



Diagnóstico, prognóstico e terapêutica da neoplasia da mama: o papel da anatomia patológica

Amadeu Borges Ferro, Carina Ladeira e Mário Matos
2008

(Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
Área Científica de Anatomia Patológica)

RESUMO

O carcinoma da mama é uma doença heterogénea, a que correspondem aspectos morfológicos distintos, comportamentos biológicos diferentes e implica a escolha de terapêuticas diferentes mais adequadas a cada pessoa, sendo para isso fundamental uma abordagem multidisciplinar, em que o diagnóstico através da Anatomia Patológica é indispensável.

A Anatomia Patológica contribui, pelo menos, de três formas para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica do carcinoma da mama, sendo estes: o exame histopatológico, a imunocitoquímica e a hibridização in situ.

Palavras-chave: Carcinoma da mama, Anatomia Patológica, Histopatologia, Imunocitoquímica, Hibridização in situ.

INTRODUÇÃO

Sendo a forma de cancro mais comum na mulher e possuindo taxas de incidência que têm vindo a subir gradualmente, o carcinoma da mama é uma doença heterogénea a que correspondem aspectos morfológicos distintos e comportamentos biológicos diferentes¹. Implica a escolha de terapêuticas diferentes e mais adequadas a cada pessoa, sendo para isso fundamental uma abordagem multidisciplinar, em que o diagnóstico, prognóstico e indicação terapêutica através da Anatomia Patológica são indispensáveis.

O carcinoma da mama pode ser dividido em dois grandes grupos: carcinoma intraductal ou in situ – confinado aos ductos, sem invasão do estroma mamário, sem capacidade de metastização – e o carcinoma invasivo – quando ultrapassa os ductos e tem capacidade de invadir vasos e metastizar.

Sendo este um artigo de revisão, não se optou pela estrutura tradicional, para facilitar a compreensão dos conceitos.

HISTOPATOLOGIA

O exame histopatológico permite caracterizar o tipo de neoplasia, bem como a existência ou não de metastização.

A avaliação da invasão dos gânglios linfáticos é o factor de prognóstico de maior importância que se baseia no exame histológico. Os factores a avaliar neste procedimento são: número de gânglios envolvidos; tamanho da metástase e extensão extraganglionar; presença de micrometástases e metástases extracapsulares². Os procedimentos de colheita e análise que se destacam são a técnica do gânglio sentinela (TGS) e a análise histopatológica do esvaziamento axilar (EA).

A TGS implica a identificação, extracção e análise intra-operatória (durante a cirurgia) do primeiro gânglio a receber a drenagem linfática proveniente de um tumor. Teoricamente, em caso de metástase axilar, este será o primeiro gânglio comprometido³. Admite-se que se o GS não possuir qualquer metástase, os outros gânglios também estarão livres e vice-versa. Com a sua identificação e análise anátomo-patológica, é possível prever se a cadeia ganglionar axilar está ou não comprometida⁴. A aplicação da TGS tem a mais-valia de permitir uma pesquisa altamente direccionada



e de ser muito menos dolorosa e invasivo. Apesar disso existe ainda a necessidade de uma maior comprovação científica da sua total eficiência em casos de micrometástase. O EA implica a análise de toda a cadeia ganglionar axilar verificando a existência ou não de metastização – Figura 1. Tem como vantagem a obtenção de maior número de gânglios e, conseqüentemente, maior amostra para fundamentar o prognóstico. No entanto, a sua realização pode implicar um risco aumentado de morbidade pós-operatória, redução da mobilidade do ombro e linfedema crónico do membro superior respectivo⁵. Se não for bem processado podem surgir eventuais falhas a nível da procura manual de gânglios.



Figura 1 – Zona de esvaziamento linfático axilar.

A identificação do GS pode fazer-se através da utilização de um radioisótopo – normalmente o Técnesio 99 – que é injectado junto ao tumor ou na zona peri-auréolar que, sendo drenado por via linfática, vai permitir a localização do GS por detecção de radioactividade. Em alternativa ou concomitantemente pode também ser utilizado o corante azul-de-metileno⁶ – ver Figura 2.

