

Estado da publicação: Não informado pelo autor submissor

# CARCINOMA MAMÁRIO DUCTAL INVASOR: CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE AXL E B-CATENINA COM A AGRESSIVIDADE TUMORAL

Lucas Gennaro, Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas , Rafael Koerich Ramos, Bruno Luiz Ariede, Ana Maria Waaga-Gasser, Luiz Martins Collaço, Marcos Fabiano Sigwalt, Jurandir Marcondes Ribas Filho, Luiz Fernando Kubrusly

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.4427>

Submetido em: 2022-07-12

Postado em: 2022-07-12 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

Artigo Original

**TÍTULO: CARCINOMA MAMÁRIO DUCTAL INVASOR: CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE AXL E B-CATENINA COM A AGRESSIVIDADE TUMORAL**

*TITLE: INVASIVE DUCTAL BREAST CARCINOMA: CORRELATION OF AXL AND B-CATENIN IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION WITH TUMOR AGGRESSIVITY*

Lucas **GENNARO**<sup>1</sup>, Carmen Austrália Paredes Marcondes **RIBAS**<sup>1</sup>, RAFAEL KOERICH **RAMOS**<sup>1,2</sup>, BRUNO LUIZ **ARIEDE**, ANA MARIA **WAAGA-GASSER**<sup>1</sup>, LUIZ MARTINS **COLLAÇO**<sup>1</sup>, MARCOS FABIANO **SIGWALT**<sup>1</sup>, JURANDIR MARCONDES **RIBAS-FILHO**<sup>1,2</sup>, LUIZ FERNANDO **KUBRUSLY**<sup>1</sup>

Trabalho realizado na <sup>1</sup>Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; <sup>2</sup>Hospital Universitário Evangélico Mackenzie, Curitiba, PR, Brasil

**ORCID**

Lucas Gennaro <https://orcid.org/0000-0002-4018-9069>

Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas <https://orcid.org/0000-0002-6195-046X>

Rafael Koerich Ramos <https://orcid.org/0000-0003-4930-5721>

Bruno Luiz Ariede <https://orcid.org/0000-0001-5397-6339>

Ana Maria Waaga-Gasser <https://orcid.org/0000-0002-5587-5256>

Luiz Martins Collaço <https://orcid.org/0000-0002-3215-1650>

Marcos Fabiano Sigwalt <https://orcid.org/0000-0002-9899-5493>

Jurandir Marcondes Ribas-Filho <https://orcid.org/0000-0002-5251-7672>

Luiz Fernando Kubrusly <https://orcid.org/0000-0002-6546-9841>

**Correspondência:**

Lucas Gennaro

Email: [lcsennaro@gmail.com](mailto:lcsennaro@gmail.com)

Conflito de interesse: Nenhum

Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

Este artigo como preprint possui endosso do Prof. Dr. Osvaldo Malafaia - <https://orcid.org/0000-0002-1829-7071>

**Contribuição dos autores**

Conceituação: Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas

Análise formal: Luiz Martins Collaço

Investigação: Lucas Gennaro, Matheus Campos Carneiro, Rafael Koerich Ramos

Supervisão: Ana Maria Waaga-Gasser

Redação (esboço original): Marcos Fabiano Sigwalt, Bruno Luiz Ariede

Redação (revisão e edição): Jurandir Marcondes Ribas-Filho

**RESUMO - Introdução:** O carcinoma ductal invasor corresponde ao tipo histológico mais comum da mama coexistindo com formas diferentes de evolução clínica, graduação histológica, expressão de determinados marcadores teciduais e perfis genômicos que procuram melhor entendimento da doença. **Objetivos:** Analisar a correlação dos marcadores  $\beta$ -catenina e AXL com a agressividade tumoral, tendo como referência a sobrevida global, progressão tumoral e fatores prognósticos histopatológicos. **Métodos:** Foi realizado estudo de 101 amostras de carcinoma mamário ductal invasor. Foram incluídas aquelas com diagnóstico do tipo ductal, submetidas inicialmente à biópsia ou tratamento cirúrgico definitivo. Incluiu-se para fins de controle 20 amostras de carcinoma intraductal, 35 de fibroadenoma mamário e 10 de tecido mamário sem qualquer alteração. Foram excluídos os submetidos à quimioterapia neoadjuvante, que não tivessem amostra tumoral prévia ao tratamento quimioterápico, que perderam o seguimento, e com dados incompletos. **Resultados:** Quando analisada a expressão da  $\beta$ -catenina, foi negativa. Quanto ao AXL foram observados diferentes graus de expressão sem significância estatística entre eles. **Conclusão:** Quando analisados adenocarcinoma mamário do tipo ductal invasor em TMA não houve correlação na expressão de  $\beta$ -catenina e AXL quando comparados a sobrevida global, progressão tumoral e grau histológico.

**DESCRITORES** - Carcinoma ductal de mama. Imunoistoquímica. AXL.  $\beta$ -catenina.

**ABSTRACT - Introduction:** Invasive ductal carcinoma corresponds to the most common histological type of the breast, coexisting with different forms of clinical evolution, histological grading, expression of certain tissue markers and genomic profiles that seek a better understanding of the disease. **Objectives:** To analyze the correlation of  $\beta$ -catenin and AXL markers with tumor aggressiveness, with reference to overall survival, tumor progression and histopathological prognostic factors. **Methods:** A study of 101 samples of invasive ductal mammary carcinoma was performed. Those with a diagnosis of ductal type, initially submitted to biopsy or definitive surgical treatment, were included. For control purposes, 20 samples of intraductal carcinoma, 35 of breast fibroadenoma and 10 of breast tissue without any alteration were included. Those undergoing neoadjuvant chemotherapy, those without a tumor sample prior to chemotherapy, those lost to follow-up, and those with incomplete data, were excluded. **Results:** When the  $\beta$ -catenin expression was analyzed, it was negative. As for AXL, different degrees of expression were observed without statistical significance between them. **Conclusion:** When analyzing invasive ductal breast adenocarcinoma in TMA, there was no correlation in the expression of  $\beta$ -Catenin and AXL when compared to overall survival, tumor progression and histological grade.

**KEYWORDS** - Breast ductal carcinoma. Immunohistochemistry. AXL.  $\beta$ -Catenin.

## INTRODUÇÃO

As neoplasias de forma geral ocorrem devido às mutações do material genético celular, alterando diversas funções e, desta forma, a divisão celular processa-se de modo anormal, dando origem aos tumores (WILKES, 2018). O câncer de mama, assim como os demais tumores, é doença heterogênea, podendo ser dividida em diferentes subtipos clínicos e histológicos (ANDERSON, 2014). Nas mulheres ele corresponde à principal neoplasia maligna (excetuando-se os tumores de pele não-melanoma). É importante notar que os dados publicados pelo Instituto Nacional de Câncer também alertam que o seu diagnóstico ocorre, na maioria dos casos, em estádios clínicos III

(44,8%) e IV (16,3%) (PEREGRINO et al., 2012), ou seja, em fases avançadas da doença. Considera-se esta realidade preocupante em razão da maior necessidade, nesses casos, de tratamentos agressivos e de alto custo que envolvem quimioterapia, radioterapia e operações radicais (MAJEWSKI et al., 2012; COSAC et al., 2016).

Convém ressaltar, no entanto, que o processo de carcinogênese é geralmente muito lento, levando vários anos para que proliferação anormal dê origem a lesão tumoral palpável. Em 80% dos casos, as neoplasias mamárias são indolores e somente 10% queixam-se de dor sem a percepção do tumor (BRASIL, 2013).

Os tipos histológicos predominantes dos carcinomas de mama são o ductal e lobular (*in situ* ou infiltrante).

O ductal infiltrante corresponde a aproximadamente 75% dos casos. São relatadas massas ovaladas, lobuladas ou irregulares e com contornos variáveis que podem ser bem definidos, indefinidos ou ainda espiculados (CAMBRUZZI et al., 2010). Ele se manifesta, em geral, como massa espiculada e irregular associado a tecido fibroso denso no estroma, dando ao tumor consistência endurecida. Esse crescimento se apresenta na forma de nódulos, que à palpação pode revelar aderência às estruturas adjacentes ou à parede torácica, e retração da pele e mamilo, distorcendo a estrutura glandular (MATHEUS et al., 2008).

O lobular invasivo pode se apresentar de forma multicêntrica e bilateral. A maioria das pacientes tem apenas adensamento ou endurecimento local mal definido, por vezes, surgindo como área nodular palpável. Em lesões avançadas, pode haver retração de pele. Em relação ao prognóstico e ao padrão de comprometimento axilar, apresenta comportamento semelhante ao carcinoma ductal invasivo (OLIVEIRA; FOLGUEIRA, 2015).

O estadiamento TNM representa o principal fator prognóstico considerando sobrevida e recorrência tumoral; no entanto, a graduação histológica também exerce importante papel principalmente em tumores pequenos e sem comprometimento linfonodal (HAMMOND, 2013).

Outros fatores prognósticos têm sido alvo de pesquisa nas últimas décadas. Dentre eles, pode-se destacar os receptores de hormônio (estrogênio e progesterona) e o receptor do fator de crescimento humano – 2 (*Human Epidermal growth factor Receptor type 2*, HER-2). Assim, lesões consideradas receptores de estrogênio e progesterona positivos predizem boa resposta dos tumores a algum tipo de terapia hormonal. No entanto, tumores receptores de estrogênio (RE) negativo, apresentam maior taxa de recorrência nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. Já a superexpressão de HER-2 está associada ao prognóstico pior quando não consideradas as modalidades terapêuticas atualmente disponíveis (HAMMOND, 2013).

Ainda assim, os parâmetros clínicos, histológicos, receptores hormonais e HER-2 nem sempre podem predizer de forma adequada a evolução do câncer de mama. Dessa forma, fatores prognósticos adicionais têm sido pesquisados visando melhor estratificar os tumores do ponto de vista de agressividade, progressão e recorrência, a fim de individualizar condutas terapêuticas. Nesse sentido, a avaliação do perfil tumoral com base nos achados moleculares (Luminal A, Luminal B, HER-2 e basalóide), de expressão genética (*Oncotype Dx*, *MammaPrint* e *Predictor Analysis of Microarray*) e novos biomarcadores teciduais, entre eles,  $\beta$ -catenina e AXL, tem-se mostrado promissor (TOTHILL; MARCHIONNI, 2009; GOPINATH et al., 2014; BAHADIR e SEZGINTÜRK, 2016).

O objetivo deste estudo foi analisar a correlação dos marcadores  $\beta$ -catenina e AXL com a agressividade tumoral, tendo como referência a sobrevida global, progressão tumoral e fatores prognósticos histopatológicos

## MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada na Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná e Hospital Universitário Evangélico Mackenzie e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba, sob o parecer de número 1.999.671.

### Características da amostra

Trata-se da avaliação de 101 amostras de carcinoma mamário do tipo ductal invasor de pacientes atendidas no hospital no período de 2010 a 2015. Foram incluídas aquelas com diagnóstico do tipo ductal, submetidas inicialmente à biópsia ou tratamento cirúrgico definitivo (resseção segmentar ou mastectomia radical modificada); incluiu-se, também, para fins de controle 20 amostras de carcinoma intraductal, 35 de fibroadenoma mamário e 10 de tecido mamário sem qualquer alteração. Foram excluídas as submetidas à quimioterapia neoadjuvante, que não tivessem amostra tumoral prévia ao tratamento quimioterápico, que perderam o seguimento, e com dados incompletos

Os dados histopatológicos foram coletados e tabulados. Evolução clínica foi acessada em prontuários e dividida em 2 grupos: bom prognóstico - quando apresentasse evolução clínica favorável, ou seja, sem evidência de progressão de doença ou recorrência -, e mau prognóstico - quando com evolução clínica desfavorável, reconhecida pela presença de progressão de doença, recorrência e/ou óbito pela doença durante o acompanhamento ambulatorial. Para classificá-las nesses grupos foram avaliados: progressão da doença, tempo de sobrevida livre de doença, tempo de sobrevida e tempo de seguimento ambulatorial.

### Materiais

Foram realizados blocos multiamostrais (BMA) e analisados por imunistoquímica pela técnica da imunoperoxidase. A incubação com anticorpos primários durou entre 16-20 min em temperatura ambiente. A amplificação foi realizada por Ultraview Universal DAB Detection Kit<sup>®</sup>. O processamento foi todo realizado em plataforma automatizada Ventana Benchmark Ultra<sup>™</sup> ( $\beta$ -catenina: clone 14/Ventana/pré-diluído; AXL: policlonal/St. John's Laboratory/Diluição 1/100). Controles positivos internos e externos atestaram a fidelidade das reações.

### Análise estatística

Os resultados foram descritos por médias, desvios-padrão, valores mínimos e máximos (variáveis quantitativas) ou por frequências e percentuais (variáveis categóricas). Para a análise da associação entre variáveis categóricas e os marcadores, foi usado o teste exato de Fisher ou o teste de qui-quadrado. Esses mesmos testes foram usados para as comparações dos tipos de tumor quanto aos marcadores. O tempo livre de progressão e o de sobrevida foram descritos por curvas de Kaplan-Meier. Para as comparações de grupos, em relação a esses tempos, foi considerado o teste de Log-rank. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Stata/SE v.14.1. StataCorpLP, USA.

