental na proliferação, sobrevivência celular, ou até mesmo no processo de diferenciação. No cancro da mama, a elevada expressão ou a amplificação deste recetor contribui para uma maior agressividade em termos clínicos (King et al., 1985). Esta amplificação poderá conduzir a uma sobre expressão da proteína a nível da membrana da célula, possibilitando o aumento da proliferação, mobilidade e angiogénese do tumor (Tan et al., 2020). Em casos de carcinoma ductal *in situ* e em estádios mais elevados, a amplificação ou a expressão aumentada dos recetores do *HER2* encontra-se em 60% dos tumores. Por outro lado, nos carcinomas invasivos sem tipo especial ((NST, *no special type*) a frequência é de 22,2% (Latta et al., 2002). O estado

dos recetores do *HER2* deve ser obrigatoriamente avaliado em todos os casos, porque permite decidir terapêutica e ter uma noção de prognóstico no cancro da mama (Rakha & Green, 2017).

1.2.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

Dependendo da célula de origem do cancro, bem como da sua análise histológica e molecular, é possível classificá-lo em diferentes tipos e subtipos, tabela 1. Com o intuito de classificar o tumor de forma mais específica, a anatomia patológica apresenta um papel fundamental no diagnóstico (Tan et al., 2020).

Um cancro da mama que se encontre restrito aos ductos e que não invada o estroma (tecido composto por gordura e por tecido conjuntivo), é classificado como um cancro não invasivo, sendo utilizado o termo “*in situ*” para descrever este tipo de tumor (Badve & Gökmen-Polar, 2019). O carcinoma ductal *in situ* é o mais frequente de entre os tipos de cancro da mama não invasivos, apresentando uma frequência de 90% (Sharma et al., 2010). Apesar da sua ausência de capacidade de invasão, as células epiteliais dos ductos deste tumor proliferam de forma anormal e desta forma, acabam por distorcer a arquitetura ductal normal da mama (Fu et al., 2018). Este tipo de cancro da mama é heterogéneo no que diz respeito aos parâmetros clínicos, radiológicos e histológicos (Tan et al., 2020). Esta lesão é considerada uma lesão pré-maligna pelo que se não for tratado vai evoluir para a variante invasiva (*Types of Cancer*, 2022). Este tipo de cancro é frequentemente identificado em mamografias, onde se podem identificar habitualmente calcificações, irregularidades na estrutura arquitetural, ou até mesmo assimetrias na densidade mamária (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012).

Por outro lado, o carcinoma lobular *in situ* é menos frequente, comparativamente ao carcinoma ductal *in situ* (Sharma et al., 2010). Contrariamente ao carcinoma ductal *in situ*, o carcinoma lobular *in situ* não possui a capacidade de alterar a arquitetura ductal normal e apresenta-se frequentemente sob a forma bilateral (Harbeck et al., 2019). Este subtipo de cancro encontra-se relacionado com a proliferação dos lóbulos terminais, em que posteriormente as células neoplásicas permeiam a maioria dos ácinos (Wen & Brogi, 2018). É mais frequente em mulheres com idades iguais ou superiores aos 50 anos de idade (C. I. Li et al., 2005; Weigelt et al., 2010) e são considerados as lesões precursoras dos carcinomas lobulares invasivos (Thomas et al., 2019, p. 20).

Entre os subtipos de cancro da mama invasivo, o mais comum é o atualmente denominado “sem tipo especial” (NST) que era antes chamado de ductal invasivo, apresentando uma frequência entre os 50 a 80%. Tem origem nos ductos da mama, em lesões precursoras e tem a capacidade de invadir o estroma adiposo da mama e eventual invasão de vasos linfáticos e sanguíneos, (Sharma et al., 2010; Weigelt et al., 2010). O carcinoma lobular invasivo é o segundo cancro mais comum no conjunto de tumores invasivos (Thomas et al., 2019) representando 10% de todos os tumores da mama (Cocquyt & Belle, 2005).

Em geral, as neoplasias lobulares invasivas caracterizam-se pela sua má delimitação. Com estas características, torna-se mais difícil o seu diagnóstico e caracterização, muito devido ao seu crescimento infiltrativo. Além disso, este tipo de carcinoma é frequentemente caracterizado pela disposição das células cancerígenas em fileira, conduzindo à invasão do estroma (Limaem et al., 2023). Proveniente de lesões frequentemente denominadas de hiperplasia lobular atípica e carcinoma lobular *in situ*, a sua progressão poderá ser conduzida por diversas e distintas alterações em oncogenes (Lopez-Garcia et al., 2010). Neste tipo de tumor maligno, a proliferação de células cancerígenas vai ocupar as estruturas lobulares dos ductos terminais. De entre as várias classificações deste tipo de tumor, enumeram-se 3 subtipos: o denominado tipo clássico, o pleomórfico e ainda o designado tubulo-lobular (McCart Reed et al., 2021). Enquanto que o tipo pleomórfico é definido por células cancerígenas maiores, constituídas por núcleos de grandes dimensões, com marcada atipia e citoplasma vasto, o tipo tubulo-lobular é caracterizado pela sua capacidade de formar pequenos tubulos que se misturam com áreas com padrão clássico, formando fileiras e com crescimento infiltrativo (Shamir et al., 2019).

Na classe de carcinomas menos frequentes, inclui-se o carcinoma medular, que apresenta na literatura uma frequência de 5% (Sharma et al., 2010), o carcinoma colóide ou mucinoso, em que a sua origem provém de células cancerígenas que têm a capacidade de produzir muco (Chtourou et al., 2009) e por fim, o carcinoma tubular, que se caracteriza por ter uma boa diferenciação e como o nome indica, ter uma arquitetura constituída por estruturas tubulares. Tem uma frequência bastante reduzida, com uma percentagem de 4%, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) do ano de 2012 (*Breast Tumours, WHO Classification of Tumours*, 2019; Cabral et al., 2003; Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012).

Tabela 1: Tabela OMS. Representação da classificação dos diversos tipos de tumores mamários, segundo a OMS (adaptado de (Breast Tumours, WHO Classification of Tumours, 2019)).

Benign epithelial proliferations and precursors		Invasive breast carcinoma	
	Usual ductal hyperplasia	8500/3	Infiltrating duct carcinoma NOS
	Columnar cell lesions, including flat epithelial atypia	8290/3	Oncocytic carcinoma
	Atypical ductal hyperplasia	8314/3	Lipid-rich carcinoma
Adenosis and benign sclerosing lesions		8315/3	Glycogen-rich carcinoma
	Sclerosing adenosis	8410/3	Sebaceous carcinoma
8401/0	Apocrine adenoma	8520/3	Lobular carcinoma NOS
	Microglandular adenosis	8211/3	Tubular carcinoma
	Radial scar / complex sclerosing lesion	8201/3	Cribiform carcinoma NOS
Adenomas		8480/3	Mucinous adenocarcinoma
8211/0	Tubular adenoma NOS	8470/3	Mucinous cystadenocarcinoma NOS
8204/0	Lactating adenoma	8507/3	Invasive micropapillary carcinoma of breast
8503/0	Duct adenoma NOS	8401/3	Apocrine adenocarcinoma
		8575/3	Metaplastic carcinoma NOS
Epithelial-myoepithelial tumours		Rare and salivary gland-type tumours	
8940/0	Pleomorphic adenoma	8550/3	Acinar cell carcinoma
8983/0	Adenomyoepithelioma NOS	8200/3	Adenoid cystic carcinoma
8983/3	Adenomyoepithelioma with carcinoma		Classic adenoid cystic carcinoma
8562/3	Epithelial-myoepithelial carcinoma		Solid-basaloid adenoid cystic carcinoma
			Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation
Papillary neoplasms		8502/3	Secretory carcinoma
8503/0	Intraductal papilloma	8430/3	Mucoepidermoid carcinoma
8503/2	Ductal carcinoma in situ, papillary	8525/3	Polymorphous adenocarcinoma
8504/2	Encapsulated papillary carcinoma	8509/3	Tall cell carcinoma with reversed polarity
8504/3	Encapsulated papillary carcinoma with invasion	Neuroendocrine neoplasms	
8509/2	Solid papillary carcinoma in situ	8240/3	Neuroendocrine tumour NOS
8509/3	Solid papillary carcinoma with invasion	8240/3	Neuroendocrine tumour, grade 1
8503/3	Intraductal papillary adenocarcinoma with invasion	8249/3	Neuroendocrine tumour, grade 2
		8246/3	Neuroendocrine carcinoma NOS
Non-invasive lobular neoplasia		8041/3	Neuroendocrine carcinoma, small cell
	Atypical lobular hyperplasia	8013/3	Neuroendocrine carcinoma, large cell
8520/2	Lobular carcinoma in situ NOS		
	Classic lobular carcinoma in situ		
	Florid lobular carcinoma in situ		
8519/2	Lobular carcinoma in situ, pleomorphic		
Ductal carcinoma in situ (DCIS)			
8500/2	Intraductal carcinoma, non-infiltrating, NOS		
	DCIS of low nuclear grade		
	DCIS of intermediate nuclear grade		
	DCIS of high nuclear grade		

These morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology, third edition, second revision (ICD-O-3.2) [921]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; /3 for malignant tumours, primary site; and /6 for malignant tumours, metastatic site. Behaviour code /6 is not generally used by cancer registries.

This classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions.

1.2.5.1 Ki-67

A descoberta do Ki-67, foi realizada em 1991 por Gerdes *et al.*, sendo este classificado como uma proteína não histona (Gerdes *et al.*, 1991). Assim, recebe a caracterização de proteína que se encontra relacionada com as primeiras etapas da síntese do ácido ribonucleico ribossomal ARN, sendo codificada pelo gene *MKI67*. A sua função ainda não se encontra bem descrita, mas pensa-se que esta esteja relacionada com a divisão celular e com a síntese de ARN

ribossomal (Penault-Llorca & Radosevic-Robin, 2017). Estudos iniciais, permitiram verificar que o Ki-67, não se encontra presente em células quiescentes. Por outro lado, esta proteína encontra-se expressa em tecidos que estejam em processo de proliferação (Urruticoechea et al., 2005). Apesar da difícil identificação das células em fase de G0, contrariamente a outros biomarcadores de proliferação, o Ki-67 demonstrou capacidade em determinar células em estado proliferativo (Urruticoechea et al., 2005).

No cancro da mama, o Ki-67 permite avaliar a velocidade de proliferação dos tumores pelo que é identificado como um bom biomarcador (Penault-Llorca & Radosevic-Robin, 2017). Deste modo, espera-se que pacientes que possuam uma menor expressão de Ki-67, considerada abaixo dos 15%, apresentem uma melhor sobrevida. Este biomarcador é frequentemente utilizado como meio de avaliação da resistência à quimioterapia ou terapia de origem endócrina, ou seja, apresenta também um papel fundamental na análise preditiva da eficácia de tratamentos. Por outro lado, Reiki Nishimura *et al.* referiram que valores de expressão de Ki-67 mais elevados, se encontram relacionados a tumores com maiores dimensões e em pacientes mais jovens. Para além disso, em tumores em que não exista a expressão do RE e RP, a expressão deste biomarcador é habitualmente mais elevada (Soliman NA & Yussif SM, sem data). No trabalho de Inwald e colaboradores foi estabelecida uma relação entre a expressão da proteína Ki-67 e o nível de expressão dos RH. Desta forma, a média observada foi similar em tumores RE positivos e RP positivos, sendo esta de 17%. Já em tumores que não expressavam recetores, a média de expressão da proteína foi de 42% para RE negativo e ligeiramente inferior em neoplasias RP negativas, 34% (Inwald et al., 2013). Em tumores que apresentem uma elevada expressão do *p53*, assim como *HER2*, a expressão do Ki-67 aparece igualmente elevada (Nishimura et al., 2010).

O Ki-67, encontra-se relacionado com diversos parâmetros clínicos. A fim de estudar a relação desta proteína com o estado dos gânglios linfáticos, foram realizadas diversas pesquisas. Assim, concluiu-se que tumores que não tinham metastização em gânglios, a média da expressão do Ki-67 era de 19%. Contrariamente em tumores com N3 (presença de metástases em gânglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterais (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012), notou-se uma maior expressão da proteína, sendo a média de 24%. O tipo histológico foi avaliado de igual modo, permitindo assumir que a expressão do Ki-67 se encontra mais elevada em tumores ductais invasivos (22%), comparativamente a tumores de

tipo lobular, com uma média de expressão de 13% (Inwald et al., 2013). Relativamente à idade de pacientes, não foi demonstrada qualquer distinção entre tumores com valores reduzidos ou elevados, em relação à expressão do Ki-67 (Tagliafico et al., 2019).

Após diversas pesquisas, o “ponto de corte” do Ki-67 continua a ser incerto. Em diversos estudos são apresentados valores distintos para o ponto de corte do biomarcador, com ausência de consenso (Cheang et al., 2009). Um estudo com o objetivo de avaliar o ponto de corte para o Ki-67, englobando a análise de 4329 pacientes, confirmou o valor da proteína como um fator preditivo no cancro da mama. Os valores do Ki-67 variaram entre 1 a 99%, sendo a média deste de 20,5%. O valor desta proteína como fator preditivo para a sobrevivência global foi de cerca de 20%, contudo o valor de prognóstico do Ki-67 teve significância apenas para tumores de subtipo luminal. Em suma, os autores conformaram o valor relevante do Ki-67, como biomarcador na clínica (Tashima et al., 2015). Uma outra avaliação de 64 196 pacientes, demonstrou que o ponto de corte de 10% acarretava um risco de morte de 50% especialmente em casos de tumor RE positivos. Foi ainda salientada a importância deste biomarcador, que é fundamental para diferenciar um tumor luminal de tipo A, do tipo luminal B. Além disso, através desta extensa pesquisa foi possível diferenciar doentes de alto risco e de baixo risco (Petrelli et al., 2015). Existem outras evidências que demonstram a relevância da avaliação da atividade proliferativa em tumores, sendo assim possível distinguir tumores luminais de tipo A e B, perante tumores RE positivos, como já referido anteriormente. Um valor de 13,25% de ponto de corte foi determinado numa pesquisa envolvendo 144 tumores da mama, de tipo luminal A e B, permitindo assim a distinção de tumores luminais B (Cheang et al., 2009). Desta forma esta avaliação tem um valor indiscutível na hora de avaliar o prognóstico do cancro da mama (Cheang et al., 2009).

Foi ainda estabelecida uma ligação entre a expressão da proteína e o possível risco de morte ou recorrência em tumores da mama (De Azambuja et al., 2007). Vários autores apelam à realização de novos estudos, de forma a clarificar os dados obtidos pela avaliação do Ki-67 (Stuart-Harris et al., 2008) e clarificar qual o ponto de corte ideal. O índice de proliferação avaliado com Ki-67 também permite decidir terapêutica e ter uma noção de prognóstico no cancro da mama (Rakha & Green, 2017).

Das inúmeras vantagens supramencionadas do Ki-67 como bom biomarcador de proliferação, acrescenta-se a facilidade em realizar a técnica, sendo esta bastante acessível e com razoável reprodutibilidade (Urruticoechea et al., 2005). A análise da expressão do Ki-67, passa pela contabilização de células tumorais marcadas após coloração usando técnicas da imunohistoquímica, mas esta contabilização pode ser feita de duas maneiras diferentes, “visual” e “automática”. Assim, no estudo publicado por Mohamed e colaboradores e com o objetivo de avaliar a validade das 2 técnicas comparou-se o sistema de contabilização da atividade proliferativa do biomarcador das duas formas referidas, a forma automatizada e a forma visual. Sendo possível realizar esta avaliação através de duas técnicas distintas, sentiu-se a necessidade de comparar os dois métodos de modo a estabelecer a precisão de ambas. Para isso, foi utilizado um anticorpo anti- Ki-67 e procedeu-se à marcação dos cortes histológicos. Posteriormente, as lâminas histológicas foram digitalizadas, e procedeu-se à contabilização de forma automática das células, através de um programa específico, (figura 5) (Konsti et al., 2011; Mohammed et al., 2012). Por outro lado, a contabilização das células de forma visual, foi realizada no monitor de um computador. Após estabelecidas as comparações, os autores encontraram uma correlação forte entre os dois métodos de avaliação. Embora os dois métodos tenham obtido resultados similares, a análise visual foi relacionada à sobrevida de pacientes com cancro da mama do tipo ductal. Contrariamente, a técnica automática não obteve valores tão elevados no que concerne à correlação com a sobrevida dos pacientes, quando se comparou com a técnica visual. Assim, é recomendado algum cuidado na substituição do método visual pelo método automatizado, (Mohammed et al., 2012).

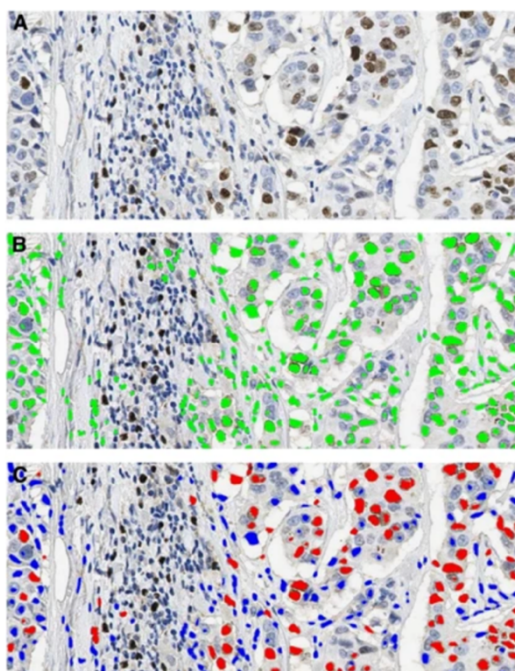


Figura 5: Representação da contagem de células que expressem Ki-67. Em A, representação do controlo positivo numa ampliação de 20x. A coloração verde é referente aos núcleos, estando esta representada em B. Por fim, em C esquematiza-se a classificação do biomarcador em cada núcleo, estando a coloração vermelha associada a uma pontuação positiva do Ki-67, contrariamente à coloração azul (pontuação negativa). (Adaptado de (Mohammed et al., 2012)).

1.2.6 GRAU DE DIFERENCIAÇÃO

Os tumores invasivos devem ainda ser classificados de acordo com o grau de diferenciação. Deve ser avaliada a capacidade de formar estruturas tubulares/glândulas, o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses. Após pesquisa e análise dos parâmetros anteriormente referidos, é possível atribuir um grau numa escala de 1 a 3 - Grau de Nottingham (Elston & Ellis, 1991). Este grau é atribuído de acordo com a soma de todas as pontuações referentes aos parâmetros supramencionados, em que o grau 1 varia entre uma pontuação de 3 a 5 pontos, o grau 2 de 6 a 7 pontos e por fim, o grau 3 com uma pontuação a variar entre os 8 e 9 pontos (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012).

Para além do grau do tumor, é ainda fundamental avaliar o seu estágio, onde a extensão do tumor, a existência de metástases nos gânglios linfáticos regionais, ou a possível metastização à distância são também alvos de apreciação (Amin, American Joint Committee on Cancer, et al., 2017). Com efeito, a partir da identificação dos dados anteriormente referidos, foi possível

criar uma escala de estádios - TNM - de 0, I, II, III e IV (Amin, American Joint Committee on Cancer, et al., 2017; Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012). A classificação TNM desenvolvida pelo *American Joint Committee on Cancer-AJCC* tem vindo a acrescentar um valor imensurável na prática clínica, desde a sua criação em 1959 (Zhu & Doğan, 2021). No entanto, a primeira edição do manual da AJCC foi publicada somente em 1977, possibilitando a sua aplicação na prática clínica (Amin, Greene, et al., 2017). Após aplicação da 8ª edição, publicada em 2016, foi colocado em prática a integração de biomarcadores de prognóstico, sendo estes validados pelo tamanho do tumor (T), metastização dos nódulos linfáticos (N) e por fim, a avaliação de metastização à distância (M) (Zhu & Doğan, 2021). Desta forma, é assim possível estabelecer um prognóstico e orientar a terapia e o controlo do estado do tumor (Amin, American Joint Committee on Cancer, et al., 2017; Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012).

1.3 INFILTRAÇÃO DE LINFÓCITOS

Atualmente, existem diversos indicadores que associam a inflamação ao cancro. Na literatura, sublinha-se o facto de doenças de foro inflamatório terem a possibilidade de contribuir para o desenvolvimento de vários tipos de cancro, (cancro colorretal, cancro da bexiga, cancro gástrico, entre muitos outros) (Balkwill & Mantovani, 2001; Mantovani et al., 2008). Em tumores em que se verifique a existência da componente inflamatória são ativados diversos fatores de modo a inibirem a imunidade anti-tumoral. No caso de carcinomas *in situ* e invasivos, a inflamação ocorre de forma distinta. No primeiro caso, a via extrínseca de proveniência inflamatória e a via intrínseca de origem oncogénica iniciam o processo de proteínas que participam na regulação da resposta imunológica, mais concretamente citocinas e quimiocinas (Allavena et al., 2008; Mantovani et al., 2008). Após este acontecimento, há uma sucessão de várias etapas, tais como a angiogénese e o aparecimento de células associadas à promoção do tumor. Já no caso de tumores de carácter invasivo, as quimiocinas e as citocinas contribuem para a formação de células promotoras do tumor. Ademais, contribuem do mesmo modo para a iniciação de angiogénese e conseqüentemente uma nova modelação do tecido, como se pode verificar na imagem 6 A) e 6 B) (Mantovani et al., 2008).

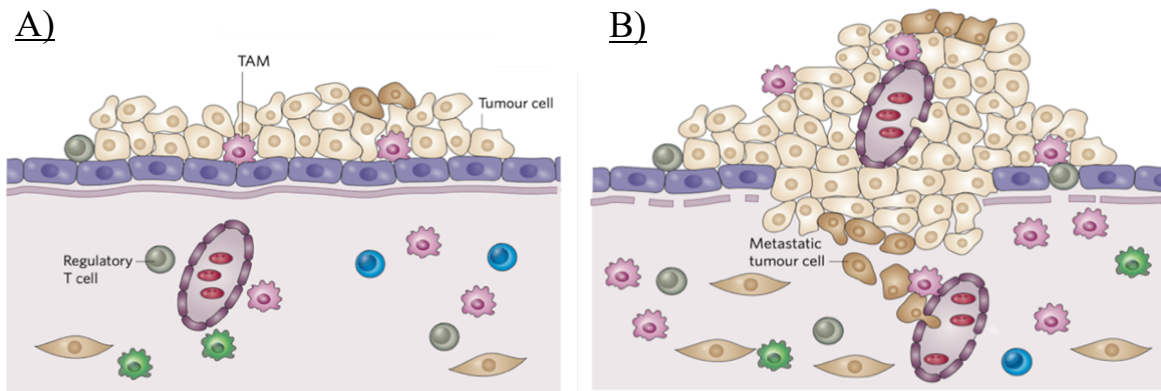


Figura 6: Inflamação em carcinoma in situ e em carcinoma invasivo. Em A), encontra-se representada a inflamação em situação de carcinoma in situ, em que as células a verde correspondem a macrófagos, a azul as células T, a rosa os macrófagos associados ao tumor e por fim, a castanho os fibroblastos. Em B), esquematiza-se a inflamação em contexto de invasão com a criação de um novo vaso vascular, envolvido pelas células cancerosas (adaptado de (Mantovani et al., 2008)).

Neste exemplo de infiltração, inserem-se diversos tipos de células pertencentes à classe das chamadas células T, que representam cerca de 75% dos linfócitos infiltrantes de tumor (LITs) (Zgura et al., 2018). A classificação destas células varia conforme a subunidade dos seus recetores e das glicoproteínas da superfície dos linfócitos T, CD4 e CD8. Estas glicoproteínas pertencem a dois complexos distintos de histocompatibilidade maior, as células T CD8 pertencem à classe I e as células T CD4 inserem-se na classe II. As células anteriormente referidas são reconhecidas através de um complexo com competência de identificar os peptídeos localizados na superfície celular das células T. As células CD8+, encontram-se relacionadas de forma positiva com os resultados de foro clínico; assim valores elevados de infiltração de células T CD8+, relacionam-se a uma sobrevida maior. Associadas às células anteriormente referidas, as células denominadas de células *natural killer* (NK), apresentam uma função de defesa, sendo esta de primeira linha. De entre muitas das células T, as células *helper* estão relacionadas a um prognóstico mais favorável, no caso do cancro da mama (Paijens et al., 2021; Zgura et al., 2018). Já os linfócitos B e a presença de células T reguladoras foram associadas a um pior prognóstico em pacientes com cancro da mama. Em tumores em que sejam reconhecidas as células linfóides inatas do tipo 3, foi identificada a possibilidade de ocorrer metastização nos gânglios linfáticos (Paijens et al., 2021). O infiltrado linfocitário é subdividido em duas componentes, a componente estromal (também chamados peritumorais) e a componente intratumoral. Os LITs intratumorais caracterizam-se por agregados que infiltram o epitélio do tumor podendo ou não estabelecer contacto com células desse mesmo epitélio. Além disso, este tipo de linfócitos apresenta-se com aspeto mononuclear e muitas das vezes

encontram-se no interior de “ninhos” compostos por células tumorais (Catacchio et al., 2019; Denkert et al., 2010). Por outro lado, os LITs de tipo peritumoral ou estromal, encontram-se num estado de desordem entre as células que constituem o tumor, podendo estar localizados no interstício ou estroma do mesmo. Estes linfócitos peritumorais não estabelecem contacto direto com as células que compõem o carcinoma (Catacchio et al., 2019; Salgado et al., 2015). Embora muitos autores defendam as definições descritas anteriormente, esta caracterização poderá não ser definitivamente clara e concisa, devido à capacidade de mobilidade dos linfócitos infiltrantes do tumor, no microambiente do mesmo. A avaliação dos linfócitos infiltrantes do tumor de carácter intratumoral e peritumoral é realizada habitualmente através de cortes histológicos onde não é possível apreciar a mobilidade dos linfócitos. Deste modo, a avaliação dos linfócitos infiltrantes do tumor poderá não ser totalmente representativa da situação tumoral. Segundo numerosos estudos, os linfócitos peritumorais possuem maior relevância para o diagnóstico visto que normalmente se encontram em maiores concentrações comparativamente aos LITs não estromais (Salgado et al., 2015).

Para avaliar a infiltração de linfócitos tumorais, o grupo de trabalho internacional da infiltração de linfócitos tumorais estabeleceu algumas etapas que devem ser cumpridas. Primeiramente, procede-se à seleção da área tumoral, onde os linfócitos infiltrantes são devidamente analisados. Nesta área, apenas devem ser contabilizados os LITs que se apresentem nos limites do tumor invasivo. Assim, áreas de tecido normal que estejam adjacentes ao tumor, não devem ser avaliadas, tal como regiões com necrose ou fibrose. Seguidamente, é recomendado definir a infiltração de linfócitos tumorais. Neste passo, somente os LITs estromais devem ser contabilizados. com recurso ao microscópio, utilizando uma baixa ampliação (200x ou 400x). Sucessivamente, o tipo de célula inflamatória deve ser devidamente determinado. Assim, apenas as células mononucleares são contabilizadas, não se considerando os granulócitos presentes em áreas de necrose. Para finalizar, é feita uma quantificação dos LITs. Nesta etapa, a lesão é classificada segundo 3 graus, de A a C. O grupo A, abrangendo percentagens entre 0 a 10% de LITs, é caracterizado por valores de LITs baixo. O grupo B (10% aos 40% de LITs estromais), recebe a designação de LITs intermédios. Por fim, no último grupo, com percentagens de LITs a variar entre os 40 a 90% de LITs estromais, é considerado como com valores elevados de LITs (Zgura et al., 2018).

Os LITs apresentam um valor potencial como fator preditivo de prognóstico no cancro da mama e encontram-se correlacionados de uma forma positiva com a sobrevivência de pacientes que não expressem RE (Zgura et al., 2018). Em 2014, um estudo contemplou a avaliação de cerca de 12000 pacientes do Reino Unido e Canadá, a fim de estudar a relação dos linfócitos T com fatores clínicos. Deste modo, os autores concluíram que em tumores que não expressavam RE, as células CD8+, se relacionavam com uma maior sobrevida (Ali et al., 2014). Com o intuito de validar a sua relevância a nível clínico, vários estudos analisaram diversos fatores que demonstram de forma estatística que este biomarcador se correlaciona com variáveis de foro clínico, como por exemplo contribuição para um bom prognóstico (Ali et al., 2014; Desmedt et al., 2018; El Bairi et al., 2021). Assim sendo, os LITs demonstram ser bons biomarcadores. Apesar da realização de numerosos estudos em tumores que expressavam RE, não foi possível estabelecer uma associação positiva entre os LITs e a sobrevivência de pacientes com este tipo de tumor. Deste modo, conclui-se que os LITs em tumores RE negativos se encontram associados de forma positiva à sobrevida, o que não se verifica em tumores RE positivos. Assim sendo, é relevante realizar estudos que permitam avaliar o valor deste biomarcador em carcinomas lobulares invasivos. Segundo, Khalid EL Bari *et al.*, os carcinomas lobulares invasivos são normalmente RE positivos (El Bairi et al., 2021). Igualmente nos carcinomas deste tipo, verificou-se uma menor taxa de infiltração de linfócitos, comparativamente aos carcinomas NST (Desmedt et al., 2018). Assim, os carcinomas NST possuem uma maior infiltração de linfócitos de células CD4+, que consequentemente conduzem a uma maior agressividade do tumor (Droeser et al., 2012). Altos níveis de LITs demonstraram ter associação com elevadas taxas de proliferação das células neoplásicas, em carcinomas lobulares e ductais invasivos. Ademais, foi estabelecida também uma relação de pacientes mais jovens com a maior infiltração de LITs (Desmedt et al., 2018).

No que concerne à relação entre a presença de RH e a infiltração linfocitária, numerosos estudos foram realizados de modo a clarificarem o valor deste biomarcador. Num estudo em que se comparou 1300 tumores de tipo triplo negativo com 3500 tumores positivos para RH, o valor dos LITs revelou-se como biomarcador de prognóstico nos tumores de tipo triplo negativo. Já nos tumores de tipo luminal, não foi possível atribuir o mesmo valor dos LITs como biomarcador de prognóstico. Assim, em tumores de tipo triplo negativo parece ser vantajoso possuir elevadas quantidades de LITs, já que favorecem o prognóstico. Foi ainda estabelecida uma relação entre os LITs e outros fatores clínico-patológicos. Tanto os LITs de

tipo estromal como os LITs intratumorais foram associados à presença de componente tumoral de tipo infiltrativo, à ausência de expressão de RH e ainda à alta expressão do biomarcador Ki-67 (Salgado et al., 2015). Em 2013, num estudo que avaliava o valor prognóstico e preditivo dos LITs, a mediana de LITs intratumorais (2%) foi inferior à mediana de LITs estromais (10%). Em tumores que não expressavam RE e que expressavam ou não o *HER2*, encontraram-se valores superiores quando em comparação com tumores que expressavam RE e não expressavam *HER2* (Loi et al., 2013).

Tendo em consideração o estágio do tumor, foi possível evidenciar uma maior incidência em tumores de estágio T1 e T2, ou seja, tumores com dimensões entre 1 cm a 2 cm e entre 2 a 5 cm, respetivamente. Já em estádios mais avançados, T3 e T4 (tumores com dimensões superiores aos 5 cm), não se verificou tal associação. Em relação ao estado de metastização dos gânglios linfáticos, não houve qualquer diferença significativa. (Gao et al., 2020; Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012).

Quando comparados carcinomas de tipo lobular e carcinomas de tipo NST, também se evidenciaram diferenças na infiltração de LITs, sendo esta mais intensa nos carcinomas NST. Não obstante, em tumores com elevado índice de proliferação (avaliado com Ki-67), observou-se uma maior infiltração de LITs, comparativamente em tumores com baixo índice de proliferação, independentemente do tipo de tumor (Gao et al., 2020).

1.4 PAPEL DA ANATOMIA PATOLÓGICA NO CANCRO DA MAMA

A avaliação anatomopatológica tem como principal objetivo fazer o diagnóstico de cancro, avaliar os parâmetros microscópicos do tumor que permitem a sua classificação, o grau de diferenciação e outros fatores que vão influenciar o prognóstico e orientar a terapêutica, tais como invasão linfovascular ou perineural, presença de recetores hormonais, amplificação de *HER2* e índice proliferativo, tal como referido anteriormente. É possível estabelecer uma associação entre a morfologia do tumor com dados clínicos, como é o caso da sobrevida (Leong & Zhuang, 2011b). Além disso, é indispensável avaliar os fatores preditivos de resposta terapêutica (RE, RP, Ki-67 e *HER2*), com recurso a estudos imunohistoquímicos, por exemplo.

Hipótese:

De acordo com a literatura, diversas são as associações entre numerosos parâmetros clínicos e biológicos de interesse. No entanto, no que concerne a correlação entre a infiltração linfocitária e a expressão de Ki-67, juntamente com outros parâmetros clínicos e biológicos, ainda são necessárias novas pesquisas de modo a avaliar o seu valor preditivo. Com o presente projeto pretende-se comparar dois grupos de carcinomas da mama, de tipo lobular e sem tipo especial (NST), avaliar a infiltração linfocitária de tipo peritumoral e intratumoral e o índice de proliferação avaliado com Ki67 e correlacioná-la com variáveis clínicas e biológicas de interesse: idade, recidiva, e expressão de RH. Deste modo, propõe-se investigar de que forma o tipo lobular se diferencia do tipo NST e qual o impacto no comportamento clínico destes tumores.

Capítulo 2

Objetivo

2 OBJETIVO

Este projeto visa analisar microscopicamente cada amostra, de modo a reconhecer as áreas tumorais e respectivas características do tumor. Para além disso, pretende-se avaliar a associação do infiltrado linfoide e a expressão do Ki-67 com distintos parâmetros clínicos e morfológicos recolhidos. A fim de concretizar o objetivo proposto, foram seguidos os seguintes passos:

1. Selecionar os casos de carcinoma da mama de tipo lobular e do tipo NST, assim como a recolha da respetiva informação clínica.
2. Realização de lâminas histológicas com coloração HE, de cada amostra tumoral e posterior avaliação microscópica (características do tumor, bem como confirmação de aspetos histológicos).
3. Avaliação das imagens microscópicas, com recolha das variáveis histológicas.
4. Análise estatística dos dados recolhidos.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste projeto de dissertação e com o intuito de validar as hipóteses propostas, optou-se por seguir duas etapas distintas.

A primeira etapa consistiu na seleção de 30 amostras de cancro lobular da mama e 30 amostras de cancro da mama NST, dos arquivos do Hospital CUF Descobertas. Após seleção dos casos, procedeu-se à análise das lâminas histológicas. Posteriormente, realizou-se um estudo mais pormenorizado de cada caso, através da observação ao microscópio com o auxílio de anatomopatologistas experientes, o que permitiu a colheita de dados suplementares para a caracterização de cada tumor.

A segunda etapa do estudo observacional, consistiu na análise da informação clínica de cada caso. Toda a informação clínica com relevância para o presente estudo foi devidamente recolhida com recurso à base de dados de Cancro da Mama da CUF. Através do estudo estatístico, foi possível estabelecer comparações e relações entre os dados do estudo e os diversos dados clínicos. Todos os dados recolhidos foram analisados estatisticamente, sob a forma de linguagem R.