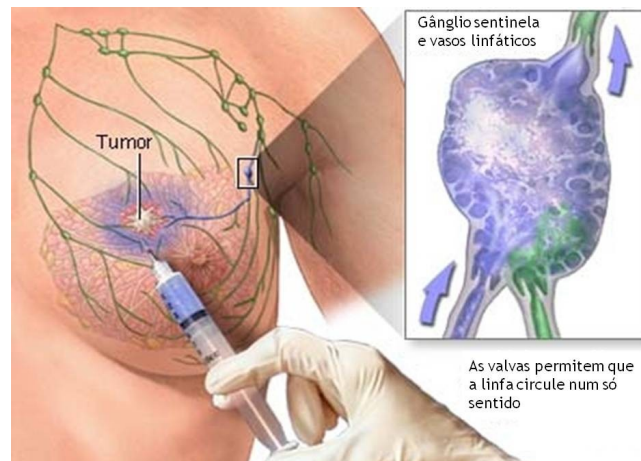


Figura 2 – Identificação de gânglio sentinela pelo corante azul-de-metileno.

O GS é removido cirurgicamente e dividido ao meio se menor que 10 mm ou seccionado segundo o maior eixo se maior ou igual a 10 mm. A análise do GS faz-se de duas formas: corte de congelação (realizado no crióstato) e, posteriormente, fixação em formaldeído e processamento histopatológico em parafina. Tanto num como noutro caso poderá ser utilizada a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e a marcação Imunocitoquímica (ICQ) para a identificação de citoqueratinas (clones AE1/AE3 e MNF116) e consequente detecção de micrometástases - Figura 3.

A avaliação intra-operatória que indique GS negativo para metástases indicará que os restantes gânglios axilares não estão comprometidos, não sendo por isso necessário realizar esvaziamento axilar. Caso o resultado seja positivo actua-se no sentido de extrair os restantes gânglios numa primeira instância, podendo posteriormente optar-se pela mastectomia radical, quadrantectomia ou tumorectomia, consoante a gravidade do caso 7.

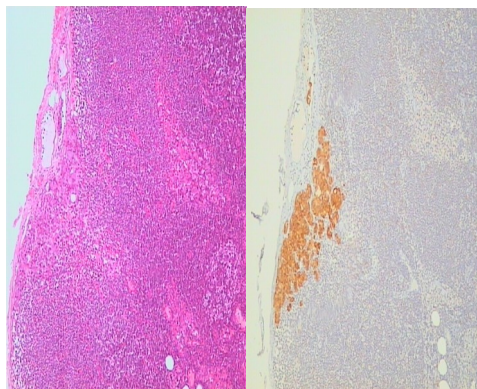


Figura 3 – TGS positiva com coloração de HE em corte de congelação (esq.); no mesmo caso, TGS com imunomarcagem para citoqueratinas (clone MNF 116) em corte de congelação (dir.).

Imunocitoquímica

Utilizando anticorpos específicos para uma determinada molécula a ICQ permite a sua visualização em lâmina histológica e consequente contextualização tecidual – Figura 4.

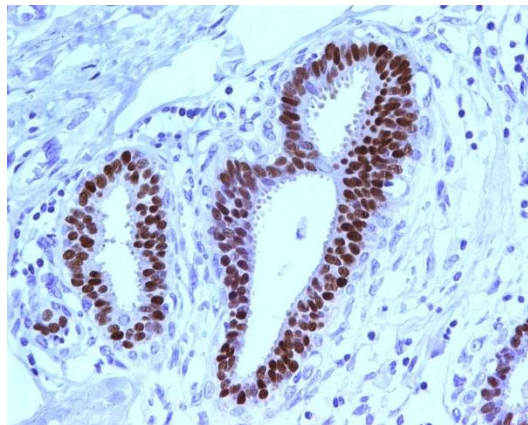


Figura 4 – Imunomarcação para Receptores de estrogénio em fibroadenoma da mama. 100X.

A ICQ pode constituir um contributo adicional na identificação de micrometastização, no entanto, a sua grande contribuição surgiu no passado recente, quando diversas estratégias começaram a ser aplicadas para um combate mais eficiente à neoplasia da mama, nomeadamente a terapêutica por trastuzumab® que implica a utilização de anticorpos humanizados de hamster chinês dirigidos contra a glicoproteína transmembranar de 185 kD codificada pelo proto-oncogene HER-2, 9. Estes anticorpos são injectados no doente e, posteriormente, vão ligar-se à referida proteína HER-2, facultando a sua destruição por acção do sistema imunitário autóctone. Este mecanismo tem validade pois verificou-se que em 15% a 30% dos casos de carcinoma da mama, o gene HER-2 se encontra amplificado, conduzindo à produção de proteína HER-2 em redundância o que, consequentemente, torna os mecanismos de estimulação do crescimento tumoral demasiado exuberantes¹⁰, mas por outro lado, constitui o alvo perfeito para as terapêuticas dirigidas. A identificação da expressão de HER-2 no carcinoma da mama por ICQ é indispensável quando se considera a elegibilidade dos doentes para a terapêutica com o trastuzumab®¹¹.