## RESULTADOS

A análise apresentada a seguir foi realizada com base nos dados de 87 pacientes com tumor ductal invasor e que preenchiam todos os critérios de inclusão. Outros subtipos foram excluídos. Foi feito o levantamento da idade ao diagnóstico, estadiamento tumoral, sobrevida livre de doença, sinais de progressão, recidiva e/ou morte pela doença. Também foram analisados fatores histopatológicos como graduação do tumor, expressão de receptores hormonais, HER2 e os chamados subtipos substitutos com base em classificação integrativa, que sabidamente são fatores prognósticos e têm estreita relação com a evolução clínica da doença.

Os dados foram colhidos entre os anos de 2005 e 2015, com a maioria tendo sido entre 2011 e 2013. Do total geral de 87 pacientes, 33 (37,9%) tinham menos do que 50 anos e 54 (62,1%) mais que 50. A média de idade foi 55,7+/-12,8 (32-79).

### Estadio clínico, avaliação de receptores, subtipos e evolução clínica

A partir da 8ª edição do AJCC para estadiamento do câncer de mama, além do estadiamento clínico TNM tradicional, incluiu-se o chamado estadiamento prognóstico que considera, entre outros, o grau do tumor, avaliação da expressão do RE, receptor de progesterona (RP) e expressão do HER2 (HARRIS, 2019).

### Classificação TNM

Os parâmetros para estadiamento do câncer foram de acordo com a classificação TNM da 8ª edição do AJCC. A Tabela 1 detalha as variáveis.

**TABELA 1 – Grau tumoral e estadiamento dos tumores mamários (n=87)**

Variável	n	Classificação	Resultado*
Tipo tumoral	87	Ca ductal invasor	87 (100)
Grau	87	G1	4 (4,6)
		G2	38 (43,7)
		G3	45 (51,7)
Grau (G1/G2 agrupados)		G1/G2	42 (48,3)
		G3	45 (51,7)
T (Tamanho tumoral)	87	T1 (2 cm ou menos)	14 (16,1)
		T1c	3 (3,4)
		T2	36 (41,4)
		T3	13 (14,9)
		T4	13 (14,9)
		T4a	1 (1,1)
		T4b	2 (2,3)
		T4d	3 (3,4)
		Tx	2 (2,3)
		T	85
T agrupado/excluindo Tx)		T2	13 (15,3)
		T3	17 (20,0)
		T4	19 (22,4)
		N (metástase para linfonodo axilar regional)	87
		N1	37 (42,5)
		N2	7 (8)
		N2a	3 (3,4)
		N3	7 (8)
		N3c	1 (1,1)
		Nx	4 (4,6)
N (N2/N3 agrupados e excluindo Nx)	83	N0	28 (33,7)
		N1	37 (44,6)
		N2/N3	18 (21,7)

M (Metástase à distância)	87	M0	73 (83,9)
		M1	7 (8)
		Mx	7 (8)
M	87	M0	80 (92,0)
(Mx/M0 agrupados)		M1	7 (8,0)
Tamanho (cm)	76		3,6±2,4 (0,8-15)
		<2	15 (19,7)
		2 a 5	45 (59,2)
		>5	16 (21,1)
Estadio clínico	85	IA	9 (10,6)
		IIA	23 (27,1)
		IIB	18 (21,2)
		IIIA	13 (15,3)
		IIIB	9 (10,6)
		IIIC	6 (7,1)
		IV	7 (8,2)
Estadio clínico	85	I	9 (10,6)
(Agrupados)		II	41 (48,2)
		III	28 (32,9)
		IV	7 (8,2)

\*=Descritos por média ± desvio-padrão (mínimo – máximo) ou por frequência (percentual)

### *Grau do carcinoma mamário*

A classificação histológica derivou de 3 recursos morfológicos, cada um com pontuação de 1 a 3. Em cada bloco procurou-se a primeira característica morfológica com estruturas tubulares, com lúmen claro e visível (ELSTON; ELLIS, 1991); a segunda, foi o pleomorfismo nuclear, e a terceira a atividade mitótica, que pôde ser vista preferencialmente na periferia do tumor, onde identificava-se crescimento ativo.

Vários estudos sugeriram que o grau histológico dos tumores tem forte correlação com a diferenciação tumoral e seu prognóstico (ELSTON, 1984, 1987; ELSTON; ELLIS, 1991). O sistema de classificação Nottingham, que é uma modificação do Scarff-Bloom-Richardson (ELSTON; ELLIS, 1991; ZHANG et al., 2010) foi utilizado na classificação do grau histológico (RAKHA et al., 2010).

Ao analisar a diferenciação tumoral quanto ao grau histológico nesta amostra, observou-se predomínio de tumores G2 (43,7%) e G3 (51,7%, Tabela 1).

### *Tamanho do tumor*

O tamanho do tumor possui alto valor prognóstico e está relacionado à agressividade da doença. Em geral, tumores maiores têm maior probabilidade de comprometimento dos linfonodos axilares, já os de menor tamanho estão relacionados a melhor prognóstico, tanto para o tempo livre de doença, quanto à sobrevida global (ELSTON; ELLIS, 1991; VUKOSAVLJEVIC et al., 2003).

Dentre 76 tumores analisados, a média geral do tamanho tumoral foi de 3,6±2,4 cm, com variação entre 0,8-15 cm. A maioria deles (59,2%) entre 2-5 cm.

### *Linfonodos*

O status linfonodal retrata o comprometimento ou não dos linfonodos axilares por células neoplásicas. Este é fator prognóstico importante do carcinoma invasor seja para análise da sobrevida global ou sobrevida livre da doença. Além disso, existe correlação direta entre o tempo de sobrevida com o número de linfonodos comprometidos (FOLLANA et al., 2014, Tabela 2).

**TABELA 2** – Linfonodos acometidos em linfadenectomia axilar (n=78)

	1—13	4 (5,1)
	1—5	2 (2,6)
	0—13	2 (2,6)
	13—13	2 (2,6)

2--3 (Pos-QT)	2 (2,6)
1--9	2 (2,6)
17--18	2 (2,6)
0--8	2 (2,6)
2--9	2 (2,6)
8--16	1 (1,3)
1--15	1 (1,3)
6--6	1 (1,3)
4--14 (Pos-QT)	1 (1,3)
1--11	1 (1,3)
9--13	1 (1,3)
7--14	1 (1,3)
4--15	1 (1,3)
2--3	1 (1,3)
2--21	1 (1,3)
0--19	1 (1,3)
1--18	1 (1,3)
0--4	1 (1,3)
1--8	1 (1,3)
1--1	1 (1,3)
1--6	1 (1,3)
7--9	1 (1,3)
1--16	1 (1,3)
3--19	1 (1,3)
34--34	1 (1,3)
14--14	1 (1,3)
0--1(Pos-QT)	1 (1,3)
0--7	1 (1,3)
0--2	1 (1,3)
3--3	1 (1,3)
1--12	1 (1,3)
15--18	1 (1,3)
10--12	1 (1,3)
1--10 (Pos-QT)	1 (1,3)
0--10, 0--12 e 0--5	1 (1,3)
3--11	1 (1,3)
9--10	1 (1,3)
3--17	1 (1,3)
5--8	1 (1,3)
6--12	1 (1,3)
0--5	1 (1,3)
4--18	1 (1,3)
11--12	1 (1,3)
9--22	1 (1,3)
5--12	1 (1,3)

### Metástases

A categoria M1 aponta a presença de metástase e setoriza por local de acometimento (Tabela 3).

**TABELA 3 – Localização de metástase à distância (M1)**

Variável	n	Classificação	n (%)
DM local	86	Não	52 (60,5)
		Sim	34 (39,5)
Variável	n	Classificação	n (%)
Local da DM	34	Local	4 (11,8)
		Cérebro	2 (5,9)
		Pulm	2 (5,9)
		Hep/Osso	2 (5,9)
		Hep	2 (5,9)
		Local/Lym	2 (5,9)
		Osso/Pulm/Lym	1 (2,9)
		Per	1 (2,9)
		Hep/Pulm/Lym	1 (2,9)
		Hep/Lym	1 (2,9)
		Lym	1 (2,9)
		Osso/Pulm/Cérebro	1 (2,9)

	Osso	1 (2,9)
	Pulm/Cérebro	1 (2,9)
	Osso/Cérebro	1 (2,9)
	Pulm/Lym	1 (2,9)
	Local/Pulm/Lym	1 (2,9)
	Lym/Pulm	1 (2,9)
	Local/Cérebro	1 (2,9)
	Cérebro/Local	1 (2,9)
	Osso/Pulm/Hep	1 (2,9)
	Hep/Per	1 (2,9)
	Osso/Hep/Cérebro/Lym	1 (2,9)
	Lym/Pulm/Osso	1 (2,9)
	Hep/Osso/Per	1 (2,9)
	Osso/Hep	1 (2,9)

### *Receptores hormonais e subtipos substitutos*

A avaliação de receptores hormonais, superexpressão de HER2, índice proliferativo Ki-67 (determinados por imunohistoquímica) e subtipos moleculares substitutos, mostram sua distribuição na Tabela 4.

**TABELA 4** – Expressão de receptores e subtipos moleculares substitutos do carcinoma mamário

Variável	n	Classificação	n (%)
HER2	65	Negativo	51 (78,5)
		Positivo	14 (21,5)
Estrógeno	66	Negativo	22 (33,3)
		Positivo	44 (66,7)
Progesterona	66	Negativo	29 (43,9)
		Positivo	37 (56,1)
KI67%	66	≤ 14	35 (53)
		> 14	31 (47)
Subtipos moleculares substitutos	65	Luminal A	30 (46,2)
		Triplo negativo	14 (21,5)
		HER2 positivo	8 (12,3)
		Luminal B	7 (10,8)
Subtipos moleculares substitutos (considerando Luminal B/HER2 como HER2 positivo)	65	Luminal /HER2	6 (9,2)
		Luminal A	30 (46,2)
		Triplo negativo	14 (21,5)
		HER2 positivo	14 (21,5)
		Luminal B	7 (10,8)

Dos resultados obtidos, com relação à análise da expressão de receptores hormonais, verificou-se que a maior frequência encontrada foi de RE+ (66,7%). Com relação aos denominados subtipos substitutos, a frequência maior foi de Luminal A (46,2%), triplo negativo (21,5%), HER2+ (21,5%) e Luminal B (10,8%).

### *Evolução clínica*

O tempo de sobrevida das pacientes foi calculado a partir do diagnóstico até a última avaliação em consulta ou a data da morte relacionada ao câncer. O tempo de sobrevida livre de doença e o total de sobrevida foram adotados como índices prognósticos. Os eventos da sobrevida livre de doença foram considerados até eventual detecção de nova doença, seja por recorrência locorregional, metástase à distância ou ainda câncer de mama contralateral. Os eventos da sobrevida total representaram o tempo de sobrevida até data do último atendimento em consulta (para pacientes sem evidência de doença) ou tempo de sobrevida até a morte quando relacionada ao câncer. (Nota: A recorrência, metástase à distância e metástase contralateral das pacientes foram confirmadas por métodos de imagem e exames anatomopatológicos).

Os dados obtidos sobre este tipo de prognóstico resumem-se na Tabela 5. A sobrevida livre de doença ocorreu em 67,1%. Houve progressão tumoral em 40% dos casos estudados. O tempo de seguimento (*follow-up*) foi em média de 45,2+/-28,1 meses, variando de 0-87,9 meses. Ocorreu óbito em 29,9% dos casos.

**TABELA 5 – Evolução clínica**

Variável	n	Classif	n (%)
Sobrevida livre de doença	85	Não	28 (32,9)
		Sim	57 (67,1)
Progressão	85	Não	51 (60)
		Sim	34 (40)
Follow-up (meses)	85		45,2 ± 28,1 (0 – 87,9)
Óbito	87	Não	61 (70,1)
		Sim	26 (29,9)
Follow-up óbito (meses)			46,5 ± 27,5 (1,9 – 103)

#### *Classificação R*

A classificação R demonstrou a ausência ou presença de tumor residual após o tratamento cirúrgico. As definições foram: Rx, quando a presença de tumor residual não pode ser avaliada; R0, na ausência de tumor residual; R1, com tumor residual microscópico e R2, com tumor residual macroscópico.

**TABELA 6 – Tumor residual após a operação**

Variável	n	Classificação	n (%)
R	87	0	68 (78,2)
		1	14 (16,1)
		2	5 (5,7)

#### *Avaliação da associação entre marcadores e variáveis demográficas e clínicas*

Nas Tabelas 7 a 9 são apresentados as frequências e percentuais de acordo com as combinações das classificações de cada variável e cada marcador. Também são apresentados os valores de p dos testes estatísticos (Observação: Os percentuais foram calculados em relação ao total nas linhas).