3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

A fim de executar este projeto foram selecionadas 30 amostras de carcinoma lobular e 30 amostras de carcinoma NST, provenientes do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital CUF Descobertas. Foram critérios de inclusão neste estudo amostras de casos com grau de diferenciação intermédio (G2), com dimensão até 2 centímetros (pT1) e sem metastização nos gânglios linfáticos (pN0). Para todas as amostras, foi necessário recolher informação clínica procedente da base de dados do hospital CUF Descobertas. Um consentimento informado foi previamente assinado por cada paciente no ato da cirurgia, de forma a aprovar a recolha de dados clínicos e de material biológico para estudos de investigação. Ademais, o presente estudo obteve a aprovação por parte da Comissão de Ética do Hospital CUF Descobertas para a sua realização.

3.1.1 SELEÇÃO DE DADOS CLÍNICOS

A informação clínica das 60 pacientes selecionadas previamente foi obtida através da base de dados da Unidade da Mama pelos elementos responsáveis pela gestão da mesma. De acordo com o presente projeto, foi selecionada a informação clínica com relevância para o mesmo.

Assim, foram recolhidos a idade à data do diagnóstico, dados relativamente à sobrevivência, assim como ausência ou presença de metástases e recidiva. É de salientar que os 60 carcinomas possuíam algumas características biológicas sobreponíveis, isto é, todos os carcinomas possuíam um grau de diferenciação intermédio, (G2), apresentavam dimensões até 2 centímetros e não revelavam metastização nos gânglios linfáticos. No entanto, dividiram-se em dois grupos histológicos diferentes, um constituído por carcinomas lobulares invasivos e outro constituído por carcinomas sem tipo especial (ex-carcinomas ductais invasivos). Posteriormente todos os dados recolhidos foram devidamente analisados, com recurso ao programa denominado R Studio, juntamente com diversas extensões das quais, Gtsummary e Ggplot2.

Após recolha da informação clínica, para cada caso foram selecionadas e avaliadas as respetivas lâminas com coloração de hematoxilina-eosina de forma a escolher blocos contendo áreas representativas do tumor. Qualquer caso com um dos materiais anteriormente referidos em falta, foi descartado. Os níveis de expressão do biomarcador Ki-67, existência de infiltração de LITs de tipo intratumoral e peritumoral, foram reavaliados através da observação das lâminas histológicas.

3.2 TECIDOS FIXADOS EM FORMALINA E EMBEBIDAS EM PARAFINA

As amostras utilizadas neste estudo foram fixadas em formalina e incluídas em parafina. A técnica que recorre à fixação de tecidos através da formalina com inclusão em parafina é considerada a técnica de eleição para a preservação de tecidos, quer para diagnóstico quer para investigação.

Para este procedimento, utiliza-se formalina como principal fixador dos tecidos. Utilizada sob a forma de solução, na qual a água atua como solvente, e composta por cerca de 37 a 40% de formaldeído, a formalina é frequentemente utilizada em técnicas de preservação (Wick, 2019). O formaldeído utilizado na solução possui a capacidade de reagir com diversas proteínas nucleares, assim como ácidos nucleicos. Através da sua ação, este composto possui a capacidade de estabilizar a região externa da proteína do ácido nucleico, procedendo à alteração de nucleotídeos (Suvarna et al., 2019). Isto é, o formaldeído possui a capacidade de reagir com o grupo livre de aminas, das proteínas e peptídeos, formando grupos de metilol. Além disso,

durante o processo de fixação são estabelecidas pontes de metileno, entre diversos aminoácidos tais como: arginina, triptofano, glutamina, histidina, asparagina e por fim, histidina. As ligações referenciadas anteriormente são executadas entre proteínas, ou até mesmo entre as suas subunidades. Além do formaldeído, são ainda adicionados vários outros produtos de foro químico, tais como cloreto de cálcio, carbonato de cálcio, brometo de amónio, cloreto, fosfato e hidróxido de sódio, entre outros, com o objetivo de servir de tampão. Os reagentes anteriormente referidos permitem assim estabilizar e preservar os tecidos (Wick, 2019). A etapa de fixação tem uma duração entre 24 a 48h, em solução de formalina, que permite mais tarde o seu armazenamento por diversos anos (Donczo & Guttman, 2018).

Devido às propriedades aquosas da solução de formalina é necessário desidratar os tecidos posteriormente, de forma a possibilitar a sua inclusão em parafina, que vai conferir aos tecidos a dureza suficiente para permitir o corte em secções com cerca de 3 a 4 micras de espessura. Assim, soluções com diferentes concentrações de etanol são utilizadas para a desidratação dos tecidos (Wick, 2019).

Esta etapa foi previamente realizada por técnicos de laboratório, da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital CUF Descobertas. Posteriormente, as amostras foram analisadas com o intuito de diagnosticar cada tipo de tumor e seguidamente armazenadas nos arquivos de armazenamento de material biológico do hospital.

A coloração HE é a coloração utilizada por rotina para o diagnóstico da maioria das patologias (Chan, 2014). Esta técnica possibilita a visualização detalhada dos cortes histológicos, permitindo assim o diagnóstico e caracterização dos tumores. Muitas vezes, posteriormente à observação inicial são necessárias novas análises complementares com recurso a técnicas de imunohistoquímica, com a utilização de anticorpos que permitem identificar epítomos (antigénios) que poderão ter expressão nos tumores e ajudar na sua caracterização. Como exemplo de biomarcadores detetados através do uso de anticorpos, pode-se incluir os recetores hormonais, E-caderina, citoqueratinas 8 e 18, e o KI-67 como já referido, entre outros (Hinton et al., 2019). Assim sendo, foi realizada uma coloração HE para cada caso, a fim de reavaliar a área tumoral em cada amostra de forma a analisar as características histológicas a analisar neste estudo, uma vez que a maioria das lâminas histológicas disponíveis em arquivo não apresentavam a qualidade necessária para este objetivo.

Para proceder à realização da coloração HE em lâminas contendo as amostras de interesse, os blocos foram recolhidos do arquivo e depósito do Hospital CUF Descobertas. O material biológico de cada caso foi colocado previamente num sistema que permite arrefecer a parafina (figura 7), a fim de possibilitar o seu corte.

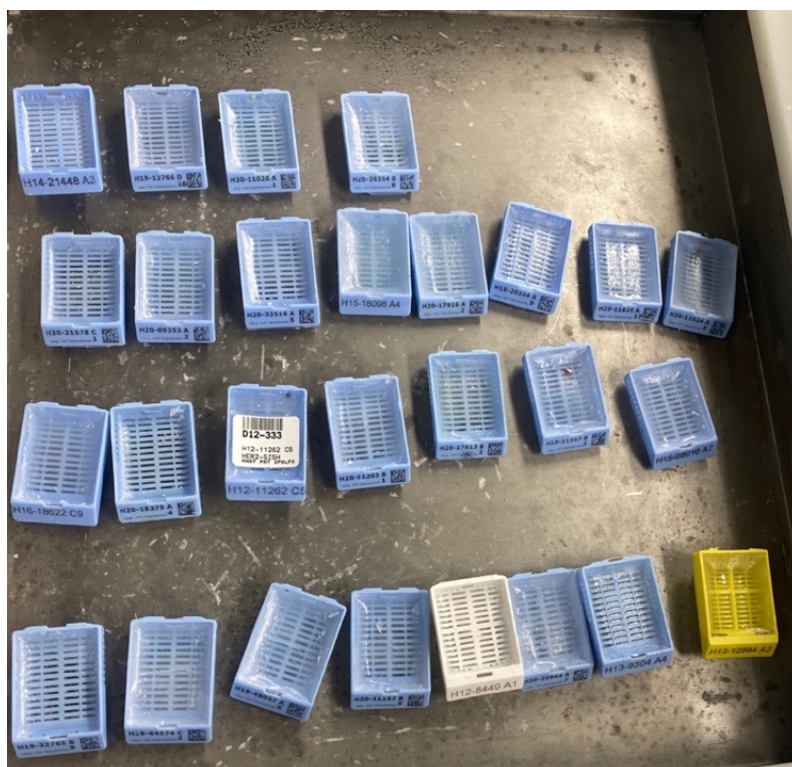


Figura 7: Sistema de arrefecimento de blocos de parafina. Este sistema permite garantir a temperatura ideal para realizar o corte do material biológico.

Posteriormente, cada bloco de parafina foi colocado no suporte de blocos de um micrótomo Leica do modelo RM2255 (figura 8), onde foram realizados os cortes histológicos de cada amostra. Todo o material foi devidamente desinfetado e limpo, entre cada corte efetuado de diferentes amostras, de modo a evitar possíveis contaminações. Os cortes histológicos efetuados, disponham de uma espessura de 3,5 micras, sendo esta ideal para tecidos provenientes de amostras da mama, devido à sua elevada quantidade de tecido adiposo.



Figura 8: Micrótomo Leica do modelo RM2255. Este micrótomo pertence ao laboratório da unidade de anatomia patológica do Hospital CUF Descobertas, sendo utilizado para realizar cortes das amostras tumorais e respetivas lâminas histológicas.

Após o corte, cada fragmento foi inserido numa tina com água à temperatura ambiente, permitindo a distensão do fragmento e respetiva adesão à lâmina de vidro. De seguida, a lâmina foi exposta ao banho-maria a cerca de 40°C, uma vez que este passo permite a adesão e evita a formação de rugosidades no corte histológico. As lâminas foram previamente identificadas com o respetivo número do caso, de forma a assegurar a devida correspondência entre o caso e a amostra. Em seguida, todas as lâminas com os respetivos cortes, foram colocadas num sistema de coloração automático, designado de estação de trabalho Leica do modelo HistoCore SPECTRA CV (figura 9), a fim de corar com a coloração HE. A etapa de coloração descrita anteriormente, teve uma duração de cerca de 1 hora, tanto para lâminas *standard*, como para lâminas de maiores dimensões, designadas de megas.



Figura 9: Estação de trabalho Leica do modelo HistoCore SPECTRA CV. Esta estação, pertence ao laboratório da unidade de anatomia patológica do hospital CUF Descobertas, sendo utilizada para realizar colorações de HE.

3.3 VISUALIZAÇÃO DE LÂMINAS AO MICROSCÓPIO

Todas as lâminas foram visualizadas num microscópio Leica, do modelo DM LS2, permitindo assim identificar as áreas tumorais e analisá-las. O microscópio utilizado dispõe de um sistema de dupla observação que permitia a visualização do anatomopatologista experiente e a aluna, de modo a facilitar a aprendizagem. Após identificação dessas mesmas áreas representativas do tumor, estas foram delimitadas na lâmina através de uma caneta permanente. O processo descrito anteriormente, facilita o corte a posteriori da área tumoral em cada bloco de parafina das amostras quando se pretende obter tecido para extração de ácidos nucleicos para realização de técnicas adicionais. Cada corte foi visualizado e validado por um patologista experiente, de forma a garantir a inclusão de áreas tumorais. Na visualização das lâminas histológicas, referentes a cada caso clínico aqui estudados, foi possível recolher e comprovar as informações relativas a cada tumor. Assim, fazem parte destas: características comumente encontradas nos tipos tumorais lobular e NST, sendo estas referentes à morfologia da célula cancerígena, bem como a sua organização e disposição no tecido, permitindo desta forma diferenciar os dois tipos de tumor estudados. Ademais, a existência de infiltração linfocitária também foi analisada e quantificada. Após visualização das lâminas histológicas referentes a cada caso, foram recolhidas imagens representativas das áreas tumorais previamente selecionadas, bem como das características específicas de cada tumor. As imagens foram posteriormente analisadas e selecionadas de modo a caracterizar devidamente cada amostra.

3.4 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

O presente estudo, contou com um passo adicional para extração de ácidos nucleicos das amostras biológicas estudadas. Com o intuito de aprofundar os conhecimentos na área da anatomia patológica tive a oportunidade de colaborar na realização dos cortes histológicos dos blocos selecionados. No entanto, por carência de condições necessárias, não foi possível proceder à análise das amostras extraídas, não fazendo esta parte do projeto.

Assim, a fim de executar a recolha de material biológico oriundo de cada bloco de parafina, foi recomendada a utilização de secções recém-cortadas. O micrótomo Leica do modelo RM2255 possibilitou a realização de cortes com dimensões de 10 μm . Procedeu-se a um primeiro desbastamento da parafina e as duas primeiras secções provenientes dos blocos, foram descartadas. O passo anterior é de extrema importância, em razão da exposição do bloco de parafina à atmosfera, que poderá levar a uma reação de oxidação. Para além do desbastamento, foram realizados cortes a 3,5 μm , a fim de englobar toda a área representativa do tumor. Dependendo da área representativa do tumor, foram realizados diversos cortes. Este passo permitiu a prevenção de uma possível sobrecarga na fase de lise e no sistema de extração, assim como a garantia de uma purificação eficiente.

Para a execução de todo este processo, foi indispensável a distinção entre o tecido tumoral e não tumoral no bloco de parafina, sendo que a área tumoral foi previamente selecionada ao microscópio. Cada lâmina histológica foi colocada sobre o respetivo bloco de parafina, permitindo delimitar a área representativa do tumor no bloco de parafina (figura 10). Neste passo, foi considerado apenas o material tecidual real, excluindo assim a área correspondente à parafina.



Figura 10: Blocos de parafina com as respectivas lâminas histológicas.

A área representativa de tumor de interesse, foi previamente selecionada ao microscópio e delimitada com caneta permanente. Este passo permitiu identificar a área de interesse no bloco, através da sobreposição da lâmina histológica no bloco de parafina.

O valor do tecido em volume foi devidamente calculado, através da área de superfície do tecido, bem como o número de secções e a espessura das secções. É de referir que fragmentos de dimensões mais reduzidas, permitem fornecer resultados com maior significância na técnica de polimerase em cadeia de reação (*RT-PCR, Real Time-Polymerase Reaction*).

3.5 LINGUAGEM R

A linguagem R é uma das ferramentas mais utilizadas para realizar análise estatística. Este programa permite analisar diversos conjuntos de dados estatísticos (Jalal et al., 2017). Através de diversas fórmulas disponíveis na plataforma, é possível obter uma análise estatística bastante detalhada, assim como a realização de gráficos a partir dos dados fornecidos (Y. Li, 2006). O programa encontra-se em constante desenvolvimento, trazendo novas funcionalidades. Neste projeto, a linguagem R foi utilizada para fazer uma breve análise estatística dos diversos dados disponibilizados (dados clínicos e biológicos dos 60 casos).

3.5.1 ANÁLISE DOS DADOS ATRAVÉS DA LINGUAGEM R

Os dados clínicos das 60 participantes deste estudo, foram submetidos a uma análise estatística, a fim de ser possível estabelecer comparações e correlações. Com o propósito de realizar o tratamento estatístico, os dados recolhidos foram devidamente registados em formato Excel, de modo a possibilitar a posterior análise estatística. Inicialmente, foi realizada uma análise estatística englobando os 60 carcinomas em simultâneo. Posteriormente, os casos foram divididos em dois grupos, ou seja, os 30 casos de carcinoma lobular foram analisados e comparados com os 30 casos de carcinoma NST. A análise possibilitou a determinação da média das idades, bem como estabelecer correlações entre a existência de infiltração de tipo peritumoral e intratumoral e expressão da proteína Ki-67, com parâmetros clínicos e biológicos (tipo de tumor, existência de recidiva, existência ou ausência de metástase, expressão dos RE e RP), assim como correlação entre infiltração de tipo peritumoral e intratumoral e expressão da proteína Ki-67. Foi estudada ainda a expressão de *HER2* em ambos os tipos carcinomas da mama.

Foram utilizadas diversas extensões disponíveis no programa, de modo a possibilitar a criação de tabelas (permitindo a comparação dos dados clínicos de interesse, com os restantes parâmetros), com determinação do p-value para análise estatística e gráficos. Além disso, foram ainda realizados testes de correlação, determinando assim o respetivo coeficiente de correlação e teste de qui-quadrado de Pearson. Ademais, as correlações foram representadas graficamente e quando possível foi inserida a linha de tendência nos gráficos obtidos.

Foram utilizadas diversas escalas conforme os dados a analisar. Na avaliação de metástases, foram registados os dados de acordo com 3 parâmetros: ausente, em todos os casos que não se registavam qualquer tipo de metástases; incerteza, quando não havia registo de dados claros que indicassem presença de metástases e presentes, quando se registava qualquer tipo de metástase. No que respeita a recolha de informação relativamente a eventos de recidiva, o levantamento dos dados procedeu de forma semelhante ao meio utilizado para analisar a presença de metástase. Foi realizada a recolha de informação referente aos valores de expressão de RH, bem como a expressão de Ki-67. Em alguns dos casos estudados, mais antigos, não foi feito estudo imunohistoquímico para avaliar o índice de proliferação pelo que não foi possível proceder à sua recolha.

Neste sentido, como o estado de recidiva e metástase é designado como variável categórica, sentiu-se a necessidade de ajustar as escalas utilizadas. Assim, no que se refere ao estado de recidiva e metástase, o estado de ausência foi equiparado a 0, o estado de incerteza a 1 e por fim, a presença dos eventos a 2.

Do mesmo modo, sendo que os valores de RH apresentam valores numéricos e nominais (referentes ao tipo de recetor expresso), também foi executado um ajuste para ser possível realizar a sua análise estatística. Desta forma, em situações em que não se verificava a expressão de ambos os recetores, foi utilizado um valor de 0. No mesmo sentido, em situações em que existia expressão de RE, mas não havia expressão de RP, foi utilizado o valor 1. Em casos que revelavam a expressão de ambos os RH, estes dados foram equiparados ao valor de 2. Por fim, em situações que não dispunham de informação relativamente à expressão de RH, foi utilizado um valor de 3.

No que respeita à infiltração linfocitária peritumoral foi adotada uma escala com 4 graus: ausente, quando não existia qualquer indicação de infiltração tumoral, incerteza em situações que não foi possível recolher este dado clínico, ligeiro em presença de um infiltrado leve e por fim, moderado em situações em que o infiltrado era mais acentuado (Alkhayyal et al., 2022; Kolberg-Liedtke et al., 2020; Salgado et al., 2015).

Para finalizar, também para infiltração linfocitária de tipo intratumoral, bem como peritumoral, as escalas foram reajustadas de forma a realizar a análise estatística. Desta forma, em situações em que não se verificava infiltração, foi utilizado um valor de 0. Em situações que existiam sinais de infiltração ligeira, foram equiparados a um valor de 1. Por outro lado, em casos clínicos com sinais de infiltração moderada foi utilizado um valor de 2. Por fim, em carcinomas que não possuíam informação, relativamente a este parâmetro clínico, foi utilizado o valor de 3.

No que respeita a análise da expressão de *HER2*, foram apenas contabilizados os casos que demonstravam ser positivos para esta expressão. Consecutivamente, outros fatores de importância foram analisados, nos casos em que havia sinais de expressão de *HER2*, de modo a estabelecer associações de acordo com as características de cada caso clínico positivo. Devido à escassez de expressão de *HER2* na maioria dos carcinomas, a sua análise estatística

demonstrou-se bastante simplificada. Assim, não foi adotada qualquer escala ou produção gráfica para analisar a expressão do oncogene nos dois tipos de carcinoma.

Capítulo 4

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

Na sequência da observação das lâminas histológicas ao microscópio, foram registadas imagens representativas dos tumores estudados. Neste processo, foi possível categorizar e relacionar as características do tumor com o diagnóstico realizado previamente para cada tumor. Além disso, foi possível confirmar aspetos histológicos previamente identificados em relatórios médicos. Dos 60 tumores estudados foram selecionados 3 casos, de modo a ilustrar os carcinomas lobulares e os carcinomas NST. Durante a seleção das imagens representativas dos carcinomas de tipo lobular e NST estudados, foram selecionados carcinomas sem existência de infiltração linfocitária, tumores malignos com infiltração linfocitária ligeira e por fim, carcinomas com infiltração linfocitária moderada a intensa.

4.1.1 ESTUDO HISTOLÓGICO DE CARCINOMAS LOBULARES

De todas as observações realizadas, foram assim selecionadas 4 imagens características de carcinoma de tipo lobular. Adicionalmente à observação das células cancerígenas, foram visualizados de igual modo tecido conjuntivo e tecido adiposo, pertencentes aos principais constituintes do tecido mamário.

4.1.1.1 ESTUDO HISTOLÓGICO DE CARCINOMAS LOBULARES SEM EXISTÊNCIA DE INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA

Na primeira observação de um tumor de tipo lobular, foram identificadas fileiras de células cancerígenas, características de carcinoma de tipo lobular. Além disso, foi observado tecido adiposo e tecido conjuntivo, invadido pelas células com características neoplásicas, como representado na figura 11. No carcinoma lobular representado na figura 11, não foram evidenciados sinais de infiltração.

Na imagem 12, salienta-se uma extensa área tumoral, na qual é possível identificar fileiras de células cancerígenas, envolvidas por tecido conjuntivo. Os núcleos normalmente apresentam-se redondos e uniformes, com escassa atipia. Além disso, muitas vezes é possível distinguir o nucléolo, como é possível verificar em algumas das células representadas na figura 13, através de uma maior ampliação microscópica. Não obstante, na mesma figura encontram-

se representadas fileiras compostas com células cancerígenas, sendo as mesmas rodeadas por tecido conjuntivo.

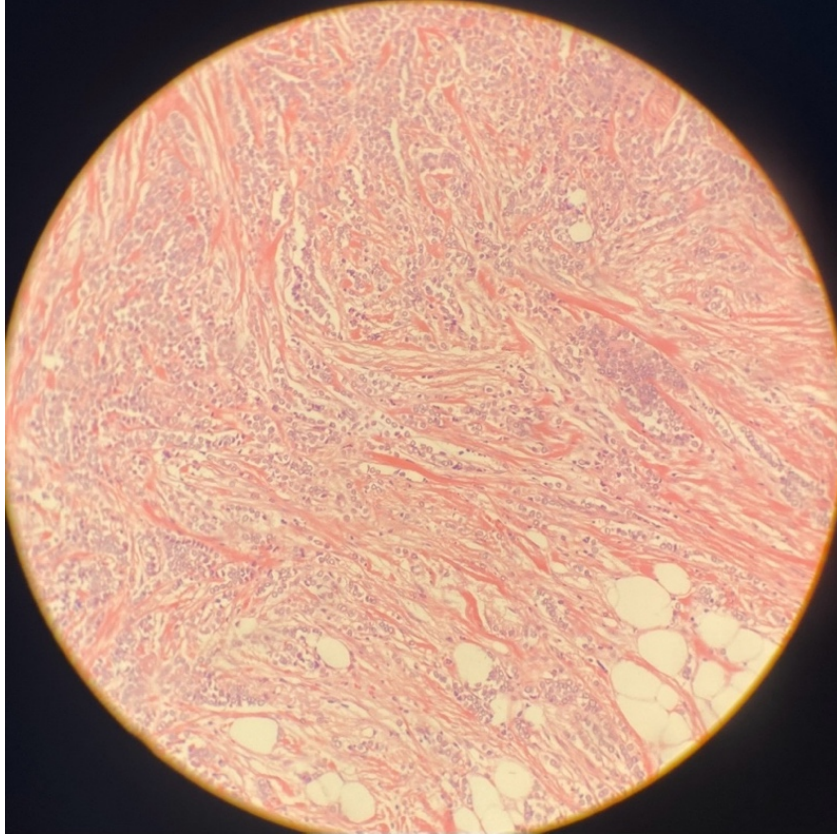


Figura 11: Representação de carcinoma lobular em infiltração. Este tumor maligno, composto por fileiras de células cancerígenas, tecido conjuntivo envolvente e tecido adiposo, ampliação 4x.

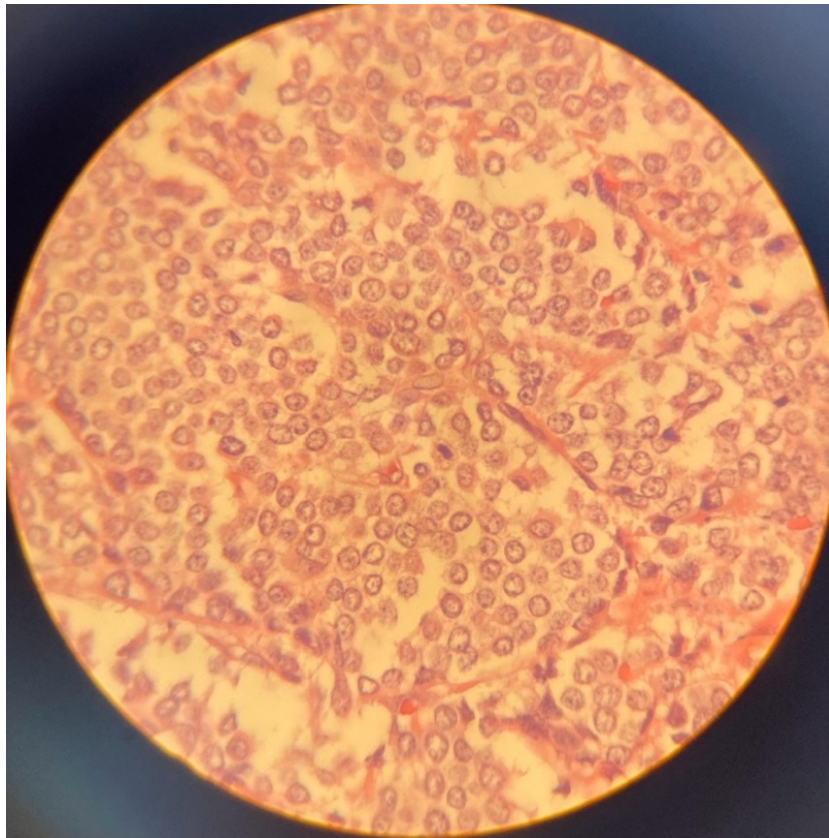


Figura 12: Representação de células cancerígenas. Representação numa ampliação de 40x, sendo possível identificar as suas características histológicas.

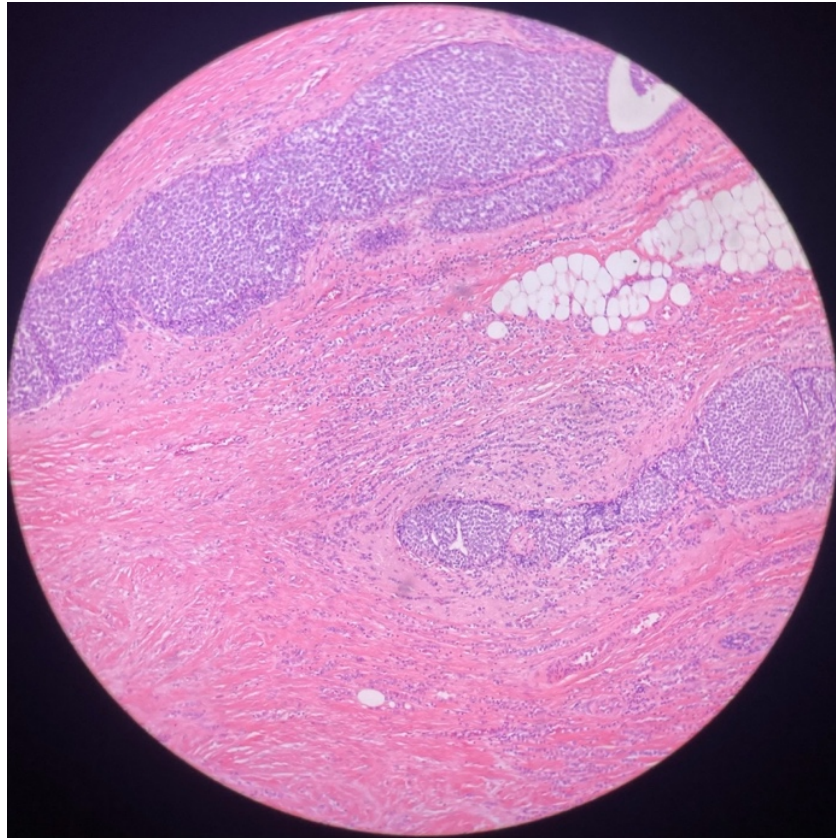


Figura 13: Figura representativa de tumor de tipo lobular. Tumor com componente invasivo, constituído por células cancerígenas em fileira, que infiltram o tecido conjuntivo e o tecido adiposo, ampliação 10x.

4.1.1.2 ESTUDO HISTOLÓGICO DE CARCINOMA DE TIPO LOBULAR, COM INFILTRAÇÃO LIGEIRA

Na análise microscópica, foi identificada uma área tumoral contendo infiltração linfocitária ligeira. Num dos casos em que se verificou presença da mesma, em pequena ampliação, 10x, já é possível diferenciar as células cancerígenas das células linfocitárias, como se encontra representado na figura 14. Na porção superior da imagem, encontram-se representadas fileiras de células cancerígenas, distintas das células linfocitárias que se encontram na porção inferior.

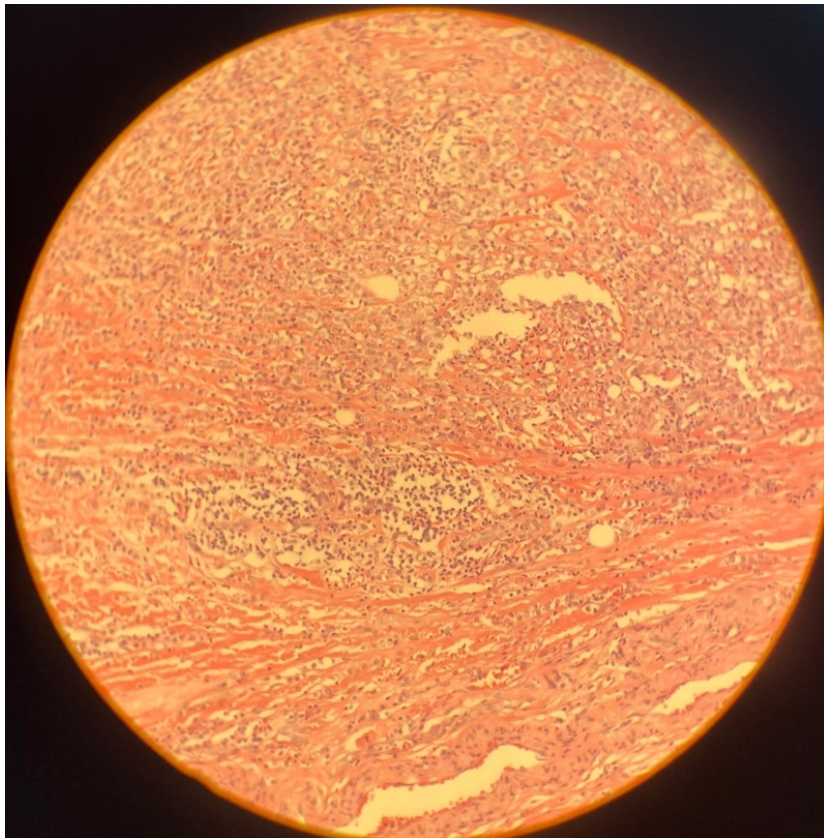


Figura 14: Registro fotográfico de carcinoma lobular. Tumor maligno, contendo fileiras de células cancerígenas e infiltração linfocitária, numa ampliação de 4x.

Em maior ampliação, 40x, é possível observar e caracterizar de forma detalhada as células linfocitárias. Assim, os linfócitos diferenciam-se pela sua hipercromasia na coloração de hematoxilina, em que apenas é possível observar o seu núcleo. Caracterizadas pela sua forma esférica, estas células possuem dimensões bastante reduzidas, o núcleo apresenta grandes dimensões relativamente ao tamanho total da célula, sendo que maioritariamente é impossível observar o citoplasma da célula linfocitária, figura 15.

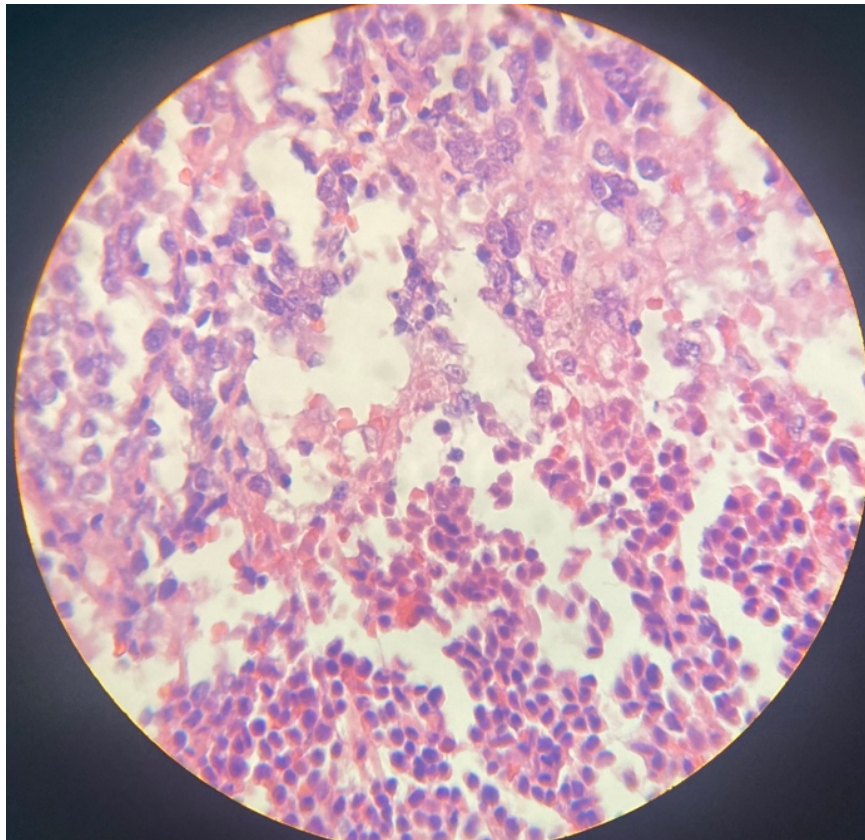


Figura 15: Representação de carcinoma lobular. Representação em ampliação de 40x, sendo possível diferenciar e caracterizar células cancerígenas de células linfocitárias.

4.1.1.3 ESTUDO HISTOLÓGICO DE CARCINOMA DE TIPO LOBULAR, CONTENDO INFILTRAÇÃO MODERADA

Nas figuras 16 e 17 exemplifica-se um caso de carcinoma com infiltração moderada de tipo intratumoral. Neste caso, as células cancerígenas encontravam-se envolvidas pela infiltração de linfócitos. Em pequena ampliação (10x) na porção inferior da imagem 16, é possível identificar um grande foco de linfócitos.

Por outra via, na figura 17, é possível visualizar detalhadamente as células supramencionadas. As células cancerígenas destacam-se com dimensões consideravelmente maiores em relação às dimensões dos linfócitos. Nas células cancerígenas é possível identificar o núcleo e em parte destas, identifica-se do mesmo modo o nucléolo. Além disso, na figura 17 representa-se um caso de carcinoma lobular da mama com infiltração linfocitária moderada. Neste caso foi possível identificar uma área com carcinoma lobular *in situ* e componente invasivo.