Assim, das várias técnicas existentes para a determinação do status HER-2, a mais utilizada é a ICQ (Figura 5) que qualifica a sua expressão pelo uso de anticorpos que reconhecem como antigénio o seu domínio extracelular¹². Posteriormente essa ligação antigénio-anticorpo é amplificada por acção de um sistema polimérico que

associa um número elevado de enzimas ao anticorpo previamente colocado. Em seguida este complexo é tornado visível por reacção enzimática, possibilitando assim uma avaliação qualitativa.

Para validação da técnica são utilizados controlos negativos e positivos (internos e externos).

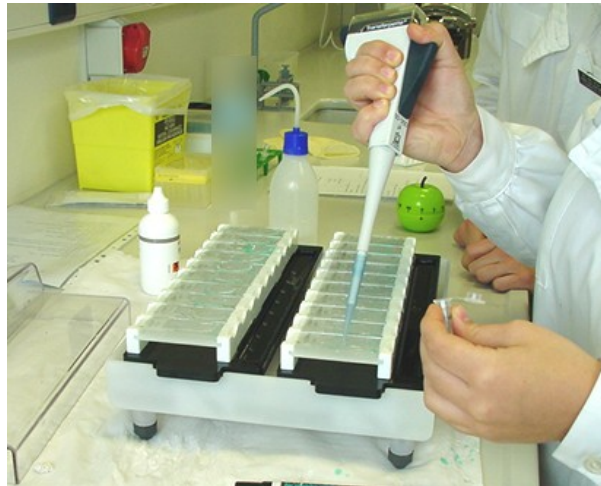


Figura 5 - Pipetagem durante a execução da Técnica imunocitoquímica

A ICQ possibilita 4 níveis qualificativos: 0; 1+; 2+; 3+ (Tabela 1). Os doentes com score 0 e 1+ não são elegíveis para a terapêutica. Os doentes com score 3+ (Figura 6) são directamente elegíveis. Os doentes 2+ necessitam de avaliação subsequente por Fluorescent in situ hibridization (FISH) ou Chromogenic in situ hibridization (CISH) que determinará se possuem amplificação do gene13.

Padrão de coloração	Avaliação da sobreexpressão de HER2	Classificação de intensidade de coloração
Marcação negativa ou observa-se marcação da membrana celular em menos de 10% das células neoplásicas.	Negativa	0
Marcação fraca da membrana em mais de 10% das células neoplásicas. A membrana celular encontra-se parcialmente marcada.	Negativa	1+
Marcação completa fraca/moderada da membrana celular em mais de 10% das células neoplásicas.	Sobreexpressão fraca/moderada	2+
Marcação completa, moderada/forte da membrana em mais de 10% das células neoplásicas.	Sobreexpressão moderada/forte	3+

Tabela 1 - Algoritmo para a quantificação da marcação imunocitoquímica

Destes, apenas os amplificados são electivos para a terapêutica com trastuzumab®, juntando-se assim aos 3+.

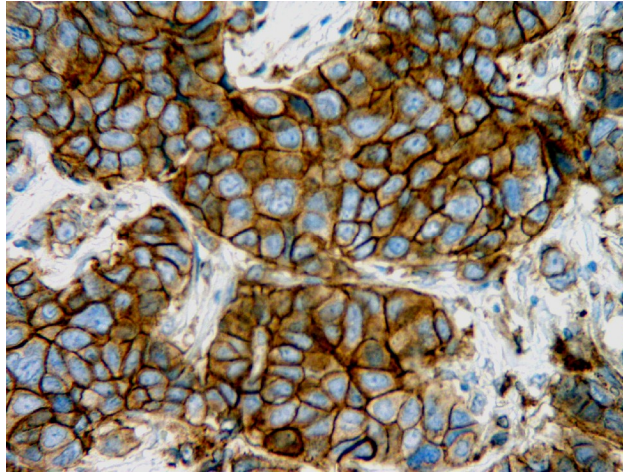


Figura 6 - Marcação ICQ 3+ com forte destaque na membrana celular.

Hibridização in situ

Tal com já foi referido, a quantidade de proteína HER-2 expressa é avaliada por ICQ, sendo que por vezes a resposta não é conclusiva. Para esclarecimento destes casos, tendo em conta que a sobre-expressão é consequência de uma amplificação do oncogene, pode ser realizada uma avaliação por hibridização in situ (HIS). Os casos sobre-expressos ou amplificados são encaminhados para trastuzumab® como terapia adjuvante e neo-adjuvante em carcinoma da mama primário e metastático.