**TABELA 7 – Padrão de marcação tecidual para o AXL e  $\beta$ -catenina**

Variável	n	Classificação	n (%)
AXL	87	Negativo	19 (21,8)
		Fraco	19 (21,8)
		Moderado	14 (16,1)
		Forte	14 (16,1)
		Inconclusivo*	21 (24,1)
AXL (excluindo inconclusivos)	66	Negativo	19 (28,8)
		Fraco	19 (28,8)
		Moderado	14 (21,2)
		Forte	14 (21,2)
$\beta$ -catenina	87	Negativo	66 (75,9)
		Inconclusivo**	21 (24,1)
$\beta$ -catenina (excluindo inconclusivos)	66	Negativo	66 (100)

\*Inconclusivo sem fragmento na lâmina (SF) (n=11); inconclusivo sem tumor no fragmento (ST) (n=10).

\*\* Inconclusivo SF (n=11); inconclusivo ST (n=9); inconclusivo (n=1)

**TABELA 8 – Distribuição do AXL por idade, grau histológico e estadio clínico**

Variável	Classif	n	AXL				p*
			Negativo	Fraco	Moderado	Forte	
Idade (anos)	< 50	24	10 (41,7)	6 (25)	4 (16,7)	4 (16,7)	0,377
	≥ 50	42	9 (21,4)	13 (31)	10 (23,8)	10 (23,8)	
Grau	G1/G2	31	6 (19,4)	11 (35,5)	7 (22,6)	7 (22,6)	0,420
	G3	35	13 (37,1)	8 (22,9)	7 (20)	7 (20)	
Variável	Classif	n	AXL				p*
			Negativo	Fraco	Moderado	Forte	
Estadio	I	6	3 (50)	1 (16,7)	0 (0)	2 (33,3)	0,296
	II	32	8 (25)	13 (40,6)	6 (18,8)	5 (15,6)	
	III	21	6 (28,6)	4 (19,1)	5 (23,8)	6 (28,6)	
	IV	6	2 (33,3)	0 (0)	3 (50)	1 (16,7)	
T	T1	10	4 (40)	2 (20)	2 (20)	2 (20)	0,383
	T2	31	7 (22,6)	13 (41,9)	5 (16,1)	6 (19,4)	
	T3	10	3 (30)	3 (30)	2 (20)	2 (20)	
	T4	14	5 (35,7)	0 (0)	5 (35,7)	4 (28,6)	
N	N0	21	7 (33,3)	8 (38,1)	1 (4,8)	5 (23,8)	0,433
	N1	27	7 (25,9)	7 (25,9)	8 (29,6)	5 (18,5)	
	N2/N3	15	4 (26,7)	3 (20)	5 (33,3)	3 (20)	
M	M0	60	17 (28,3)	19 (31,7)	11 (18,3)	13 (21,7)	0,204
	M1	6	2 (33,3)	0 (0)	3 (50)	1 (16,7)	
PDM	Não	39	13 (33,3)	12 (30,8)	7 (18)	7 (18)	0,699
	Sim	26	6 (23,1)	7 (26,9)	7 (26,9)	6 (23,1)	
Subtipos	Triplo negativo	14	5 (35,7)	6 (42,9)	0 (0)	3 (21,4)	-
	Luminal A	30	7 (23,3)	8 (26,7)	8 (26,7)	7 (23,3)	
	HER2 positivo	7	3 (42,9)	2 (28,6)	1 (14,3)	1 (14,3)	
	Luminal B	7	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,9)	0 (0)	
	Luminal B/HER2	6	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)	
Subtipos/agrupado	Triplo negativo	14	5 (35,7)	6 (42,9)	0 (0)	3 (21,4)	0,475
	Luminal A	30	7 (23,3)	8 (26,7)	8 (26,7)	7 (23,3)	
	HER2 positivo	13	5 (38,5)	3 (23,1)	3 (23,1)	2 (15,4)	
	Luminal B	7	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,9)	0 (0)	
Tamanho (cm)	< 2	8	3 (37,5)	2 (25)	1 (12,5)	2 (25)	0,340
	2 a 5	39	10 (25,6)	15 (38,5)	6 (15,4)	8 (20,5)	
	> 5	10	5 (50)	0 (0)	3 (30)	2 (20)	

Resultados descritos por frequência (percentual); \*=teste exato de Fisher ou teste de Qui-quadrado, p&lt;0,05

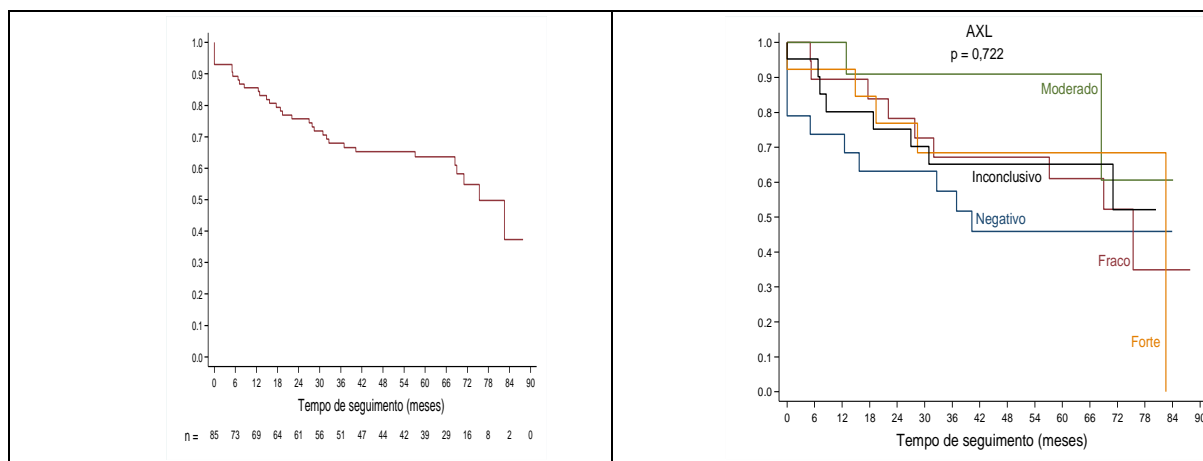
**TABELA 9 – Distribuição da β-catenina por idade, grau histológico e estadio clínico**

Variável	Classif	n	p*	
			Negativo	
Idade (anos)	< 50	24	24 (72,7)	0,614
	≥ 50	42	42 (77,8)	
Grau	G1/G2	31	31 (73,8)	0,803
	G3	35	35 (77,8)	
Variável	Classif	N	p*	
			Negativo	
Estadio	I	6	6 (66,7)	0,826
	II	31	31 (75,6)	
	III	22	22 (78,6)	
	IV	6	6 (85,7)	
T	T1	10	10 (58,8)	0,217
	T2	30	30 (83,3)	
	T3	11	11 (84,6)	
	T4	14	14 (73,7)	
N	N0	21	21 (75)	0,694
	N1	27	27 (73)	
	N2/N3	15	15 (83,3)	
M	M0	60	60 (75)	1
	M1	6	6 (85,7)	
PDM	Não	39	39 (76,5)	1
	Sim	26	26 (74,3)	
Subtipos	Triplo negativo	14	14 (100)	-
	Luminal A	30	30 (100)	
	HER2 positivo	8	8 (100)	
	Luminal B	7	7 (100)	
	Luminal B/HER2	6	5 (83,3)	
Subtipos/agrup	Triplo negativo	14	14 (100)	-
	Luminal A	30	30 (100)	
	HER2 positivo	13	13 (92,9)	
	Luminal B	7	7 (100)	
Tamanho (cm)	< 2	8	8 (53,3)	0,044
	2 a 5	38	38 (84,4)	
	> 5	11	11 (68,8)	

Resultados descritos por frequência (percentual); \*=teste exato de Fisher ou teste de qui-quadrado,  $p < 0,05$ .

### Análise do tempo livre de progressão – Marcadores AXL e $\beta$ -catenina

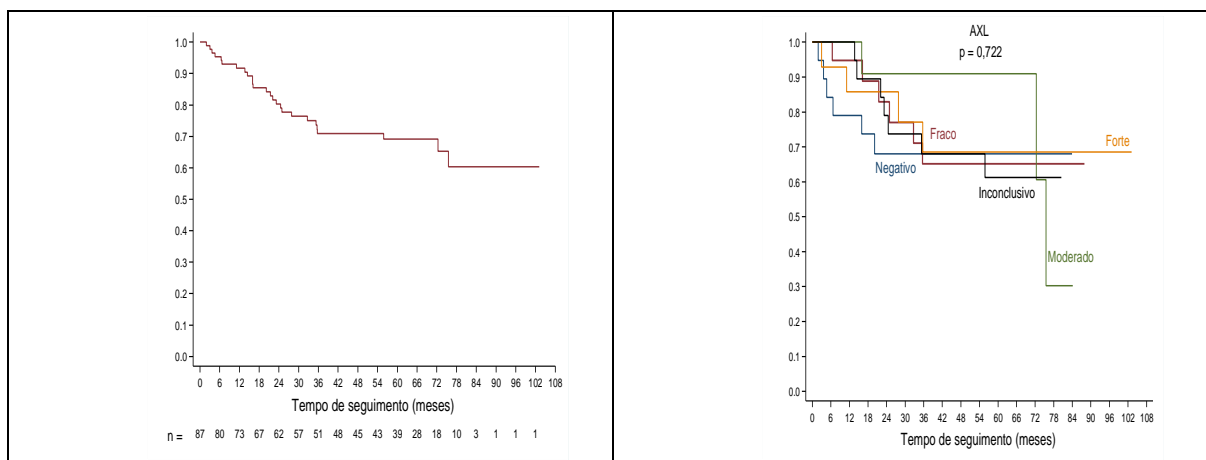
Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de que as curvas de tempo livre de progressão eram iguais para todas as classificações do marcador, vs. a hipótese alternativa de curvas diferentes. Na Figura 1 estão apresentadas as curvas de Kaplan-Meier para o tempo livre de progressão (geral) e para cada uma das classificações dos marcadores comparados. Também são apresentados os valores de p dos testes estatísticos (teste de Log-rank).

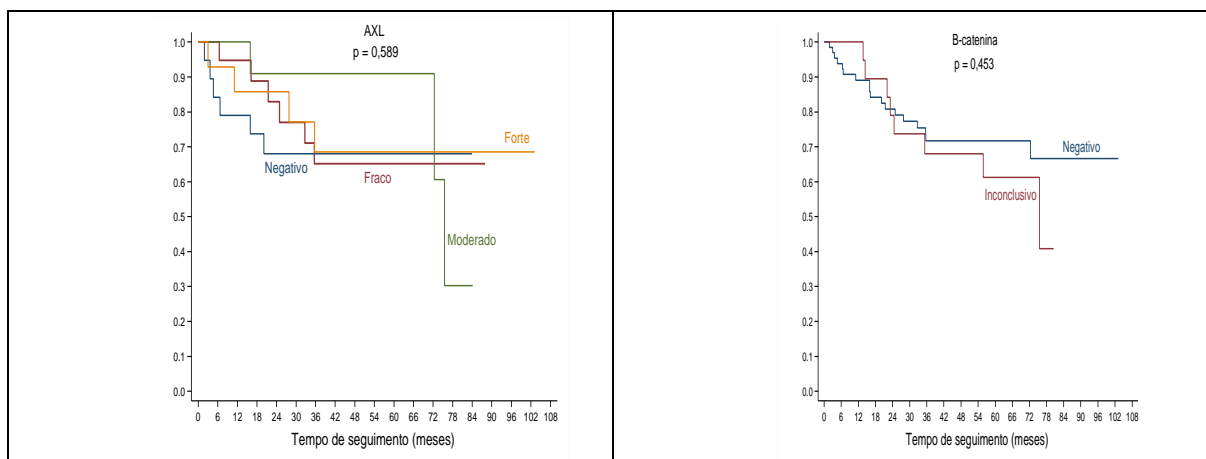


**FIGURA 1** – Curvas de Kaplan-Meier para o tempo livre de progressão (geral)

### Análise do tempo de sobrevida – Marcadores AXL e $\beta$ -catenina

Na Figura 2 são apresentadas as curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida (geral) e para cada uma das classificações dos marcadores comparados. Também são apresentados os valores de p dos testes estatísticos (teste de Log-rank).





**FIGURA 2** – Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida (geral): comparação dos grupos definidos pelo tipo de tumor em relação aos marcadores AXL e  $\beta$ -catenina

Para cada comparação de grupos e cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de que as distribuições sobre as classificações do marcador eram iguais nos grupos sob comparação, vs. a hipótese alternativa de distribuições diferentes.

Nas Tabelas 11 a 16 são apresentadas estatísticas descritivas e os valores de  $p$  dos testes estatísticos.