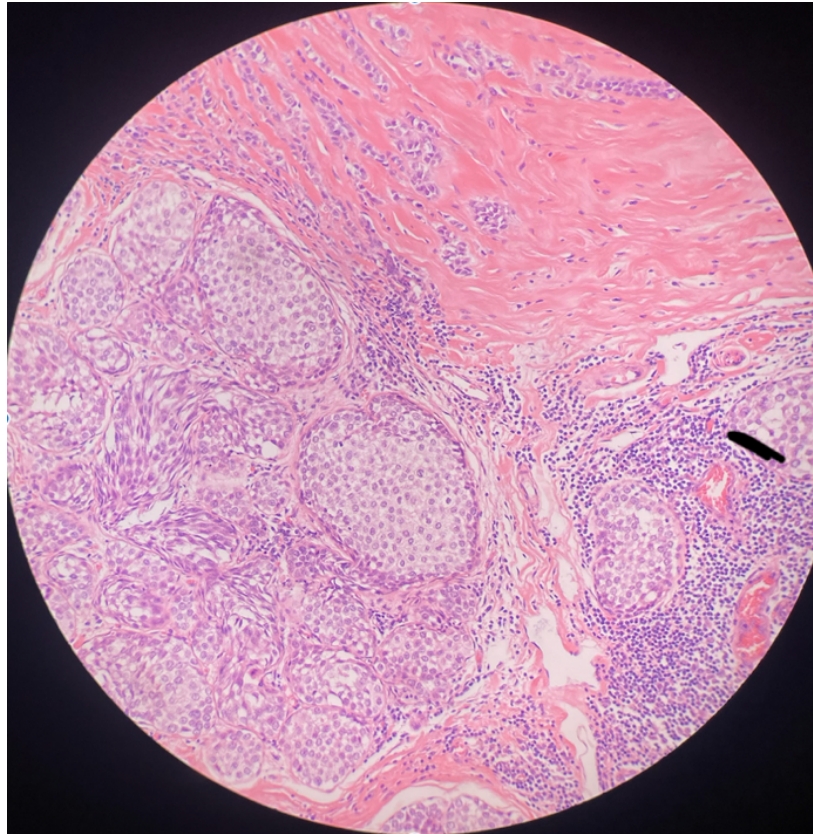


Figura 16: Representação de tumor de tipo lobular. Tumor constituído por grande área de células cancerígenas em fileira e tecido conjuntivo, com infiltrado linfocitário moderado a intenso, em ampliação de 10x.

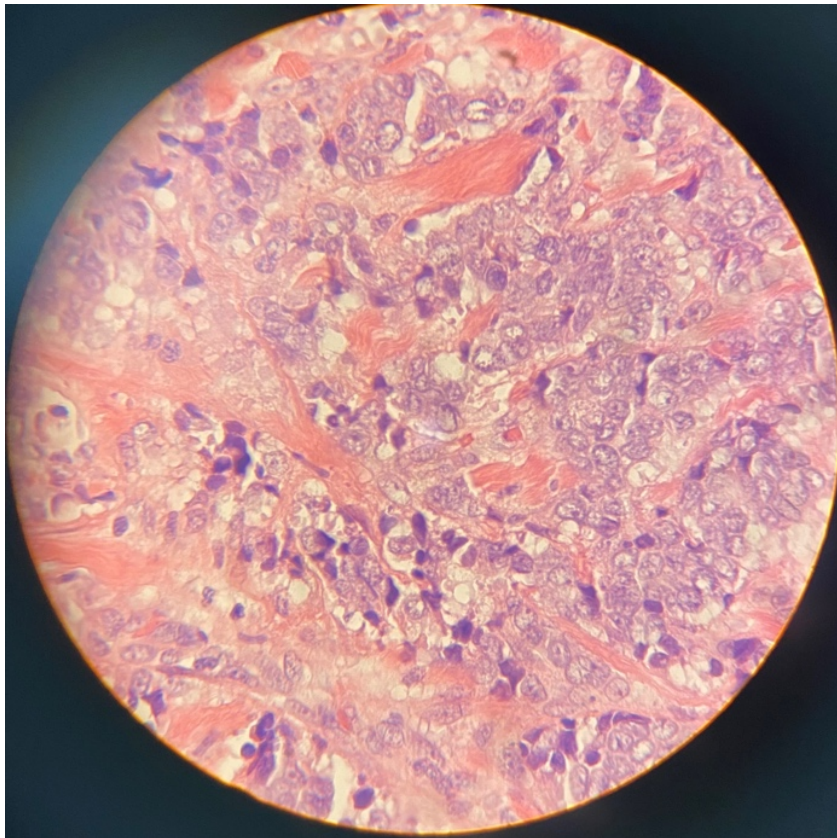


Figura 17: Representação de carcinoma lobular. Registo contendo área tumoral com células carcinogêneas e linfócitos, ampliação 40x.

4.1.2 ESTUDO HISTOLÓGICO DE CARCINOMAS DE TIPO NST SEM INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA

Tal como para o carcinoma lobular foram selecionados alguns casos representativos de carcinomas NST, que representavam o tipo de tumor estudado e o tipo de infiltração linfocitária presente. Estes tumores caracterizam-se pela formação de ductos ou de agregados sólidos, de acordo com o grau de diferenciação, e por terem um grau de anaplasia que também é variável, mas habitualmente mais significativa do que nos casos de carcinoma lobular clássico.

Através do estudo histológico foram identificadas áreas representativas deste tipo histológico. Na imagem 18 identificam-se células cancerígenas, que invadem tecido conjuntivo e escasso tecido adiposo. Além disso, consegue-se visualizar ainda um ducto normal, na porção inferior direita. Estes tumores são bastantes mais heterogêneos do ponto de vista histológico do que os carcinomas lobulares.

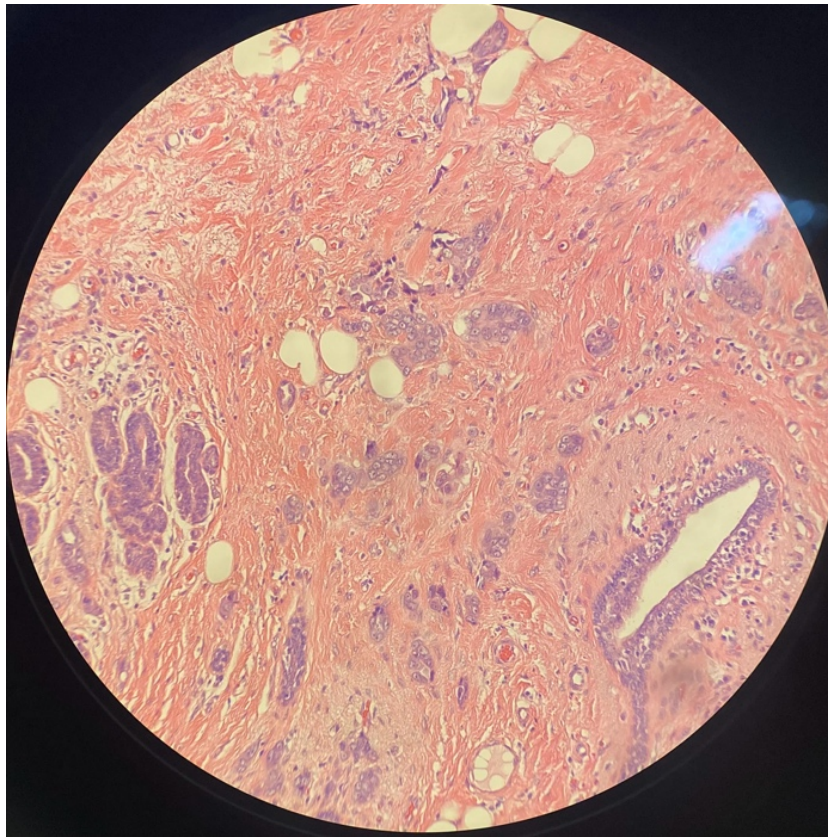


Figura 18: Representação de um carcinoma de tipo NST. Registro com presença de células cancerígenas que formam estruturas tubulares irregulares, envolvidas por tecido conjuntivo e tecido adiposo, em ampliação de 10x.

No tumor maligno aqui representado, não existem sinais de infiltração. Assim, as células do carcinoma NST caracterizam-se pelas diversas dimensões, e por terem cromatina que também apresenta grande variabilidade (figura 19).

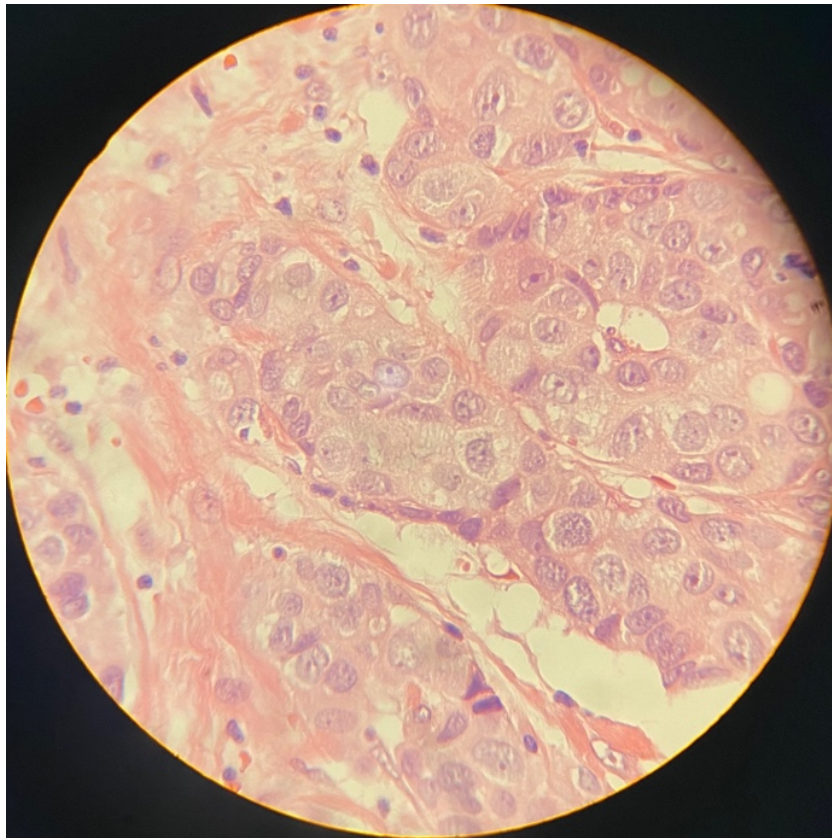


Figura 19: Representação de tumor de tipo NST. Registo salientando-se células cancerígenas no interior dos ductos mamários, ampliação 40x.

4.1.3 ESTUDO HISTOLÓGICO DE CARCINOMAS DE TIPO NST COM INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA LIGEIRA

Tal como nos casos de carcinomas de tipo lobular, a infiltração linfocitária foi de igual modo identificada. Assim, como representado na figura 20, foi assinalada a presença de infiltração ligeira. Na imagem apresentada, é possível observar focos de infiltração de linfócitos que se distinguem das células cancerígenas, como representado na porção inferior.

Já na figura 21, com ampliação de 40x, salienta-se a coloração das células linfóides, que têm características basófilas, na coloração HE. Os linfócitos rodeiam as células cancerígenas, que se destacam pelas grandes dimensões, invadindo o tecido conjuntivo do estroma. Algum conteúdo de tecido adiposo é observado entre a infiltração linfocitária e o agrupado de células cancerígenas.

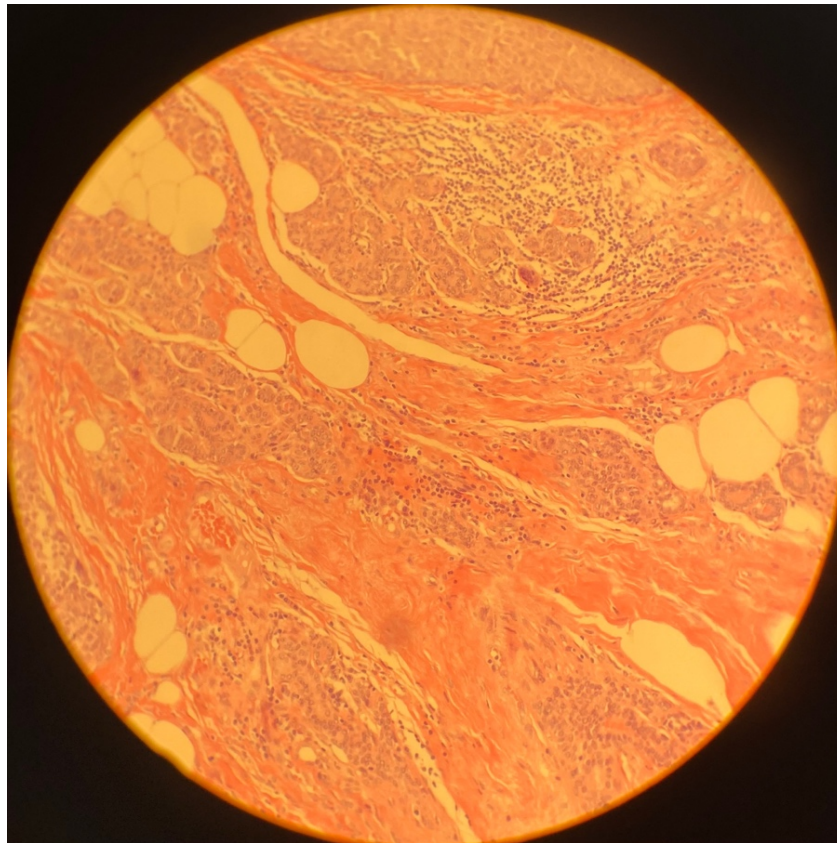


Figura 20: Representação de área tumoral, de carcinoma de tipo NST. Registro fotográfico de uma observação de ampliação de 10x. Aglomerados de células cancerígenas são identificados, juntamente com infiltração linfocitária ligeira. .

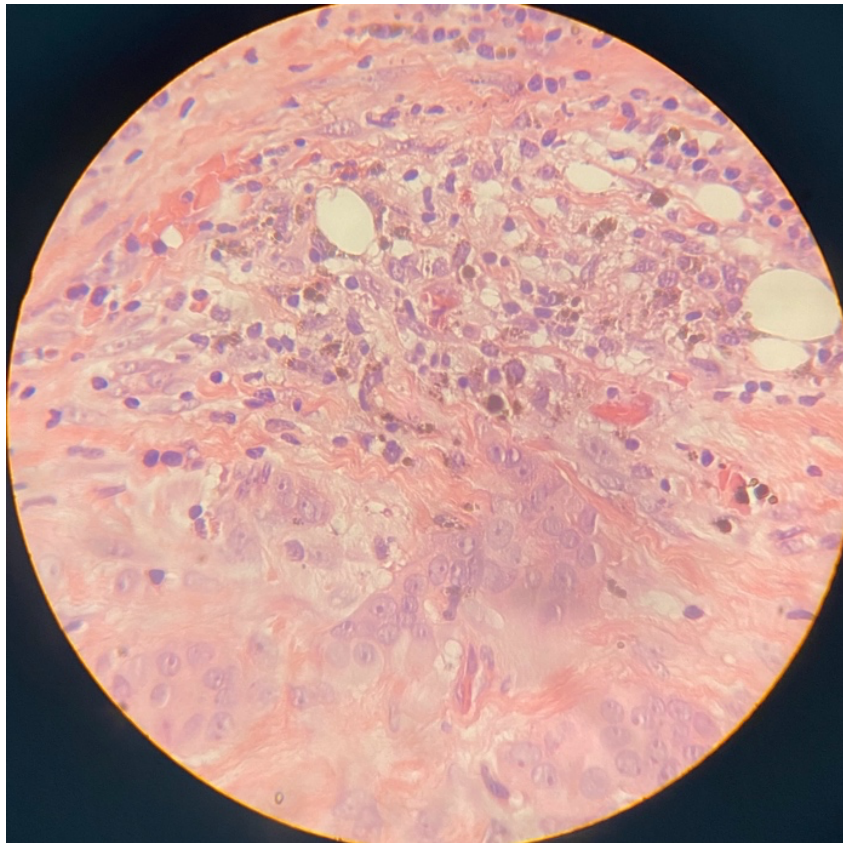


Figura 21: Registo fotográfico de carcinoma de tipo NST. Representação de área tumoral numa ampliação de 40x, com identificação de células cancerígenas e linfócitos. Pequenas quantidades de células adipóscitas identificam-se do mesmo modo na imagem.

4.1.4 ESTUDO HISTOLÓGICO DE CARCINOMAS DE TIPO NST COM INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA MODERADA

A finalizar o estudo histológico dos 30 carcinomas de tipo NST, procedeu-se à seleção de uma imagem representativa de uma neoplasia maligna, contendo infiltração moderada. Assim, através da imagem 22 é possível identificar focos de infiltração linfocitária. De forma previsível, comparativamente à imagem 20 que demonstrava a presença de infiltração ligeira, na imagem 22 verifica-se uma maior quantidade de infiltração. Aglomerados focos de linfócitos aparecem rompendo o estroma, envolvendo na maioria das vezes os lóbulos. Além disso, é possível ainda identificar áreas contendo células cancerígenas.

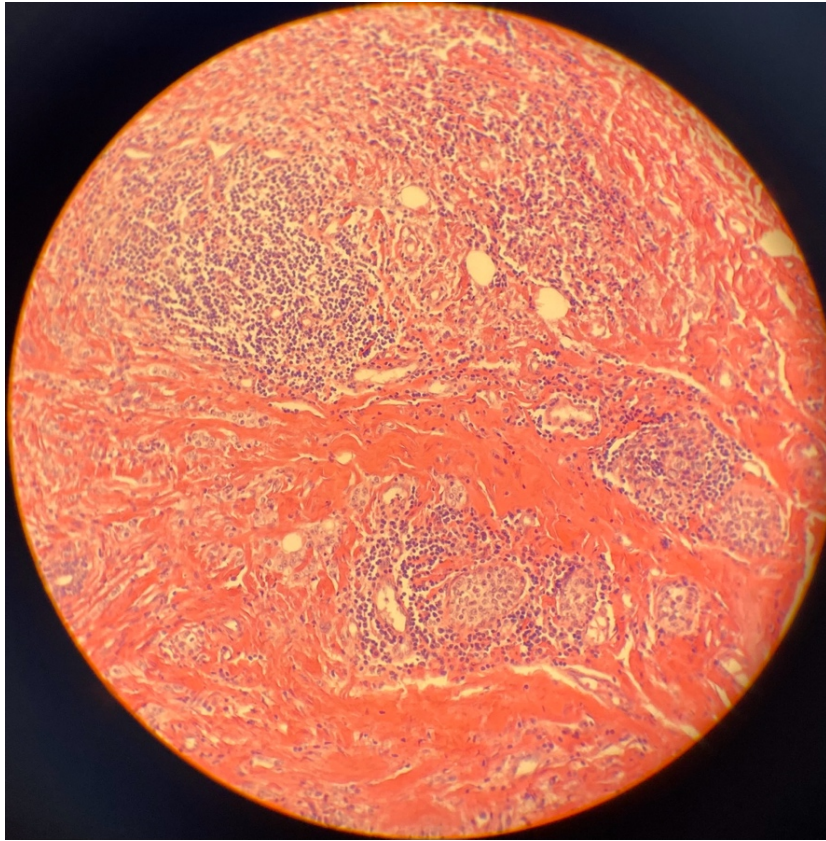


Figura 22: Carcinoma NST com infiltração linfocitária moderada. O tumor encontra-se envolvido por tecido conjuntivo e escasso tecido adiposo, em ampliação de 10x.

Em grande ampliação é possível observar a relação entre as células cancerígenas e as células linfocitárias. É recorrente observar células linfocitárias a rodear focos de células com características cancerígenas, como se pode identificar na imagem 23.

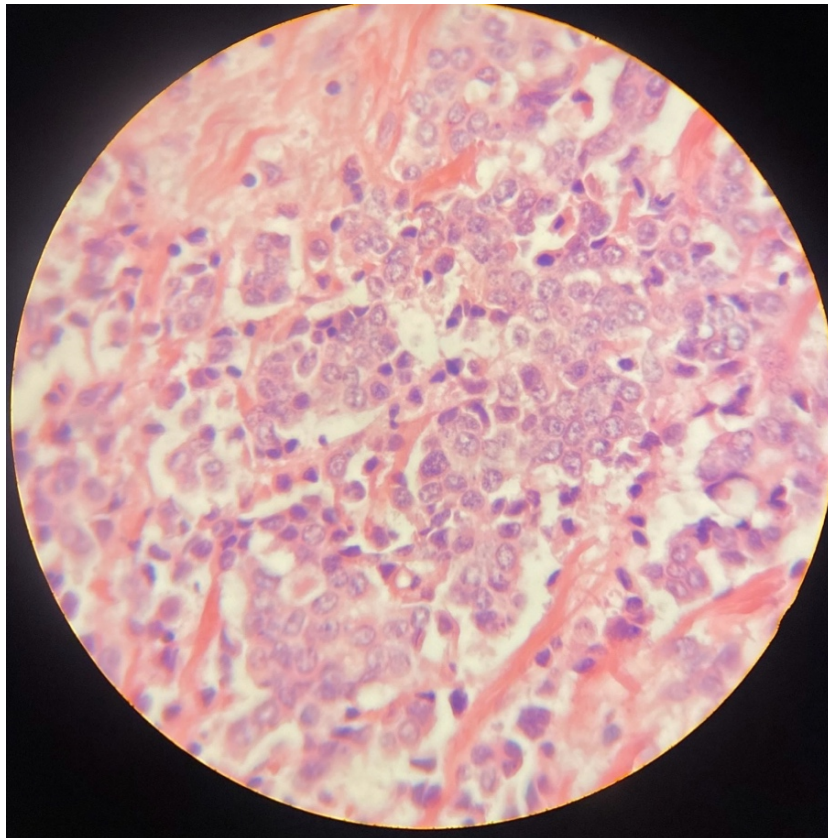


Figura 23: Representação de carcinoma de tipo NST, com infiltração moderada. Neste registo fotográfico numa ampliação de 40x, é possível observar as células cancerígenas do tumor, rodeadas de células linfocitárias.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS DE CARCINOMAS DE TIPO LOBULAR E DE TIPO NST

Após análise dos dados clínicos recolhidos com o auxílio da plataforma de linguagem R, foi possível obter os seguintes resultados:

Nos 30 casos de carcinoma lobular, a média das idades das mulheres participantes neste estudo, foi de 61 anos. As idades encontravam-se compreendidas entre o mínimo de 39 anos e o máximo de 83 anos. Por outro lado, nos carcinomas NST a média das idades das pacientes foi de 57 anos. A idade mínima observada foi de 35 anos de idade e a máxima de 81 anos.

Relativamente à sobrevivência das pacientes com carcinoma lobular, apenas se registou um falecimento, estando 29 das participantes ainda vivas até à data da recolha dos dados

clínicos. No que concerne a sobrevivência das 30 pacientes com carcinoma de tipo NST, todas elas se mantinham vivas no momento da recolha dos dados clínicos.

No que respeita à presença de metastização, em 14 (47%) das participantes não se identificaram metástases, em 14 estava referida no processo clínico a suspeita de uma possível metastização (47%) e 2 (6%) pacientes confirmou-se a existência de metastização. Nos carcinomas de tipo NST identificaram-se 19 (63%) casos em que não se verificou qualquer tipo de metástase e os restantes 11 (37%) não dispunham de informação referente à metastização. Nenhum dos tumores de tipo NST demonstrou ter metastização.

Em relação à recidiva local, 17 casos (57%) não recidivaram, em 12 (40%) houve suspeitas quanto a este parâmetro e somente em 1 (3,3%) caso se revelou existir recidiva. Por outro lado, nas neoplasias de tipo NST, 12 (40%) casos foram registados com ausência de recidiva, 16 (53%) casos com incerteza e 2 (6,7%) neoplasias revelaram sinais de recidiva.

A respeito da expressão dos RH nos carcinomas lobulares, de acordo com registos, a maioria (11) das neoplasias tinham uma expressão de 95% para ambos recetores. Por outro lado, com uma expressão de 100% de RE e 0% de RP, foram identificados 2 casos. Do mesmo modo, com uma expressão de 100% para RE e RP, foram identificados 3 carcinomas, como se verifica através da figura 24.

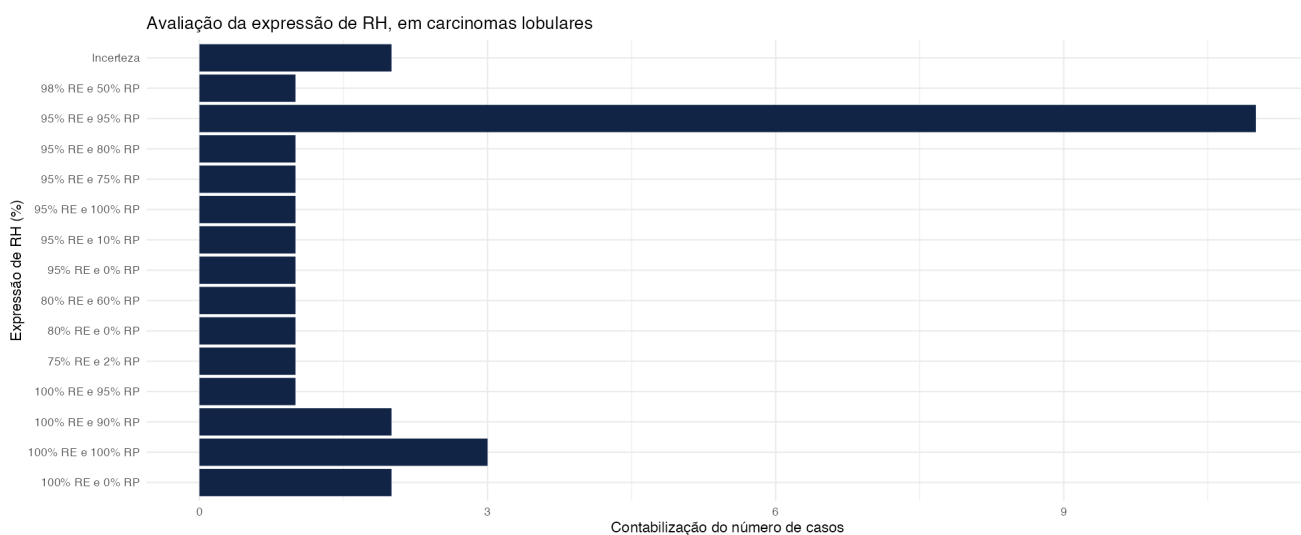


Figura 24: Gráfico representativo da expressão de RH dos 30 carcinomas lobulares.

Na avaliação da expressão dos RH dos carcinomas de tipo NST, foram observados diversos valores, como se verifica na figura 25. Em maior número, 11 (37%) neoplasias malignas foram identificadas pela expressão de 100% RE e 100% RP. Seguidamente, 5 (17%) casos foram identificadas pela expressão de 95% RE e RP 95% e 3 (10%) carcinomas com 100% de expressão de RE e 0% RP.

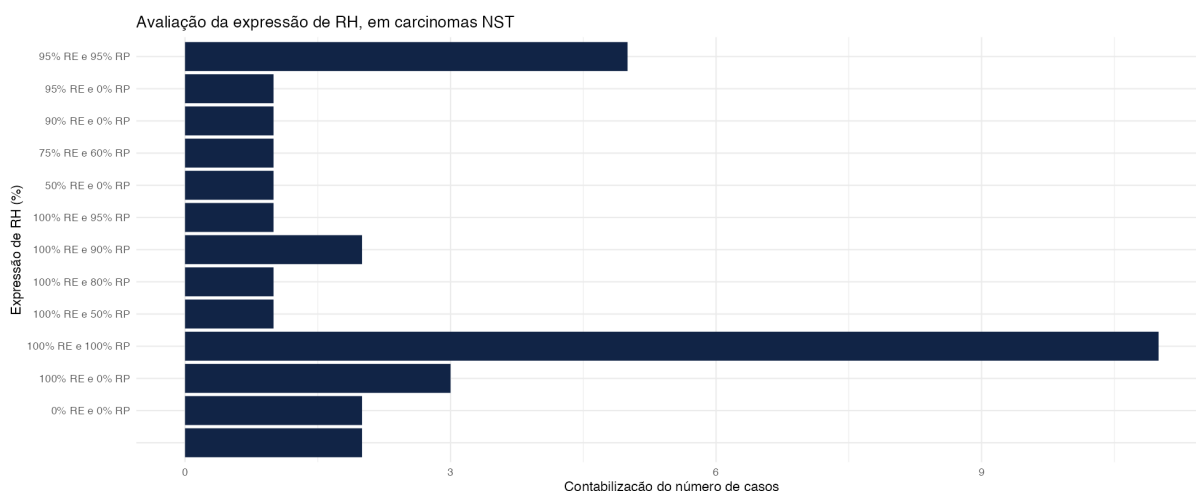


Figura 25: Gráfico representativo da expressão de RH dos 30 carcinomas de tipo NST.

4.2.1 AVALIAÇÃO GERAL DA INFILTRAÇÃO PERITUMORAL E INTRATUMORAL E NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE KI-67, ENTRE CARCINOMAS LOBULARES E CARCINOMAS DE TIPO NST

Nos 30 casos de carcinoma lobular, foi registado um caso em que não se identificou qualquer tipo de infiltração peritumoral e 22 casos em que não estava disponível este registo, pois nos relatórios mais antigos este dado não foi avaliado. Foram identificados 4 carcinomas com presença de infiltração ligeira e a infiltração moderada, foi identificada em 3 casos clínicos. Por outra lado, nos carcinomas de tipo NST, 13 (43%) dos 30 casos não tinham infiltração peritumoral. Por outro lado, 17 (57%) carcinomas tinham infiltração de LITs ligeira. No que respeita tumores sem informação referente à infiltração peritumoral, ou mesmo infiltração de tipo moderado, não foi registado qualquer caso clínico.

Relativamente à infiltração intratumoral em carcinomas lobulares, foram confirmadas 5 (17%) casos sem este tipo de infiltração e em 18 (60%) neoplasias não havia qualquer avaliação deste dado. Em relação à infiltração de tipo ligeiro, foram identificadas 5 casos (17%). Em 2 casos foi identificado um infiltrado moderado.

Relativamente à infiltração intratumoral dos carcinomas de tipo NST, 14 (47%) casos não revelaram este tipo de infiltrado e as restantes 16 (53%) neoplasias demonstraram infiltração de tipo intratumoral ligeira. Ademais, não foram identificados casos sem informação referente ao infiltrado linfoide, nem casos como infiltração moderada.

Na avaliação da expressão do biomarcador Ki-67, nos casos de carcinoma lobular, para expressões inferiores a 15% foram registados 22 casos. No que respeita expressões da proteína iguais a 15%, foram identificados apenas 3 carcinomas de tipo lobular. Por fim, em referência a expressões acima dos 15% foram identificados 5 tumores malignos. No entanto, um total de 7 pacientes não possuíam registo da avaliação do parâmetro anteriormente referenciado.

A expressão da proteína Ki-67, foi também avaliada conforme a percentagem de expressão apresentada por cada tumor de tipo NST. Assim, para expressões com valores inferiores a 15%, foram identificados 6 carcinomas de tipo NST. Por outro lado, para expressões iguais a 15%, foram observados 5 casos. Para finalizar, com expressões superiores a 15%, foram registados 19 casos.

4.3 AVALIAÇÃO GERAL DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE O BIOMARCADOR KI-67 E LITs, COM OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS NOS 60 CARCINOMAS

A fim de avaliar de forma generalizada os parâmetros clínicos de interesse e as restantes variáveis de interesse, foi realizada uma análise estatística dos 60 carcinomas em simultâneo. Nesta análise foram estabelecidas correlações entre as variáveis de relevância: infiltração peritumoral, infiltração intratumoral e expressão de Ki-67, juntamente com a idade, estado de recidiva e expressão de RH. Para cada correlação foi determinado o valor de coeficiente de correlação, assim como o respetivo gráfico de dispersão.

4.3.1 AVALIAÇÃO DOS DADOS RELATIVOS À ANÁLISE DA INFILTRAÇÃO PERITUMORAL COM OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS, NOS 60 CARCINOMAS

No que concerne a correlação entre a infiltração peritumoral e a idade dos 30 carcinomas de tipo lobular e os 30 carcinomas de tipo NST, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de -0.233, figura 26. Deste modo, é possível afirmar a existência de uma correlação negativa fraca entre as duas variáveis em estudo. De acordo com o valor anteriormente referido,

é esperado que valores de infiltração peritumoral reduzidos se encontrem associados a idades mais elevadas.

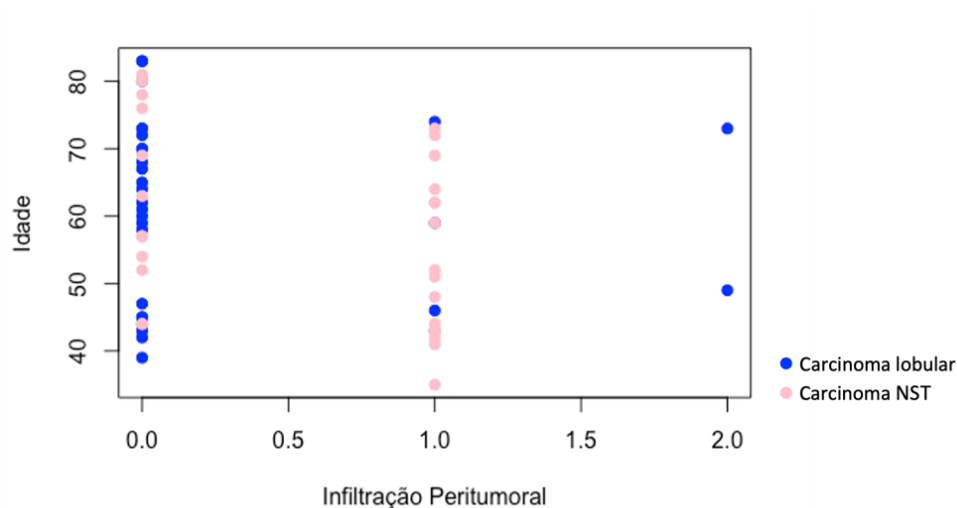


Figura 26: Relação entre a infiltração peritumoral e a idade nos 60 carcinomas. Relação entre a ausência, a presença ligeira ou moderada da infiltração peritumoral e a idade das 60 pacientes com carcinoma lobular ou NST.

Em referência à correlação entre a infiltração peritumoral e o estado de recidiva das 60 pacientes com carcinoma lobular ou NST, o valor de coeficiente de correlação determinado foi de 0.195, figura 27. Assim, é viável afirmar que existe uma correlação positiva fraca e, portanto, espera-se que valores de infiltração peritumoral reduzidos se associem à ausência de recidiva.

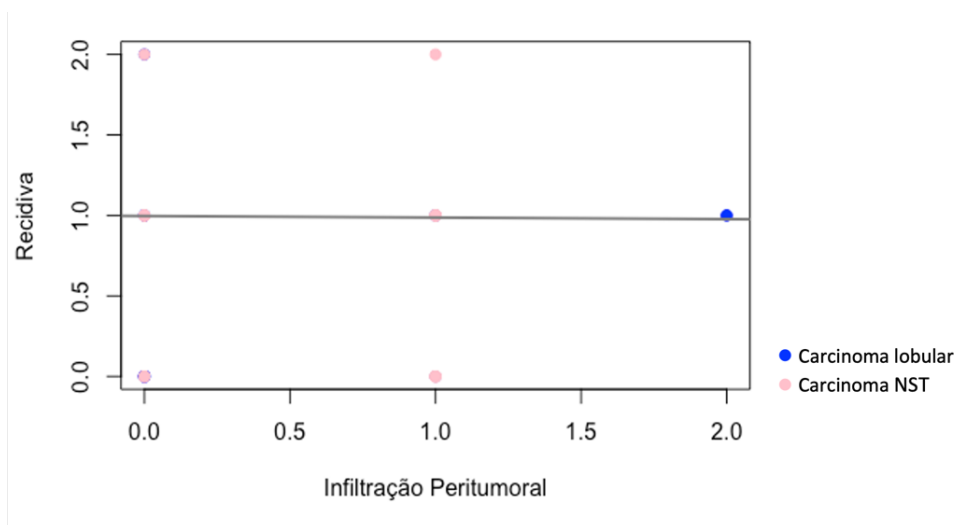


Figura 27: Relação entre a infiltração peritumoral e o estado de recidiva nos 60 carcinomas. Associação entre a ausência, presença ligeira ou moderada de infiltração

peritumoral e a ausência, presença ou incerteza de recidiva, nas 60 pacientes com carcinoma lobular ou NST.