A HIS cromogénica (CISH) para o gene HER-2 é um método que utiliza uma sonda de ADN específica conjugada com digoxigenina. A técnica é efectuada em biópsias ou peças de tumorectomia, consistindo em: permeabilização das membranas; desnaturação total do ADN; hibridização com sonda; lavagens de estringência; detecção ICQ e avaliação. Para validação da técnica são utilizados controlos negativos e positivos (internos e externos).

Em cada caso é seleccionada uma área para contagem e a avaliação é efectuada numa ampliação de 400x e em mais de 50% das células tumorais. Os casos não amplificados apresentam de 1 a 5 pontos por núcleo (figura 7a), os de baixa amplificação de 6 a 10 (figura 7b) e os de grande amplificação possuem mais de 10 (figura 7c) ou grandes aglomerados (figura 7d). Os casos de baixa amplificação são sujeitos a uma avaliação do cromossoma 17 para excluir a hipótese de polissomia.

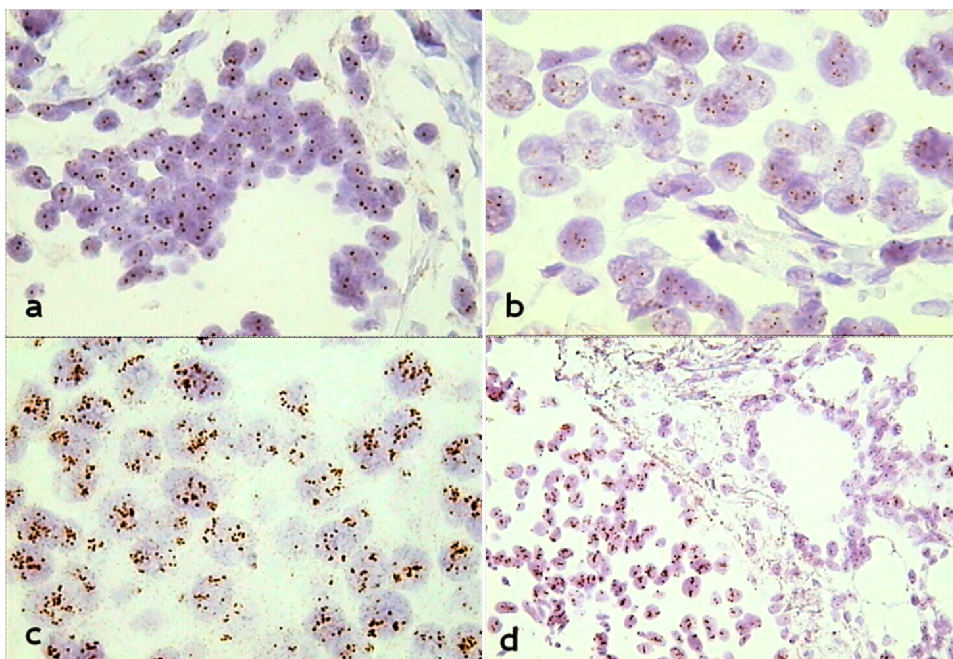


Figura 7 - Técnica de CISH para HER-2. a) Caso de carcinoma da mama não amplificado (1000x) b) Caso de carcinoma da mama com baixa amplificação (1000x) c) Caso de carcinoma da mama de grande amplificação (1000x) d) Caso de metástase hepática de carcinoma da mama de grande amplificação (400x), note-se a presença de controlo interno em células normais.

CONCLUSÃO

A TGS permite não só identificá-lo como removê-lo e tomar uma decisão sobre os caminhos a tomar em cada caso de neoplasia. A grande vantagem da utilização da extracção única do GS em detrimento da remoção total de gânglios imediata é essencialmente a rapidez na recuperação e a cura da incisão. Pode ainda levar a uma avaliação mais correcta sobre se o carcinoma é invasivo ou não, dando informação sobre possíveis micrometástases. Se for estritamente necessário realizar o EA, este será também um fundamental determinante de prognóstico e terapêutica.

Por seu lado, a ICQ apresenta-se aqui como uma arma extremamente potente na indicação terapêutica das doentes com carcinoma da mama. O trastuzumab® implica a aplicação de anticorpos humanizados dirigidos ao domínio extracelular do receptor do HER-2 e sua consequente destruição imunológica¹⁴.