**TABELA 11** – Padrão de marcação do AXL por grupo tumoral invasor, intraductal, fibroadenoma e controle não tumoral

AXL	Grupo			
	Ductal	Intraductal	Não tumoral	Fibroadenoma
Negativo	19 28,8%	2 28,6%	2 40,0%	1 7,1%
Fraco	19 28,8%	2 28,6%	0 0,0%	1 7,1%
Moderado	14 21,2%	2 28,6%	1 20,0%	6 42,9%
Forte	14 21,2%	1 14,3%	2 40,0%	6 42,9%
Total	66	7	5	14

$p=0,259$  (teste de qui-quadrado,  $p<0,05$ )

**TABELA 12** – Padrão de marcação do AXL por grupo tumoral ductal e controles não ductais

AXL	Grupo		
	Ductal	Intraductal	Não tumoral / fibroadenoma
Negativo	19 28,8%	2 28,6%	3 15,8%
Fraco	19 28,8%	2 28,6%	1 5,3%
Moderado	14 21,2%	2 28,6%	7 36,8%
Forte	14 21,2%	1 14,3%	8 42,1%
Total	66	7	19

$p=0,182$  (teste de qui-quadrado,  $p<0,05$ )

**TABELA 13** – Padrão de marcação do AXL por grupo tumoral invasor e controles

AXL	Grupo	
	Ductal	Intraductal / não tumoral / fibroadenoma
Negativo	19	5
	28,8%	19,2%
Fraco	19	3
	28,8%	11,5%
Moderado	14	9
	21,2%	34,6%
Forte	14	9
	21,2%	34,6%
Total	66	26

p=0,130 (teste de qui-quadrado, p&lt;0,05)

**TABELA 14** – Padrão de marcação da  $\beta$ -catenina por grupo tumoral invasor, intraductal, fibroadenoma e controle não tumoral

$\beta$ -catenina	Grupo			
	Ductal	Intraductal	Não tumoral	Fibro adenoma
Negativo	66	7	6	19
	75,9%	53,9%	60,0%	54,3%

p=0,074 (teste de qui-quadrado, p&lt;0,05)

**TABELA 15** – Padrão de marcação da  $\beta$ -catenina por grupo tumoral ductal e controles não ductais

$\beta$ -catenina	Grupo		
	Ductal	Intraductal	Não tumoral / fibroadenoma
Negativo	66	7	25
	75,9%	53,9%	55,6%

p=0,033 (teste de qui-quadrado, p&lt;0,05)

**TABELA 16** – Padrão de marcação da  $\beta$ -catenina por grupo tumoral invasor e controles

$\beta$ -catenina	Grupo	
	Ductal	Intraductal / não tumoral / fibroadenoma
Negativo	66	32
	75,9%	55,2%

p=0,011 (teste exato de Fisher, p&lt;0,05)

## DISCUSSÃO

Diversos fatores associam-se ao maior risco de desenvolver o câncer de mama, dentre eles a idade, uma vez que 75% de todos os carcinomas mamários ocorrem em mulheres com idade superior a 50 anos. O fator hereditário também contribui com aumento do risco entre 1,5-3%. Além disso, também concorrem aspectos relacionados à dieta e hábitos de vida, uma vez que mulheres com índice de massa corporal superior ou igual a 31,1 têm risco 3,5 vezes maior de desenvolver a doença quando comparadas àquelas com IMC inferior ou igual a 22,6 (GOLDMAN; SCHAFER, 2015; SUN et al., 2017; ANASTASIADI et al., 2017; AKINYEMIJU; WIENER; PISU, 2017; HAYES; LIPPMAN, 2018; NUNES; BERMAN; HARRIS, 2019).

Quando consideram-se outros grupos etários, principalmente aqueles classificados como “jovens” (definidos com idade entre 25-40 anos), observam-se algumas particularidades nos aspectos de apresentação desse câncer e nos fatores de risco relacionados, que versam, por exemplo, sobre características biológicas e

hormonais, influenciando diretamente o padrão específico tumoral (CANCELLO et al., 2013).

Estudos com mulheres em faixa etária variando de 30-50 anos apontam que os grupos de idade de até 35 apresentam pior sobrevida quando comparados com outros grupos mais avançados, mas ainda em faixa de pré-menopausa (HAN; KANG, 2010). Sabiani et al. (2016), demonstraram o mesmo para o grupo entre 36-40 anos, também com maior frequência de metástases à distância. Esses dados podem ser justificados por estudos que relacionam o carcinoma mamário, em pacientes mais jovens, a pior prognóstico (COLLEONI et al., 2002; HAN et al., 2004), muitas vezes por apresentarem tamanho tumoral maior ao diagnóstico, com menor grau de diferenciação histológica, maior acometimento linfonodal e diagnóstico em estágios mais avançados (GNERLICH et al., 2009; MORRISON et al., 2012; FREDHOLM et al., 2016; MARTINEZ et al., 2019).

Pacientes mais jovens também apresentam frequência de fenótipos moleculares mais agressivos (FREDHOLM et al., 2017), como de HER2+ e triplo negativo e menor frequência de tumores de prognóstico mais favorável, como o Luminal A (CANCELLO et al., 2010). Por fim, e considerando os aspectos anteriormente descritos, observa-se que pacientes com menos de 40 anos também apresentaram maior taxa de morte por câncer de mama (80%) quando comparadas às mais velhas (49%) em período de acompanhamento de 15 anos (GNERLICH et al., 2009).

### **$\beta$ -catenina**

Na interpretação dos dados obtidos, todas as reações relacionadas à ela foram consideradas negativas, tanto no grupo tumoral analisado, quanto nos controles, contrariando os dados da literatura. Tal fato, levou-nos a interpretar esses resultados como falhas de imunomarcção.

Ao utilizar técnicas de marcação imunistoquímica semelhante às aplicadas nesse estudo, pesquisadores avaliaram a correlação da  $\beta$ -catenina e seu valor prognóstico no câncer de mama, demonstrando que essa molécula de adesão se apresentava em menor quantidade no tecido mamário doente, quando comparado ao tecido normal. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores também encontraram correlação positiva entre a expressão de  $\beta$ -catenina que era maior em estágios menos avançados de câncer de mama, tanto do ponto de vista da graduação histológica quanto na classificação TNM (PANG et al., 2013).

Segundo Li et al. (2014), as pesquisas que buscam correlacionar a expressão da  $\beta$ -catenina com a evolução do câncer de mama são muito controversas nos resultados. Eles a investigaram em diferentes subtipos de câncer de mama e os respectivos significados clínicos, obtendo como resultado expressão mais frequente e intensa da  $\beta$ -catenina no núcleo e citoplasma de células de tumores invasivos, enquanto a expressão membranosa, que era característica das células normais, estava reduzida. A expressão de  $\beta$ -catenina tanto no núcleo quanto citoplasma é indicativo de que a via de sinalização Wnt está ativa. No entanto, no presente estudo, as lâminas passíveis de análise não apresentaram nenhum padrão específico de marcação.

Quando analisada a expressão aberrante de  $\beta$ -catenina, ou seja, quando a molécula de adesão se expressou em maior quantidade no núcleo e citoplasma e comparou-se essa expressão aos subtipos de câncer de mama, em 78,95% das com subtipo triplo-negativo, apresentaram expressão aberrante da molécula, podendo indicar possível relação da  $\beta$ -catenina com esse subtipo da neoplasia. Uma importante

hipótese sugerida pelo estudo é de que as discrepâncias entre os resultados de estudos anteriores podem estar relacionadas à falta de localização subcelular do sítio de expressão da  $\beta$ -catenina, uma vez que os estudos mais antigos focavam-se na expressão da molécula na membrana citoplasmática (LI et al., 2014). Novamente, nesse estudo, mesmo ao avaliar o grupo correlato (tumores triplo-negativos) não foi observado qualquer marcação.

Ainda sobre o câncer de mama triplo-negativo, Xu et al. (2015) investigaram através de ensaios *in vivo* e *in vitro* o comportamento tumoral das células do câncer de mama e o papel desempenhado pela  $\beta$ -catenina neste processo. Segundo os autores, a ativação do caminho de sinalização Wnt é mais intensa no câncer de mama triplo negativo e está associada à redução na sobrevida global dos pacientes. Os pesquisadores observaram que, através do silenciamento e *knock-out* da  $\beta$ -catenina, havia redução na população celular tumoral e na expressão de genes relacionados à células-tronco. De uma forma geral, os dados obtidos na pesquisa sugerem que a  $\beta$ -catenina é necessária para o desenvolvimento dos cânceres de mama triplo-negativo por controlar diversas propriedades relacionadas ao tumor, como a migração, quimiossensibilidade e o crescimento independente de ancoragem (XU et al., 2015).

Nesse mesmo sentido, outra pesquisa realizou bloqueio da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, avaliando a expressão de genes relacionados à expressão de células-tronco tumorais (CSC-related genes) e de como essa via de sinalização correlaciona-se com a ocorrência de metástase e com a formação do tumor *in vivo* e *in vitro*. Os pesquisadores hipotetizaram que a Wnt/ $\beta$ -catenina deve regular a autorrenovação e migração de células-tronco, possibilitando assim a ocorrência de metástase e disseminação sistêmica do câncer de mama. Novamente os autores demonstraram ativação mais intensa da via de sinalização nos tecidos neoplásicos, além de relacionarem essa ativação ao pior prognóstico e maior potencial de metástase, uma vez que essa maior ativação demonstrou ser ligada à maior atividade dos genes ligados a células-tronco tumorais. Assim, por meio de um *knockout* de Wnt1, observou-se a supressão da via de sinalização como esperado e diminuição da população de células-tronco (JANG et al., 2015).

Sun et al. (2015) avaliaram a expressão de ALDH1A1, da  $\beta$ -catenina e as respectivas expressões combinadas nos pacientes com câncer de mama tratados com ciclofosfamida. Novamente a expressão citoplasmática de  $\beta$ -catenina se mostrou mais relacionada ao câncer de mama além de estar mais expressa em tumores com maior expressão de ALDH1A1. Quando analisada isoladamente, a expressão aumentada de ALDH1A1 e da  $\beta$ -catenina citoplasmática, ambas mostraram-se associadas à metástase linfonodal e a pior prognóstico clínico, especialmente nos pacientes em tratamento com ciclofosfamida (SUN et al., 2015). No presente estudo, ao analisar grupo de características semelhantes (com metástases linfonodais e/ou subgrupo de mau prognóstico), não foram observadas marcações relacionadas a expressão da  $\beta$ -catenina.

Além dos tumores triplo-negativos, em pesquisa anterior avaliou-se a localização da expressão de  $\beta$ -catenina em pacientes com outro importante subtipo de câncer de mama, o HER2 positivo. Observou-se nas que apresentavam expressão de  $\beta$ -catenina mais proeminentemente localizada na membrana, tinham sobrevidas livre da neoplasia e global significativamente maior. O estudo também avaliou o comportamento da  $\beta$ -catenina e a expressão de HER2 quanto à exposição das células ao estresse (induzido com a administração de cádmio). Essa indução fez com que a  $\beta$ -catenina e o HER2 mudassem sua localização em direção ao citoplasma e regiões perinucleares, dado esse já demonstrado na literatura e que relaciona a localização

subcelular da  $\beta$ -catenina ao pior prognóstico do tumor (CUELLO-CARRIÓN et al., 2015). Novamente, ao selecionar amostra semelhante de tumores HER2 superexpressos, nesse estudo não foram observadas marcações relacionadas à  $\beta$ -catenina.

Ao considerar-se também outros sítios de tumores além da mama, a expressão da  $\beta$ -catenina tem-se mostrado relacionada ao pior prognóstico e menor sobrevida global nos casos de carcinoma de células renais e de células escamosas no pulmão. Em carcinomas renais, a  $\beta$ -catenina demonstrou ser fator prognóstico independente e relacionada a risco 4 vezes maior de mortalidade, podendo inclusive ser utilizada como ferramenta auxiliar na estratificação de risco desses pacientes (KOVACS et al., 2016; KIM et al., 2016)

Ainda sobre os carcinomas renais, Kovacs et al. (2016) investigou em 488 pacientes com diagnóstico de carcinoma de células renais a possível relação da expressão da  $\beta$ -catenina como biomarcador específico de sobrevida e concluíram que a expressão citoplasmática da  $\beta$ -catenina pode representar fator de mau prognóstico independente relacionado ao maior risco de progressão de doença após tratamento cirúrgico e morte relacionada ao tumor.

Conforme discutidos nos estudos acima e com base nos dados amplamente validados em outras pesquisas, a imunoistoquímica, apesar de ser método relativamente simples e disponível, possui certas particularidades que devem ser respeitadas nas diferentes etapas do processamento do material, pois a avaliação dos resultados é diretamente influenciada por fatores como a fixação inicial do espécime, a escolha adequada dos anticorpos a serem utilizados para análise bem como e, por fim, a interpretação ou leitura das lâminas (JAFFER, 2004).