A respeito da correlação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, também foi realizada uma análise estatística semelhante (figura 28). Deste modo, foi determinado um coeficiente de correlação de 0.015. Assim, é plausível afirmar que não existe correlação entre as duas variáveis estudadas, entre os dois carcinomas estudados.

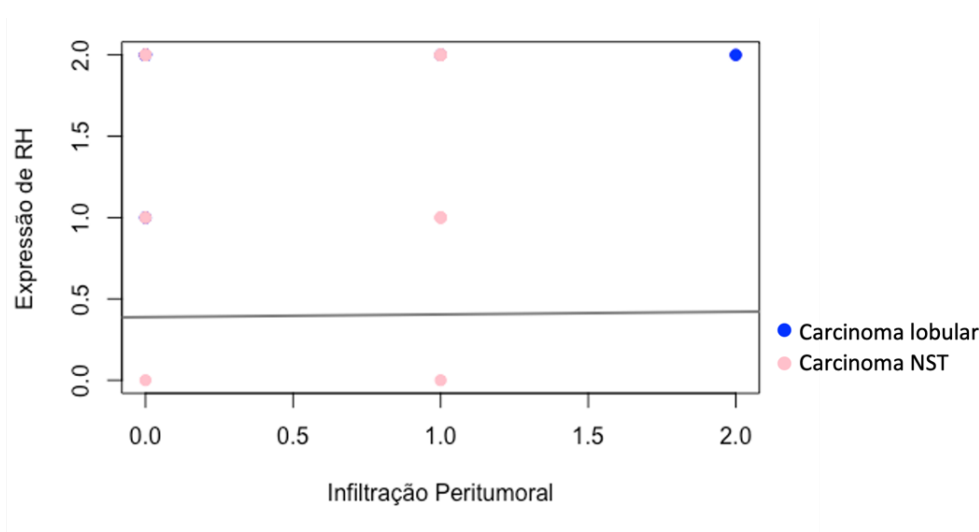


Figura 28: Relação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, em 60 carcinomas. Relação entre a ausência, presença ligeira ou moderada de infiltração peritumoral e a expressão de RH: ambos RH negativos, RH positivo e RH negativo e ambos RH positivos, nas 60 pacientes com carcinoma lobular ou NST.

No que respeita a correlação entre a infiltração intratumoral e a idade, foi realizada uma análise estatística similar, figura 29. Assim, foi obtido um valor de coeficiente de correlação de -0.288, revelando assim a presença de uma correlação fraca negativa. Deste modo, é previsível que valores de infiltração intratumoral reduzidos estejam associados a idades mais avançadas.

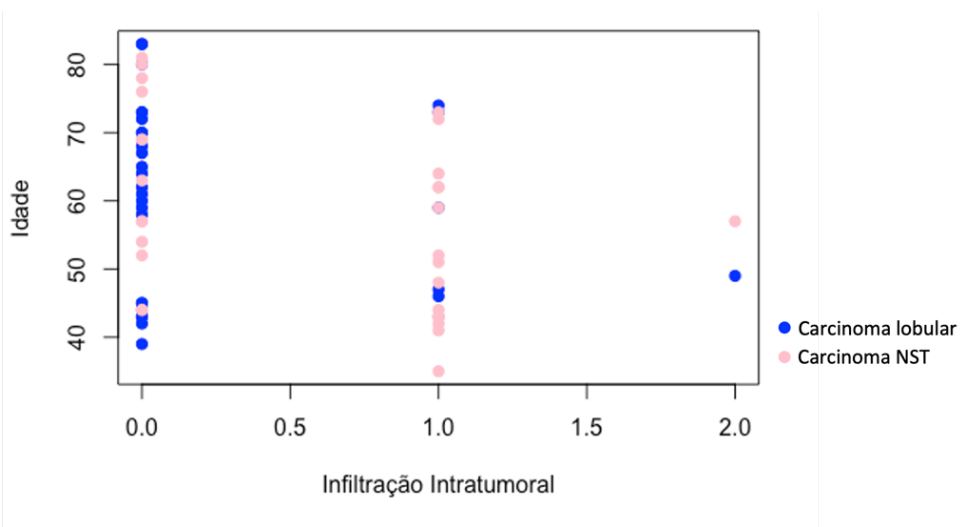


Figura 29: Relação entre a infiltração intratumoral e a idade, em 60 carcinomas. Associação entre a ausência, presença ligeira ou moderada de infiltração intratumoral e a idade, das 60 pacientes com carcinoma lobular e NST.

No que se refere à correlação de infiltração intratumoral e a recidiva, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de 0.246, figura 30. Desta forma, é viável afirmar que existe uma correlação fraca negativa, sendo que valores de infiltração intratumoral reduzidos se encontram associados à ausência de recidiva.

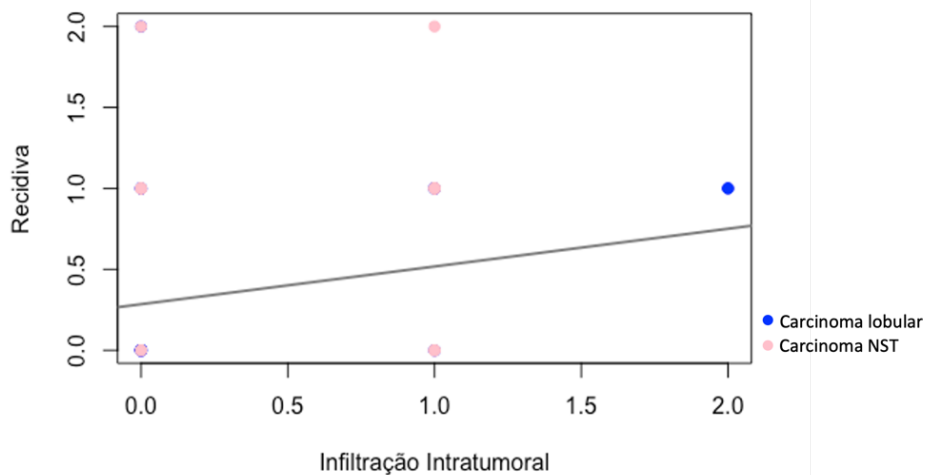


Figura 30: Relação entre a infiltração intratumoral e a recidiva, nos 60 carcinomas. Associação entre a ausência, presença ligeira ou moderada de infiltração intratumoral e o estado de recidiva, das 60 pacientes com carcinoma lobular ou NST.

Em relação à correlação entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH foi determinado um valor de coeficiente de correlação de 0.015, figura 31. De acordo com o valor anteriormente referido, é possível referir que não existe correlação entre as variáveis estudadas.

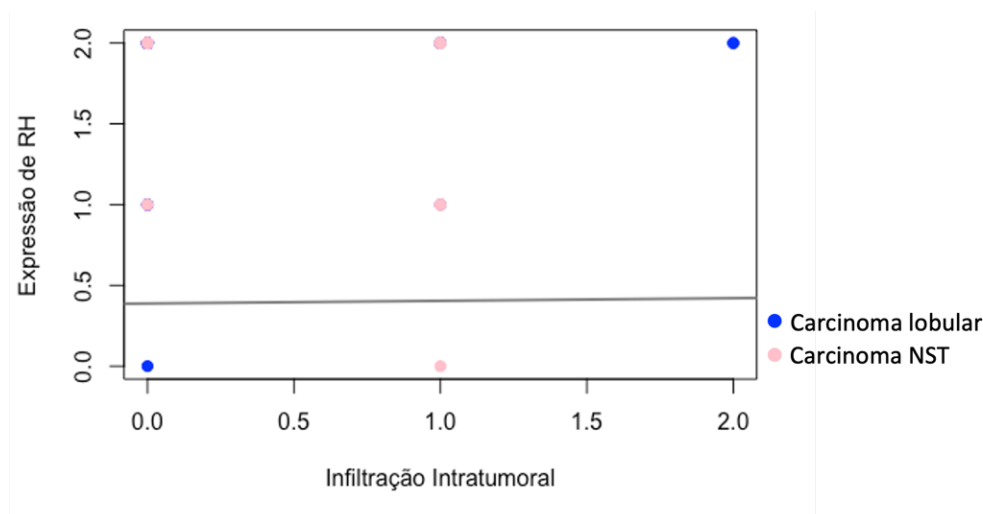


Figura 31: Relação entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH, nos 60 carcinomas. Associação entre a ausência, presença ligeira ou moderada de infiltração intratumoral e a expressão de RH: ambos RH negativos, RH positivo e RH negativo e ambos RH positivos, das 60 pacientes com carcinoma lobular ou NST.

Já no que respeita a correlação entre a expressão de Ki-67 e a idade das 60 pacientes, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de 0.034, figura 32. De acordo com o valor anteriormente apresentado, é possível afirmar que não existe qualquer tipo de correlação entre as variáveis estudadas.

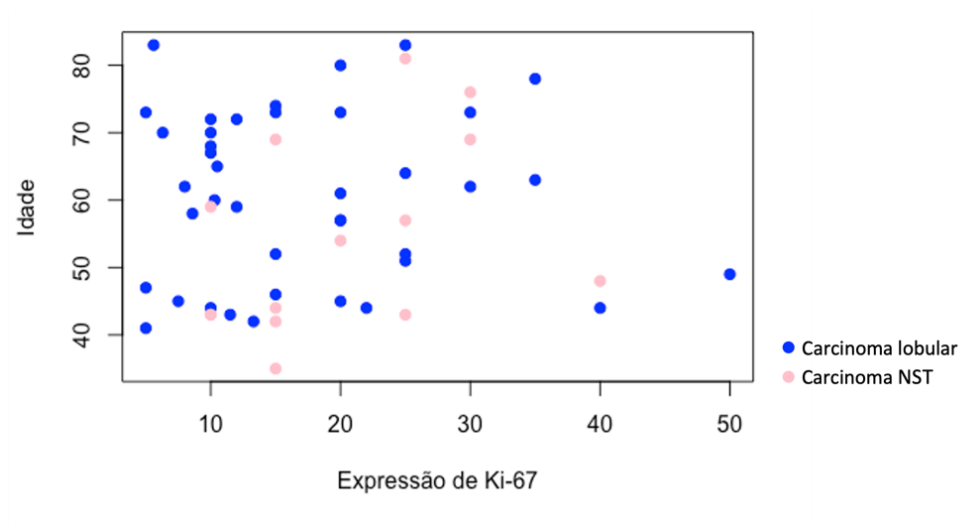


Figura 32: Relação entre a expressão de Ki-67 e a idade das 60 participantes.

Em referência à correlação entre a expressão de Ki-67 e o estado de recidiva das 60 pacientes com carcinoma lobular e NST (figura 33), foi determinado um valor de coeficiente de

correlação, sendo este de 0.245. Demonstrando a existência de uma correlação positiva, esperando-se que valores de expressão de Ki-67 reduzidos, se associem à ausência de recidiva.

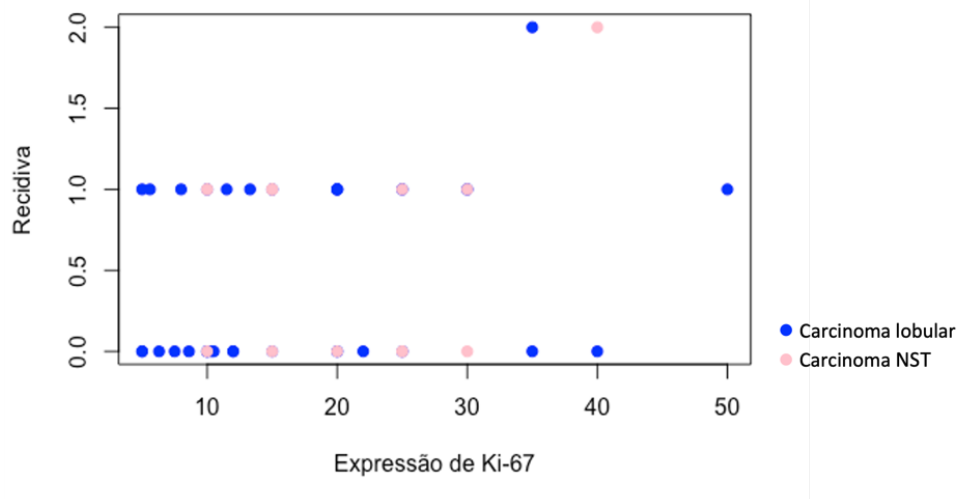


Figura 33: Relação entre a expressão de Ki-67 e a recidiva, dos 60 carcinomas. Associação entre a expressão de Ki-67 e o estado de recidiva: ausência, presença ou incerteza, nos 60 carcinomas de tipo lobular e de tipo NST.

Relativamente à correlação de expressão de Ki-67 e o estado de infiltração peritumoral dos 60 carcinomas, foi obtido um valor de coeficiente de correlação de 0.158, figura 34. Deste modo, segundo o valor obtido é plausível afirmar que existe uma correlação positiva fraca, entre as duas variáveis. Desta forma, é esperado que valores de expressão de Ki-67 reduzidos estejam associados a valores de infiltração peritumoral igualmente reduzidos.

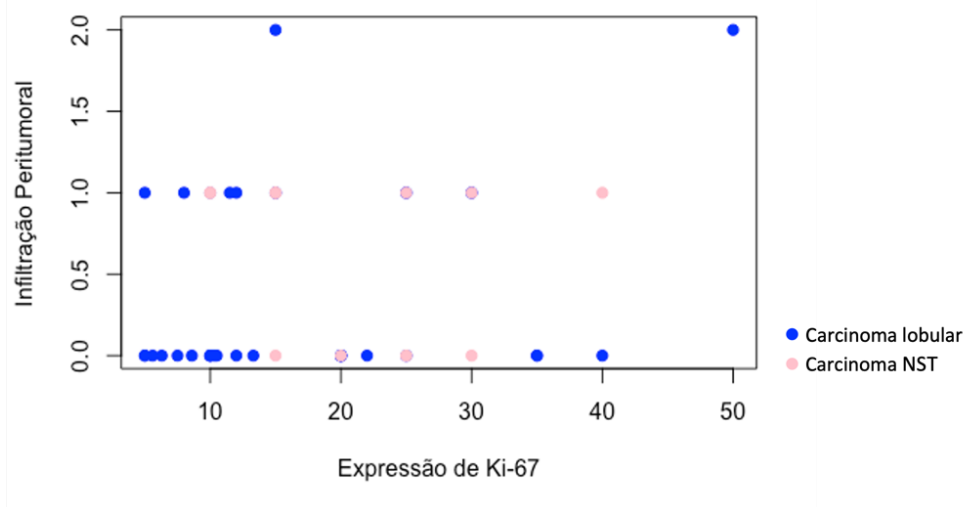


Figura 34: Relação da expressão de Ki-67 e a infiltração peritumoral, dos 60 carcinomas. Associação entre a expressão de Ki-67 e o estado de infiltração peritumoral: ausência, presença ligeira ou moderada, nos 60 carcinomas de tipo lobular e de tipo NST.

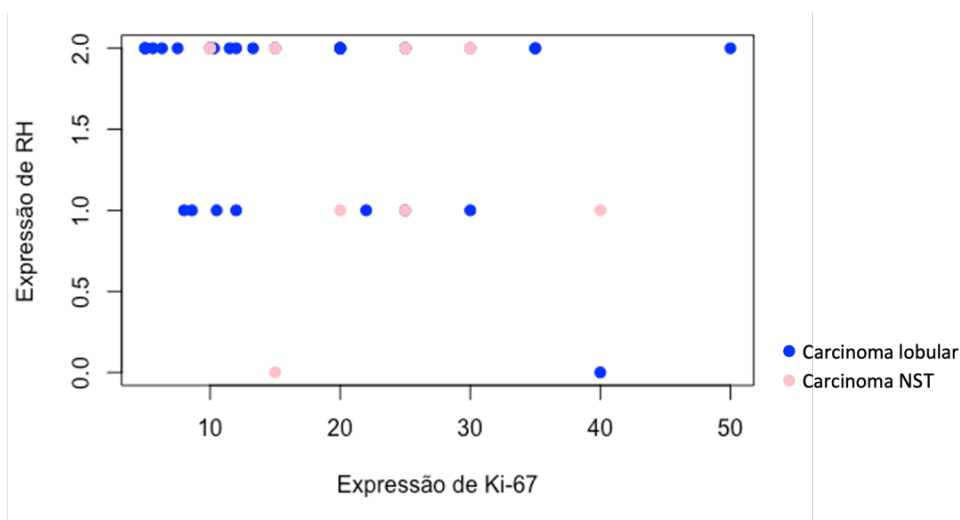


Figura 36: Relação entre a expressão de Ki-67 e a expressão de RH, dos 60 carcinomas. Relação entre os valores de expressão de Ki-67 e os valores de RH, nos 60 carcinomas de tipo lobular e de tipo NST.

4.3.1.1 ASSOCIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO PERITUMORAL E INTRATUMORAL E EXPRESSÃO DE KI-67 COM OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS, EM TUMORES LOBULARES E DE TIPO NST

Tendo em consideração, os dados estatísticos analisados, foram realizadas várias associações entre os parâmetros de foco deste estudo: infiltração peritumoral e intratumoral e expressão de Ki-67, com os restantes dados clínicos: idade, recidiva e expressão de RH, de cada tumor

4.3.1.2 ASSOCIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO PERITUMORAL COM OS RESTANTES DADOS CLÍNICOS EM CARCINOMAS LOBULARES E EM CARCINOMAS DE TIPO NST

Procedendo ao estudo da infiltração peritumoral com os restantes dados clínicos, foram estabelecidas diversas relações. Primeiramente, correlacionou-se a infiltração peritumoral com a idade das doentes com carcinoma lobular, como se verifica na figura 37. Através do estudo estatístico, foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson, sendo este de -0.082. Segundo o valor apresentado anteriormente, é possível referir que não existe correlação entre a infiltração peritumoral e a idade das 30 pacientes com carcinoma lobular, inseridas neste estudo.

No decurso da análise estatística, foi averiguada a tabela suplementar B.1. Consequentemente foram contempladas as idades nos diferentes estados de infiltração peritumoral. Assim sendo, com a presença de apenas um caso, em que não existiam indícios de infiltração, a idade observada foi de 47 anos. Por outro lado, em pacientes que não dispunham de qualquer tipo de informação relativamente à infiltração, a média das idades foi de 61 anos, estando esta compreendida entre os 39 e 83 anos. Em termos de infiltração peritumoral ligeira, a média das idades observadas foi de 56 anos, sendo os 43 anos de idade a idade mínima e os 74 anos a idade máxima. Por fim, na análise da infiltração peritumoral moderada, a média das idades averiguada foi de 67 anos num mínimo de 49 anos e num máximo de 80 anos.

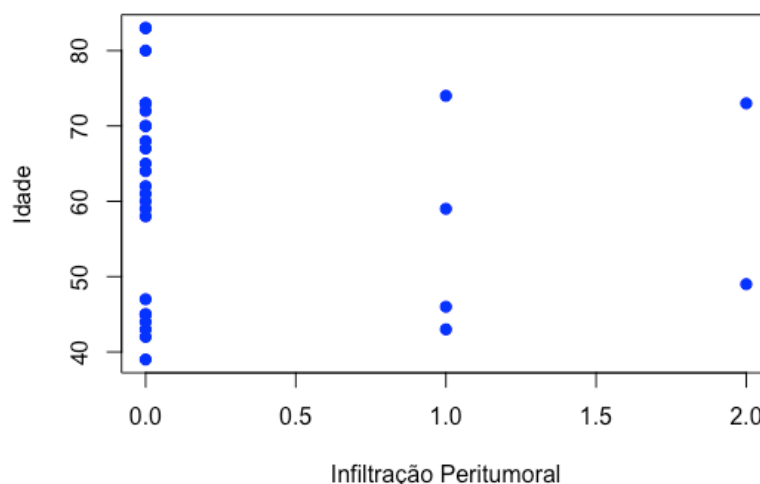


Figura 37: Relação entre a infiltração peritumoral e a idade em carcinomas lobulares. Associação de acordo com a sua ausência, escassez, incerteza, presença ligeira ou moderada de infiltração peritumoral e a idade das 30 pacientes com tumores de tipo lobular.

Dando continuidade à análise estatística, no que concerne à infiltração de tipo peritumoral em carcinomas de tipo NST, foram estabelecidas 3 associações: idade, recidiva e expressão dos RH.

Primeiramente, na relação entre a infiltração e a idade, figura 38, foi estabelecido um valor de coeficiente de correlação sendo este de -0.357. Deste modo, é possível afirmar que existe uma correlação negativa fraca entre a infiltração peritumoral e a idade das 30 pacientes com

carcinoma NST. Além disso, é esperado que valores de infiltração peritumoral reduzidos estejam associados a idades mais avançadas.

Após análise da tabela suplementar B.2 resultante da análise estatística, a média da idade determinada das 13 pacientes que não possuíam infiltração de tipo peritumoral, foi de 62 anos estando esta compreendida entre os 44 e 81 anos. Por outro lado, a média das idades das restantes 17 pacientes com indícios de infiltração peritumoral ligeira, foi de 53 anos. Além disso foi de igual modo determinado o mínimo e o máximo das idades das 17 pacientes, da qual 35 anos de idade correspondentes ao mínimo e 73 anos ao máximo das idades. Como supramencionado, não foram identificados casos clínicos sem informação referente à infiltração peritumoral, bem como tumores com indicação de infiltração moderada.

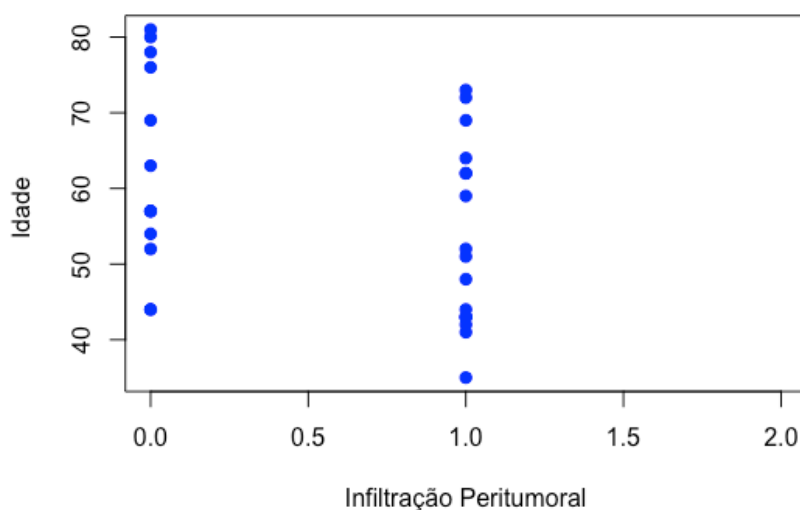


Figura 38: Relação entre a infiltração peritumoral e a idade, em tumores de tipo NST. Relação entre a ausência ou presença ligeira da infiltração peritumoral e a idade, das 30 pacientes com tumor de tipo NST.

Do mesmo modo, a infiltração peritumoral foi submetida a uma relação juntamente com a ausência, presença, ou incerteza de recidiva, figura 39, nos carcinomas lobulares. No seguimento da análise estatística, foi observada uma correlação positiva fraca entre a infiltração peritumoral e o estado de recidiva das 30 pacientes, segundo o valor apresentado do coeficiente de correlação de Pearson, 0.338. Assim, é esperado que valores de infiltração peritumoral reduzidos, associem-se à ausência de recidiva.

Após averiguação da tabela suplementar B.1, apenas 1 caso revelou recidiva, não tendo esta informação relativamente à infiltração peritumoral. Por outro lado, dos 17 casos que não possuíam recidiva, 15 (88%) não dispunham do mesmo modo de informação relativamente à infiltração peritumoral. Dos restantes carcinomas, 1 (5,9%) tumor revelou evidências de uma ligeira infiltração peritumoral e outra situação (5,9%) demonstrou indícios de infiltração moderada. Das 12 neoplasias em que não foi possível obter informação relativamente à recidiva, 6 (50%) também não dispunham de informação relativamente a este tipo de infiltração. Num dos 30 tumores (8,3%) não havia sinais de infiltração. A finalizar, 3 dos 30 carcinomas lobulares mostravam sinais de infiltração ligeira e 2 tumores (17%) exibiam índices de infiltração moderada.

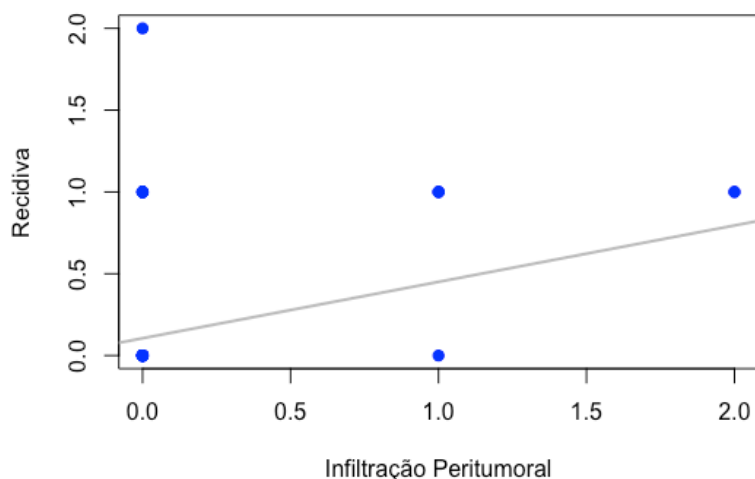


Figura 39: Relação entre a infiltração peritumoral e a recidiva, em tumores lobulares. Comparação entre a infiltração peritumoral e a ausência, incerteza ou presença de recidiva analisada nas 30 participantes com carcinoma lobular.

Quando analisada a associação entre a infiltração peritumoral e a recidiva em pacientes com tumor NST (figura 40), o valor de coeficiente de correlação determinado foi de -0.038 . Assim, de acordo com o valor anteriormente apresentado é plausível garantir que não existe correlação entre a infiltração peritumoral e o estado de recidiva dos 30 casos de carcinoma de tipo NST estudados.

No seguimento da análise estatística, segundo os dados apresentados na tabela B.2, 2 casos revelaram indícios de recidiva dos quais 1 registo (50%) não possuía infiltração peritumoral e

o restante caso (50%) revelava sinais de infiltração peritumoral. No que respeita a ausência de recidiva, um total de 12 carcinomas foram identificados. Assim, em 7 casos (58%) foi identificada infiltração peritumoral ligeira e os restantes 5 registos (42%), não demonstraram quaisquer sinais de recidiva. Por fim, relativamente à incerteza de risco de recidiva, quer por carência de dados clínicos, quer por dificuldade de diagnóstico, 16 carcinomas foram identificados na totalidade. Deste modo, 56% dos 16 carcinomas NST foram assinalados pela presença de indícios de infiltração peritumoral ligeira. Por outra via, as restantes 7 neoplasias malignas (44%), não apresentaram sinais de infiltração de tipo peritumoral. Como referido anteriormente, não foram observados casos clínicos com carência de informação referente à infiltração peritumoral, bem como casos com infiltração moderada.

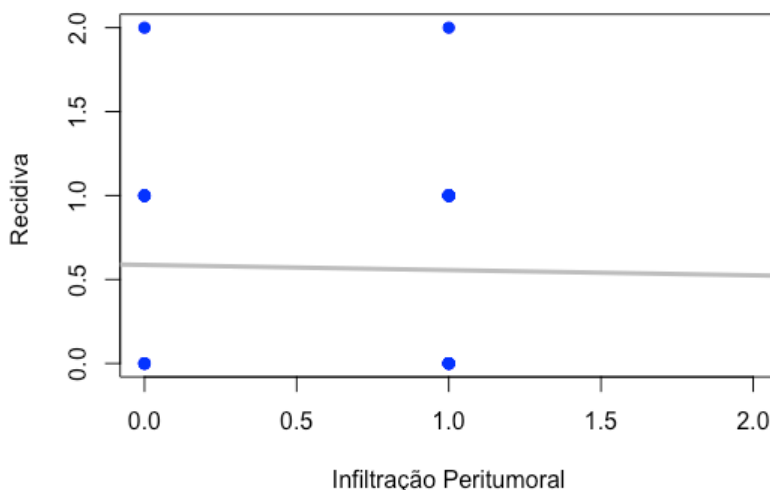


Figura 40: Relação entre a infiltração peritumoral e a recidiva, em tumores de tipo NST. Associação entre a ausência ou presença ligeira da infiltração peritumoral e a ausência, presença, risco ou incerteza de recidiva nas 30 pacientes com tumor de tipo NST.

Em continuidade da análise estatística, a infiltração de tipo peritumoral foi relacionada com a expressão dos RH, em carcinomas lobulares. Deste modo, o valor determinado para o coeficiente de correlação foi de 0.070. Assim, não é possível identificar uma correlação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, nos 30 carcinomas de tipo NST aqui estudados, figura 41.

Em concordância com a tabela suplementar B.1 explorada, os dados da infiltração peritumoral e a expressão de RH demonstravam uma grande diversidade. Os dados observados

na relação estabelecida entre os dois parâmetros, apresentaram uma grande diversidade, pelo que foram reportados aqui apenas parte destes, informações adicionais podem ser encontradas na tabela suplementar. No entanto, dos 3 tumores malignos de infiltração moderada, 1 destes correspondia a uma expressão de 100% de RE e 90% de RP, 1 carcinoma com expressão de 80% de RE e 60% de RP e um outro caso com expressões de RH desconhecidas. Também na infiltração peritumoral ligeira foram observadas 3 situações, tendo uma delas expressão de 100% para ambos os RH, outra neoplasia com expressão de 95% de RE e 10% de RP e finalmente, um carcinoma com expressão de 100% de RE e 95% de RP.

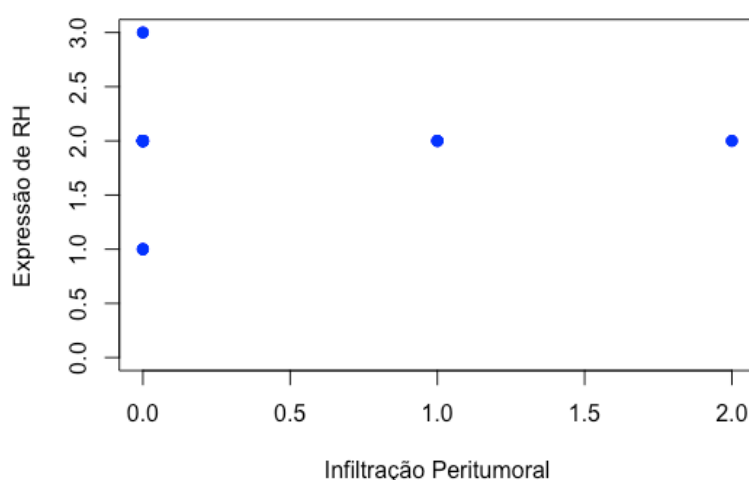


Figura 41: Relação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, em tumores lobulares. Associação entre a ausência, escassez, incerteza, ou presença ligeira a moderada de infiltração peritumoral, observada nas 30 pacientes com tumor lobular, e a expressão dos RH (em %).

Respetivamente à infiltração peritumoral e à variabilidade de dados de expressão dos RH, foi ajustado um vínculo entre estes dois fatores (figura 42). Tendo em consideração esta análise, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de correlação de 0.026. Neste sentido, é possível demonstrar que não existe correlação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, nos 30 casos de carcinoma NST estudados.

Recorrendo a uma análise estatística similar à aplicada nos parâmetros supramencionados, foram detalhados do mesmo modo os valores entre a associação estabelecida entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, nos 30 carcinomas de tipo lobular. No entanto, uma grande variabilidade de dados foi recolhida após análise da tabela suplementar resultante da associação, pelo que foram ressaltados apenas os dados com maior significância, sendo possível obter mais

informação através da tabela suplementar B.2. Por conseguinte, destacaram-se 11 situações com expressões de 100% tanto para RE, como para o RP. Assim, 7 dos 11 carcinomas (64%), revelavam sinais de infiltração peritumoral ligeira. Em contrapartida, 4 dos casos (36%) não possuíam qualquer indício de infiltração peritumoral. No mesmo seguimento, no que respeita a expressões de 100% de RE e 0% RP, 3 registos foram observados. Deste modo, 2 carcinomas (67%) dispunham de infiltração peritumoral ligeira e apenas 1 caso (33%), não possuía qualquer sinal de infiltração. Por fim, 5 neoplasias malignas foram identificadas de acordo com expressões de 95% de ambos os recetores. Neste grupo, em 3 dos carcinomas NST (60%) identificou-se infiltração ligeira, os restantes 2 casos (40%), não demonstraram qualquer indício de infiltração peritumoral.

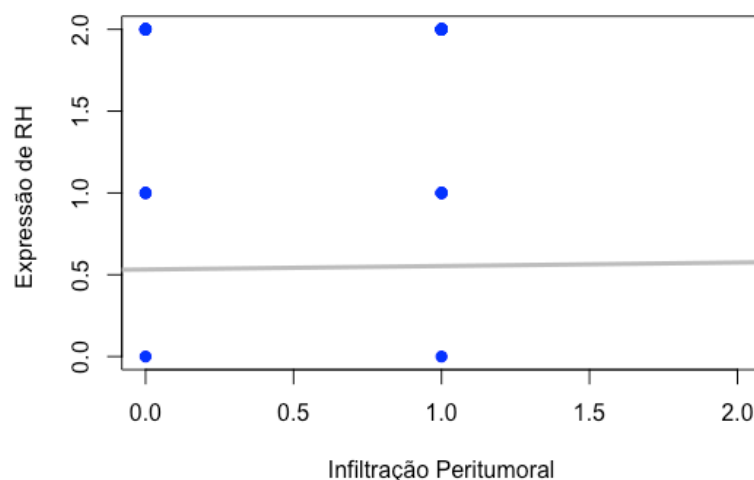


Figura 42: Relação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, em tumores de tipo NST. Associação entre a ausência ou presença ligeira de infiltração peritumoral, presente em 30 carcinomas NST, e a expressão dos RH (em %).

Com o intuito de completar a análise estatística referente a infiltração peritumoral das 60 pacientes com carcinoma da mama, foi realizado um teste de qui-quadrado de Pearson, entre os carcinomas de tipo lobular e de tipo NST. O valor de p-value determinado após a análise estatística foi de 0,073. Assim, embora o valor de p-value esteja próximo de 0,05, não é possível afirmar a existência de significância entre a associação da variável, entre os dois tipos de carcinoma.

4.3.1.3 ASSOCIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO INTRATUMORAL COM OS RESTANTES

DADOS CLÍNICOS EM CARCINOMAS LOBULARES E CARCINOMAS NST

Foram estabelecidas relações semelhantes entre a infiltração de tipo intratumoral e os restantes dados clínicos de relevância em carcinomas lobulares, figura 43. Primeiramente, na análise entre a infiltração e a idade das pacientes foi determinado um valor de coeficiente de correlação de Pearson de -0.138 . Deste modo, em concordância com o valor anteriormente referido, é possível afirmar que as variáveis estabelecem uma correlação negativa fraca. Neste sentido, é esperado que valores de infiltração intratumoral reduzidos estejam associados a idades mais avançadas.