Finalmente a HIS surge como última esclarecedora na determinação da amplificação do oncogene HER-2 permitindo o encaminhamento terapêutico para trastuzumab® em carcinoma da mama¹⁵.

A utilização do trastuzumab®, para além de neo-adjuvante, pode ser aplicada como terapia adjuvante da radioterapia excedendo as taxas de remissão obtidas com a radioterapia como terapia única. Alguns estudos experimentais indicam que o trastuzumab® aumenta a sensibilidade tumoral à radiação, e mostram que a terapêutica combinada com radioterapia diminui o volume tumoral em 15 dias¹³. Existem já estudos de caso publicados onde esta abordagem resultou na remissão tumoral de cancro da mama que não responderam ao tratamento apenas com radiações¹⁶. Estão neste momento a decorrer ensaios clínicos que visam validar esta abordagem terapêutica, assim como explicar melhor os mecanismos subjacentes.

Bibliografia

- 1 - Brenton J, Carey L, Ahmed A, Caldas C (2005). Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? *Journal of Clinical Oncology*. Vol 23, No 29, pp. 7350-7360.
- 2 - Kumar, V. et al. (2007). *Robbins Basic Pathology* (8 ed.). USA: Saunders Book Company.
- 3 - Tanis PJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Th Rutgers EJ, Kroon BB (2001). History of sentinel node and validation of the technique. *Breast Cancer Res* 3:109-12.
- 4 - Cartin J, Scarth H, Levine M & Hugi M (2001). Clinical Practice Guidelines for the care on treatment of breast cancer: Sentinel lymph node biopsy.
- 5 - Solin L, Moore H & Fox K (1999). *Basic and Clinical Oncology*. USA: Informa Healthcare.
- 6 - Golshan M, Nakhli F (2006). Can Methylene Blue Only Be Used in Sentinel Lymph Node Biopsy for Breast Cancer? *The Breast Journal*, Volume 12, Number 5, pp. 428-430(3).
- 7 - The Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the care and treatment of breast cancer – Axillary dissection. (1998). *Canadian Medical Association*, 158, S22-S26.
- 8 - Peiro G, Adrover E, Aranda FI, Peiro FM, Niveiro M, Sanchez-Paya J (2007). Prognostic implications of HER-2 status in steroid receptor-positive, lymph node-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 127(5):780-6.
- 9 - Dowsett M, Hanby AM, Laing R, Walker R. HER-2 testing in the UK: consensus from a national consultation (2007). *J Clin Pathol*. Feb 23;
- 10 - Traina A, Agostara B, Marasa L, Calabro M, Zarccone M, Carruba G (2006). HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci*. 1089:159-67.



- 11 - Laudadio J, Quigley DI, Tubbs R, Wolff DJ (2007). HER2 testing: a review of detection methodologies and their clinical performance. *Expert Rev Mol Diagn.* 7(1):53-64. Review.
- 12 - Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, Cabaret V, Fermeaux V, Bertheau P, Garnier J, Jeannin JF, Coudert B (2006). Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer.* 94(2):259-67.
- 13 - Bellon JR, Gover MT, Burstein HJ, Harris JR, Harris LN. Concurrent Trastuzumab and Radiation Therapy (RT) in the Adjuvant Treatment of Breast Cancer (2005). *Internacional Journal of Radiation Oncology.* 63: 55-56
- 14 - Gonzalez RJ, Buzdar AU, Fraser Symmans W, Yen TW, Broglio KR, Lucci A, Esteva FJ, Yin G, Kuerer HM (2007). Novel clinical trial designs for treatment of ductal carcinoma in situ of the breast with trastuzumab (herceptin). *Breast J.* 13(1):72-5.
- 15 - Wolff A, Hammond M, Schwartz J, Hagerty K, Allred D, Cote R, Dowsett M, Fitzgibbons P, Hanna W, Langer A, McShane L, Paik S, Pegram M, Perez E, Press M, Rhodes A, Sturgeon C, Taube S, Tubbs R, Vance G, van de Vijver M, Wheeler T, Hayes D (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 25: 118-145.
- 16 - Palm S, Bäck T, Claesson I, Danielsson A, Elgqvist J, Frost S, Hultborn R, Jensen H, Lindegren S, Jacobsson L (2007). Therapeutic Efficacy of Astatine-211-Labeled Trastuzumab on Radioresistant SKOV-3 Tumors in Nude Mice. *International Journal of Radiation OncologyBiologyPhysics.* Volume 69, Issue 2, Pages 572 – 579.