Estudos semelhantes a esse desenvolvido - que também trazem relatos sobre falhas dos métodos de imunomarcacão, ou ainda, situações em que a imunoistoquímica não contribuiu para a resolução de problemas diagnósticos - trazem, muitas vezes alguns fatores em comum. De acordo com Leong et al. (1987), dentre as principais razões para que a imunoistoquímica não contribuísse para o diagnóstico final, incluíram, por exemplo, os resultados inespecíficos de determinadas colorações em alguns tumores e a fixação inadequada dos espécimes (LEONG, 1987). Outros autores também apontaram a fixação inadequada em formol como um dos principais fatores complicadores, no entanto em diferentes percentuais na avaliação global comparativamente às demais falhas relacionadas à imunomarcacão. Essas diferenças possivelmente decorrem da evolução das técnicas com o passar dos anos (feitas mais recentemente de maneira automatizada), bem como dos avanços nos mecanismos de recuperação antigênica que, atualmente, são realizados de forma mais específica para cada anticorpo, reduzindo parcialmente a importância da condição de preservação do tecido e dos epítomos antigênicos na qualidade das reações imunoistoquímicas (SCHMITT, 1991; TORRES, 1998).

Ainda assim, mesmo com a evolução das técnicas relacionadas às diferentes etapas no processo de imunomarcacão, os cuidados básicos com o material são essenciais e devem ser respeitados desde o início do processo. Nesse sentido, de modo geral, utiliza-se como principal solução no processo de fixação, o formol tamponado à 10%, contendo formaldeído (4%). Nessa etapa, a principal modificação molecular induzida pelo formaldeído é a formação de *cross-links* entre as proteínas entre si ou entre proteína e ácidos nucleicos do tecido (HELANDER, 1994). A formação dessas ligações possivelmente é uma das responsáveis pelo mascaramento dos epítomos por alterar a conformação tridimensional das proteínas; no entanto, a

estrutura secundária das proteínas fixadas ainda se mantém da mesma maneira quando previamente à fixação (MASON, 1991).

A formação dos *cross-links* pelo formaldeído é processo lento e necessário, demandando pelo menos 24-48 h para ser completado (FOX, 1985). Tempos de fixação menores interrompem o processo e podem acarretar formas alternativas de fixação como ocorre, por exemplo, no processo de fixação por coagulação durante a desidratação do tecido por álcool na etapa que sucede o processo de fixação propriamente dito. Dessa forma, esses diferentes mecanismos de fixação podem resultar em mistura entre a formação de *cross-links* de fato e fixação por coagulação, sendo este um dos principais responsáveis por falhas e variabilidades observadas nos processos de imunomarcção (WERNER et al., 2000).

Após o período de fixação em formaldeído, o tecido habitualmente é incluído em parafina. Esse processo tem como etapas a desidratação em solução alcoólica, a lavagem com solução de xileno e, em seguida, a incubação em um meio de incorporação quente, que usualmente é feito com parafina (LEONG, 1987).

De forma geral, todos os processos de fixação tendem a reduzir a capacidade antigênica dos tecidos. No caso do formaldeído, a utilização de enzimas ou a recuperação de epítomos induzida por calor podem recuperar locais indisponíveis, dependendo do epítomo buscado e do anticorpo utilizado (RUDIGER, 1997). Uma vez que a interpretação das imunomarcções é feita de modo semiquantitativo, faz-se importante minimizar as variabilidades na intensidade das reações que estejam relacionadas tanto ao processo de fixação, quanto ao processamento ou ainda recuperação antigênica. Para isso, ressalta-se a necessidade de rigorosa padronização nos cuidados da peça desde a obtenção até a fase de imunomarcção (WASIELWSKI, 1994).

Atrasos na fixação, por exemplo, resultam em aumento da degradação proteolítica e, a depender do antígeno utilizado, pode determinar ausência ou reação fraca em decorrência da redução da imunoreatividade do tecido. Além disso, a proteólise frequentemente causa ligações não específicas entre moléculas não relacionadas. (WASIELWSKI, 1998). Tal fato, eventualmente pode ter contribuído para a ausência de marcação na avaliação da expressão da  $\beta$ -catenina em nosso estudo. Para tanto, o processo de fixação deve preferencialmente iniciar logo após a remoção cirúrgica do tecido (em período inferior a 30 min). Órgãos e tumores sólidos devem ser incisados para garantir maior rapidez na fixação. Caso o atraso no processo de fixação seja inevitável, a refrigeração da peça é recomendada (WERNER et al., 2000).

O processo de fixação pelo formaldeído inicia-se pelas porções periféricas do tecido conforme a solução penetra no material e, caso esse processo seja interrompido por remoção precoce do material (inferior a 24 h) poderá haver fixação mista do tecido, dada inicialmente pelo formaldeído e, secundariamente pelo álcool. Assim, a formação de *cross-links* ocorrerá apenas nas margens enquanto em direção ao centro, poderá ocorrer o processo de fixação por coagulação pelo álcool (durante a fase de desidratação) ou, ainda, as porções centrais podem permanecer não fixadas. Como resultado, em determinados cortes, as imunomarcções podem ser erroneamente mais intensas no centro ou na periferia, a depender do anticorpo utilizado e se o epítomo recuperado foi utilizado ou não (FOX, 1985).

Para evitar situações semelhantes, amostras de espécimes cirúrgicas destinadas a imunistoquímica devem preferencialmente ser processadas, em fatias finas (cerca de 3 mm) e fixadas por período de 24 h para garantir a otimização na formação de *cross-links* em toda extensão do tecido. Para pequenos fragmentos

(como nos casos de biópsias) em que a fixação por 24 h nem sempre é factível; um período mínimo de 100 min deve ser então respeitado, pois pelo menos metade da capacidade máxima de ligação do formaldeído já foi atingida (HELANDER, 1994).

Em um outro extremo, vale ressaltar que processos de fixação prolongados em solução de formol podem também levar às reações fracas ou ausentes, que irão depender amplamente da susceptibilidade individual dos epítomos a serem analisados. Um excesso de *cross-links*, assim como a presença de substâncias contaminantes na solução, possivelmente contribui para isso podendo levar a danos irreversíveis em alguns epítomos (WASIELWSKI, 1998).

Como possível meio de evitar tal situação, ao manejar tecidos que permaneceram por tempo prolongado de fixação, preconiza-se processar o material em 3 blocos separados, expondo-os a tempos diferentes e progressivamente maiores de ação a proteases ou de recuperação de epítomos induzidas por calor. A fatia que apresentar o melhor padrão de marcação, deve ser utilizado para leitura e interpretação. Além disso, artifícios como exposição a altas concentrações de anticorpos, longos períodos de incubação ou ainda amplificação de sinal, podem também ser úteis nesse processo. No entanto, vale lembrar que todos esses mecanismos podem recuperar alguns epítomo, porém frequentemente aumentam o ruído de fundo. Assim sendo, o melhor a fazer é sempre evitar períodos de fixação excessivos por além de 48 h. (WERNER et al., 2000).

Por fim, com relação aos artefatos decorrentes do processamento do tecido, alguns pontos devem ser ressaltados. Em primeiro lugar, se a solução alcoólica for repetidamente utilizada, a desidratação tecidual pode ocorrer de forma inadequada uma vez que a solução pode perder a capacidade desidratante, resultando em marcação fraca ou ausente das células. Ao mesmo tempo, reações não específicas, especialmente na periferia dos cortes, podem ocorrer (RUDIGER, 1997).

Além disso, tanto a presença de contaminantes no xileno, quanto variações na temperatura da incorporação à parafina, podem ser deletérias e contribuir para amplas variações na imunomarcação. No entanto, sabe-se que esse processamento do tecido exerce menor influência nos mecanismos de imunomarcação quando comparados a etapa de fixação no formaldeído (WASIELWSKI, 1994).

## **AXL**

A família de receptores tirosinaquinases (Tyro 3, Axl, MerTK) é assim definida porque cada membro dessa família possui 1 combinação extracelular de 2 domínios similares a imunoglobulinas e 2 repetições de fibronectina tipo III, sendo 1 porção transmembrana e 1 região intracelular com atividade intrínseca de tirosinaquinase. Expressão aumentada de AXL tem sido frequentemente detectada em vários tipos de neoplasias e seu papel na manutenção da tumorigênese tem sido bem reconhecido. Dessa forma, AXL tem-se relacionado ao crescimento tumoral e à disseminação por meio de efeitos positivos com relação a sobrevivência celular, proliferação, migração e invasão tumoral. Além disso, a sinalização do AXL também está envolvida em outros processos que envolvem mecanismos desde a diferenciação celular, proteção dos vasos sanguíneos contra injúria, remoção de células apoptóticas, hematopoiese, agregação de plaquetas e regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006; GRAHAM et al., 2014; COMO et al., 2016).

Neste estudo, a análise da expressão do AXL no carcinoma ductal invasor de mama foi realizada com a presença de controles que eram compostos por tecido mamário normal, fibroadenoma (lesão benigna) e carcinoma intraductal (lesão *in situ*). Além disso, a análise de expressão do AXL nos tecidos foi categorizada de forma

semiquantitativa em diferentes padrões, definidos como ausente, fraco, moderado e forte. Assim, ao considerar os percentuais de marcação dentre todas as amostras tumorais avaliadas, obteve-se a seguinte distribuição: negativo (28,8%); fraco (19%); moderado (21,2%); e forte (14%).

Apesar de aqui não haver significância estatística nas diferentes análises quando se subdividiram os respectivos padrões de expressão do AXL e correlacionaram com fatores prognósticos específicos ou aos diferentes grupos-controle, pôde-se ainda sim observar algumas diferenças percentuais que valem ser citadas conforme seguem.

Inicialmente, quando se compara o padrão de expressão do AXL entre o grupo tumoral e controles, observa-se predomínio de marcações do tipo negativo ou fraco no grupo tumoral (58%), enquanto nos grupos-controle o predomínio foi de padrão moderado ou forte (70%). Esses dados contrapõem-se às informações disponíveis na literatura, pois conforme alguns autores, o AXL apresenta-se largamente distribuído nos tumores sólidos, incluindo o carcinoma mamário e seus níveis se correlacionam com a maior ocorrência de metástases (SHIEH et al., 2005; RANKIN et al., 2010; GJERDRUM et al., 2010; YU et al., 2015; LOZNEANU et al., 2016). Além disso, diversos estudos têm mostrado que a expressão aberrante do AXL está ligada à ativação de vias sinalizadoras da oncogênese, incluindo as vias PI3K/Akt e/ou MAPK/Erk e que, além disso, estão entre as principais vias envolvidas na manutenção de características agressivas das células tumorais, dentre elas a resistência a drogas e o comportamento metastático (HAFIZI; DAHLBÄCK, 2006; CASSINELLI et al., 2013; COSSA et al., 2013).

Em análises envolvendo aspectos clínicos e fatores prognósticos histopatológicos relacionados ao câncer de mama, quando consideraram-se inicialmente o fator idade, observou-se que no grupo de pacientes mais jovens (<50 anos) houve predomínio dos padrões de expressão negativo ou fraco (67%).

Com relação a avaliação do tamanho tumoral (T) observou-se que, para tumores menores, a expressão do AXL predominava como padrão negativo ou fraco, com frequência de 60% nos tumores T1 e 64,5% em T2. Para tumores T3 e T4 não houve diferenças percentuais entre os padrões de marcação existente, o que limita a interpretação desses dados.

Nesse mesmo sentido, ao correlacionar o acometimento linfonodal com a expressão do AXL, observou-se que no grupo de pacientes sem comprometimento linfonodal (N0) os padrões predominantes foram negativo ou fraco (71%). Para os subgrupos com acometimento linfonodal axilar (N1, N2 e N3) não houve diferenças percentuais de expressão.

Ao considerar-se ainda o grau de diferenciação tumoral, dentre os demais fatores prognósticos anatomopatológicos descritos, observou-se que, em tumores pouco diferenciados (G3), o maior percentual foi de padrões negativo ou fraco (60%). Nos grupos bem diferenciado (G1) e moderadamente diferenciados (G2) não foram observadas diferenças percentuais.

Em contrapartida a esses dados, Ahmed et al. (2015), sugeriram que a expressão aumentada de AXL associa-se à maior agressividade do câncer de mama, dado, entre outros, por menor grau de diferenciação tumoral e maior acometimento linfonodal. No entanto, Jin et al. (2017) não encontraram qualquer correlação significativa entre a expressão de AXL e alguns dos fatores prognósticos acima descritos, que incluem idade, tamanho do tumor e metástases em linfonodos. Apesar disso, estes autores reportaram correlação significativa entre a expressão de AXL e o

grau histológico tumoral, assim como com a expressão de ER e de PR (JIN et al., 2017).

Em análise do padrão de expressão do AXL correlacionado aos subtipos moleculares substitutos, nota-se que nos subtipos tumorais considerados de biologia mais agressiva (triplo negativo e HER2+) há maior percentual dos padrões de expressão negativo e fraco (78% nos triplos negativos e 71% HER 2+) quando comparados aos padrões de expressão moderado e forte. Com relação aos subtipos luminais, não foram observadas diferenças percentuais nestas distribuições. Esses dados são contrapostos por alguns autores que relacionam a expressão de AXL principalmente com o subtipo triplo-negativo (TNBC) e, devido a isto, ele tem sido considerado como marcador deste subtipo de carcinoma mamário (LECONET et al., 2016; D'ALFONSO et al., 2014; WILSON et al., 2014).