De acordo com os dados da tabela suplementar C.1 ponderada, a média das idades nos casos em que não existia infiltração intratumoral foi de 63 anos, sendo o mínimo de 43 anos e o máximo de 83 anos. Do mesmo modo, nos casos em que não foi possível obter informação deste tipo de infiltração, a média das idades calculada foi de 60 anos, estando esta compreendida entre os 39 anos e 83 anos. Já a média de idade na infiltração ligeira foi de 60 anos, estando compreendida entre um intervalo de 46 anos e 74 anos de idade. Finalmente, em situações com infiltração moderada a média de idade obtida foi de 65 anos, sendo o mínimo de 49 anos e o máximo de 80 anos.

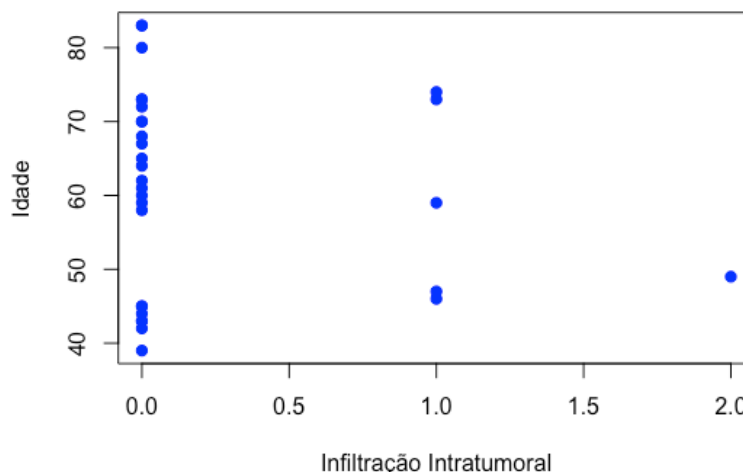


Figura 43: Relação entre a infiltração intratumoral e a idade, em tumores lobulares. Associação entre a ausência, incerteza, ou presença ligeira a moderada de infiltração intratumoral, em 30 tumores de tipo lobular, com a idade das participantes.

Em última análise, nos 30 carcinomas de tipo NST, os dados da infiltração intratumoral foram de igual modo associados à idade, recidiva e à expressão dos RH. Inicialmente a infiltração intratumoral foi relacionada com a idade das 30 pacientes com carcinoma NST, figura 44. De acordo com a associação estabelecida, o valor de coeficiente de correlação identificado foi de -0.376. Deste modo, é razoável atestar a presença de uma correlação negativa fraca entre a infiltração intratumoral e a idade das 30 pacientes com carcinoma de tipo NST. Contudo, segundo o valor supramencionado é esperado que em determinados casos valores de infiltração intratumoral reduzidos estejam associados à presença de recidiva.

Tendo em conta a análise estatística da tabela suplementar C.2, a média das idades das pacientes que não dispunham de sinais de infiltração intratumoral foi de 64 anos, estando esta compreendida entre um intervalo de 44 e 81 anos. Por outro lado, a média das idades das pacientes que possuíam infiltração ligeira foi de 51 anos, sendo a idade mínima de 35 anos e a máxima de 73 anos. Segundo a observação dos registos clínicos, não foram identificados casos clínicos sem informação clínica a nível da infiltração intratumoral, bem como tumores com infiltração intratumoral de tipo moderado.

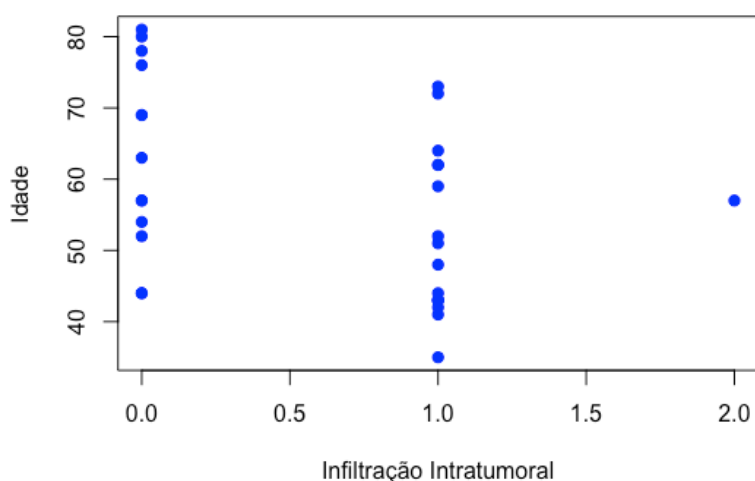


Figura 44: Relação entre a infiltração intratumoral e a idade, em tumores de tipo NST. Associação entre a ausência e presença ligeira da infiltração intratumoral e a idade das 30 pacientes com carcinoma de tipo NST.

No que respeita a infiltração intratumoral e a recidiva em carcinomas lobulares, foram realizados testes estatísticos para determinar a correlação das duas variáveis apresentadas.

Assim, foi identificado um coeficiente de correlação de 0.327, demonstrando assim uma correlação positiva fraca entre as duas variáveis estudadas (figura 45), pelo que é expectável que valores de infiltração intratumoral reduzidos estejam associados à ausência de recidiva.

Através da decomposição da tabela suplementar C.1, apenas um caso com recidiva foi identificado, não tendo o mesmo informação relativamente à infiltração intratumoral. Dos 17 casos sem presença de infiltração intratumoral, 11 destes (65%) não dispunham de informação relativamente à recidiva. Por outro lado, 4 (24%) dos 17 carcinomas, não evidenciavam sinais de infiltração, uma neoplasia (5,9%) revelou infiltração de tipo ligeira e outro tumor maligno (5,9%) exibia indícios de infiltração intratumoral moderada. Ademais, 12 dos tumores malignos não possuíam informação relativamente a este achado clínico. Das 12 situações identificadas, 6 não possuíam de igual modo informação no que respeita a infiltração de tipo intratumoral, 4 (33%) revelavam indícios de infiltração intratumoral ligeira, e por fim, 1 neoplasia não revelava possuir infiltração intratumoral. Para finalizar dos 12 carcinomas lobulares sem informação relativa à recidiva, 1 caso demonstrou sinais de infiltração de tipo moderado. Por fim, foi observado um tumor de tipo lobular com recidiva, mas que não tinha informação no que respeita a infiltração intratumoral.

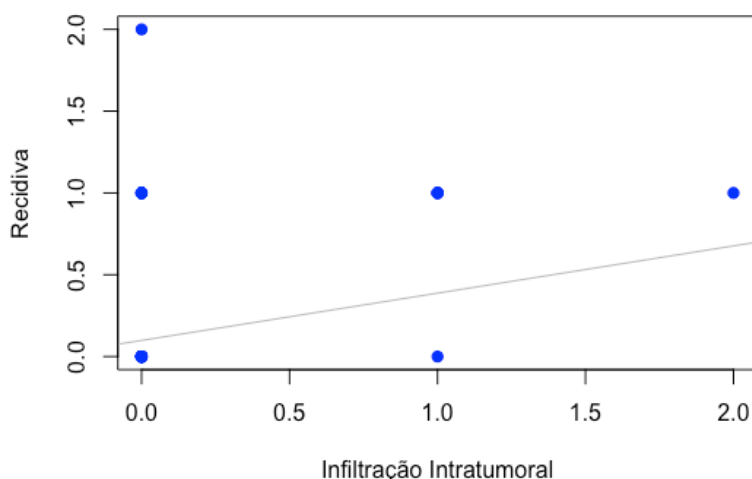


Figura 45: Relação entre a infiltração intratumoral e recidiva, em tumores lobulares. Associação entre infiltração de tipo intratumoral e a ausência, presença ou incerteza de recidiva, registada nas 30 participantes com tumor de tipo lobular.

Seguidamente, foi procurado um vínculo entre a infiltração intratumoral e a recidiva, nos 30 carcinomas de tipo NST (figura 46). Em concordância com a análise estatística determinada foi

identificado um valor de coeficiente de correlação de 0.101. Assim, é plausível concluir que as variáveis estudadas se encontram correlacionadas de forma positiva, embora com fraca correlação.

Analisando a tabela suplementar C.2, foi possível identificar 2 casos dos 30 carcinomas de tipo NST com recidiva, em que em 1 (50%) não tinha sinais de infiltração linfocitária e o outro exibiu (50%) infiltração ligeira. Seguidamente, foram identificados 12 casos clínicos sem recidiva, dos quais 6 (50%) não possuíam infiltração e os restantes 6 (50%), revelavam infiltração ligeira. Por fim, 16 casos foram analisados segundo a incerteza quanto ao risco ou presença de recidiva. Assim, 7 dos carcinomas (44%) observados não tinham infiltração intratumoral. Relativamente aos restantes 9 casos (56%), estes apresentavam infiltração ligeira. A acrescentar à informação anteriormente referida, não foram observadas situações com carência de informação no que respeita a infiltração intratumoral, tal como casos com presença de sinais de infiltração intratumoral moderada.

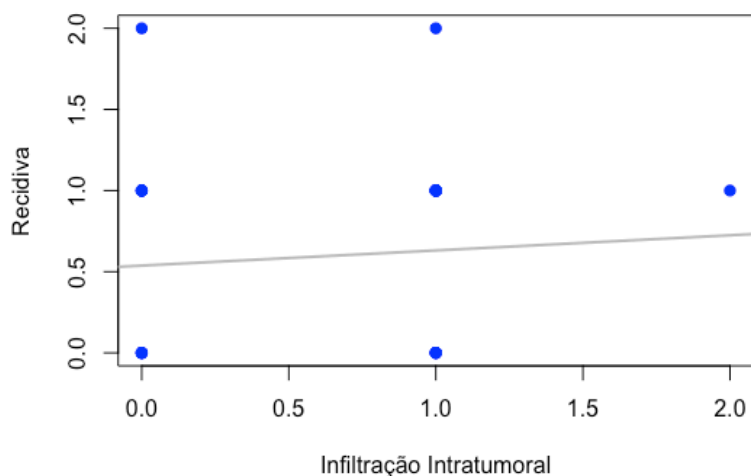


Figura 46: Relação entre a infiltração intratumoral e recidiva, em tumores de tipo NST. Associação entre a ausência ou presença ligeira da infiltração intratumoral e a ausência, presença, risco ou incerteza de recidiva, nos 30 tumores de tipo NST avaliados.

A análise dos carcinomas de tipo lobular deu seguimento ao estudo entre a infiltração intratumoral e a expressão dos RH, figura 47. Segundo a análise efetuada, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de 0.071. Tendo em conta o valor anteriormente apresentado, não é possível identificar correlação entre as duas variáveis analisadas, nos 30 carcinomas de tipo lobular.

Pela apreciação da tabela suplementar C.1, chegou-se à conclusão que existia uma grande variabilidade nos dados entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH, sendo que foram analisados somente os casos mais frequentes, sendo possível obter informações adicionais através da análise da tabela suplementar 5. No entanto, dos 5 casos com presença de infiltração ligeira, 1 dos carcinomas revelou uma expressão de 100% para ambos os recetores, outro caso uma expressão de 100% de RE e 90% de RP, outro tumor maligno com expressão de 100% para RE e 95% para RP. As restantes duas situações revelaram uma expressão de 95% de RE e 10% de RP e 95% de RE e 95% de RP. Já no que respeita a infiltração intratumoral moderada, dois carcinomas foram identificados, sendo que a expressão dos RH correspondia a valores de 80% para expressões de RE e 60% no que respeita a expressão de RP. O caso restante de infiltração intratumoral moderada, não possuía informação relativamente à expressão de RH.

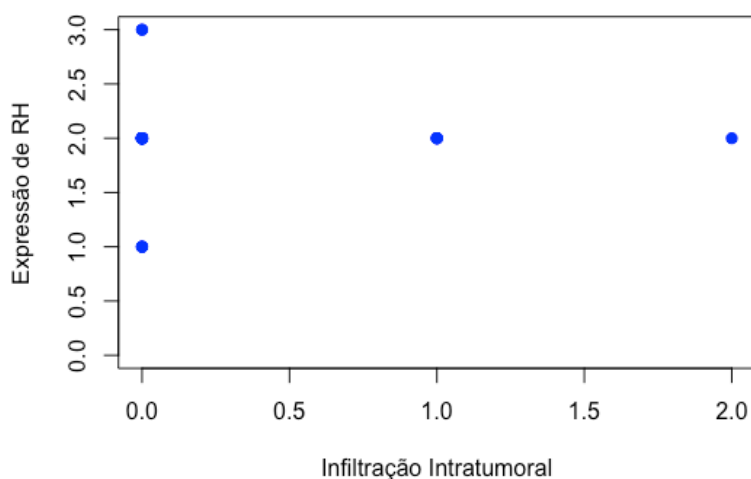


Figura 47: Relação entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH, em tumores lobulares. Associação entre a infiltração linfocitária de tipo intratumoral e a expressão dos RH, de 30 pacientes com tumor lobular.

Na ligação instituída pela análise estatística, entre a infiltração intratumoral e a expressão dos RH em tumores de tipo NST, foi estipulado um valor de coeficiente de correlação de Pearson de 0.060. Deste modo, segundo o valor anteriormente referenciado é plausível afirmar a presença de uma correlação positiva fraca entre os dois parâmetros clínicos (figura 48).

Recorrendo à análise da tabela suplementar C.2, foi possível delinear uma grande variabilidade de valores no que concerne a associação entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH. Deste modo, apenas se fez referência às situações mais frequentes, pelo que

informações adicionais podem ser obtidas através da análise da tabela suplementar C.2. Dos dados obtidos, salientaram-se 11 registos com expressão de 100% para ambos os recetores. Dos 11 carcinomas, 6 (55%) evidenciavam sinais de infiltração ligeira e os restantes 5 (45%), não possuíam indícios de infiltração. Seguidamente, para expressões de 100% de RE e 0 % de RP, identificaram-se 3 registos, em que 1 (33%) não revelou infiltração linfocitária e os restantes 2 (67%) demonstraram uma ligeira infiltração. Por fim, com valores de percentagem de 95% para o RE e RP, 5 casos foram assinalados. Dos 5 carcinomas, 3 (60%) revelaram sinais de infiltração ligeira, contrariamente as restantes 2 neoplasias malignas (40%) não demonstraram quaisquer indícios de infiltração.

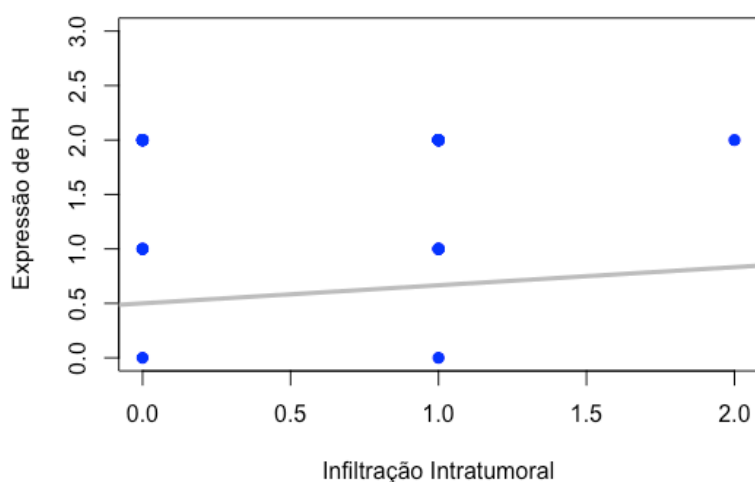


Figura 48: Relação entre infiltração intratumoral e a expressão de RH, em tumores de tipo NST. Associação entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH, nas 30 pacientes com tumor de tipo NST.

A fim de aprofundar a análise estatística no que respeita a infiltração intratumoral nos dois tipos de carcinomas, foi realizado o teste de qui-quadrado de Pearson. Deste modo, o valor de p-value determinado entre a associação das duas variáveis, foi de 0,084. De acordo com o valor anteriormente indicado, é possível concluir que não existe significância entre a associação estabelecida.

4.3.1.4 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO KI-67 COM AS RESTANTES

VARIÁVEIS, EM CARCINOMAS LOBULARES E CARCINOMAS DE TIPO NST

Dando seguimento à análise estatística procedeu-se à análise da expressão do biomarcador Ki-67 com a idade, a infiltração peritumoral e intratumoral, recidiva e por fim, expressão de RH, nos 30 carcinomas de tipo lobular.

Assim, quando analisada a correlação entre a expressão do biomarcador Ki-67 com a idade, de acordo com a análise estatística aplicada, foi estabelecido um valor de coeficiente de correlação de -0.109, figura 49. Deste modo, é possível afirmar que existe uma correlação negativa fraca entre as duas variáveis em estudo. Assim, é esperado que em determinados casos valores de expressão de Ki-67 mais reduzidos, estejam associados a idades mais jovens.

De modo a facilitar a análise estatística, os dados referentes à expressão de Ki-67 foram subdivididos em 3 grupos: expressões inferiores a 15%, iguais a 15%, e por fim, superiores a 15%, como se verifica na tabela D.1. Nos 22 casos que se notou uma expressão de Ki-67 inferior aos 15% ou que não possuíam informação relativamente a este parâmetro clínico, a média das idades observadas foi de 60 anos, compreendida entre os 39 e 83 anos. Por fim, nas 5 situações em que se identificou uma expressão de Ki-67 superior a 15%, as idades variavam entre os 45 e 83 anos, sendo a média de 62 anos. Para valores de expressão de Ki-65 iguais a 15, foram identificadas 3 situações, ao qual a média das idades identificada foi de 64 anos de idade, estando esta compreendida entre os 46 e 74 anos.

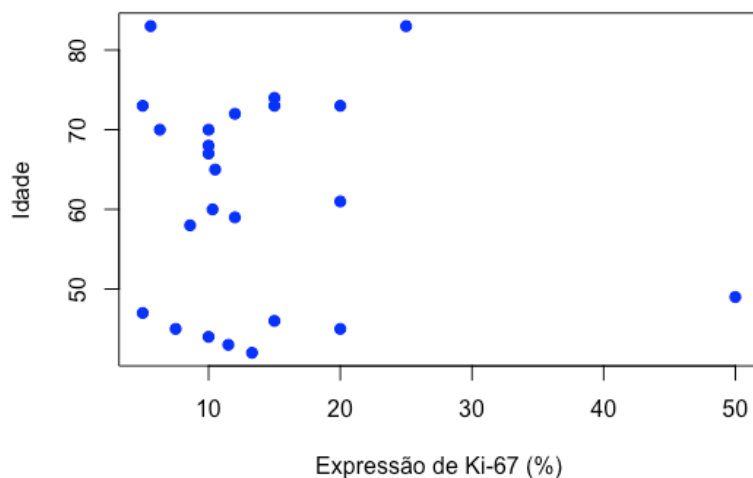


Figura 49: Relação entre a expressão de Ki-67 e a idade, em carcinomas de tipo lobular.

A análise estatística teve continuidade com o estudo dos 30 carcinomas de tipo NST. Assim, análises estatísticas permitiram determinar a relação entre a expressão da proteína Ki-67 em tumores de tipo NST e a respetiva idade das pacientes, como representado na figura 50. O valor do coeficiente de correlação de Pearson determinado foi de 0.271. De acordo com os dados apresentados, é possível identificar uma correlação positiva fraca entre as variáveis estudadas. Desta forma, é expectável que valores de expressão da Ki-67 reduzidos se associem a idades mais jovens.

No que concerne os dados da tabela suplementar D.2, a média das idades para expressões de Ki-67 inferiores a 15% foi de 53 anos, estando esta compreendida entre os 41 e 72 anos de idade. Por outro lado, para expressões do biomarcador acima dos 15% a média observada foi de 61 anos, sendo que o mínimo da idade identificada foi de 43 anos e o máximo de 81 anos. Por fim, para expressões da proteína iguais aos 15%, a média das idades identificada foi de 48 anos de idade, sendo 35 anos o mínimo e 69 anos, o máximo.

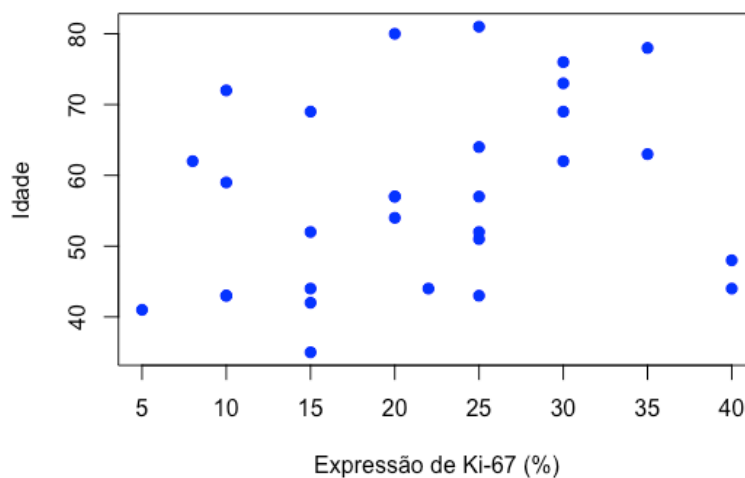


Figura 50: Relação entre a expressão de Ki-67 e a idade, em tumores de tipo NST.

Em referência à correlação entre a expressão da proteína Ki-67 e a infiltração de tipo peritumoral das 30 participantes com carcinoma lobular, o valor de coeficiente de correlação apresentado foi de 0.545, figura 51. Tendo em conta o valor anteriormente referido, foi identificada uma correlação positiva moderada. Assim, é esperado que valores de expressão de Ki-67 reduzidos se associem a valores de infiltração peritumoral igualmente reduzidos.

Avaliando a análise estatística presente na tabela suplementar D.1, verificou-se que 50% dos 4 casos que tinham uma infiltração linfocitária peritumoral ligeira, possuíam uma expressão de Ki-67 inferior aos 15% e igual a 15%. No caso da infiltração moderada, um caso (33%) possuía valores do biomarcador Ki-67 iguais a 15%, outro carcinoma (33%) dispunha de uma expressão de Ki-67 inferior a 15% e por fim, um tumor (33%) evidenciava uma expressão de Ki-67 superior a 15%. A infiltração peritumoral encontrava-se ausente em apenas numa situação tendo esta uma expressão de Ki-67 inferior a 15%. No que concerne à incerteza da presença de infiltração, por falta de dados clínicos, 6 casos (27%) não dispunham de informação de expressão de Ki-67.

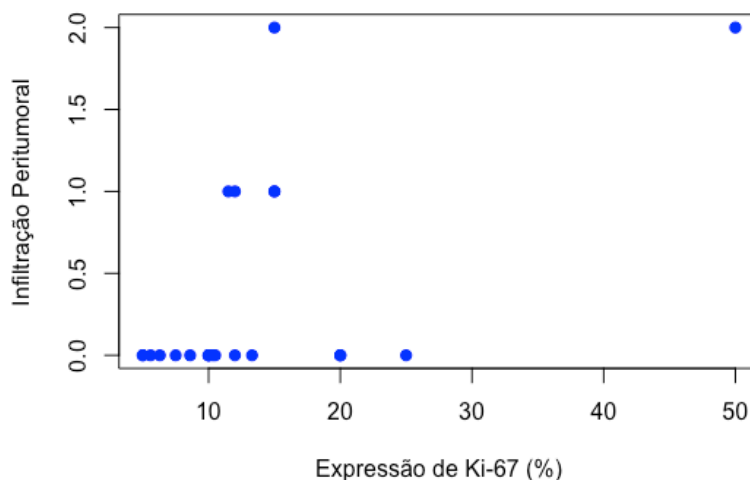


Figura 51: Associação entre a expressão do biomarcador de expressão do KI-67 (em %) e a infiltração peritumoral, em 30 pacientes com carcinoma lobular.

Seguidamente, foi analisada a relação entre a expressão do biomarcador Ki-67 e a infiltração de tipo peritumoral nos tumores de tipo NST, como representado na figura 52. Assim, após análise estatística foi determinado um valor de coeficiente de correlação de Pearson de -0.363. Segundo o valor anteriormente referenciado, existe uma correlação negativa fraca entre os dois parâmetros estudados. Tendo em conta que valores negativos próximos de -1 correspondem a correlações inversas, é plausível inferir que existe uma correlação inversa entre as duas variáveis, isto é, valores elevados de expressão de Ki-67 se associam a valores de infiltração peritumoral reduzidos.

Na contemplação dos dados da tabela suplementar D.2, para expressões inferiores a 15% foram observados 6 tumores malignos, ao qual apresentavam sinais de infiltração peritumoral ligeira. Para valores de expressão de Ki-67 iguais a 15%, foram observados 5 casos, dos quais 1 não relevava sinais de infiltração peritumoral e os restantes 4 indicavam a presença de infiltração peritumoral ligeira. Ademais, em expressões superiores a 15% de Ki-67, para situações sem sinais de infiltração peritumoral foram observados 12 carcinomas. A acrescentar a esta análise, 7 situações, foram identificadas com expressões de Ki-67 superiores a 15% e com presença de infiltração peritumoral ligeira.

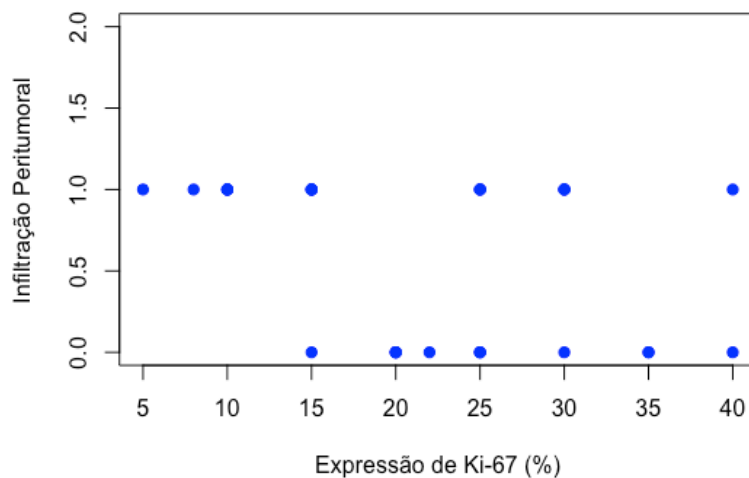


Figura 52: Relação entre a expressão de Ki-67 e a infiltração peritumoral, em tumores de NST.

Posteriormente, a análise realizada entre a expressão do Ki-67 e a infiltração intratumoral em carcinomas lobulares, possibilitou concluir que o valor do coeficiente de correlação observado foi de 0.564, figura 53. De acordo com o valor anteriormente apresentado, é provável a existência de uma correlação positiva moderada, entre a expressão de Ki-67 e a infiltração intratumoral. Deste modo, espera-se que valores de expressão de Ki-67 reduzidos se associem a valores de infiltração intratumoral, do mesmo modo reduzidos.

No que respeita à análise da tabela suplementar D.1, 2 casos foram identificados com uma infiltração intratumoral moderada. Deste modo, 1 dos carcinomas (50%) não dispunha de informação relativamente à expressão de Ki-67. Por outro lado, o outro carcinoma lobular identificado (50%), revelava uma expressão de Ki-67 superior a 15%. Relativamente à infiltração intratumoral ligeira, 5 neoplasias foram identificadas, tendo 40% destas, 2 tumores, uma expressão de Ki-67 inferior a 15%. Os restantes 3 tumores, possuíam expressões de Ki-67 iguais a 15%. Nas 5 situações em que não foi identificada qualquer tipo de infiltração de tipo intratumoral, 1 caso (20%), não possuía informação relativamente à expressão de Ki-67. A acrescentar a esta análise, foram identificados 3 carcinomas (60%) com expressões de Ki-67 inferiores a 15%. Por fim, apenas um caso (20%) revelou uma expressão de Ki-67 superior a 15%. Para finalizar a associação entre a expressão do biomarcador Ki-67 e a infiltração intratumoral, foram identificados 18 carcinomas que não possuíam qualquer tipo de informação relativamente à infiltração intratumoral. Assim, 5

situações (28%) não dispunham de igual modo de dados à cerca da expressão do biomarcador. Em contrapartida, 10 neoplasias possuíam uma expressão de Ki-67 inferior aos 15% e 3 carcinomas lobulares, salientavam valores de expressão de Ki-67 superiores a 15%.

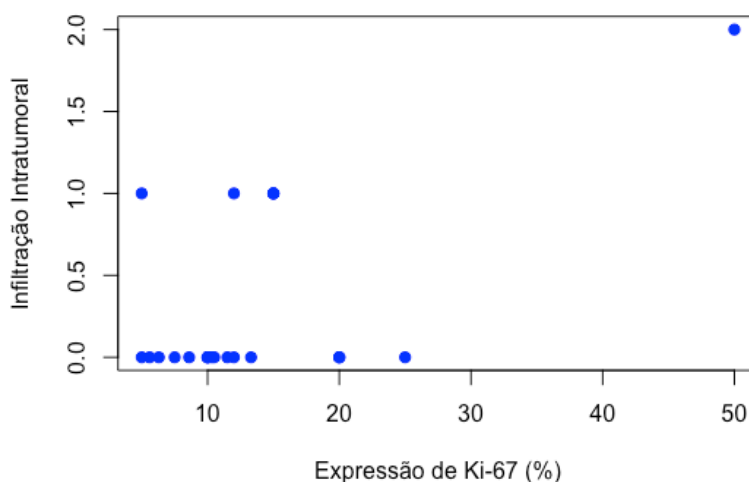


Figura 53: Associação entre a expressão do Ki-67 (em %) e a infiltração linfocitária intratumoral, em 30 pacientes com carcinoma do tipo lobular.

Relativamente à relação entre a expressão de Ki-67 e a infiltração intratumoral em tumores de tipo NST, após análise estatística foi estabelecido um valor de coeficiente de correlação de Pearson de -0.400. Desta forma, é possível concluir que existe uma correlação negativa fraca entre as duas variáveis em estudo (figura 54). Além disso, é possível que em determinados casos valores de expressão da proteína reduzidos se associem a infiltração intratumoral elevados.

Em relação à tabela suplementar D.2, dos 14 casos sem infiltração intratumoral, 1 deles (7,1%) tinha uma expressão de Ki-67 igual a 15%. Por outro lado, 12 carcinomas (86%) possuíam uma expressão do biomarcador Ki-67 superior a 15%. E por fim, o restante tumor de tipo NST, indicava valores de expressão da proteína inferiores a 15%. Ademais, em termos de infiltração intratumoral ligeira foram identificados 16 registos. Dos 16 casos, 7 (44%) revelavam uma expressão da proteína Ki-67 superior a 15%. Por fim, 5 carcinomas (31%) possuíam uma expressão inferior aos 15%, assim como 4 tumores revelavam valores de expressão de Ki-67 iguais a 15%. Para infiltrações de tipo moderado, ou em casos de ausência

de informação no que respeita este achado clínico, não foram observados casos clínicos de acordo com estas características.

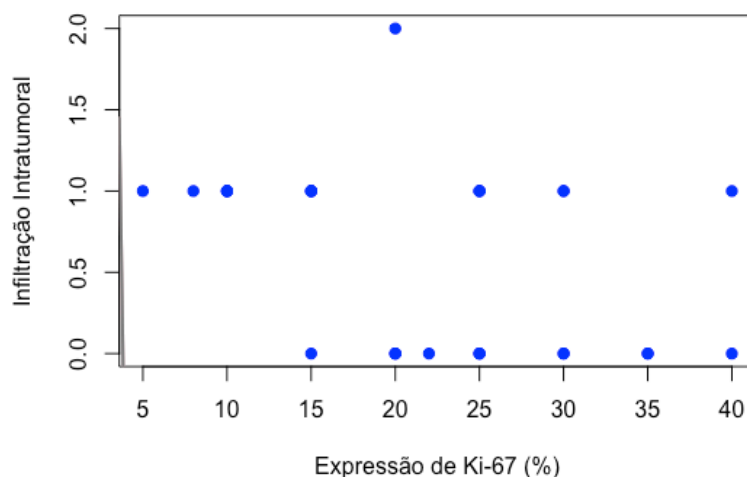


Figura 54: Relação entre a expressão de Ki-67 e infiltração intratumoral, em tumores de tipo NST.

Para além dos dados já analisados, foi pertinente relacionar a expressão do Ki-67 com a recidiva, nas pacientes com carcinoma lobular (figura 55). Desta correlação, conclui-se que o valor de coeficiente de correlação existente foi de 0.222. Assim, destaca-se a existência de uma correlação positiva fraca entre as variáveis estudadas. Além disso, é esperado que valores de expressão de Ki-67 reduzidos se associem à ausência de recidiva.

Recorrendo à tabela suplementar D.1 para exercer uma análise mais detalhada, foi possível aprofundar os dados entre a associação estabelecida. No que respeita à ausência de recidiva, 17 tumores foram identificados sendo que 3 (18%) destes não possuíam informação relativamente à expressão de Ki-67. A destacar, 11 situações (65%) em que não dispunham de indicação de recidiva, expressavam o biomarcador em percentagens inferiores a 15%. Por fim, 3 (18%) dos 17 carcinomas, revelavam percentagens de expressão da proteína superiores aos 15%. A terminar a presente análise, 12 neoplasias foram identificadas pela ausência de informação no que respeita ao risco ou presença de recidiva. Assim, 3 (25%) dos casos possuíam valores de expressão do Ki-67 iguais a 15%. Não obstante, 7 situações

(58%) expressavam o biomarcador Ki-67 em percentagens inferiores a 15%. Apenas dois carcinomas (17%), obtiveram valores superiores a 15% em referência à expressão de Ki-67.

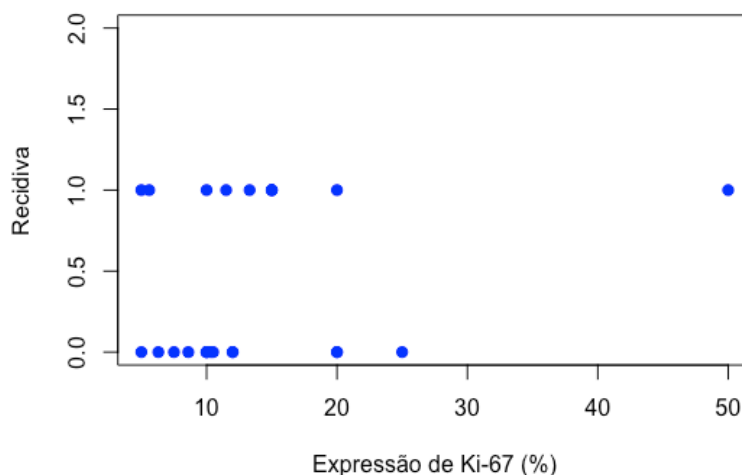


Figura 55: Relação entre a expressão de Ki-67 e recidiva, em tumores malignos lobulares.

No seguimento do estudo estatístico da expressão do biomarcador Ki-67, o mesmo foi relacionado com a recidiva em carcinomas de tipo NST, figura 56. Nesta avaliação, o valor do coeficiente de correlação encontrado foi de 0.148, demonstrando assim a existência de uma correlação positiva fraca entre a expressão da proteína e recidiva. Deste modo, é esperável que em determinados casos, valores de expressão de Ki-67 estejam associados à ausência de recidiva.

Através da análise da tabela suplementar D.2, 2 carcinomas revelaram recidiva, tendo estes uma expressão de Ki-67 superior a 15%. Dos 12 registos que não revelavam sinais de recidiva, 8 dos casos (67%) demonstravam uma expressão superior a 15% e 2 carcinomas (17%) possuíam expressões de Ki-67 inferiores a 15%. Os restantes tumores de tipo NST, com incertezas a nível de sinais de recidiva, possuíam valores de expressão da proteína iguais a 15%. Em termos de ausência de informação que indique presença ou risco de recidiva, 16 neoplasias malignas foram observadas. Assim, 4 destas (25%) expressavam valores inferiores a 15%. Os restantes 9 carcinomas (56%), revelavam valores de expressão da proteína superiores a 15%. E por fim, 3 dos tumores malignos demonstravam valores de expressão de Ki-67 iguais a 15%.