Esses achados são também confirmados por análises de dados de sequenciamento de RNA (WILSON et al., 2014) que revelaram que somente o subtipo TNBC expressa altos níveis de AXL. Entretanto, a análise dos níveis de expressão de AXL em diferentes amostras de pacientes levou a dados conflitantes (GJERDRUM et al., 2010; WILSON et al., 2014; WU et al., 2015; JIN et al., 2017).

Outros autores avaliaram a expressão AXL ao nível proteico, utilizando anticorpos AXL em amostras de tumores mamários humanos, correlacionando essas informações aos dados clínicos (WILSON et al., 2014; YOUSEF et al., 2014). Estas análises revelaram que a expressão de AXL pode ser detectada em diversos subtipos moleculares, assim como encontrado no presente estudo e os níveis de expressão podem estar relacionados à evolução clínica. Assim, em pacientes com o subtipo HER2+, nos quais a existência de complexos de proteínas AXL/HER2 colocalizadas na membrana plasmática estejam em altos níveis, observa-se maior ocorrência de metástases no pulmão e cérebro (GOYETTE et al., 2018).

Por fim, considerando-se o desfecho clínico e a progressão ou não de doença, que é caracterizada por recorrência local ou evolução com metástases nas pacientes com desfecho clínico favorável, ou seja, sem sinais de progressão de doença, o padrão de expressão predominante foi negativo ou fraco (64,1%). Aquelas com desfecho clínico desfavorável, isto é, com evidência de progressão de doença, não apresentaram diferenças percentuais nestes padrões. Assim, novamente, esses achados apresentam-se parcialmente discordantes de publicações anteriores que correlacionam a alta expressão da proteína de AXL com evolução clínica desfavorável em todos os subtipos de carcinoma mamário. Em contrapartida, baixos níveis de expressão de AXL foram associados à maior sobrevida, o que, em parte, está de acordo com os percentuais identificados nesta pesquisa (GOYETTE et al., 2018). No entanto, outros pesquisadores não encontraram qualquer associação entre a expressão de AXL e a sobrevida livre de doença ou sobrevida global (JIN et al., 2017).

Estes resultados mostram, portanto, associações conflitantes entre a expressão do AXL e o comportamento biológico do câncer de mama, assim como também observado em publicações anteriores. D'Alfonso et al. (2014), investigaram 569 casos de câncer de mama e sugeriram que não há relação entre a expressão de AXL e o nível de expressão ER; Ahmede et al. (2015), reportaram que alta expressão de AXL era associada com a negatividade ER; Berclaz et al. (2001), sugeriram que a expressão de AXL era significativamente associada com o nível de ER, assim, a expressão de AXL era confinada aos tumores ER positivo, entretanto nem todos os tumores ER positivos expressaram a proteína AXL. Nesse sentido, estes autores hipotetizaram que ER regula a ativação de AXL, também inibindo a apoptose celular pela superexpressão de Bcl-3 (um gene anti-apoptótico), o que levaria à algumas das

características de comportamento agressivo observada nestas células tumorais (BERCLAZ et al., 2001).

Portanto, conforme alguns dados da literatura, bem como considerando os resultados desta pesquisa, permanece contenciosa a relação da expressão do AXL com os fatores prognósticos específicos do carcinoma mamário ductal invasivo, bem como a expressão do AXL como possível fator prognóstico independente quando relacionado aos desfechos clínicos. Sendo assim, os mecanismos subjacentes a estas relações permanecem não completamente esclarecidos.

### **Considerações finais, limitações e perspectivas futuras**

Tendo em vista os dados atuais de incidência, prevalência e mortalidade pelo câncer de mama, faz-se necessário a busca por novos marcadores que possam ser utilizados como indicadores de gravidade ou evolução clínica desfavorável, orientando o uso de modalidades distintas de tratamento, bem como o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Limitações maiores a este estudo foram ter sido ele avaliado retrospectivamente, por meio da coleta de dados em prontuários e blocos histológicos, das pacientes com diagnóstico de câncer de mama atendidas em um hospital universitário único. Foram feitas buscas para coleta dos respectivos blocos de parafina com a amostra tumoral (biópsia ou cirurgia). Vale ressaltar que nessa etapa houve perda significativa de amostras, seja pela fragmentação de dados em prontuários, ausência de segmento clínico adequado, inexistência dos blocos histopatológicos correspondentes, ou terem sido eles insuficientes para as análises que se deseja fazer.

Ponto positivo é que no planejamento do trabalho foram confeccionados blocos multiamostrais (a partir do material histopatológico tumoral) para realização da técnica de imunistoquímica utilizando os anticorpos  $\beta$ -catenina e AXL, mas também foram incluídos controles compostos por tecido mamário normal, lesão mamária benigna (fibroadenoma) e tumor *in situ* (carcinoma intraductal).

Apesar dos resultados conflitantes com os dados disponíveis na literatura, sabe-se que  $\beta$ -catenina e AXL estão relacionadas aos processos de regulação e crescimento celular e, a expressão aberrante de ambos, relacionada a carcinogênese. Além disso, alguns estudos ao analisar o padrão de expressão desses marcadores, correlacionando-os aos padrões de resposta em diferentes tipos de neoplasias malignas, sugerem possível papel preditivo e prognóstico de ambos como potenciais biomarcadores de agressividade, bem como eventuais alvos para terapias anticâncer.

Novos esforços devem ser direcionados para maior esclarecimento da relação desses e de outros marcadores para que em futuro próximo, novos fatores preditores de evolução de doença e agentes terapêuticos alvo-específicos sejam desenvolvidos, individualizando ainda mais o tratamento do câncer de mama para que um novo horizonte de maior sobrevida e melhor qualidade de vida seja revelado.

### **CONCLUSÕES**

Quando analisados adenocarcinoma mamário do tipo ductal invasor em TMA não houve correlação na expressão de  $\beta$ -catenina e AXL quando comparados à sobrevida global, progressão tumoral e grau histológico.

### **REFERÊNCIAS**

- AGUIAR, O. G. G.; et al. Tomada de consciência de conflitos: análise da atividade discursiva em uma aula de ciências. **Revista Investigações em Ensino de Ciências**, v. 10, n. 2, p. 179-207, 2016.
- ADORNA, E. L.; et al. Breast cancer and support group in the life of mastectomized women. **Fisioter Mov.**, v. 28, n. 3, p. 597-602, jul-sept 2015.
- AHMED, L.; et al. Increased tumor cell expression of Axl is a marker of aggressive features in breast cancer among African women. **APMIS**, v. 123, p. 688-696, 2015.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). **Cancer Staging Manual**. 4<sup>th</sup> ed. 1992.
- AKINYEMIJU, T.; WIENER, H.; PISU, M. Cancer-related risk factors and incidence of major cancers bay race, gender and region; analysis of the NIH-AARP diet and health study. **BMC Cancer**, v. 17, p. 597 - 607, 2017
- ALBERTS, B.; et al. **Fundamentos da biologia celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- ALMEIDA, T. G. de; et al. Vivência da mulher jovem com câncer de mama e mastectomizada. **Esc. Anna Nery Rev. Enferm.**, v. 19, n. 3, p. 432-438, jul-set., 2015.
- ALMEIDA, J. R. C.; et al. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-16, 2009.
- ALVES, A.; et al. **Emotional expression: the brain and the face**. v. 5. Porto: University. Fernando Pessoa Freitas-Magalhães, 2014.
- ALVES, M. T.; et al. HFE, MTHFR, and FGFR4 genes polymorphisms and breast cancer in Brazilian women. **Mol Cell Biochem**, v. 357, n. 1-2, p. 247-53, nov., 2011.
- ALVES, E. M.; TAVARES, M. G.; GÓES, J. C. Clinicopathological predictor factors of axillary involvement in patients with metastatic breast cancer in the sentinel lymph node. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 32, n. 3, p. 144-9, mar., 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Types of breast cancer**. 2013. Disponível em: [www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types](http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types). Acesso em: 18 abril de 2020.
- ANASTASIADI, Z.; et al. Breast cancer in Young women: na overview. **Updates in Surgery**, v. 69, p. 313-317, 2017.
- ANDERSON, A. C. Tim-3: na emerging target in the cancer immunotherapy landscape. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 5, p. 393-399, 2014.
- AQUINO, R. G. F.; et al. Carcinoma ductal invasor: relação de características anatomopatológicas com a presença de metástases axilares em 220 casos. **Revista Col. Bras. Cir.**, v. 44, n. 2, p. 163-170, 2017.
- AQUINO, R. G. F.; et al. Ductal carcinoma of the breast: morphological aspects according to the age. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 51, n. 4, p. 252-257, 2015.
- ARAÚJO, A. O.; OLIVEIRA, M. C. **Tipos de pesquisa**. São Paulo, 1997.
- ARIHIRO, K. Pathological approach to evolving prognostic and predictive factors of breast cancer. **Breast Cancer**, v. 11, n. 4, p. 343-349, 2004.
- ASIEDU, M. K.; et al. AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. **Oncogene**, v. 33, p. 1316-1324, 2014.
- AXELROD, H.; PIENTA, K. J. Axl as a mediator of cellular growth and survival. **Oncotarget**, v. 5, n. 19, p. 8818, 2014.
- BAGNOLI, F.; et al. **Mastologia: do diagnóstico ao tratamento**. Goiânia: Conexão Propaganda e Editora, 2017.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Label-free, ITO-based immunosensor for the detection of a câncer biomarker: receptor for activated C Kinase 1. **Analyst**, v. 141, p. 5618-5626, 2016.
- BARROS, N. de C.; et al. The impact of breast cancer screening among younger women in the Barretos Region, Brazil. **Anticancer Res.**, v. 33, n. 6, p. 2651-5, jun., 2013.
- BARROS, A. C. S. D.; BUZAID A. C. **Fatores prognósticos e preditivos de resposta**. In: BARROS, A. C. S. D.; BUZAID A. C. Câncer de mama: Tratamento multidisciplinar. São Paulo: Dentrix Edição e Design. Cap. 4, p. 43-60, 2007.
- BASTOS, E. P.; et al. A set of miRNAs, their gene and protein targets and stromal genes distinguish early from onset ER positive breast câncer. **PLoS One**, v. 11, n. 5, 2016.
- BELGATE, N. O. **Inserção da Variante rs11614913 do MiRNA 196<sup>a2</sup> no Câncer de Mama esporádico**. [Dissertação Mestrado em Genética Humana] Métodos em Genética Molecular. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas. 64p., 2019.
- BERCLAZ, G.; et al. Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. **Ann. Oncol.**, v. 12, p. 819-824, 2001.
- BERNARDES, A. **Anatomia da mama feminina**. In: OLIVEIRA, C. F. D. Manual de ginecologia. Lisboa, Portugal: Permanyer Portugal, v. II, Cap. 33, p. 167-174, 2011.
- BLAMEY, R. W.; et al. ONCOPOOL – a European database for 16,944 cases of breast cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 46, n. 1, p. 56-71, 2010.
- BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. **Expert Opin Biol. Ther.**, v. 2, n. 4, p. 371-93, 2002.
- BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. **Expert Opin Biol. Ther.**, v. 2, n. 4, p. 371-93, 2002.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A mulher e o câncer de mama no Brasil**. 3<sup>a</sup> ed. Revisada e atualizada, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. 2<sup>o</sup> ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde; Secretaria de Atenção à Saúde; Instituto Nacional do Câncer. **TNM. Classificação de Tumores Malignos**. UICC União Internacional Contra o Câncer. In: SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. (Eds) 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