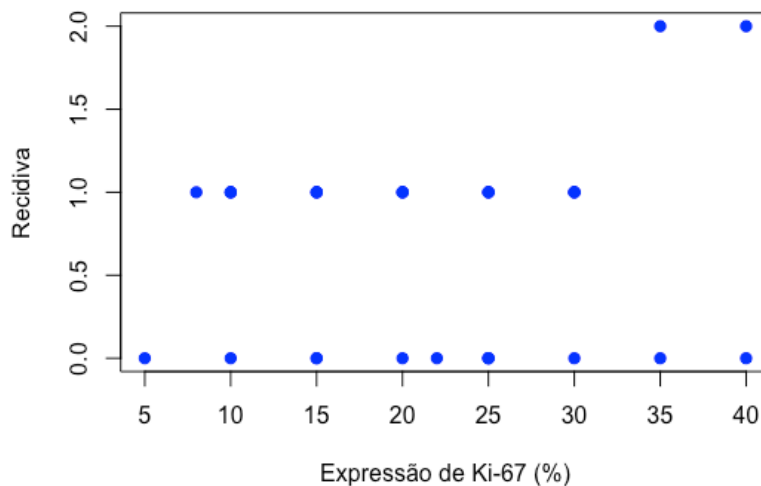


Figura 56: Relação entre a expressão de Ki-67 e recidiva, em 30 pacientes com carcinoma NST.

Para concluir a análise da expressão do Ki-67 nos carcinomas lobulares, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de 0.136 entre a expressão do biomarcador e a expressão dos RH, figura 57. Neste sentido, afirma-se a existência de uma correlação positiva fraca entre as variáveis estudadas. Além disso, é esperado que valores de expressão de Ki-67 reduzidos, estejam relacionados a valores de expressão de RH igualmente reduzidos.

Recorrendo à análise da tabela suplementar D.1, foi possível sublinhar que 3 dos 30 casos apresentavam valores de expressão de Ki-67 iguais 15%, 22 revelavam valores de expressão inferiores a 15% e 5 casos, possuíam níveis de expressão de Ki-67 superiores aos 15%. Assim, 91% dos 11 carcinomas que dispunham de uma expressão dos RH de 95% para ambos os recetores da proteína, possuíam uma expressão da proteína Ki-67 inferior a 15%, com a exceção de um caso que tumor que indicava expressões de Ki-67 superiores a 15%. Por outro lado, destacam-se 3 situações que revelaram valores de expressão de 100 % de RE e 100% de RP, com uma expressão de Ki-67 inferior, igual e superior a 15%, respetivamente. Para uma análise detalhada, poderão ser consultadas informações adicionais na tabela suplementar D.1 apresentada nos anexos.

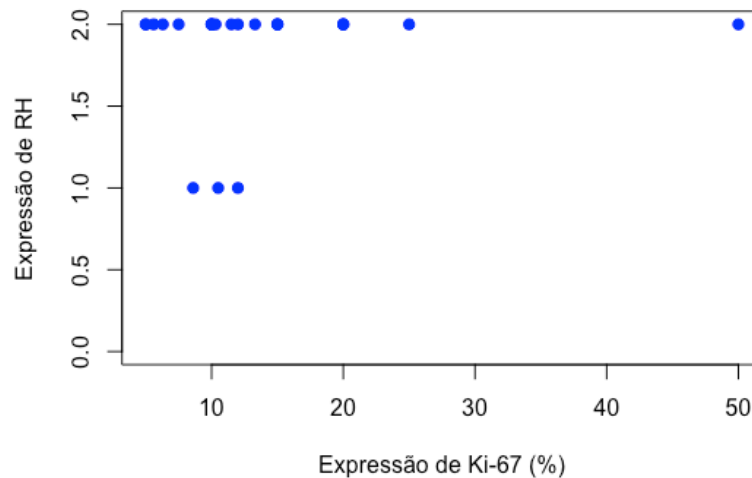


Figura 57: Relação entre a expressão de Ki-67 e expressão de RH, em tumores lobulares.

Por fim, no que respeita ao estudo da expressão do Ki-67 em conjunto com os outros parâmetros, foi determinada uma relação entre o biomarcador e a expressão de RH, nos carcinomas de tipo NST. Deste modo, após análise chegou-se à conclusão de um valor de coeficiente de correlação de -0.246 (figura 58). Neste sentido, é plausível afirmar que nesta série existe uma correlação negativa fraca, assim é esperado que em determinados casos valores de expressão de Ki-67 mais elevados se associem a valores reduzidos de expressão de RH.

Como última análise estatística efetuada e de acordo com os dados já analisados, a associação entre a expressão de RH e a expressão de Ki-67 nos carcinomas NST demonstrou valores com elevada diversidade. Procedeu-se à apresentação de resultados mais significativos, no entanto informações adicionais poderão ser consultadas na tabela suplementar D.2. Em destaque, das 11 situações em que se assinalava uma expressão de 100% para ambos os RH, 4 dos carcinomas (36%) demonstravam uma expressão de Ki-67 inferior a 15%. Em continuidade, 4 dos registos (36%), possuíam uma expressão de biomarcador superior a 15% e por fim, 3 tumores apresentavam expressões da proteína iguais a 15%. No que concerne a expressões de RH de 100% para RE e 0% RP, 3 casos foram identificados, na qual 2 (67%) dos tumores apresentavam expressões de Ki-67 superiores a 15% e a restante neoplasia, apresentava valores de expressão de Ki-67 inferiores a 15%. Por fim, em situações de expressões de 95%

para ambos os RH, foram identificados 5 casos. Das 5 neoplasias malignas assinaladas, todos os registos possuíam expressões de Ki-67 superior a 15%.

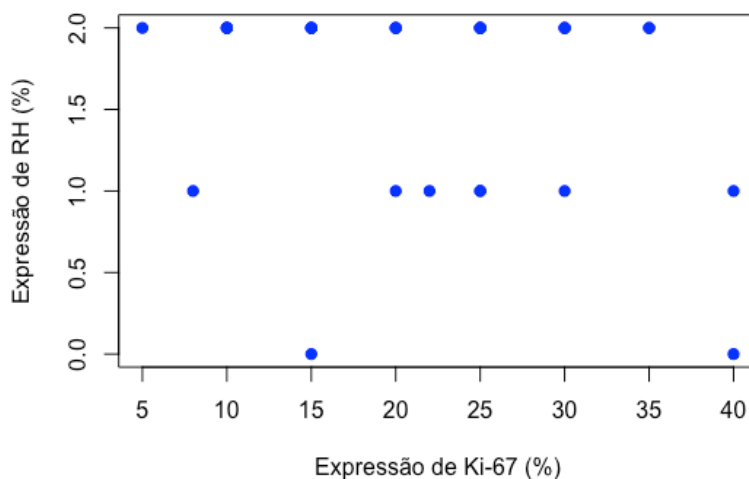


Figura 58: Relação entre a expressão de Ki-67 e expressão de RH, em tumores NST.

Para finalizar a análise estatística entre a expressão de Ki-67 em carcinomas de tipo lobular e de tipo NST, foi realizado um teste qui-quadrado de Pearson. Neste sentido, o valor de p-value encontrado foi de 0,7252. Segundo o valor anteriormente referenciado, é possível afirmar que não existe significância entre a associação entre a expressão de Ki-67 de carcinomas de tipo lobular e de tipo NST.

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *HER2*, EM CARCINOMAS DE TIPO LOBULAR E DE TIPO NST

Na avaliação dos 60 carcinomas estudados, poucos foram os casos clínicos que indicavam a expressão do oncogene *HER2*. Assim, em 30 carcinomas de tipo lobular, apenas 2 carcinomas revelavam expressão de *HER2*. Por outro lado, também nos carcinomas de tipo NST foram identificados apenas 2 tumores malignos com expressão de *HER2*.

Segundo a análise dos 4 casos clínicos positivos à expressão de *HER2*, a idade observada nos 2 carcinomas de tipo lobular foi de 43 e 72 anos. Por outra via, nos 2 carcinomas de tipo NST, as idades identificadas foram de 35 e 44 anos. No que respeita a expressão de Ki-67 dos casos de carcinoma lobular que expressavam a proteína, um dos tumores expressava valores de 12% e o restante caso não apresentava qualquer tipo de informação no que refere a expressão

de Ki-67. Por outro lado, nas 2 neoplasias que demonstravam expressões de *HER2*, um dos casos revelava valores de Ki-67 de 15% e 22%. No que respeita o estágio dos carcinomas, sendo que todos os carcinomas de tipo lobular e NST se apresentavam em estágio 1 não foi nosso objetivo estabelecer associações entre as variáveis biológicas e o estágio dos tumores.

Capítulo 5

Discussão

5 DISCUSSÃO

Atualmente são inúmeros os estudos científicos que pretendem estabelecer associações entre os parâmetros clínicos e biológicos e determinar a sua significância, apesar de muitas das vezes não ser possível obter resultados objetivos e claros.

Com a descoberta do anticorpo monoclonal Ki-67, que possui a capacidade de reconhecer o respetivo antígeno especificamente em células proliferativas, o mesmo permitiu avaliar o índice de proliferação e velocidade de crescimento em carcinomas da mama. Desde então, este biomarcador tem um valor significativo em termos de prognóstico e valor preditivo nos vários tipos de cancro da mama. Após reconhecimento das vantagens do Ki-67, foi necessário estabelecer uma definição mais clara no que concerne aos valores de ponto de corte, sendo que vários grupos de investigação trabalharam nesse sentido. No entanto, atualmente esses mesmos valores para este biomarcador, continuam a possuir uma extensa diversidade, variando entre 1 a 28,6%. Brian S. Finkelman *et al.* apelam aos laboratórios de patologia, à evolução de meios que permitam alcançar uma maior confiabilidade da proteína, que possibilitem assim validar a sua utilidade a nível clínico (Finkelman et al., 2023).

Diversos são os estudos que se realizam com o objetivo de responder à questão da validade e utilidade clínica dos LITs. Coloca-se em aberto diversas questões que carecem de resposta, tais como: a análise da função preditiva destas células através de estudos observacionais, bem como reconhecer e definir o valor de prognóstico de LITs em todos os tipos de cancro da mama e sobretudo a idealização de novos métodos para estudar este tipo de células. No entanto, diversos autores salientam a relevância dos LITs como biomarcadores de prognóstico e preditivos, muito devido ao baixo custo da sua análise. Além disso, estes biomarcadores permitem conduzir o paciente a uma terapia mais específica (Valenza et al., 2023). Diversas relações foram previamente estabelecidas, como por exemplo a associação entre valores de expressão reduzidos de RE e RP, em mulheres de idades mais jovens, com valores de LITs mais elevados. No entanto, é necessário continuar estudos com o intuito de determinar a causa e a forma como ocorre este tipo de acontecimentos (García-Torralba et al., 2023).

Neste contexto com a realização do presente projeto, pretende-se comparar duas coortes de doentes com carcinoma da mama de tipo lobular e NST e determinar correlações entre os dados

clínicos e os biomarcadores analisados e assim contribuir para a avaliação do valor destes biomarcadores como prognóstico, e o respetivo uso na prática clínica.

É de mencionar que sendo a série estudada reduzida, o estudo acarretou diversas limitações. Além disso, existe uma grande carência no que se refere às informações nos casos dos carcinomas lobulares, muito devido à sua antiguidade. Por outro lado, em casos mais recentes (maioria dos carcinomas NST aqui estudados e determinados tumores lobulares) os registos efetuados estão bastante completos, incluindo todas as informações clínicas de relevância. Assim, a análise das neoplasias anteriormente referidas demonstra-se com maior significância.

5.1 RECOLHA DE INFORMAÇÃO CLÍNICA

O funcionamento e gestão de dados e amostras do Hospital CUF Descobertas, facilitou o presente projeto. Ademais, toda a organização da informação na plataforma digital e respetiva gestão e recolha de dados clínicos pelos responsáveis, proporcionou todo o processo de levantamento de dados e amostras.

Os relatórios clínicos dispunham de informações com elevada relevância, quer relativamente ao diagnóstico, ao tratamento aplicado, informações relativamente a risco de recidiva na maioria dos casos, metastização, histórico familiar, entre outros parâmetros. É de salientar, que em determinadas situações não foi possível recolher certos dados clínicos, pela antiguidade dos casos. Os casos anteriormente referidos, referem-se a registos clínicos dos anos de 2010 a 2015 em que nem todas as variáveis eram analisadas tais como: expressão do biomarcador Ki-67 e a infiltração peritumoral e intratumoral. A acrescentar à lista de dados desconhecidos, insere-se ainda nalguns casos a ausência informação relativamente à presença de recidiva.

Com a evolução do conhecimento e pesquisa científica, dados biológicos como o índice de proliferação avaliado através da expressão de Ki67 e infiltrado linfocitário revelaram-se de extrema relevância e começaram a ser introduzidos nos relatórios anatomopatológicos. Relatórios com avaliação dos fatores supramencionados, auxiliam na caracterização do tumor e orientação da terapêutica, sendo por este motivo indispensável esta informação.

No que concerne ao armazenamento das amostras biológicas, todas as amostras utilizadas estavam devidamente armazenadas e identificadas, facilitando a sua recolha a qualquer momento. Outro dos aspetos pertinentes observado no Hospital CUF Descobertas, tem a ver

com a organização de todo o processo de recolha e análise das amostras. Primeiramente, no ato da cirurgia a amostra biológica é retirada e enviada para laboratório, onde é devidamente tratada, conservada e processada de modo a produzir lâminas histológicas representativas da área tumoral para análise de patologistas experientes. Juntamente com a amostra, segue o relatório com a descrição do tipo de peça anatómica, orientação da mesma, assim como dimensões. Após análise laboratorial são adicionadas informações ao relatório inicial, tais como: expressão de RH, expressão de Ki-67 e avaliação de outros marcadores tumorais. O acompanhamento da peça anatómica, conjuntamente com o respetivo relatório permite identificar e facilitar a análise da mesma durante todo o processo. Ademais, evita-se a perda de informação da mesma no ato do processamento, bem como eventuais erros na troca de amostras.

Deste modo, salienta-se a importância de organização e gestão hospitalar que maioritariamente é dificultada pelo imenso número de casos analisados, mas que se verifica todo este gerenciamento regulamente no Hospital CUF Descobertas.

5.2 EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS

Toda a extração de amostras foi devidamente realizada nos laboratórios do Hospital CUF Descobertas, com o acompanhamento de técnicos especializados. As infraestruturas do hospital permitiram o bom funcionamento e adequada gestão de todo o procedimento. Todos os procedimentos foram executados através de equipamentos altamente adequados para o mesmo efeito, evitando assim imprecisões das tarefas.

Inumeráveis são as informações contidas em cada amostra biológica e que de certa forma, podem trazer proveito à investigação científica. Posteriormente ao processamento adequado da recolha das amostras, através da utilização de técnicas altamente especializadas, seria possível efetuar uma avaliação aprofundada no que concerne à informação contida nas mesmas. A avaliação de determinados genes, tais como *HER2* e *PIK3CA*, são alguns dos genes estudados e incluídos nos relatórios clínicos, pelo seu valor na orientação da terapêutica. Assim, com a devida avaliação genética das amostras, seria possível comprovar e retirar mais informação das mesmas. No presente estudo, não foi possível reunir condições essenciais para a análise das amostras biológicas, pelo que a mesma não foi concretizada.

5.3 OBSERVAÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS

A observação de todos os casos clínicos, de forma microscópica permitiu não só a aquisição de conhecimento relativamente à histologia dos diferentes tipos de carcinoma da mama, mas também confrontação com os respetivos relatórios. Em determinados relatórios clínicos, essencialmente os de longa data, existia uma escassez de informação no que concerne à infiltração de tipo peritumoral e intratumoral. Em certos casos foi observada microscopicamente a presença de infiltração na área tumoral, pelo que seria pertinente inseri-la no relatório clínico. Na maioria dos casos, encontravam-se disponíveis lâminas histológicas com coloração de HE e imunohistoquímica, de modo a avaliar diversos parâmetros biológicos, tais como para determinar a presença ou ausência de E-caderina, expressão de RE e RP, entre outras. O conjunto das colorações anteriormente referido, facilitou a deteção e identificação do tipo de tumor e das respetivas características, tendo estas um valor significativo no ato do diagnóstico e posterior prognóstico e orientação terapêutica. É de referir que o sistema de dupla observação presente no microscópio do Hospital CUF Descobertas facilitou o processo de aprendizagem e observação das lâminas histológicas da aluna. Além disso, o registo fotográfico no ato da visualização das lâminas histológicas ao microscópio, permitiu a posterior análise e caracterização de cada tumor. Assim, foi possível não só reconhecer o carcinoma, bem como estabelecer comparações entre carcinomas do mesmo tipo.

5.4 AVALIAÇÃO DOS ACHADOS DAS IMAGENS MICROSCÓPICAS DE CARCINOMAS LOBULARES E NST

De acordo com a OMS, é sabido que determinados aspetos histológicos são característicos de distintos tipos de carcinomas. Isto é, em carcinomas de tipo lobular existe uma proliferação de células cancerígenas que ao perderem a capacidade de coesão, se desprendem do tecido e infiltram-se entre as fibras do tecido conjuntivo. Com núcleos com formas redondas ou ovóides e citoplasmas escasso e pouca atipia citológica, estes tumores são habitualmente diagnosticados em HE, mas pode ser necessário o recurso a imunohistoquímica, nomeadamente para avaliar a expressão de E-caderina, que está ausente nestes tumores (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012).

Por outro lado, nos carcinomas NST são identificadas diferentes características, em relação aos carcinomas lobulares. Assim, nos tumores bem diferenciados as células têm formas monomórficas, com arquitetura ductal e com núcleos de dimensões uniformes, apresentando

uma cromatina com padrão regular, com pouca atipia. Já em carcinomas de tipo NST com grau de diferenciação intermédio, as células apresentam uma diversidade no que respeita à arquitetura, aos seus tamanhos e forma, bem como a estrutura da cromatina. Por fim, carcinomas pouco diferenciados têm geralmente um elevado grau nuclear, são compostos por células que proliferam com padrões distintos, com polimorfismos variáveis (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012). Um fator com muita importância entre os diferentes graus de diferenciação é sem margem de dúvida o índice mitótico, pois é também a partir deste que se determina a gravidade do tumor (Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, 2012)

Assim, de acordo com as observações microscópicas realizadas no decorrer do presente projeto, foi possível adquirir conhecimento suficiente para diferenciar os dois tipos de tumor aqui estudados. Além disso, a infiltração linfocitária intratumoral ((LITs) foi igualmente identificada e quantificada, incluindo casos em que não havia indicação nos relatórios anatomopatológicos.

Diversas características foram recolhidas no decorrer do estudo histológico destes tumores, nomeadamente dimensão do tumor, arquitetura, grau de diferenciação, tipo histológico, presença de invasões vasculares. Em síntese, carcinomas lobulares destacam-se pela organização das células cancerígenas, que aparecem agrupadas em fileiras, rompendo o estroma do tumor, com perda de expressão de E-caderina, pelo que adquirem a capacidade de se desprenderem do tecido e rodear os ductos. No caso do carcinoma de tipo NST, A expressão de E-caderina está mantida e o tumor cresce formando ductos, trabéculas ou áreas sólidas.

5.5 AVALIAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES ESTABELECIDAS ENTRE A EXPRESSÃO DE KI-67 E LITs, COM OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS

Após análise dos gráficos, bem como as tabelas concebidas através do programa de linguagem R, foi possível recolher informação relativamente ao valor e significância do Ki-67 e LITs, como biomarcadores de prognóstico. Para isso, foram analisados todos os valores correspondentes à análise estatística, tais como: coeficiente de correlação, tanto de forma generalizada englobando os 60 carcinomas, mas também para os carcinomas lobulares e os 30 carcinomas de tipo NST, de forma separada. Além disso, como complemento foi ainda

determinado o qui-quadrado, entre os dois tipos de carcinoma, de forma a completar toda a análise.

5.5.1 AVALIAÇÃO GERAL DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE O BIOMARCADOR KI-67 E LITs, COM OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS NOS 60 CARCINOMAS

Em referência à análise estatística geral, isto é, dos 60 carcinomas em simultâneo, foram obtidos diversos dados referentes à correlação entre as variáveis de interesse e os restantes parâmetros.

Primeiramente, em referência à correlação entre a infiltração peritumoral a idade das 60 pacientes, de acordo com o valor de coeficiente de correlação obtido verificou-se a existência de uma correlação inversa. Assim, de acordo com esta associação, espera-se que valores de infiltração peritumoral reduzidos se associem a idades mais avançadas. De acordo com a literatura, de facto valores de infiltração peritumoral mais reduzidos, associam-se a idades mais avançadas (Kolberg-Liedtke, C., Feuerhake, F., Garke, M. et al., 2022).

Por outro lado, no que respeita a associação entre a infiltração peritumoral e o estado de recidiva, foi encontrada uma correlação positiva entre as duas variáveis, no estudo dos 60 carcinomas em simultâneo. Deste modo, é esperado que valores de infiltração peritumoral reduzidos se associem à ausência de recidiva, como se verifica na literatura (Perez et al., 2016).

Na análise efetuada entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH, não demonstrou a existência qualquer tipo de correlação.

Dando continuidade à análise estatística efetuada, foram analisadas as correlações entre a infiltração intratumoral e os restantes parâmetros clínicos. Inicialmente, a análise entre a infiltração intratumoral e a idade, revelou a presença de uma correlação positiva entre as duas variáveis, prevendo que valores de infiltração peritumoral elevados se associem a idades mais avançadas, como se verifica em (He et al., 2020).

Do mesmo modo, também foi estabelecida uma correlação positiva entre a infiltração intratumoral e o estado de recidiva. Neste sentido, valores de infiltração intratumoral elevados, associam-se à presença de recidiva, como descrito em artigos científicos previamente publicados (He et al., 2020)

Contrariamente, neste estudo não foi verificada nenhuma correlação entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH, nos 60 carcinomas estudados.

A finalizar a análise estatística dos 60 carcinomas, foram estabelecidas diversas correlações entre a expressão de Ki-67 e as restantes variáveis. No entanto, através da análise dos dados referentes aos 60 carcinomas, não foi estabelecida uma correlação entre a expressão de Ki-67 e a idade das 60 pacientes (Kamranzadeh et al., 2019).

Por outro lado, no que respeita a expressão de Ki-67 e ao estado de recidiva, foi encontrada uma correlação positiva entre os parâmetros estudados. Esta correlação também foi encontrada em outros estudos precedentes (Kamranzadeh et al., 2019).

A acrescentar, relativamente à correlação entre a expressão de Ki-67 e a infiltração peritumoral, foi igualmente determinada uma correlação positiva (0,158) entre as duas variáveis, estando esta de acordo com estudos já realizados, 0,236 (Ruan et al., 2018). Assim, espera-se que valores de expressão de Ki-67 reduzidos se associem a valores de infiltração peritumoral, igualmente reduzidos. Não obstante, também na correlação entre a expressão de Ki-67 e a infiltração intratumoral foi encontrada do mesmo modo uma correlação positiva, de acordo com a análise dos 60 carcinomas. Deste modo, é previsível que valores de expressão de Ki-67 reduzidos se associem igualmente a valores de infiltração intratumoral reduzidos, como verificado na literatura (Ruan et al., 2018).

Por fim, em referência à análise estatística entre a expressão de Ki-67 e a expressão de RH, foi estabelecida uma correlação inversa entre as duas variáveis. Assim, é esperado que valores elevados de expressão de Ki-67 se relacionem à ausência de expressão de RH (Trihia et al., 2003).

5.5.2 AVALIAÇÃO GERAL DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE O BIOMARCADOR KI-67 E LITs, COM OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS EM CARCINOMAS LOBULARES E DE TIPO NST

No que respeita à análise estatística dos dados referentes ao carcinoma de tipo lobular, a mesma permitiu retirar diversas conclusões.

No que concerne às idades das pacientes foi determinada uma média de 61 anos, sendo que na literatura é referido que a probabilidade de detetar um carcinoma lobular aos 45 anos é de

84% para as mulheres (Dossus & Benusiglio, 2015). O intervalo das idades encontrava-se compreendido entre os 39 anos e os 83 anos, sendo que a execução de rastreios em Portugal, é recomendada a partir dos 40 anos (Silva et al., 2021). Portanto, os valores obtidos encontram-se nos intervalos habitualmente encontrados. No que se refere à sobrevivência, todas as pacientes se encontravam vivas na data da recolha dos dados clínicos, à exceção de uma paciente com 83 anos de idade, que faleceu aparentemente sem qualquer relação com a neoplasia.

Para a análise estatística dos 30 carcinomas de tipo NST, foi tida em conta a mesma linha de estudo aplicada aos carcinomas lobulares. Inicialmente foi determinada uma média de idades de 57 anos, para as 30 pacientes com carcinoma de tipo NST. A média anteriormente referida encontrava-se compreendida entre os 35 anos e os 81 anos. Segundo a literatura, a taxa de incidência de carcinoma de tipo NST é de 1,3 em 1000 exames, em mulheres com idades compreendidas entre os 70 a 84 anos (Randolph, 2002), comparativamente a valores de 0,6 por 1000 exames em mulheres com idades entre os 40 e 49 anos (Ernster, 2002).

Neste sentido, a média da idade determinada no presente estudo aproxima-se do grupo de maior incidência de carcinoma de NST. Em referência ao estado de sobrevivência das 30 pacientes, todas elas se mantinham vivas até ao momento da recolha das informações clínicas.

Relativamente à metastização, em 14 pacientes com carcinoma lobular havia indicação da inexistência de dados que indicassem a presença ou risco de ocorrer metastização. Assim das 30 pacientes com carcinoma lobular, apenas 2 tiveram registo de presença de metastização. Comparativamente ao que se verifica na literatura, um estudo de 2417 pacientes revelou que a probabilidade de ocorrer metástase em carcinomas de tipo lobular é de 0,980 (Cao et al., 2012). Contudo, não é possível estabelecer uma relação pelo que no presente estudo todos os carcinomas estudados possuem o mesmo estágio, contrariamente ao estudo anteriormente apresentado, onde não existia este padrão. No entanto, determinou-se a taxa de incidência referente aos carcinomas lobulares estudados, sendo esta de 53,33%.

No tocante à presença ou ausência de metastização nos 30 carcinomas de tipo NST, 11 dos 30 casos não apresentavam sinais inequívocos de metastização, embora existisse dúvida relativamente à sua presença. Por outro lado, em 19 carcinomas, não foram identificados sinais de metastização, pelo que se considera que nesta série os valores são inferiores ao habitualmente

descrito. Por exemplo, numa série publicada por Cao e colaboradores estudos científicos previam, num total de 2417 pacientes, 301 destas pacientes mostravam a presença de metastização (Cao et al., 2012). No entanto no estudo supramencionado foi realizada uma análise geral, isto é, todos os carcinomas de tipo NST estudados dispunham de estádios diferentes. Contrariamente, no presente estudo foram estudados carcinomas de igual estágio (pT1 pN0).

Já em termos de recidiva, 17 pacientes com carcinoma lobular, não demonstraram indícios de recidiva, mas 12 das 30 pacientes não tinham qualquer informação. A falta de informação deste parâmetro clínico, dificulta novamente a análise estatística, bem como a relação entre os parâmetros a analisar. A presença de recidiva verificou-se assim em apenas uma das pacientes, correspondendo a uma percentagem de 3,3%. De acordo com o descrito na literatura, a taxa de recidiva para carcinomas de tipo lobular varia entre 1 a 7%, pelo que o resultado obtido se insere neste intervalo, embora o presente estudo englobe igualmente apenas tumores com o mesmo estágio (Wilson et al., 2021).

Seguidamente, foi analisada a taxa de recidiva nos casos de carcinoma NST, ao qual 12 das situações não demonstravam sinais de recidiva e 16 neoplasias tinham indicações de dúvida em relação a este parâmetro. No entanto, foram identificados dois carcinomas com sinais de recidiva. Recorrendo aos dados disponibilizados na literatura, foi determinada uma taxa de recidiva de 4 a 9% para carcinomas de tipo NST (Wilson et al., 2021). Assim, no presente estudo se forem consideradas como positivas as duas situações com sinais sugestivos de recidiva, é determinada uma taxa de 6,7%, pelo que esta se insere no intervalo supramencionado.

Respetivamente à expressão de RH, foram obtidas diversas percentagens de expressões dos RH. No entanto, sublinha-se a expressão de 95% de RE e 95% de RP, com 11 casos identificados, que de certa forma se encontra relacionada com dados descritos em outros estudos científicos, onde se faz referência a taxas de 84% para expressões iguais ou superiores aos 90% de RE. Já para o RP, a taxa referida é de 54% para a presença de percentagens iguais ou superiores a 90% (Truin et al., 2017). Sendo que dos restantes valores obtidos, a grande maioria apresenta percentagens iguais ou superiores aos 90% no RE, o mesmo não se verifica no RP, como é o caso de 4 tumores com expressões superiores a 80% para RE, e de percentagem de 0% para RP.

A nível da expressão de RH nos tumores malignos de tipo NST, estabeleceu-se a recolha de algumas informações no que respeita a análise estatística. Neste levantamento de dados, foram identificados 11 casos com valores de expressão de RH de 100% para ambos os RH. Com expressões de 95% para RE e RP, foram confirmadas 5 neoplasias e para expressões de 100% para RE e 0% para RP, 3 carcinomas. As restantes situações obtiveram expressões bastante variáveis, variando entre os 0 a 90% para o RP e 50% a 100% para o RE. Tendo em contra outros estudos científicos, foi mencionada uma taxa de 86% de casos de carcinoma de tipo NST com expressões iguais ou superiores aos 90% de expressão de RE. Por outro lado, a taxa determinada para expressões de 90%, no que se refere ao RP, foi de 54% dos casos. Neste sentido, a grande maioria dos tumores malignos estudados possuíam valores de expressão de RE superiores aos 90% e 19 neoplasias (63,3%) possuíam valores de expressão de RP iguais ou superiores a 90%. Deste modo, é possível afirmar que os dados aqui referidos se inserem nos intervalos determinados previamente em outros estudos científicos (Truin et al., 2017).

Em suma, nos 30 casos de carcinoma lobular, em geral todos os valores analisados até ao momento se encontram dentro dos parâmetros descritos pela literatura. No entanto, a ausência de informação sobre determinados parâmetros clínicos dificulta a sua análise e respetiva relação. Futuramente, visto que este tipo de carcinoma possui um grande número de casos antigos, 2010 a 2015, seria revelante selecionar casos mais recentes, de modo a diminuir a probabilidade de carência de informação, visto que na atualidade os processos clínicos possuem mais conteúdo no que respeita a informação.

Do mesmo modo, nos 30 carcinomas de tipo NST, na generalidade a maioria dos dados analisados encontrava-se entre os intervalos referidos na literatura, resultantes de análises estatísticas similares. No entanto, a grande maioria dos estudos aqui citados inclui carcinomas que dispunham de diferentes estádios.

5.5.3 AVALIAÇÃO DOS DADOS RELATIVOS À ANÁLISE DA INFILTRAÇÃO PERITUMORAL COM OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS, EM CARCINOMAS LOBULARES E CARCINOMAS DE TIPO NST

No que se refere à associação entre a infiltração peritumoral e a idade das 30 pacientes com carcinoma lobular, foi obtido um valor de coeficiente de correlação de -0,082. De acordo com o valor apresentado, é possível afirmar que não existe qualquer correlação entre estas variáveis.

Em termos da análise dos carcinomas de tipo NST, foram também analisados os dados referentes à infiltração peritumoral e às idades das pacientes, onde foi determinado um valor de coeficiente de correlação de $-0,357$, que demonstra a presença de uma correlação inversa entre os 2 dados clínicos. Conseqüentemente, espera-se que valores mais reduzidos de infiltração peritumoral, se relacionem com idades mais avançadas. De acordo com a análise dos dados, a média das idades para carcinomas com existência de infiltração peritumoral ligeira foi de 53 anos, estando esta compreendida entre os 35 e 73 anos. Já nas 13 situações em que não se encontraram indícios de infiltração peritumoral, a média foi de 62 anos, em que 44 anos tinha como referência a idade mínima e 81 anos, a idade máxima. Assim sendo, idades mais avançadas associam-se a ausência de infiltração peritumoral e idades mais jovens apresentam maior infiltração.

Relativamente à correlação entre recidiva e infiltrado linfocitário peritumoral em tumores lobulares, o valor obtido correspondeu a $0,338$; sendo este valor positivo, é possível concluir que as variáveis se encontram correlacionadas fracamente. Desta forma, é esperado que em situações com uma menor quantidade de infiltração peritumoral se encontre uma menor taxa de presença de recidiva.

No seguimento da análise, foi estudada a relação entre a infiltração peritumoral e a presença ou risco de recidiva nas 30 pacientes com carcinoma de tipo NST. Posto isto, foi estabelecido um valor de coeficiente de correlação, tendo este um valor de $-0,038$. Assim sendo, não foi observada qualquer tipo de correlação entre as duas variáveis. Num total de 16 em 30 tumores, não havia informações claras que identificassem a presença de recidiva, pelo que não foi possível estabelecer associação entre as variáveis.

No que concerne a associação entre a infiltração peritumoral e a expressão de RE e RP nos carcinomas lobulares, o valor obtido foi de $0,070$, o que indica a ausência de correlação entre as variáveis estudadas. No entanto, dos 3 casos identificados como tendo infiltração peritumoral moderada, as expressões de RE e de RP apresentavam valores acima dos 60%. Na infiltração peritumoral ligeira, dos 4 carcinomas identificados, a maioria apresentava expressões de RE superiores a 95%, exceto uma das situações que apresentava expressões de RP de 10%. De acordo com os achados anteriormente, a infiltração peritumoral de tipo ligeiro e moderado é associada a expressões de RE e RP, consideravelmente altas. Assim, tendo em

conta a hipótese proposta, não foi possível estabelecer uma correlação entre as variáveis estudadas, através do valor de coeficiente de correlação.

A terminar a análise estatística entre a infiltração peritumoral e os restantes parâmetros clínicos, sublinha-se a relação estabelecida entre o parâmetro de foco e a expressão de RH nos tumores NST. Deste modo, determinou-se um valor de coeficiente de correlação entre as variáveis estudadas, referente a um valor de 0,026. Em concordância com o valor anteriormente apresentado, sendo este próximo de 0, não é identificada qualquer tipo de correlação entre a infiltração de tipo peritumoral e a expressão de RH.

5.5.4 AVALIAÇÃO DOS DADOS RELATIVOS À ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO INTRATUMORAL COM OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS, EM CARCINOMAS LOBULARES E CARCINOMAS DE TIPO NST

Relativamente à associação da inflamação intratumoral e às idades das 30 pacientes com carcinoma da mama de tipo lobular, o valor de coeficiente de correlação, sendo este de -0,138. Analisando o valor indicado anteriormente, é possível afirmar que existe uma correlação negativa fraca, assim valores reduzidos de taxa de infiltração intratumoral, relacionam-se com idades mais avançadas. A média das idades obtidas quando presença de infiltração ligeira foi de 60 anos, sendo que o mínimo de idade observada foi de 46 anos e o máximo de 74 anos. Respetivamente à infiltração intratumoral moderada, a média das idades foi de 65 anos, estando compreendida entre os 49 e os 80 anos. Segundo a associação estabelecida anteriormente seria esperado que em determinados casos, idades mais avançadas estariam associadas a infiltrações intratumorais ligeiras e pacientes mais jovens possuísem indícios de infiltração moderada. No entanto, esta relação não foi verificada a nível geral, estando presente em apenas escassos casos clínicos.