- BRENTON, J. D.; et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 7350-7360, 2005.
- CAETANO, E. A.; PANOBIANCO, M. S.; GRADIM, C. V. C. Análise da produção científica nacional sobre a utilização de grupos na reabilitação de mastectomizadas. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 14, n. 4, p. 965-973, 2012.
- CÂMARA, J. I. M.; et al. Evaluación económica del uso de pegfilgrastim frente a filgrastim en profilaxis primaria en pacientes con cáncer de mama con riesgo de padecer neutropenia febril en España. **Pharmacoecon. Span. Res. Artic**, v. 5, p. 71-81, 2008.
- CAMARGO, M. C.; MARX, A. G. **Reabilitação física no câncer de mama**. São Paulo: Roca, 2000.
- CAMBRUZZI, E.; et al. Myofibroblastoma arising in mammary hamartoma: a case report. **Patholog. Res. Int.**, v. 1, 726829, aug 2010.
- CANCELLO, G.; et al Pathological features and survival outcomes of very Young patients with early breast câncer: How much is "very Young"? **The Breast**, v. 22, p. 1046-1051, 2013.
- CANCELLO, G.; et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast câncer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast câncer. **Ann. Oncol.**, v. 10, p. 1974-1981, 2010.
- CARTER, C. L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer**, v. 63, n. 1, p. 181-187, 1989.
- CARVALHO, C. M.; et al. Quality of life in women with breast cancer undergoing chemotherapy. **Acta Paul. Enferm.**, v. 27, n. 6, p. 554-9, 2014.
- CARVALHO, A. P. R.; SANTOS, T. M. B.; LINHARES, F. M. P. Promoção do autocuidado a mulheres mastectomizadas. **Cogitare Enferm.**, v. 17, n. 3, p. 485-91, 2012.
- CASSINELLI, G.; et al. Targeting the Akt kinase to modulate survival, invasiveness and drug resistance of câncer cells. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, p. 1923-1945, 2013.
- CECILIO, A. P.; et al. Breast câncer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 43-49, 2015.
- CEZAR, K.; NASCIMENTO, A. P. C. Qualidade de vida de pacientes pós-mastectomizadas. **UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde**, v. 16, n. 1, jan., 2014.
- CHEANG, M. C. U.; et al. Ki67 index, HER2 Status, and Prognosis of Patients with Luminal B Breast Cancer. **JNCI**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.
- CHEN, Y. W.; et al. Value of nodal drainage patterns and tumor location from lymphoscintigraphic mapping in detecting axillary sentinel lymph node status in breast cancer: experience at Kaohsiung Medical University Hospital. **Kaohsiung J. Med. Sci.**, v. 21, n. 6, p. 251-257, 2005.
- CHIANG, C. H.; HOU, M. F.; HUNG, W. C. Up-regulation of miR-182 by  $\beta$ -catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 4, p. 3067-3076, 2013. Elsevier B. V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.009>.
- CHIMGE, N.-O.; et al. RUNX1 prevents oestrogen-mediated AXIN1 suppression and  $\beta$ -catenin activation in ER-positive breast cancer. **Nature communications**, v. 7, p. 10751, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/ncomms/2016/160226/ncomms10751/full/ncomms10751.html%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26916619%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4773428>. Acesso em: 18 abr. 2020.
- CHIZZOTTI, A. **Pesquisa em ciências humanas e sociais**. 4ª. ed. São Paulo: Cortez, 2000.
- CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. **Oncologist.**, v. 9, n. 6, p. 606-16, 2004.
- COATES, A. S.; et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1533-46, aug. 2015.
- COLLEONI, M.; et al. Very Young women (<35 years) with breast câncer: features of disease at presentation. **Annals of Oncology**, v. 13, p. 273-279, 2002.
- COMO, C.; et al. Role of the receptor tyrosine Axl and its targeting in câncer cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 1496-1512, 2016.
- COSAC, O. M.; et al. Surgical treatment of complications resulting from adjuvant radiotherapy: a case report. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (Brazilian Journal of Plastic Surgery – BJPS)**, v. 31, n. 4, 2016.
- COSSA, G.; et al. Modulation of sensitivity to antitumor agents by targeting the MAPK survival pathway. **Curr. Pharm. Des.**, v.19, p. 883-894, 2013.
- COSTA, M.; BELLOSTA, P.; BASILICO, C. Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo. **J. Cellular Physiol**, v. 168, n. 3, p. 737-744, 1996.
- CUELLO-CARRIÓN, F. D.; et al. HER2 and  $\beta$ -catenin protein location: importance in the prognosis of breast cancer patients and their correlation when breast cancer cells suffer stressful situations. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 32, n. 2, p. 151-168, 2015.
- D'ALFONSO, T. M.; et al. Axl receptor tyrosinekinase expression in breast cancer. **J. Clin. Pathol.**, v. 67, p. 690-696, 2014.
- DAI, X.; et al. Breast câncer intrinsic classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2929-2943, 2015.
- DE LAURENTIIS, M.; et al. Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology. **Ann. Oncol**, v. 16 (Suppl 4), p. iv7-13, 2005.

- DE BOCK, G. H.; et al. Role of the general practitioner during the active breast cancer treatment phase: an analysis of health care use. **Support Care Cancer**, v. 20, n. 4, p. 705-14, apr 2012. doi: 10.1007/s00520-011-1133-9. Epub 2011 Mar 25.
- DELVAEYE, T.; et al. Therapeutic Targeting of Connexin Channels: new views and challenges. **Trends in Molecular Medicine**, 2018.
- DILLON, D.; GUIDI, A. J.; SCHMITT, S. J. Pathology of invasive breast cancer. **Diseases of the breast**, n. 5, p. 381-410, 2014.
- DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. **Cancer Treat. Rev.**, v. 37, n. 2, p. 151-9, apr. 2011.
- DURAN, A. **Determinação de microRNAs circulantes em plasma de pacientes jovens e de meia idade com câncer de mama.** [Dissertação Mestrado em Ciências] Faculdade de Medicina. Programa de Oncologia. Universidade de São Paulo. 97p., São Paulo, 2019.
- EDGE, S. B.; et al. American Joint Committee on Cancer. **AJCC Cancer Staging Manual**, n. 7, New York, NY, p. 347-376, 2010.
- EKMAN, C.; STENHOFF, J.; DAHLBACK, B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor axl in human blood. **J. Thromb. Haemost.**, v. 8, n. 4, p. 838-844, 2010.
- ELSTON, C. W. **Grading of invasive carcinoma of the breast.** In: PAGE, D. L.; ANDERSON, T. J. (Eds). *Diagnostic Histopathology of the Breast.* Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987. p. 300-311.
- ELSTON, C. W. The assessment of histological differentiation in breast cancer. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v. 54, p. 11-15, 1984.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. 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**, v. 19, p. 403-410, 1991.
- ELSAMANY, S.; et al. Predictive Value of the Pattern of beta-Catenin Expression for Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 17, n. 8, p. 4089-4093, 2016.
- EROLE, P.; et al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 698-707, 2012.
- FIGUEIREDO, E. M. D. A.; et al. **Tratado de Oncologia.** 1. Rio de Janeiro: Revinter, 2013.
- FISHER, B.; BAUER, M.; WICKERHAM, D.L. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. **Cancer**, v. 52, n. 9, p. 1551-1557, 1983.
- FITZGIBBONS, P. L.; et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol. Lab. Med.**, v. 124, n. 7, p. 966-978, 2000.
- FOLLANA, P.; et al. Prognostic factors in 401 elderly women with metastatic breast cancer. **Oncology**, v. 86, n. 3, p. 143-151, 2014.
- FONSECA, C. M. O.; TEIXEIRA, L. A. **INCA e o controle do câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2002.
- FOUKAKIS, T.; BERGH, J. **Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer.** Set. 2013. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/prognostic-and-predictive-factors-in-early-non-metastatic-breast-cancer>. Acesso em: 18 abr. 2020.
- FOX, C.; et al. Formaldehyde fixation. **J. Histochem. Cytochem.**, v.33, p. 845-853, 1985.
- FREDHOLM, H.; et al. Breast cancer in Young women and prognosis. How important are proliferation markers? **European Journal of Cancer**, v. 84, p. 278-289, 2017.
- FREDHOLM, H.; et al. Long-term outcome in Young women with breast cancer: a population-based study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 160, p. 131-143, 2016.
- FUJIMORI, T.; et al. The Axl receptor tyrosine kinase is a discriminator of macrophage function in the inflamed lung. **Mucosal immunology**, v. 8, n. 5, p. 1021, 2015.
- FUSTER, D.; et al. Preoperative staging of large primary breast cancer with [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/compound tomography compared with conventional imaging procedures. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, n. 29, p. 4746-4751, 2008.
- GAO, Y.; et al. A novel RING-type ubiquitin ligase breast cancer-associated gene 2 correlates with outcome in invasive breast cancer. **Cancer Res.**, v. 65, n. 22, p. 10401-12, nov., 2005.
- GARCIA, F. O. T.; et al. Controle da Expressão gênica e suas alterações no câncer. In: SAITO, R. F.; et al. *Fundamentos de Oncologia Molecular.* São Paulo: Atheneu, 2015. p. 117-131.
- GAY, C. M.; BALAJI, K.; BYERS, L. A. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. **British Journal of Cancer**, v. 116, n. 4, p. 415, 2017.
- GERBER, B.; et al. Perioperative screening for metastatic disease is not indicated in patients with primary breast cancer and no clinical signs of tumor spread. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 82, n. 1, p. 29-37, 2003.
- GJERDRUM, C.; et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, p. 1124-1129, 2010.
- GNERLICH, J. L.; et al. Elevated Breast Cancer mortality in Women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 208, p. 341-347, 2009.
- GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **JBPML**, v. 48, n. 6, p. 463-474, 2012.
- GOLDMAN, L.; SCHAFFER, A. L. (Eds) **Goldman's Cecil Textbook of medicine.** 25. ed. Philadelphia: Saunders – Elsevier, 2015.

- GOMES, D. S.; et al. Usefulness and limitations of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in the classification of breast carcinomas in situ with mixed pattern. **Diagn Pathol**, v. 9, p. 8-114, jul 2013. doi: 10.1186/1746-1596-8-114.
- GOPINATHK, K. S.; et al. Chromatin dynamics meet câncer: Chromatin protein PC4 in genome organization and breast câncer manifestation. **Journal of Clinical Oncology**, 2014.
- GOYETTE, M. A.; et al. The receptor Tyrosine Kinase AXL is required at multiple steps of the Metastatic Cascade during HER2-positive breast câncer progression. **Cell Reports**, v. 23, p. 1476-1490, 2018.
- GRAHAM, D. K.; et al. The TAM family: phosphatidylserine-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 14, p. 769-85, 2014.
- GUIMARÃES, J. R. Q. **Manual de Oncologia**. 3. São Paulo: BBS Editora, 2008.
- GUINDALINI, R. S. C.; et al. **Evolução do diagnóstico do câncer**. In: SAITO, R. F.; et al. Fundamentos de Oncologia Molecular. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. p. 301-313.
- HADDAD, P.; et al. Aloe vera for prevention of radioation-induced dermatitis: a self-controlled clinical trial. **Curr. Oncol.**, v. 20, e345-8, 2013.
- HAFIZI, S.; DAHLBÄCK, B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, p. 295-304, 2006.
- HAMAJI, M. P.; et al. O cuidado à mastectomizada com linfadenectomia axilar, prevenção de linfedema: revisão integrativa. **Rev. Enferm UFPE on line**, Recife, v. 8, n. 4, p. 1064-71, abr., 2014.
- HAMMOND, M. E. H. **Hormone receptors in breast cancer: clinical utility and guideline recommendations to improve test accuracy**. Dez. 2013. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/hormone-receptors-in-breast-cancer-clinical-utility-and-guideline-recommendations-to-improve-test-accuracy>. Acesso em: 8 ago. 2019.
- HAN, W.; KANG, S. Y. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast câncer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast câncer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 119, n. 1, p. 193-200, 2010.
- HAN, W.; et al. Young age: na independente risk fator for disease-free survival in women with operable breast câncer. **BMC Cancer**, v. 4, p. 1-8, 2004.
- HARRIS, L.; et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 33, p. 5287-5312, 2007.
- HAYES, D. F.; LIPPMAN, M. E. New guideline for reporting tumor marker studies in breast cancer research and treatment. **Breast Cancer Res. Treatment**, v.100, p. 237-8, 2018.
- HELANDER, K. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. **Biotech Histochem.**, v. 69, p. 177-179, 1994
- HOCHMAN, B.; et al. Research designs. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, Suppl 2, p. 2-9, 2005.
- HOFF, P. M. G. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013.
- HOWLADER, N.; et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, **National Cancer Institute**. Bethesda, MD, mar., 2014.
- IAMAMOTO, M. V. **O Serviço Social na contemporaneidade: Trabalho e formação**. São Paulo: Cortez, 2011.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18,1 million new cases and 9,6 million cancer deaths in 2018. **IARC Press Release**, n. 263, GCO (Global Cancer Observatory) website, 12 sept. 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA); MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Câncer de mama – versão para profissionais de Saúde**. 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/profissional-de-saude>. Acesso em: 18 ago. 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA); MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 6 jan., 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA); MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Tabulador. Atlas on-line da mortalidade**. 2016. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo10/consultar.xhtml>. Acesso em: 6 jan., 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA); MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.
- INUMARU, L. E.; et al. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 1259-1270, 2011.
- G, G.-B.; et al. Blockade of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12465, 2015.
- JAFFER, S.; BLEIWEISS, I.J. Beyond hematoxylin and eosin: the role of immunohistochemistry in surgical pathology. **Cancer Invest.**, v. 22, n. 3, p. 445-65, 2004.
- JAMMAL, M. P.; et al. Fisioterapia na reabilitação de mulheres operadas por câncer de mama. **O Mundo da Saúde**, v. 4, n. 32, p. 506-10, 2008.
- JIN, G.; et al. Expression of Axl and its prognostic significance in human breast cancer. **Oncol.Lett**, v. 13, p. 621-628, 2017.
- KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism.**, v. 64, n. 3, Suppl 1, p. S16-21, mar., 2015.
- KAZAN, J.; et al. cx-43 Expression correlates with breast cancer metastasis in MDA-MB-231 cells in vitro, in a mouse xenograft model and in human breast cancer tissues. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 460, 2019.
- KIM, Y.; et al. Overexpression of  $\beta$ -Catenin and Cyclin D1 is Associated with Poor Overall Survival in Patients with Stage IA–IIA Squamous Cell Lung Cancer Irrespective of Adjuvant Chemotherapy. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 11, n. 12, p. 2193-2201, 2016.