Dando continuidade à análise estatística do presente estudo, foi estabelecida uma relação entre a infiltração intratumoral e a idade das pacientes com carcinoma de tipo NST. Assim, foi determinado um valor de correlação de -0,376, que demonstra a presença de uma correlação inversa, isto é, valores de infiltração intratumoral reduzidos, associam-se a idades mais velhas. De modo a testar a correlação anteriormente referenciada, foram analisados de forma minuciosa todos os dados relativos aos 2 parâmetros clínicos em estudo. Portanto, a média das idades das pacientes que não dispunham de infiltração intratumoral, foi de 64 anos estando esta

compreendida entre os 44 e 81 anos. Seguidamente, a média das pacientes com infiltração ligeira foi de 51 anos, variando entre idades de 35 anos e 73 anos.

De facto, a presença de infiltração intratumoral foi verificada em casos com idades mais jovens, contrariamente aos casos que não possuíam qualquer sinal da mesma, que possuíam idades mais elevadas. Desta forma, é viável afirmar que a correlação estabelecida vai de encontro com a correlação esperada.

No que concerne à presença ou ausência de recidiva em neoplasias de tipo lobular, foi determinada uma correlação entre a variável anteriormente referida e a infiltração intratumoral. Em respeito à medida de correlação, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de 0,327, o que indica uma correlação positiva fraca. Neste seguimento, é possível afirmar que o aumento de risco de recidiva ou presença da mesma, encontra-se relacionado com valores de infiltração intratumoral mais altos. Através da análise dos dados clínicos, foram identificados 12 casos que não possuíam informação relativamente à recidiva, pelo que esta carência de informação pode de algum modo influenciar a análise estatística. Por outro lado, o único carcinoma que tinha sinais de recidiva, não possuía informação respetivamente à infiltração intratumoral. Do mesmo modo, a análise estatística acaba por sofrer alguma alteração, devido à ausência de dados relevantes ao estudo.

Prosseguindo com a análise estatística, foram analisados os dados recolhidos entre a associação da infiltração intratumoral e a presença ou ausência de recidiva, em pacientes com carcinoma de tipo NST. Assim, no que respeita a correlação entre os 2 parâmetros foi determinado um valor de 0,101 para a mesma. Assim, é esperado que valores reduzidos de infiltração intratumoral se associem à ausência ou escassez de recidiva. Após análise detalhada dos dados recolhidos, foi possível evidenciar que 2 casos foram identificados pela presença de indícios sugestivos de recidiva. Destas 2 situações, uma delas não apresentava informações relativas à infiltração intratumoral e a restante evidenciava infiltração ligeira. Além disso, 6 casos foram identificados com infiltração intratumoral ligeira e ausência de sinais indicativos de presença de recidiva. No entanto 16 carcinomas, não dispunham de informação suficiente para clarificar a presença de recidiva, pelo que a sua análise estatística foi dificultada.

Embora apenas um número reduzido de casos apresentasse informações relativamente aos 2 dados clínicos aqui estudados, efetivamente valores reduzidos ou mesmo ausência de recidiva foram associados a valores de infiltração intratumoral reduzidos.

Por fim, a finalizar a avaliação das associações efetuadas entre a infiltração intratumoral e os restantes parâmetros clínicos nos 30 tumores lobulares, analisaram-se os dados recolhidos da relação entre o parâmetro de foco e a expressão de RH. Neste sentido, foi realizada uma análise referente ao valor de correlação entre as duas variáveis associadas. Assim, o valor de correlação determinado foi de 0,071, indicando assim a ausência de uma correlação. Através da análise pormenorizada dos dados, foi possível observar que a grande maioria dos dados não dispunha de sinais de infiltração intratumoral. Além disso, verificou-se uma grande variabilidade no que se refere aos dados relativos à expressão de RH. Deste modo, torna-se difícil estabelecer uma correlação entre as variáveis apresentadas.

Para finalizar a análise da infiltração intratumoral no caso dos 30 carcinomas NST, estabeleceu-se uma associação entre o parâmetro de foco e a expressão de RH. De acordo com os dados obtidos segundo a análise estatística, foi de igual modo calculado o valor de coeficiente de correlação entre as variáveis, sendo este de 0,060. Desta forma, visto que o valor se aproxima de 0, não é possível verificar uma correlação entre os parâmetros estudados. Tendo em conta os dados dos 30 carcinomas de tipo NST, verificou-se uma grande variabilidade no que respeita os valores de infiltração intratumoral e a expressão de RH. Assim, a identificação de uma correlação entre as duas variáveis em estudo, é dificultada, não sendo possível determinar a mesma.

5.5.5 AVALIAÇÃO DOS DADOS RELATIVOS À ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE KI-67 E OS RESTANTES PARÂMETROS CLÍNICOS, EM CARCINOMAS LOBULARES E CARCINOMAS DE TIPO NST

A finalizar a análise estatística dos carcinomas lobulares, apresentou-se o estudo da expressão de Ki-67 em conjunto com os restantes dados clínicos. No que respeita à correlação entre a expressão de Ki-67 e a idade, foi determinado um valor de coeficiente de correlação, sendo este de -0,109. Deste modo, é plausível afirmar que existe uma correlação inversa entre as variáveis, isto é, valores de expressão de Ki-67 menores relacionam-se com idades mais avançadas. De acordo com a análise de dados suplementares, 19 casos evidenciaram valores de

expressão de Ki-67 inferiores a 15%, sendo caracterizados como valores de expressão relativamente baixos. A média das idades verificada nesta associação foi de 61 anos, entre um intervalo de 42 e 83 anos. Por outro lado, para valores de expressões de Ki-67 superiores a 15%, foram identificados 5 carcinomas. Assim, a média das idades verificada para a situação anteriormente referenciada foi de 62 anos, estando esta compreendida entre os 45 e 83 anos. Em contrapartida, 7 das neoplasias não possuía informação relativamente à expressão do biomarcador. Assim, é possível afirmar que os dados vão de encontro ao esperado, em situações de expressões de Ki-67, de valores reduzidos, a média das idades foi ligeiramente inferior à média das idades determinada em expressões de Ki-67 mais elevadas.

Para terminar a análise estatística dos dados obtidos no que concerne os carcinomas de tipo NST, enuncia-se assim as conclusões provenientes das relações efetuadas entre a expressão do biomarcador Ki-67 e os restantes dados clínicos.

Primeiramente, em análise da correlação entre a expressão da proteína Ki-67 e a idade das pacientes, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de 0,271, que indica a presença de uma correlação entre os 2 parâmetros clínicos. Assim, é esperado que idades mais jovens se encontrem relacionadas com expressões de Ki-67 elevadas. Para testar a correlação anterior, foi feito um levantamento das idades das pacientes e respetivos valores de expressão de Ki-67. Desta forma, para expressões de Ki-67 inferiores a 15%, a média das idades das pacientes foi de 53 anos, estando esta compreendida entre os 41 e 72 anos. Por outro lado, para expressões de Ki-67 superiores aos 15%, a média das idades determinada foi de 61 anos, entre um intervalo de 43 e 81 anos.

Neste seguimento, é possível comprovar a correlação estabelecida, salientando que idades mais jovens se associam a valores de expressão de Ki-67 mais reduzidos, em carcinomas de tipo NST.

Dando continuidade à análise estatística entre a expressão de Ki-67 e a recidiva dos tumores lobulares, foram analisados os resultados obtidos do estudo estatístico. Dos valores obtidos obteve-se o valor de coeficiente de correlação de 0,222, pelo que as variáveis se correlacionam proporcionalmente, isto é, valores de expressão de Ki-67 elevados, associam-se de igual modo à presença de sinais de recidiva. É de referir que 12 dos casos clínicos estudados não possuíam informação referentemente ao estado de recidiva.

A associação entre a expressão de Ki-67 e a presença ou ausência de recidiva, foi igualmente estudada nos carcinomas NST. Deste modo, foi determinado um valor de coeficiente de correlação entre as duas variáveis 0,148. De acordo com este valor é possível identificar uma correlação entre os dados, isto é, valores de expressão de Ki-67 baixos, associam-se à ausência de recidiva. Dos dados apresentados, apenas 2 casos revelaram sinais de recidiva, tendo todos expressões de Ki-67 superiores a 15%. No entanto, dos 12 carcinomas com ausência de recidiva, apenas 2 possuíam valores de expressão de Ki-67 inferiores a 15%. Neste seguimento, a associação da correlação aplica-se apenas às neoplasias com presença de recidiva, com valores de expressão superiores a 15%. Por outro lado, seria de extremo interesse clarificar as informações quanto ao estado ou probabilidade de recidiva, de modo a classificar os dados em apenas dois grupos: ausente e presente.

Do mesmo modo, foi realizada uma análise estatística entre a expressão de Ki-67 e a infiltração de tipo peritumoral, em carcinoma lobulares. Assim, foi identificado um valor de coeficiente de correlação de 0,545, o que indica a presença de uma correlação moderada entre os parâmetros clínicos, isto é, valores de expressão reduzidos, associam-se a valores de infiltração peritumoral igualmente reduzidos. No seguimento da análise, foram identificados 2 carcinomas que continham informações no sentido da existência de expressão de Ki-67 inferior a 15% e igualmente uma expressão de infiltração peritumoral ligeira. No caso da infiltração moderada, também foram identificadas 3 neoplasias, no entanto uma destas não possuía informação relativamente à expressão de Ki-67, um outro caso apresentava valores de expressões inferiores a 15% e contrariamente, o restante carcinoma apresentava expressões de Ki-67 superiores a 15%.

De acordo com a relação supramencionada, era esperado que valores de expressões de Ki-67 reduzidos fossem associados a valores elevados de infiltração peritumoral. Em determinados casos, foi possível verificar a associação anteriormente referida. No entanto, visto que a maioria dos casos clínicos não demonstravam sinais de infiltração peritumoral, não se verificou uma grande variabilidade entre os dados.

No que respeita a associação entre a expressão de Ki-67 e a infiltração peritumoral, foi efetuada uma análise estatística englobando os 30 carcinomas NST, similar às análises já mencionadas.

Desta forma, foi calculado um valor de coeficiente de correlação encontrado foi de -0,363 indicando a presença de uma correlação inversa entre as variáveis. Deste modo, é esperado que valores de expressão de Ki-67 reduzidos estejam relacionados com elevados índices de infiltração peritumoral. Com o intuito de comprovar a correlação anteriormente referenciada, efetuou-se uma análise de forma minuciosa. Desta forma, 19 carcinomas foram identificados com valores de expressão da proteína Ki-67 superiores a 15%, ao qual 12 não possuíam sinais de infiltração peritumoral e as restantes neoplasias revelavam sinais de infiltração peritumoral ligeiros. Para valores de expressão inferiores a 15%, foram encontradas 6 situações, em que todos os tumores apresentavam infiltração peritumoral. Assim, é possível validar a correlação efetuada, visto que valores de expressão de Ki-67 reduzidos, associam-se a valores de infiltração peritumoral mais elevados.

Relativamente à associação entre a infiltração intratumoral e a expressão de Ki-67 nos carcinomas lobulares, foi aplicada uma análise estatística semelhante às associações realizadas para os restantes parâmetros de interesse.

Desta forma, o valor de coeficiente de correlação determinado, foi de 0,564, pelo que é identificada uma correlação moderada entre as variáveis. Por conseguinte, valores de expressão de Ki-67 reduzidos, associam-se a valores de infiltração intratumoral igualmente reduzidos. Como complemento da análise estatística, foi efetuado um levantamento do número de casos que revelavam sinais de infiltração intratumoral. Neste seguimento, 2 carcinomas foram identificados com evidências de infiltração intratumoral moderada, ao qual uma das situações não possuía informação relativamente à expressão de Ki-67 e a outra neoplasia possuía percentagens de Ki-67 superiores a 15%. No grupo da infiltração intratumoral ligeira, identificaram-se 5, dos quais 2 apresentavam valores de expressão inferiores a 15% e 3 apresentavam valores iguais a 15%. Os restantes carcinomas não dispunham de informações no que concerne as duas variáveis aqui estudadas.

A relação entre a expressão de Ki-67 e a infiltração intratumoral em tumores NST, foi também abordada e os seus dados foram igualmente analisados. Assim, para valor de coeficiente de correlação, o valor determinado foi de -0,400, relevando assim uma correlação inversa entre os parâmetros analisados. Assim, espera-se que valores de expressão de Ki-67 reduzidos, se associem a valores de infiltração intratumoral elevados. De modo a avaliar a correlação proposta, os dados recolhidos resultantes da associação estabelecida foram

analisados. Por esta via, foram identificados 11 carcinomas com valores de expressão inferiores ou iguais a 15%, ao qual 2 destas situações não possuíam infiltração intratumoral e os restantes 9, apresentavam achados sugestivos de infiltração intratumoral ligeira. Por outro lado, 19 neoplasias foram identificadas pela expressão de Ki-67 superior aos 15%, sendo que 12 destas não possuíam sinais de infiltração intratumoral e os restantes 7 casos, relevavam sinais de infiltração intratumoral ligeira.

Desta forma, é possível afirmar que valores de expressão de Ki-67 reduzidos, são associados a valores de infiltração intratumoral elevados, comparativamente a valores de expressão de Ki-67 superiores a 15%.

Por fim, foi efetuada do mesmo modo uma associação entre a expressão de Ki-67 e a expressão de RH, em carcinomas lobulares. Para este efeito, foi determinado um valor de coeficiente de correlação de 0,136. De acordo com o valor apresentado anteriormente, é possível afirmar que existe uma correlação entre as variáveis, isto é, valores reduzidos de expressão de Ki-67 associam-se a valores igualmente baixos de expressão dos RH. Neste sentido, foram assim identificados 11 carcinomas com uma expressão de Ki-67 inferior a 15%, sendo que os mesmos obtiveram expressões de RH de 95%, outros 3 casos obtiveram expressões de RE iguais a 95%, mas expressões de RP inferiores a 80%. Além disso, foi identificado uma neoplasia que revelava uma expressão de 75% para RE e 2% RP, com uma expressão de Ki-67 igualmente inferior a 15%. Com expressões de Ki-67 superiores a 15%, foram identificadas 5 situações, no qual 3 destas possuíam expressões de RH superiores a 90% e os restantes casos apresentavam expressões de RH inferiores ou iguais a 80%. No seguimento desta análise, é possível concluir que a relação anteriormente estabelecida aplica-se aos dados apresentados, embora seja possível identificar neoplasias com expressões de Ki-67 reduzidas e contrariamente, expressões de RH elevadas. No entanto, a grande maioria dos 4 casos identificados com expressões de Ki-67 superiores a 15%, possuía de igual modo expressões de RH elevadas.

Do mesmo modo, para finalizar a análise estatística das relações estabelecidas entre os parâmetros de interesse e os restantes dados clínicos nos 30 tumores NST, foi analisada a relação estabelecida entre a expressão de Ki-67 e a expressão de RH.

Para isso, foi determinado o valor de coeficiente de correlação de -0,246, foi possível identificar uma correlação inversa entre os 2 parâmetros clínicos. Assim, espera-se que valores de expressão de Ki-67 reduzidos, estabeleçam uma associação com valores de expressão de RH elevados. Como forma completar a correlação identificada, foram reconhecidos 6 carcinomas com expressões de Ki-67 inferiores aos 15% e expressões de RH de maioritariamente superiores a 80%, para ambos os recetores. Apesar da grande variabilidade de valores de expressão de RH, em situações com expressões de Ki-67 superiores a 15%, foram identificadas 6 neoplasias com ausência de expressão do RP.

Desta forma, valida-se a correlação entre valores de expressão de Ki-67 mais elevados, encontram-se associados a valores de expressão de RH mais reduzidos.

Não obstante, segundo a literatura existe uma variabilidade entre os diferentes laboratórios, no que se refere ao valor de Ki-67. Assim, é recomendada a utilização da informação proveniente do estudo da proteína, mas sempre tendo em conta os valores de referência do laboratório, visto que estes podem ser distintos consoante o laboratório (Focke et al., 2017).

Embora se tenha verificado um número reduzido de casos clínicos que revelavam sinais de expressão de *HER2*, foram igualmente analisados todos os dados. No que respeita a idade dos carcinomas identificados, no caso dos carcinomas lobulares, uma das pacientes apresentava uma idade inferior a 50 anos e a outra paciente, possuía uma idade superior aos 50 anos de idade. No entanto, nos 2 carcinomas de tipo NST, ambas pacientes possuíam idades inferior aos 50 anos. Segundo dados de estudos precedentes, a expressão de *HER2* é observada em casos clínicos com idades inferiores aos 50 anos de idade, sendo que os dados aqui apresentados vão de encontro com o esperado (Seo et al., 2006). Já na avaliação da expressão de Ki-67, dos 3 carcinomas que possuíam dados relativamente a este parâmetro, um deles apresentava valores de expressão da proteína inferiores a 15%, um outro carcinoma demonstrava valores iguais a 15% e por fim, o restante carcinoma possuía valores superiores a 15%. É de referir que as expressões com valores mais elevados, correspondem aos casos clínicos de carcinoma de tipo NST. De acordo com estudos previamente realizados, valores de sobre expressão de *HER2*, foram associados a valores de expressão de Ki-67 elevados (Shokouh et al., 2015). No entanto, no presente estudo não foi observada a associação anteriormente referida.

Capítulo 6
Conclusões e
perspetivas futuras

6 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Muitos são os estudos realizados com o intuito de fornecer resposta a tantas questões colocadas na área do cancro da mama. O valor dos biomarcadores e a sua utilidade clínica estão em constante avaliação, de forma a esclarecer as numerosas dúvidas existentes. No entanto, até à presente dada ainda não foi possível chegar a um consenso relativamente a alguns destes biomarcadores, existindo na literatura muitas publicações com resultados contraditórios. Efetivamente, os valores determinados em estudos científicos por vezes apresentam-se com uma grande discrepância entre si, as opiniões e hipóteses dos autores rumam em direções opostas, dificultando assim todo este processo. Nesse sentido, o presente projeto foi idealizado de forma a contribuir para esta pesquisa que carece de respostas. Trata-se de uma série pequena, em que se identificaram no decorrer do estudo muitas lacunas no que se refere a variáveis clínicas, mas também a variáveis biológicas, mas que apesar de tudo permitiu tirar algumas conclusões, que deverão obviamente ser validadas através de novos estudos. Através da seleção dos carcinomas da mama mais frequentes, esperou-se contribuir com alguns dados científicos, ou comprovar os dados já existentes.

Na literatura, todos os estudos existentes analisaram de uma forma generalizada os tumores de tipos diferentes, com séries muito heterogéneas quer do ponto de vista histológico quer do ponto de vista clínico e de estágio. Desta forma, tentou-se nesta série uma análise focada em tumores com características similares de estadiamento clínico.

Muitos foram os dados recolhidos no decorrer do presente estudo, e foram avaliadas relações entre variáveis clínicas e características histológicas dos diferentes tipos de carcinomas nesta série. Em relação à análise dos 60 carcinomas em simultâneo, a grande maioria das correlações encontradas foram de encontro com os dados disponíveis na literatura, muito devido à dimensão da amostra. Já na análise dos 30 carcinomas de tipo lobular e de tipo NST em separado, também foram estabelecidas diversas correlações entre as variáveis. Em suma, é possível constatar que a média das idades determinada (61 anos) para o carcinoma lobular se encontrava no intervalo esperado. Por outro lado, no que respeita a média das idades das 30 pacientes com carcinoma de tipo NST, o valor determinado foi de 57 anos de idade. Relativamente à existência de metastização, também este dado clínico se encontrava inserido entre os intervalos descritos por outros estudos científicos. De igual modo, encontram-se dentro dos valores descritos os valores de expressão de RH identificados nos 30 casos de carcinoma do tipo NST. Ademais,

salientaram-se valores elevados de expressão de RH, alcançando valores superiores a 90%. Não obstante, a presença de recidiva numa percentagem de 6,6%, insere-se de igual modo no intervalo de valores sugeridos pela literatura para carcinomas da mama de tipo luminal.

Para os carcinomas lobulares, em termos da avaliação de episódios de metastização, a correlação com os outros parâmetros clínicos foi dificultada, pela escassez de dados porque muitos dos casos dos carcinomas lobulares não tinham registo dessa informação. No que concerne ao parâmetro de recidiva, apesar da escassez de dados referentes a este achado clínico, foi possível determinar uma percentagem, estando esta dentro dos valores de referência.

Por outro lado, a análise da expressão de RH revelou a existência de algumas correlações entre os parâmetros avaliados. Registou-se um elevado número de casos de tumores lobulares com expressões de RE superiores a 90%, contrariamente à expressão de RP, que revelou menores expressões.

Em relação aos parâmetros de foco do presente estudo, a infiltração peritumoral em carcinomas NST teve uma correlação negativa com a idade das pacientes, retirando-se desta análise, que é esperado que idades mais avançadas estejam associadas a valores de infiltração peritumoral mais reduzidos. Este aspeto pode ser explicado pela maior “eficácia” do sistema imune nas doentes mais jovens. Por outro lado, a relação entre a infiltração peritumoral e o estado de recidiva nos tumores lobulares revelou a existência de uma correlação positiva. De forma contrária, a relação definida entre a infiltração peritumoral e o estado de recidiva em carcinomas NST, não demonstrou ter qualquer tipo de correlação.

Do mesmo modo, a associação estabelecida entre a infiltração peritumoral e a expressão de RH em carcinomas lobulares e carcinomas de tipo NST, não revelou a existência de correlação entre as variáveis.

No que respeita a infiltração intratumoral e a idade das pacientes com carcinoma lobular, as duas variáveis correlacionam-se de forma inversa, esperando-se assim que taxas de infiltrações intratumorais mais elevadas, estejam associadas a idades mais jovens. Do mesmo modo, em tumores de tipo NST, a infiltração intratumoral encontra-se correlacionada à idade, estando as variáveis igualmente correlacionadas inversamente.

Por outra perspectiva, a infiltração intratumoral e o estado de recidiva presente nas 30 participantes com neoplasias lobulares deste estudo, encontravam-se correlacionadas de forma positiva. Em relação à infiltração intratumoral e ao estado de recidiva em tumores NST, também o estudo estatístico revelou a existência de uma correlação positiva.

No que respeita a associação definida entre a infiltração intratumoral e a expressão de RH, a mesma não demonstrou existência de correlação em carcinomas lobulares. Concordantemente, os valores obtidos entre a relação da infiltração intratumoral e o estado de expressão de RH entre carcinomas de tipo NST, também não revelaram estar correlacionados entre si.

Por outro lado, também a associação entre a expressão do biomarcador Ki-67 e a expressão de RH revelou um maior número de correlações, sendo o parâmetro de interesse mais correlacionado com as outras variáveis clínicas. É de referir que de acordo com os registos de carcinomas de tipo lobular, foram estabelecidas 2 correlações positivas moderadas, e ter a expressão deste biomarcador e o estado de infiltração peritumoral e intratumoral. Por outro lado, a idade, o estado de recidiva, bem como a expressão de RH, encontravam-se correlacionadas de forma fraca com a expressão de Ki-67. Da mesma forma, em carcinomas de tipo NST, a expressão de Ki-67 e a infiltração intratumoral revelaram correlação moderada, embora negativa correlacionando-se assim inversamente. Por outra via, a idade, o estado de infiltração peritumoral, o estado de recidiva e a expressão de RH, encontravam-se correlacionados de forma fraca com o biomarcador, sendo que a infiltração peritumoral e a expressão de RH, correlacionavam-se inversamente com a expressão de Ki-67.

No tocante à expressão de *HER2*, poucos foram os carcinomas que apresentavam amplificação deste marcador pelo que não foi possível fazer qualquer estudo estatístico significativo relativamente a este biomarcador.

A escassez de correlações moderadas ou fortes nos casos clínicos aqui estudados, encontra-se relacionada ao facto da constante insuficiência de informação encontrada, maioritariamente nos carcinomas lobulares e à dimensão reduzida desta amostra. Um dos fatores influenciadores para esta relação, é o facto da maioria dos carcinomas lobulares aqui estudados, serem bastante antigos e portanto, com menos informação clínica, visto que algumas das variáveis estudadas não eram consideradas de relevância clínica à data do diagnóstico e portanto, não eram

avaliadas ou não foram registradas. Assim, sugere-se a análise de casos mais recentes de modo a incluir maior informação referente as variáveis clínicas e biológicas.

O estudo desta série permitiu avaliar a evolução dos relatórios clínicos e anatomopatológicos. Assim, nos casos mais atuais foi possível encontrar e recolher um maior conteúdo de informação clínica e das características da biologia relativamente a cada tumor. Com a realização da presente pesquisa, verificou-se que relatórios atuais contêm frequentemente referências que contribuem de uma forma muito importante, para o diagnóstico do tumor, mas também fatores de prognóstico e resposta preditiva de terapêutica, contribuindo assim para a orientação correta de cada caso.

A morfologia e outras características das células cancerígenas, são alguns dos requisitos de extrema importância na hora do diagnóstico clínico e portanto, deve-se dar o devido destaque a todos estes fatores. Torna-se muito relevante estudar e analisar minuciosamente cada caso, incluindo toda a informação que pode ser importante para o prognóstico de cada caso.

Capítulo 7

Referências

7 REFERÊNCIAS

Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Blows, F. M., Liu, B., Shah, M., Earl, H. M., Poole, C. J., Hiller, L., Dunn, J. A., Bowden, S. J., Twelves, C., Bartlett, J. M. S., Mahmoud, S. M. A., Rakha, E., Ellis, I. O., Liu, S., Gao, D., Nielsen, T. O., ... Caldas, C. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Annals of Oncology*, 25(8), 1536–1543. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu191>

Alkhayyal, N., Elemam, N. M., Hussein, A., Magdub, S., Jundi, M., Maghazachi, A. A., Talaat, I. M., & Bendaraf, R. (2022). Expression of immune checkpoints (PD-L1 and IDO) and tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Heliyon*, 8(9), e10482. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10482>

Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, M. G., Sica, A., & Mantovani, A. (2008). Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.003>

Allison, K. H., Hammond, M. E. H., Dowsett, M., McKernin, S. E., Carey, L. A., Fitzgibbons, P. L., Hayes, D. F., Lakhani, S. R., Chavez-MacGregor, M., Perlmutter, J., Perou, C. M., Regan, M. M., Rimm, D. L., Symmans, W. F., Torlakovic, E. E., Varella, L., Viale, G., Weisberg, T. F., McShane, L. M., & Wolff, A. C. (2020). Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 144(5), 545–563. <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0904-SA>

Alluri, P., & Newman, L. A. (2014). Basal-like and triple-negative breast cancers: Searching for positives among many negatives. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 23(3), 567–577. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2014.03.003>

Amin, M. B., American Joint Committee on Cancer, & American Cancer Society (Eds.). (2017). *AJCC cancer staging manual* (Eight edition / editor-in-chief, Mahul B. Amin, MD, FCAP ; editors, Stephen B. Edge, MD, FACS [and 16 others] ; Donna M. Gress, RHIT, CTR-Technical editor ; Laura R. Meyer, CAPM-Managing editor). American Joint Committee on Cancer, Springer.

Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., & Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>

Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkäs, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., Fostira, F., Tomiak, E., Neuhausen, S. L., Teo, Z. L., Khan, S., Aittomäki, K., Moilanen, J. S., Turnbull, C., Seal, S., Mannermaa, A., ... Tischkowitz, M. (2014). Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in *PALB2*. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 497–506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400382>

Antoniou, A. C., Pharoah, P. P. D., Smith, P., & Easton, D. F. (2004). The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 91(8),

1580–1590. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602175>

Badve, S. S., & Gökmen-Polar, Y. (2019). Ductal carcinoma in situ of breast: Update 2019. *Pathology*, *51*(6), 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.07.005>

Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: Back to Virchow? *The Lancet*, *357*(9255), 539–545. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0)

Breast Tumours, WHO Classification of Tumours (5.^a ed.). (2019). WHO Classification Editorial Board.

Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Family history and risk of breast cancer: An analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Research and Treatment*, *165*(1), 193–200. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4325-2>

Cabral, A. H., Recine, M., Paramo, J. C., McPhee, M. M., Poppiti, R., & Mesko, T. W. (2003). Tubular Carcinoma of the Breast: An Institutional Experience and Review of the Literature. *The Breast Journal*, *9*(4), 298–301. <https://doi.org/10.1046/j.1524-4741.2003.09409.x>

CANCER TODAY Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020. (2020). <https://gco.iarc.fr/today/home>

Cao, A.-Y., Huang, L., Wu, J., Lu, J.-S., Liu, G.-Y., Shen, Z.-Z., Shao, Z.-M., & Di, G.-H. (2012). Tumor characteristics and the clinical outcome of invasive lobular carcinoma compared to infiltrating ductal carcinoma in a Chinese population. *World Journal of Surgical Oncology*, *10*(1), 152. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-10-152>

Catacchio, I., Silvestris, N., Scarpi, E., Schirosi, L., Scattone, A., & Mangia, A. (2019). Intratumoral, rather than stromal, CD8+ T cells could be a potential negative prognostic marker in invasive breast cancer patients. *Translational Oncology*, *12*(3), 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.12.005>

Chan, J. K. C. (2014). The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, *22*(1), 12–32. <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>

Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *101*(10), 736–750. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>

Chtourou, I., Makni, S. K., Bahri, I., Abbes, K., Sellami, A., Fakhfakh, I., Gouiaa, N., Ayadi, L., Frikha, M., Daoud, J., & Boudawara, T. S. (2009). Carcinome colloïde pur du sein: Étude anatomoclinique de sept cas. *Cancer/Radiothérapie*, *13*(1), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2008.06.004>

Cocquyt, V., & Belle, S. V. (2005). Lobular carcinoma in situ and invasive lobular cancer of the breast: *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *17*(1), 55–60. <https://doi.org/10.1097/00001703-200502000-00010>

Cooper GM. (2000). *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. The Development and Causes of Cancer.* Sunderland (MA): Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

Culver, J. O., Bowen, D. J., Reynolds, S. E., Pinsky, L. E., Press, N., & Burke, W. (2009). Breast cancer risk communication: Assessment of primary care physicians by standardized patients. *Genetics in Medicine, 11*(10), 735–741. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181b2e5eb>

Dawson, D. A., & Thompson, G. B. (1990). Breast cancer risk factors and screening: United States, 1987. *Vital and Health Statistics. Series 10, Data from the National Health Survey, 172*, iii–iv, 1–60.

De Azambuja, E., Cardoso, F., De Castro, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., Sotiriou, C., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M. J., & Paesmans, M. (2007). Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British Journal of Cancer, 96*(10), 1504–1513. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603756>

De Mattos-Arruda, L. (2020). PIK3CA mutation inhibition in hormone receptor-positive breast cancer: Time has come. *ESMO Open, 5*(4), e000890. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2020-000890>

De Rose, F., Meduri, B., De Santis, M. C., Ferro, A., Marino, L., Colciago, R. R., Gregucci, F., Vanoni, V., Apolone, G., Di Cosimo, S., Delalogue, S., Cortes, J., & Curigliano, G. (2022). Rethinking breast cancer follow-up based on individual risk and recurrence management. *Cancer Treatment Reviews, 109*, 102434. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102434>

Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B. M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., Von Törne, C., Weichert, W., Engels, K., Solbach, C., Schrader, I., Dietel, M., & Von Minckwitz, G. (2010). Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology, 28*(1), 105–113. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7370>

Desmedt, C., Salgado, R., Fornili, M., Pruneri, G., Van den Eynden, G., Zoppoli, G., Rothé, F., Buisseret, L., Garaud, S., Willard-Gallo, K., Brown, D., Bareche, Y., Rouas, G., Galant, C., Bertucci, F., Loi, S., Viale, G., Di Leo, A., Green, A. R., ... Sotiriou, C. (2018). Immune Infiltration in Invasive Lobular Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute, 110*(7), 768–776. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx268>

Donczo, B., & Guttman, A. (2018). Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 155*, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.065>

Dossus, L., & Benusiglio, P. R. (2015). Lobular breast cancer: Incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Research, 17*(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0546-7>

Droeser, R., Zlobec, I., Kilic, E., Güth, U., Heberer, M., Spagnoli, G., Oertli, D., & Tapia, C. (2012). Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. *BMC Cancer, 12*(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-134>

El Bairi, K., Haynes, H. R., Blackley, E., Fineberg, S., Shear, J., Turner, S., De Freitas, J. R., Sur, D., Amendola, L. C., Gharib, M., Kallala, A., Arun, I., Azmoudeh-Ardalan, F., Fujimoto, L., Sua, L. F., Liu, S.-W., Lien, H.-C., Kirtani, P., Balancin, M., ... Van Diest, P. J. (2021). The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *Npj Breast Cancer*, 7(1), 150. <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00346-1>

El Ghamrasni, S., Quevedo, R., Hawley, J., Mazrooei, P., Hanna, Y., Cirilan, I., Zhu, H., Bruce, J. P., Oldfield, L. E., Yang, S. Y. C., Guilhamon, P., Reimand, J., Cescon, D. W., Done, S. J., Lupien, M., & Pugh, T. J. (2022). Mutations in Noncoding *Cis* -Regulatory Elements Reveal Cancer Driver Cistromes in Luminal Breast Cancer. *Molecular Cancer Research*, 20(1), 102–113. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0471>

Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). 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*, 19(5), 403–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>

Ernster, V. L. (2002). Detection of Ductal Carcinoma In Situ in Women Undergoing Screening Mammography. *CancerSpectrum Knowledge Environment*, 94(20), 1546–1554. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.20.1546>

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: A hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

Finkelman, B. S., Zhang, H., Hicks, D. G., & Turner, B. M. (2023). The Evolution of Ki-67 and Breast Carcinoma: Past Observations, Present Directions, and Future Considerations. *Cancers*, 15(3), 808. <https://doi.org/10.3390/cancers15030808>

Fioretti, F., Tavani, A., Bosetti, C., Vecchia, C. L., Negri, E., Barbone, F., Talamini, R., & Franceschi, S. (1999). Risk factors for breast cancer in nulliparous women. *British Journal of Cancer*, 79(11–12), 1923–1928. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690306>

Focke, C. M., Bürger, H., Van Diest, P. J., Finsterbusch, K., Gläser, D., Korsching, E., Decker, T., Anders, M., Bollmann, R., Eiting, Fr., Friedrich, K., Habeck, J.-O., Haroske, G., Hinrichs, B., Behrens, A., Krause, U., Lang, U., Lorenzen, J., Minew, N., ... Woziwodski, J. (2017). Interlaboratory variability of Ki67 staining in breast cancer. *European Journal of Cancer*, 84, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.07.041>

Freitas, A. J. A. de, Causin, R. L., Varuzza, M. B., Calfa, S., Hidalgo Filho, C. M. T., Komoto, T. T., Souza, C. de P., & Marques, M. M. C. (2022). Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9952. <https://doi.org/10.3390/ijms23179952>

Fu, F., Gilmore, R. C., & Jacobs, L. K. (2018). Ductal Carcinoma In Situ. *Surgical Clinics of North America*, 98(4), 725–745. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2018.03.007>

Gao, Z., Li, C., Liu, M., & Jiang, J. (2020). Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: A meta-analysis. *BMC Cancer*, 20(1), 1150. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07654-y>

García-Torralba, E., Pérez Ramos, M., Ivars Rubio, A., Navarro-Manzano, E., Blaya Boluda, N., De La Morena Barrio, P., García-Garre, E., Martínez Díaz, F., Chaves-Benito, A., García-Martínez, E., & Ayala De La Peña, F. (2023). Clinical Meaning of Stromal Tumor Infiltrating Lymphocytes (sTIL) in Early Luminal B Breast Cancer. *Cancers*, 15(10), 2846. <https://doi.org/10.3390/cancers15102846>

Gennari, A., André, F., Barrios, C. H., Cortés, J., de Azambuja, E., DeMichele, A., Dent, R., Fenlon, D., Gligorov, J., Hurvitz, S. A., Im, S.-A., Krug, D., Kunz, W. G., Loi, S., Penault-Llorca, F., Ricke, J., Robson, M., Rugo, H. S., Saura, C., ... Harbeck, N. (2021). ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 32(12), 1475–1495. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.019>

Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E., & Flad, H. D. (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *The American Journal of Pathology*, 138(4), 867–873.

González, C. A., & Agudo, A. (2012). Carcinogenesis, prevention and early detection of gastric cancer: Where we are and where we should go. *International Journal of Cancer*, 130(4), 745–753. <https://doi.org/10.1002/ijc.26430>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074), 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

He, L., Wang, Y., Wu, Q., Song, Y., Ma, X., Zhang, B., Wang, H., & Huang, Y. (2020). Association between levels of tumor-infiltrating lymphocytes in different subtypes of primary breast tumors and prognostic outcomes: A meta-analysis. *BMC Women's Health*, 20(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12905-020-01038-x>

Hinton, J. P., Dvorak, K., Roberts, E., French, W. J., Grubbs, J. C., Cress, A. E., Tiwari, H. A., & Nagle, R. B. (2019). A Method to Reuse Archived H&E Stained Histology Slides for a

Multiplex Protein Biomarker Analysis. *Methods and Protocols*, 2(4), 86. <https://doi.org/10.3390/mps2040086>

Howlander, N., Altekruze, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A. G., & Cronin, K. A. (2014). US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106(5). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju055>

Huang, H., Hu, J., Maryam, A., Huang, Q., Zhang, Y., Ramakrishnan, S., Li, J., Ma, H., Ma, V. W. S., Cheuk, W., So, G. Y. K., Wang, W., Cho, W. C. S., Zhang, L., Chan, K. M., Wang, X., & Chin, Y. R. (2021). Defining super-enhancer landscape in triple-negative breast cancer by multiomic profiling. *Nature Communications*, 12(1), 2242. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22445-0>

Hyeraci, M., Papanikolaou, E. S., Grimaldi, M., Ricci, F., Pallotta, S., Monetta, R., Minafò, Y. A., Di Lella, G., Galdo, G., Abeni, D., Fania, L., & Dellambra, E. (2023). Systemic Photoprotection in Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancer. *Biomolecules*, 13(7), 1067. <https://doi.org/10.3390/biom13071067>

Idikio, H. A. (2011). Human cancer classification: A systems biology- based model integrating morphology, cancer stem cells, proteomics, and genomics. *Journal of Cancer*, 2, 107–115. <https://doi.org/10.7150/jca.2.107>

International Agency for Research on Cancer. (2022). *CANCER TODAY*. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=population&mode_population=countries&population=900&population_s=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=5&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=1

Inwald, E. C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstädter, F., Zeman, F., Koller, M., Gerstenhauer, M., & Ortmann, O. (2013). Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(2), 539–552. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2560-8>

Jafari, S. H., Saadatpour, Z., Salmaninejad, A., Momeni, F., Mokhtari, M., Nahand, J. S., Rahmati, M., Mirzaei, H., & Kianmehr, M. (2018). Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), 5200–5213. <https://doi.org/10.1002/jcp.26379>

Jalal, H., Pechlivanoglou, P., Krijkamp, E., Alarid-Escudero, F., Enns, E., & Hunink, M. G. M. (2017). An Overview of R in Health Decision Sciences. *Medical Decision Making*, 37(7), 735–746. <https://doi.org/10.1177/0272989X16686559>

Kamranzadeh, H., Ardekani, R. M., Kasaeian, A., Sadighi, S., Maghsudi, S., Jahanzad, I., & Maleki, N. (2019). Association between Ki-67 expression and clinicopathological features in prognosis of breast cancer: A retrospective cohort study. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 24, 30. https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_553_18

King, C. R., Kraus, M. H., & Aaronson, S. A. (1985). Amplification of a Novel v- *erb* B-

Related Gene in a Human Mammary Carcinoma. *Science*, 229(4717), 974–976. <https://doi.org/10.1126/science.2992089>

Kohler, B. A., Sherman, R. L., Howlader, N., Jemal, A., Ryerson, A. B., Henry, K. A., Boscoe, F. P., Cronin, K. A., Lake, A., Noone, A.-M., Henley, S. J., Ehemann, C. R., Anderson, R. N., & Penberthy, L. (2015). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv048>

Kolberg-Liedtke, C., Feuerhake, F., Garke, M. et al. (2022). Impact of stromal tumor-infiltrating lymphocytes (sTILs) on response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative early breast cancer in the WSG-ADAPT TN trial. *Breast Cancer Res*, 24, 58. <https://doi.org/10.1186>

Kolberg-Liedtke, C., Gluz, O., Heinisch, F., Feuerhake, F., Kreipe, H., Clemens, M., Nuding, B., Malter, W., Reimer, T., Wuerstlein, R., Graeser, M., Shak, S., Nitz, U., Kates, R., Christgen, M., & Harbeck, N. (2020). Association of TILs with clinical parameters, Recurrence Score® results, and prognosis in patients with early HER2-negative breast cancer (BC)-a translational analysis of the prospective WSG PlanB trial. *Breast Cancer Research: BCR*, 22(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01283-w>

Konsti, J., Lundin, M., Joensuu, H., Lehtimäki, T., Sihto, H., Holli, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Kataja, V., Sailas, L., Isola, J., & Lundin, J. (2011). Development and evaluation of a virtual microscopy application for automated assessment of Ki-67 expression in breast cancer. *BMC Clinical Pathology*, 11(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-11-3>

Kurbel, S., Dmitrović, B., Marjanović, K., Vrbanec, D., & Juretić, A. (2017). Distribution of Ki-67 values within HER2 & ER/PgR expression variants of ductal breast cancers as a potential link between IHC features and breast cancer biology. *BMC Cancer*, 17(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3212-x>

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. (2012). *WHO Classification of Tumours of the Breast* (WHO, Vol. 4).

Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>

Latta, E. K., Tjan, S., Parkes, R. K., & O'Malley, F. P. (2002). The Role of HER2/neu Overexpression/Amplification in the Progression of Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Carcinoma of the Breast. *Modern Pathology*, 15(12), 1318–1325. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000038462.62634.B1>

Leone, J. P., & Lin, N. U. (2019). Systemic Therapy of Central Nervous System Metastases of Breast Cancer. *Current Oncology Reports*, 21(6), 49. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0802-6>

Leong, A. S.-Y., & Zhuang, Z. (2011a). The Changing Role of Pathology in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Pathobiology*, 78(2), 99–114. <https://doi.org/10.1159/000292644>

Leong, A. S.-Y., & Zhuang, Z. (2011b). The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular*

Biology, 78(2), 99–114. <https://doi.org/10.1159/000292644>

Levin, E. R., & Pietras, R. J. (2008). Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 108(3), 351–361. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9618-4>

Lewandowska, A., Rudzki, M., Rudzki, S., Lewandowski, T., & Laskowska, B. (2019). Environmental risk factors for cancer – review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(1), 1–7. <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>

Li, C. I., Daling, J. R., & Malone, K. E. (2005). Age-Specific Incidence Rates of *In situ* Breast Carcinomas by Histologic Type, 1980 to 2001. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(4), 1008–1011. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0849>

Li, K., Ricker, K., Tsai, F. C., Hsieh, C. J., Osborne, G., Sun, M., Marder, M. E., Elmore, S., Schmitz, R., & Sandy, M. S. (2021). Estimated Cancer Risks Associated with Nitrosamine Contamination in Commonly Used Medications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9465. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189465>

Li, Y. (2006). Using the open-source statistical language R to analyze the dichotomous Rasch model. *Behavior Research Methods*, 38(3), 532–541. <https://doi.org/10.3758/BF03192809>

Limaïem, F., Khan, M., & Lotfollahzadeh, S. (2023). Lobular Breast Carcinoma. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554578/>

Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J. P. A., Hitre, E., De Azambuja, E., Quinaux, E., Di Leo, A., Michiels, S., Piccart, M. J., & Sotiriou, C. (2013). Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of Clinical Oncology*, 31(7), 860–867. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902>

Lopez-Garcia, M. A., Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways: Molecular evolution of breast cancer. *Histopathology*, 57(2), 171–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03568.x>

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>

McCart Reed, A. E., Kalinowski, L., Simpson, P. T., & Lakhani, S. R. (2021). Invasive lobular carcinoma of the breast: The increasing importance of this special subtype. *Breast Cancer Research: BCR*, 23(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01384-6>

Mohammed, Z. M. A., McMillan, D. C., Elsberger, B., Going, J. J., Orange, C., Mallon, E., Doughty, J. C., & Edwards, J. (2012). Comparison of Visual and automated assessment of Ki-67 proliferative activity and their impact on outcome in primary operable invasive ductal breast cancer. *British Journal of Cancer*, 106(2), 383–388. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.569>

Mohr, S. B., Garland, C. F., Gorham, E. D., Grant, W. B., & Garland, F. C. (2011). Ultraviolet B and Incidence Rates of Leukemia Worldwide. *American Journal of Preventive Medicine*, 41(1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2011.04.003>

Mullangi, S., & Lekkala, M. R. (2023). Adenocarcinoma. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562137/>

Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., Van Loo, P., Ju, Y. S., Smid, M., Brinkman, A. B., Morganella, S., Aure, M. R., Lingjærde, O. C., Langerød, A., Ringnér, M., ... Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47–54. <https://doi.org/10.1038/nature17676>

Nishimura, R., Osako, T., Okumura, Y., Hayashi, M., Toyozumi, Y., & Arima, N. (2010). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(5), 747–754. <https://doi.org/10.3892/etm.2010.133>

Paijens, S. T., Vledder, A., de Bruyn, M., & Nijman, H. W. (2021). Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(4), 842–859. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00565-9>

Park, H.-L., & Hong, J. (2014). Vacuum-assisted breast biopsy for breast cancer. *Gland Surgery*, 3(2), 120–127. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2227-684X.2014.02.03>

Patel, A. (2020). Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology*, 6(9), 1488. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>

Penault-Llorca, F., & Radosevic-Robin, N. (2017). Ki67 assessment in breast cancer: An update. *Pathology*, 49(2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.11.006>

Perez, E. A., Ballman, K. V., Tenner, K. S., Thompson, E. A., Badve, S. S., Bailey, H., & Baehner, F. L. (2016). Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncology*, 2(1), 56. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.3239>

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

Petrelli, F., Viale, G., Cabiddu, M., & Barni, S. (2015). Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 153(3), 477–491. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3559-0>

Proietti, C. J., Cenciarini, M. E., & Elizalde, P. V. (2018). Revisiting progesterone receptor (PR) actions in breast cancer: Insights into PR repressive functions. *Steroids*, 133, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.12.015>

Pruneri, G., Lorenzini, D., Mastropasqua, M. G., Perrone, G., Rizzo, A., Santini, D., Volpi, C. C., Cinieri, S., Zambelli, A., Sapino, A., & Castellano, I. (2023). The central role of pathology labs in breast cancer precision oncology: A call for action. *Npj Breast Cancer*, 9(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41523-023-00506-5>

Pujol, P., Barberis, M., Beer, P., Friedman, E., Piulats, J. M., Capoluongo, E. D., Garcia Foncillas, J., Ray-Coquard, I., Penault-Llorca, F., Foulkes, W. D., Turnbull, C., Hanson, H., Narod, S., Arun, B. K., Aapro, M. S., Mandel, J.-L., Normanno, N., Lambrechts, D., Vergote, I., ... Alés Martínez, J. E. (2021). Clinical practice guidelines for BRCA1 and BRCA2 genetic testing. *European Journal of Cancer*, 146, 30–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.12.023>

Rakha, E. A., & Green, A. R. (2017). Molecular classification of breast cancer: What the pathologist needs to know. *Pathology*, 49(2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.012>

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Badve, S., & Ellis, I. O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Research*, 12(4), 207. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>

Randolph, W. M. (2002). Regular Mammography Use Is Associated with Elimination of Age-Related Disparities in Size and Stage of Breast Cancer at Diagnosis. *Annals of Internal Medicine*, 137(10), 783. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-10-200211190-00006>

Ritte, R., Lukanova, A., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Mesrine, S., Fagherazzi, G., Dossus, L., Teucher, B., Steindorf, K., Boeing, H., Aleksandrova, K., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Palli, D., Grioni, S., Mattiello, A., Tumino, R., ... Kaaks, R. (2013). Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: A cohort study. *International Journal of Cancer*, 132(11), 2619–2629. <https://doi.org/10.1002/ijc.27913>

Ruan, M., Tian, T., Rao, J., Xu, X., Yu, B., Yang, W., & Shui, R. (2018). Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers. *Diagnostic Pathology*, 13(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0743-7>

Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A., Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., ... International TILs Working Group 2014. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(2), 259–271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>

Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 23(S2), S60–S64. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.33>

Seo, B. K., Pisano, E. D., Kuzimak, C. M., Koomen, M., Pavic, D., Lee, Y., Cole, E. B., &

Lee, J. (2006). Correlation of HER-2/neu Overexpression With Mammography and Age Distribution in Primary Breast Carcinomas. *Academic Radiology*, 13(10), 1211–1218. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2006.06.015>

Shamir, E. R., Chen, Y.-Y., Chu, T., Pekmezci, M., Rabban, J. T., & Krings, G. (2019). Pleomorphic and Florid Lobular Carcinoma In Situ Variants of the Breast: A Clinicopathologic Study of 85 Cases With and Without Invasive Carcinoma From a Single Academic Center. *American Journal of Surgical Pathology*, 43(3), 399–408. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001191>

Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(2), 109–126.

Shokouh, T. Z., Ezatollah, A., & Barand, P. (2015). Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes: Retrospective-Observational Analytical Study. *Medicine*, 94(32), e1359. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001359>

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>

Silva, C. F., Melo Abreu, E., Marques, J. C., & Pool, K.-L. (2021). Annual Breast Cancer Screening Beginning at Age 40: Why Should Portugal Choose Wisely? *Acta Médica Portuguesa*, 34(11), 717–720. <https://doi.org/10.20344/amp.16601>

Soliman NA & Yussif SM. (sem data). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol Med*. 2016 Dec, 496–504. <https://doi.org/10.20892%2Fj.issn.2095-3941.2016.0066>

Stuart-Harris, R., Caldas, C., Pinder, S. E., & Pharoah, P. (2008). Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *The Breast*, 17(4), 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2008.02.002>

Sudhir, R., Sannapareddy, K., Potlapalli, A., & Penmetsa, V. (2021). Clinico-radiopathological Features and Biological Behavior of Breast Cancer in Young Indian Women: A Prospective Study. *The Indian Journal of Radiology & Imaging*, 31(2), 323–332. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1734342>

Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P., & Zhu, H.-P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>

Suresh, S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells☆. *Acta Biomaterialia*, 3(4), 413–438. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.002>

Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (Eds.). (2019). *Bancroft's theory and practice of histological techniques* (Eighth edition). Elsevier.

Tagliafico, A. S., Bignotti, B., Rossi, F., Matos, J., Calabrese, M., Valdora, F., & Houssami, N. (2019). Breast cancer Ki-67 expression prediction by digital breast tomosynthesis radiomics

features. *European Radiology Experimental*, 3(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s41747-019-0117-2>

Tan, P. H., Ellis, I., Allison, K., Brogi, E., Fox, S. B., Lakhani, S., Lazar, A. J., Morris, E. A., Sahin, A., Salgado, R., Sapino, A., Sasano, H., Schnitt, S., Sotiriou, C., Diest, P., White, V. A., Lokuhetty, D., Cree, I. A., & for the WHO Classification of Tumours Editorial Board. (2020). The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*, 77(2), 181–185. <https://doi.org/10.1111/his.14091>

Tashima, R., Nishimura, R., Osako, T., Nishiyama, Y., Okumura, Y., Nakano, M., Fujisue, M., Toyozumi, Y., & Arima, N. (2015). Evaluation of an Optimal Cut-Off Point for the Ki-67 Index as a Prognostic Factor in Primary Breast Cancer: A Retrospective Study. *PLOS ONE*, 10(7), e0119565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119565>

Thomas, M., Kelly, E. D., Abraham, J., & Kruse, M. (2019). Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Seminars in Oncology*, 46(2), 121–132. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.03.002>

Tice, J. A., & Kerlikowske, K. (2009). Screening and Prevention of Breast Cancer in Primary Care. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 36(3), 533–558. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2009.04.003>

Torre, L. A., Islami, F., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2017). Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 26(4), 444–457. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0858>

Trihia, H., Murray, S., Price, K., Gelber, R. D., Golouh, R., Goldhirsch, A., Coates, A. S., Collins, J., Castiglione-Gertsch, M., Gusterson, B. A., & for the International Breast Cancer Study Group. (2003). Ki-67 expression in breast carcinoma: Its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors? A surrogate marker? *Cancer*, 97(5), 1321–1331. <https://doi.org/10.1002/cncr.11188>

Truin, W., Roumen, R. M. H., Siesling, S., van de Vijver, K. K., Tjan-Heijnen, V. C. G., & Voogd, A. C. (2017). Estrogen and progesterone receptor expression levels do not differ between lobular and ductal carcinoma in patients with hormone receptor-positive tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 164(1), 133–138. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4220-x>

Types of Cancer. (2022). National Cancer Institute at the National Institutes of Health; National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#types>

Unger-Saldaña, K. (2014). Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 465–477. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.465>

Urruticoechea, A., Smith, I. E., & Dowsett, M. (2005). Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(28), 7212–7220. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.501>

Vahid, F., Hajizadeghan, K., & Khodabakhshi, A. (2023). Nutritional Metabolomics in Diet–

Breast Cancer Relations: Current Research, Challenges, and Future Directions—A Review. *Biomedicines*, 11(7), 1845. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071845>

Valenza, C., Taurelli Salimbeni, B., Santoro, C., Trapani, D., Antonarelli, G., & Curigliano, G. (2023). Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. *Cancers*, 15(3), 767. <https://doi.org/10.3390/cancers15030767>

Wang, L. (2017). Early Diagnosis of Breast Cancer. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17(7), 1572. <https://doi.org/10.3390/s17071572>

Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology*, 4(3), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>

Wellings, E., Vassiliades, L., & Abdalla, R. (2016). Breast Cancer Screening for High-Risk Patients of Different Ages and Risk—Which Modality Is Most Effective? *Cureus*, 8(12), e945. <https://doi.org/10.7759/cureus.945>

Wen, H. Y., & Brogi, E. (2018). Lobular Carcinoma In Situ. *Surgical Pathology Clinics*, 11(1), 123–145. <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.009>

Wick, M. R. (2019). The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology—An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 36(5), 303–311. <https://doi.org/10.1053/j.semmdp.2019.06.003>

Wilson, N., Ironside, A., Diana, A., & Oikonomidou, O. (2021). Lobular Breast Cancer: A Review. *Frontiers in Oncology*, 10, 591399. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.591399>

Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In *Em Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 151, pp. 1–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>

Yip, C.-H., & Rhodes, A. (2014). Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncology*, 10(14), 2293–2301. <https://doi.org/10.2217/fon.14.110>

Youn, H. J., & Han, W. (2020). A Review of the Epidemiology of Breast Cancer in Asia: Focus on Risk Factors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(4), 867–880. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.4.867>

Zgura, A., Galesa, L., Bratila, E., & Anghel, R. (2018). Relationship between Tumor Infiltrating Lymphocytes and Progression in Breast Cancer. *Maedica*, 13(4), 317–320. <https://doi.org/10.26574/maedica.2018.13.4.317>

Zhang, J., Wang, Z., Hu, X., Wang, B., Wang, L., Yang, W., Liu, Y., Liu, G., Di, G., Hu, Z., Wu, J., & Shao, Z. (2015). Cisplatin and gemcitabine as the first line therapy in metastatic triple negative breast cancer: Cisplatin and Gemcitabine as first line therapy in mTNBC. *International Journal of Cancer*, 136(1), 204–211. <https://doi.org/10.1002/ijc.28966>

Zhu, H., & Doğan, B. E. (2021). American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians. *European Journal of Breast Health*, 17(3), 234–238. <https://doi.org/10.4274/ejbh.galenos.2021.2021-4-3>

Capítulo 8

Anexos

8 ANEXOS

Anexo A

Tabela A.1: Análise dos 30 carcinomas lobulares. Descrição de diversos parâmetros clínicos: RH, follow-up, recidiva, metástase, idade, infiltração peritumoral, intratumoral e expressão de Ki-67.

Características	N = 30 ¹
RE e RP	
100% RE e 0% RP	2 (6.7%)
100% RE e 100% RP	3 (10%)
100% RE e 90% RP	2 (6.7%)
100% RE e 95% RP	1 (3.3%)
75% RE e 2% RP	1 (3.3%)
80% RE e 0% RP	1 (3.3%)
80% RE e 60% RP	1 (3.3%)
95% RE e 0% RP	1 (3.3%)
95% RE e 10% RP	1 (3.3%)
95% RE e 100% RP	1 (3.3%)
95% RE e 75% RP	1 (3.3%)
95% RE e 80% RP	1 (3.3%)
95% RE e 95% RP	11 (37%)
98% RE e 50% RP	1 (3.3%)
Incerteza	2 (6.7%)
Follow-up	
Faleceu	1 (3.3%)
Viva	29 (97%)
Recidiva	
Ausente	17 (57%)
Incerteza	12 (40%)
Presente	1 (3.3%)
Metástases	
Ausente	14 (47%)

Características	N = 30¹
Incerteza	14 (47%)
Presente	2 (6%)
Idade	61 (39 - 83)
Infiltração Peritumoral	
Ausente	1 (3.3%)
Incerteza	22 (73%)
Ligeiro	4 (13.3%)
Moderado	3 (10%)
Infiltração Intratumoral	
Ausente	5 (17%)
Incerteza	18 (60%)
Ligeiro	5 (17%)
Moderado	2 (6%)
Ki-67	
10%	4 (13%)
10,3%	1 (3.3%)
10,5%	1 (3.3%)
11,5%	1 (3.3%)
12%	2 (6.7%)
13,3%	1 (3.3%)
15%	3 (10%)
20%	2 (6.7%)
25%	1 (3.3%)
5%	2 (6.7%)
5,6%	1 (3.3%)
50%	1 (3.3%)
6,3%	1 (3.3%)
7,5%	1 (3.3%)
8,6%	1 (3.3%)
Incerteza	7 (23.3%)

¹n (%); Mean (Range)

Tabela A.2: Análise dos 30 carcinomas NST. Descrição de diversos parâmetros clínicos: RH, follow-up, recidiva, metástase, idade, infiltração peritumoral, intratumoral e expressão de Ki-67.

Características	N = 30¹
RE e RP	
0% RE e 0% RP	2 (6.7%)
100% RE e 0% RP	3 (10%)
100% RE e 100% RP	11 (37%)
100% RE e 50% RP	1 (3.3%)
100% RE e 80% RP	1 (3.3%)
100% RE e 90% RP	2 (6.7%)
100% RE e 95% RP	1 (3.3%)
50% RE e 0% RP	1 (3.3%)
75% RE e 60% RP	1 (3.3%)
90% RE e 0% RP	1 (3.3%)
95% RE e 0% RP	1 (3.3%)
95% RE e 95% RP	5 (17%)
Incerteza	0 (0%)
Follow-up	
Faleceu	0 (0%)
Viva	30 (100%)
Recidiva	
Ausente	12 (40%)
Incerteza	18 (53%)
Presente	2 (6.7%)
Metástases	
Ausente	19 (63%)
Incerteza	11 (37%)
Presente	0 (0%)
Idade	57 (35 - 81)

Características	N = 30¹
Infiltração Peritumoral	
Ausente	13 (43%)
Incerteza	0 (0%)
Ligeiro	17 (53%)
Moderado	0 (0%)
Infiltração Intratumoral	
Ausente	14 (47%)
Incerteza	0 (0%)
Ligeiro	16 (53%)
Moderado	0 (0%)
Ki-67	
10%	4 (13%)
15%	5 (17%)
20%	4 (13%)
22%	1 (3.3%)
25%	6 (20%)
30%	4 (13%)
35%	2 (6.7%)
40%	2 (6.7%)
5%	1 (3.3%)
8%	1 (3.3%)
Incerteza	0 (0%)

¹n (%); Mean (Range)

Anexo B

Tabela B.1: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas lobulares, entre a infiltração peritumoral e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração.

Características	Ausente, N = 1 ¹	Incerteza, N = 22 ¹	Ligeiro, N = 4 ¹	Moderado, N = 3 ¹	p-value ²
RE e RP					0.10
100% RE e 0% RP	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
100% RE e 100% RP	0 (0%)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	
100% RE e 90% RP	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	
100% RE e 95% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
75% RE e 2% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
80% RE e 0% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
80% RE e 60% RP	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
95% RE e 0% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 10% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
95% RE e 100% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 75% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 80% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 95% RP	1 (9.1%)	10 (91%)	0 (0%)	0 (0%)	
98% RE e 50% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
Incerteza	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	
Recidiva					0.3
Ausente	0 (0%)	15 (88%)	1 (5.9%)	1 (5.9%)	
Incerteza	1 (8.3%)	6 (50%)	3 (25%)	2 (17%)	
Presente	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Metástases					0.14
Ausente	1 (7.1%)	7 (50%)	4 (29%)	2 (14%)	
Incerteza	0 (0%)	13 (93%)	0 (0%)	1 (7.1%)	
Presente	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Idade	47 (47 - 47)	61 (39 - 83)	56 (43 - 74)	67 (49 - 80)	0.5
Infiltração Intratumoral					<0.001
Ausente	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	
Incerteza	0 (0%)	18 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ligeiro	1 (20%)	0 (0%)	3 (60%)	1 (20%)	
Moderado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	

Ki-67

0.2

10%	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
10.3%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
10.5%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
11.5%	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
12%	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)
13.3%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
15%	0 (0%)	0 (0%)	2 (67%)	1 (33%)
20%	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
25%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
5%	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
5.6%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
50%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
6.3%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
7.5%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
8.6%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Incerteza	0 (0%)	6 (86%)	0 (0%)	1 (14%)

¹n (%); Median (IQR)

²Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test

Tabela B.2: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas NST, entre a infiltração peritumoral e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração intratumoral e expressão de Ki-67.

Características	Ausente, N = 13 ¹	Incerteza, N = 0 ¹	Ligeiro, N = 17 ¹	Moderado, N = 0 ¹	p-value ²
RE e RP					0.3
0% RE e 0% RP	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	
100% RE e 0% RP	1 (33%)	0 (0%)	2 (67%)	0 (0%)	
100% RE e 100% RP	4 (36%)	0 (0%)	7 (64%)	0 (0%)	
100% RE e 50% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
100% RE e 80% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
100% RE e 90% RP	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
100% RE e 95% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
50% RE e 0% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
75% RE e 60% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
90% RE e 0% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 0% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 95% RP	3 (60%)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	
Recidiva					0.038
Ausente	5 (42%)	0 (0%)	7 (58%)	0 (0%)	
Incerteza	7 (44%)	0 (0%)	9 (56%)	0 (0%)	
Presente	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	
Metástases					0.001
Ausente	11 (58%)	0 (0%)	8 (42%)	0 (0%)	
Incerteza	2 (18%)	0 (0%)	9 (82%)	0 (0%)	
Presente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Idade	62 (44 - 81)	NA (NA, NA)	53 (35 - 73)	NA (NA, NA)	0.046
Infiltração Intratumoral					<0.001
Ausente	12 (86%)	0 (0%)	2 (14%)	0 (0%)	
Incerteza	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ligeiro	1 (6.3%)	0 (0%)	15 (94%)	0 (0%)	
Moderado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

Ki-67

0.006

10%	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)
15%	1 (20%)	0 (0%)	4 (80%)	0 (0%)
20%	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
22%	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
25%	3 (50%)	0 (0%)	3 (50%)	0 (0%)
30%	1 (25%)	0 (0%)	3 (75%)	0 (0%)
35%	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
40%	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)
5%	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
8%	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Incerteza	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

¹n (%); Median (IQR)²Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test

Anexo C

Tabela C.1: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas lobulares, entre a infiltração intratumoral e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração peritumoral e expressão de Ki-67.

Características	Ausente, N = 5 ¹	Incerteza, N = 18 ¹	Ligeiro, N = 5 ¹	Moderado , N = 2 ¹	p-value ²
RE e RP					0.14
100% RE e 0% RP	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	
100% RE e 100% RP	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)	0 (0%)	
100% RE e 90% RP	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	
100% RE e 95% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
75% RE e 2% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
80% RE e 0% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
80% RE e 60% RP	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
95% RE e 0% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 10% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
95% RE e 100% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 75% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 80% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 95% RP	1 (9.1%)	9 (82%)	1 (9.1%)	0 (0%)	
98% RE e 50% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Incerteza	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	
Recidiva					0.5
Ausente	4 (24%)	11 (65%)	1 (5.9%)	1 (5.9%)	
Incerteza	1 (8.3%)	6 (50%)	4 (33%)	1 (8.3%)	
Presente	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Metástases					0.016
Ausente	4 (29%)	4 (29%)	5 (36%)	1 (7.1%)	
Incerteza	1 (7.1%)	12 (86%)	0 (0%)	1 (7.1%)	
Presente	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Idade	63 (43 - 83)	60 (39 - 83)	60 (46 - 74)	65 (49 - 80)	0.9
Infiltracao Peritumoral					<0.001
Ausente	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
Incerteza	4 (18%)	18 (82%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ligeiro	1 (25%)	0 (0%)	3 (75%)	0 (0%)	
Moderado	0 (0%)	0 (0%)	1 (33%)	2 (67%)	

Ki-67

0.031

10%	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
10,3%	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
10,5%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
11,5%	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
12%	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)
13,3%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
15%	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)
20%	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
25%	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5%	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)
5,6%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
50%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
6,3%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
7,5%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
8,6%	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Incerteza	1 (14%)	5 (71%)	0 (0%)	1 (14%)

¹n (%); Mean (Range)

²Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test

Tabela C.2: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas NST, entre a infiltração intratumoral e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração peritumoral e expressão de Ki-67.

Características	Ausente, N = 14¹	Incerteza, N = 1¹	Ligeiro, N = 16¹	Moderado, N = 1¹	p-value²
RE e RP					0.5
0% RE e 0% RP	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	
100% RE e 0% RP	1 (33%)	0 (0%)	2 (67%)	0 (0%)	
100% RE e 100% RP	5 (45%)	0 (0%)	6 (55%)	0 (0%)	
100% RE e 50% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
100% RE e 80% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
100% RE e 90% RP	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	
100% RE e 95% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
50% RE e 0% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
75% RE e 60% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
90% RE e 0% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 0% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 95% RP	2 (40%)	0 (0%)	3 (60%)	0 (0%)	
Recidiva					0.036
Ausente	6 (50%)	0 (0%)	6 (50%)	0 (0%)	
Incerteza	7 (44%)	0 (0%)	9 (56%)	0 (0%)	
Presente	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	
Metástases					0.003
Ausente	11 (58%)	0 (0%)	8 (42%)	0 (0%)	
Incerteza	3 (27%)	0 (0%)	8 (73%)	0 (0%)	
Presente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Idade	64 (44 - 81)	NA (NA - NA)	51 (35 - 73)	NA (NA- NA)	0.007
Infiltração Peritumoral					<0.001
Ausente	12 (92%)	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	
Incerteza	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ligeiro	2 (12%)	0 (0%)	15 (88%)	0 (0%)	
Moderado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ki-67					0.2
10%	1 (25%)	0 (0%)	3 (75%)	0 (0%)	
15%	1 (20%)	0 (0%)	4 (80%)	0 (0%)	

20%	3 (75%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
22%	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
25%	3 (50%)	0 (0%)	3 (50%)	0 (0%)
30%	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)
35%	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
40%	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)
5%	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
8%	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Incerteza	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

¹n (%); Mean (Range)

²Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test

Anexo D

Tabela D.1: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas lobulares, entre a expressão de Ki-67 e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração peritumoral, infiltração intratumoral e expressão de Ki-67.

Características	15, N = 3¹	<15, N = 22¹	>15, N = 5¹	p-value²
RE e RP				0.059
100% RE e 0% RP	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
100% RE e 100% RP	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)	
100% RE e 90% RP	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	
100% RE e 95% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
75% RE e 2% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
80% RE e 0% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
80% RE e 60% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
95% RE e 80% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
95% RE e 0% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
95% RE e 10% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
95% RE e 100% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
95% RE e 75% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
95% RE e 95% RP	0 (0%)	10 (91%)	1 (9.1%)	
98% RE e 50% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
Incerteza	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
Recidiva				0.3
Ausente	0 (0%)	14 (82%)	3 (18%)	
Incerteza	3 (25%)	7 (58%)	2 (17%)	
Presente	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
Metástases				0.3
Ausente	3 (21%)	8 (57%)	3 (21%)	
Incerteza	0 (0%)	12 (86%)	2 (14%)	
Presente	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
Idade	64 (46 - 74)	60 (39 - 83)	62 (45 - 83)	0.5

Infiltração Peritumoral				0.026
Ausente	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
Incerteza	0 (0%)	18 (82%)	4 (18%)	
Ligeiro	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	
Moderado	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)	
Infiltração Intratumoral				0.021
Ausente	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	
Incerteza	0 (0%)	15 (83%)	3 (17%)	
Ligeiro	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	
Moderado	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	

¹n (%); Median (IQR)

²Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test

Tabela D.2: Análise das relações estabelecidas dos 30 carcinomas NST, entre a expressão de Ki-67 e os restantes parâmetros clínicos: RH, recidiva, metástases, idade, infiltração peritumoral, infiltração intratumoral e expressão de Ki-67.

Características	15, N = 5 ¹	<15, N = 6 ¹	>15, N = 19 ¹	p-value ²
RE e RP				0.3
0% RE e 0% RP	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	
100% RE e 0% RP	0 (0%)	1 (33%)	2 (67%)	
100% RE e 100% RP	3 (27%)	4 (36%)	4 (36%)	
100% RE e 50% RP	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
100% RE e 80% RP	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
100% RE e 90% RP	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
100% RE e 95% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
50% RE e 0% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
75% RE e 60% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
90% RE e 0% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
95% RE e 0% RP	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
95% RE e 95% RP	0 (0%)	0 (0%)	5 (100%)	
Recidiva				0.13
Ausente	2 (17%)	2 (17%)	8 (67%)	
Incerteza	3 (19%)	4 (25%)	9 (56%)	
Presente	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
Metástases				0.022
Ausente	2 (11%)	4 (21%)	13 (68%)	
Incerteza	3 (27%)	2 (18%)	6 (55%)	
Presente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Idade	48 (35 - 69)	53 (41 - 72)	61 (43 - 81)	0.10
Infiltração Peritumoral				<0.001
Ausente	1 (7.7%)	0 (0%)	12 (92%)	
Incerteza	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ligeiro	4 (24%)	6 (35%)	7 (41%)	
Moderado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

Infiltração Intratumoral

0.002

Ausente	1 (7.1%)	1 (7.1%)	12 (86%)
Incerteza	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ligeiro	4 (25%)	5 (31%)	7 (44%)
Moderado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

¹n (%); Median (IQR)²Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test