- KORSHUNOV, V. Axl dependent signalling: A clinical update. **Clin Sci**, v. 122, p. 361-368, 2012.
- KOVACS, G.; et al. Cytoplasmic expression of  $\beta$ -catenin is an independent predictor of progression of conventional renal cell carcinoma: a simple immunostaining score. **Histopathology**, 2016.
- LAKHANI, S. R.; et al. **WHO classification of tumours of the breast**. Lyon: IARC, 2012.
- LE DOUSSAL, V.; et al. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. **Cancer**, v. 64, n. 9, p. 1914-1921, 1989.
- LECONET, W.; et al. Therapeutic activity of anti-AXL antibody against triple-negative breast cancer patient derived xenografts and metastasis. **Clin. Cancer Res.**, v. 23, p. 2806-2816, 2016.
- LEE, J. K.; et al. Clinicopathological features of infiltrating lobular carcinomas comparing with infiltrating ductal carcinomas: a case control study. **World J Oncol.**, v. 8, n. 34, p. 1-8, 2010.
- LEONG, A.; et al. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. **Histopathology**, v.11, n.12, p. 1295-1305, 1987
- LI, N.; et al. Mice lacking Axl and Mer tyrosine kinase receptors are susceptible to experimental autoimmune orchitis induction. **Immunology and cell biology**, v. 93, n. 3, p. 311-320, 2015.
- LI, S.; et al. The expression of  $\beta$ -catenin in different subtypes of breast cancer and its clinical significance. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, p. 7693-7698, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24801904>. Acesso em: 18 abr., 2020.
- LI, Y.; et al. Axl mediates tumor invasion and chemosensitivity through PI3K/Akt signaling pathway and is transcriptionally regulated by slug in breast carcinoma. **IUBMB Life**, v. 66, p. 507-518, 2014b.
- LIM, J.; THIERY, J. Epithelial mesenchymal transitions: Insights from development. **Development**, v. 139, p. 3471-3486, 2012.
- LIPS, E. H.; et al. Breast cancer subtyping by immunohistochemistry and histological grade outperforms breast cancer intrinsic subtypes in predicting neoadjuvant chemotherapy response. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 140, n. 1, p. 63-71, jul. 2013.
- LOPES, C. M.; et al. Clinical, histomorphological, and therapeutic prognostic factors in patients with triple-negative invasive breast cancer. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 6, nov-dec., 2015.
- LOPES, V. F. A. **Conexina 43 no cancro da mama: papel fisiopatológico e potencial terapêutico**. [Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas] Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. 80 p., 2019.
- LOUREIRO, J.; et al. Discovering mammography-based machine learning classifiers for breast cancer diagnosis. **J. Med. Syst.**, v. 36, n. 4, p. 2259-69, aug., 2012.
- LOZNEANU, L.; et al. Computational and immunohistochemical analyses highlight AXL as a potential prognostic marker for ovarian cancer patients. **Anticancer Res.**, v. 36, p. 4155-4163, 2016.
- MAJEWSKI, J. M.; et al. Quality of life of women recovering from breast cancer after being subjected to mastectomies compared with those who had conservative surgery: a review of the literature. **Cien. Saude Colet.**, v. 17, n. 3, p. 707-16, mar., 2012.
- MARCONI, M. de A.; LAKATOS, E. M. **Metodologia científica**. 3ª. ed. São Paulo: Atlas, 2000.
- MARINHO, V. F. Z.; et al. Marcadores Moleculares Em Câncer de Mama Preditivos de Metástases Axilares. **Ver. Assoc. Med. Bras.**, v. 54, n. 3, p. 203-7, 2008.
- MARTELLA, E.; et al. **Câncer de mama – estádios iniciais**. In: SALVAJOLI, J. V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S. L. Radioterapia em oncologia. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 731-754.
- MARTINEZ, M. T.; et al. Breast cancer in very Young patients in a Spanish cohort: age as na independente bad prognostic indicator. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 13, p. 1-10, 2019.
- MARTINS, F. C.; et al. Influence of normal mammary epithelium on breast cancer progression: the protective role of early pregnancy. **Tumori**, v. 96, n. 6, p. 999-1003, nov., 2010.
- MASON, J.; et al. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. **J. Histochem. Cytochem.** v. 39, p. 225-229, 1991.
- MATHEUS, V. S.; et al. Carcinoma medular da mama: correlação anátomo-radiológica. **Radiol. Bras.**, v. 41, n. 6, nov-dec., 2008.
- MATOSO, L. M. L.; et al. As necessidades assistenciais do perioperatorio da mastectomia. **Rev. Saúde Públ. Santa Cat.**, v. 7, n. 1, 2014.
- MEDEIROS, G. C.; et al. Análise dos determinantes que influenciam o tempo para o início do tratamento de mulheres com câncer de mama no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 6, p. 1269-1282, 2015.
- MEIRA, K. C.; et al. Análise de efeito idade-período-coorte na mortalidade por câncer de mama no Brasil e regiões. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 37, p. 402-408, 2014.
- MEYER, A. M.; et al. Preoperative breast MRI and surgical outcomes in elderly women with invasive ductal and lobular carcinoma: a population-based study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 143, n. 1, p. 203-12, jan 2014.
- MIGOWSKI, A.; et al. Diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil. II - Novas recomendações nacionais, principais evidências e controvérsias. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, 2018.
- MONTEIRO, P.; et al. Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 111, n. 18, E1872-9, may 2014.
- MORAIS, K.; BASTOS, M. Incidência de complicações em mulheres pós mastectomizadas no município de Vitória da Conquista-BA. **Revista InterScientia**, v. 2, n. 3, 15 dez., 2016.
- MORRISON, D. H.; et al. Tumour biomarker expression. Relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 107, p. 1-6, 2012.

- MUKOHARA, T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. **Cancer Sci.**, v. 102, p. 1-8, 2011.
- NGUYEN, K-Q; et al. TAM receptors in apoptotic cell clearance, autoimmunity, and cancer. **Autoimmunity**, v. 46, n. 5, p. 294-297, 2013.
- NUNES, A. T.; BERMAN, T.; HARRIS, L. **Principles & practice of Oncology: molecular biology of breast cancer**. 11. ed. Philadelphia: Absolute Service, Inc., 2019.
- NUNES, P. S. G. **Síntese de novas quinazolininas para tratamento de tumores sob hipóxia e nitroimidazol para diagnóstico por PET**. [Tese] Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências /farmacêuticas de Ribeirão Preto. 42p., 2018.
- OLIVEIRA, L. B.; FOLGUEIRA, M. A. A. K. **Biomarcadores no Câncer**. In: SAITO, R. F.; et al. Fundamentos de oncologia molecular. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. p. 315-327.
- OLIVEIRA, T. N. **Proteção social dirigida às mulheres com câncer de mama: um estudo exploratório**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2017.
- OLIVEIRA, T. N.; SENNA, M. C. M. O Controle do Câncer de Mama no Brasil. In: 16º Congresso Brasileiro de Assistentes Sociais, **Anais**. p. 1-11, 30/10 a 03/11/2019.
- OPAS/OMS Brasil – Câncer | OPAS/OMS. **Pan American Health Organization / World Health Organization**, 2018/02/02/23:48:38 2018. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094). Acesso em: 14 ago., 2019.
- OSTEEN, R. **Breast cancer**. In: LENHARD, R. E.; OSTEEN, R. T.; GANSLER, R. Clinical Oncology. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2001.
- PACCEZ JD, VOGELANG M, PARKER MI, ZERBINI LF. The receptor tyrosine kinase Axl in cancer: biological functions and therapeutic implications. **Int J Cancer**, v. 134, n. 5, p. 1024-33, 2014.
- PACCEZ, J. D.; et al. The receptor tyrosine kinase Axl in cancer: biological functions and therapeutic implications. **Int J Cancer**, v. 134, n. 5, p. 1024-33, mar 2014.
- PANG, H.; et al. Prognostic values of osteopontin-c, E-cadherin and  $\beta$ -catenin in breast cancer. **Cancer Epidemiology**, v. 37, n. 6, p. 985-992, 2013.
- PAOLINO, M.; et al. The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. **Nature**, v. 507, n. 7493, p. 508, 2014.
- PEITER, C. C.; LANZONI, G. M. M.; OLIVEIRA, W. F. Regulação em saúde e promoção da equidade: o Sistema Nacional de Regulação e o acesso à assistência em um município de grande porte. **Saude Debate**, v. 40, n. 111, p. 63-73, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201611105>
- PEÑA-CHILET, M.; et al. MicroRNA profile in very Young women with breast cancer. **BMC Cancer**, v. 14, p. 529, 2014.
- PEREGRINO, A. A. F.; et. al. Análise de Custo-efetividade do rastreamento do câncer de mama com mamografia convencional, digital e ressonância. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 1, p. 215-222, 2012.
- PEROU, C. M.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.
- PIACENTINI, A. B.; MENEZES, H. Recentes aspectos sobre a biologia do câncer e das metástases. **Rev Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, p. 593-604, may-aug 2012.
- PINHEIRO, A. B.; et al. Câncer de mama em mulheres jovens: análise de 12.689 casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 3, p. 351-359, 2013.
- PRAT, A.; et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within Immunohistochemically defined Luminal A Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 2, p. 203-209, 2013.
- RAKHA, E. A.; et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 4, p. 207, 2010.
- RAKHA, E. A.; et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, n. 19, p. 3153-3158, 2008.
- RANKIN, E. B.; et al. AXL is an essential fator and therapeutic target for metastatic ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 70, p. 7570-7579, 2010.
- RIBEIRO, L. F.; et al. Modified radical mastectomy sparing one or both pectoral muscles in the treatment of breast cancer: intra and postoperative complications. **Sao Paulo Med. J.**, v. 124, n. 3, p. 130-4, may, 2006.
- ROCHA, J. C. C.; RAMIREZ, R.; COSTA, S. C. V. **Câncer de mama**. In: FERREIRA, G. C.; ROCHA, J. C Oncologia molecular. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. p. 217-225.
- RUDIGER, T; et al. Immunohistochemistry circle trial of the university institutes of pathology in Germany. **Pathologe**. V.18, p. 262-268, 1997.
- SABIANI, L.; et al. Breast Cancer in Young women: Pathologic features and molecular phenotype. **The Breast**, v. 29, p. 109-116, 2016.
- SANCHEZ-TILLO, E.; et al.  $\beta$ -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 48, p. 19204-19209, 2011.
- SAINAGHI, P. P.; et al. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. **Journal of cellular physiology**, v. 204, n. 1, p. 36-44, 2005.
- SASSE, A. D.; SASSE, E. C.; Estudo de custo-efetividade do anastrozol adjuvante no câncer de mama em mulheres pós-menopausa. **Ver. Assoc. Med. Bras.**, v. 55, n. 5, p. 535-540, 2009.
- SCHIMITT, F. et al. Utilidade dos métodos imuno-histoquímicos para o diagnóstico anatomopatológico. **Rev. Hosp. Clin. Facul. Med. São Paulo**, v. 33, p. 642-5, 2002

- SCHLESSINGER, J. Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. **Cold Spring Harb Perspect. Biol.**, v. 6, pii: a008912, 2014.
- SCHNEIDER, I. J.; et al. Knowledge about mammography and associated factors: population surveys with female adults and elderly. **Rev Bras Epidemiol**, v. 16, n. 4, p. 930-42, dec., 2013.
- SEAL, M. D.; CHIA, S.K. What is the difference between triple-negative and basal breast cancers? **Cancer J.**, v. 16, p. 12-16, 2010.
- SHAH, R.; et al. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. **World J. Clin. Oncol.**, v. 5, n. 3, p. 283-298, 2014.
- SHIEH, Y. S.; et al. Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. **Neoplasia**, v. 7, p. 1058-1064, 2005.
- SILVA, A. P.; et al. Knowledge and expectations of women in the preoperative mastectomy. **Ver. Esc. Enferm. USP**, v. 44, n. 4, p. 989-95, dec. 2010.
- SILVA, J.; et al. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, n. 12, p. 3761-6, dec., 2002.
- SPAGNOL, G.; et al. Connexin 43 Carboxyl-terminal domain directly interacts with  $\beta$ -catenin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1562, 2018.
- SUDRE, A. P.; et al. **Robbins & Cotran fundamentos de patologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- SUN, R.; et al. Expression Status of PIWIL1 as a Prognostic Marker of Colorectal Cancer. **Dis. Markers**, v. 2017, p. 1204937, 2017.
- SUN, M.; et al. Combined expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 and  $\beta$ -catenin is associated with lymph node metastasis and poor survival in breast cancer patients following cyclophosphamide treatment. **Oncology Reports**, v. 34, n. 1, p. 165-174, 2015.
- TAI, K.; et al. Axl promotes cell invasion by inducing MMP 9 activity through activation of NF kappaB and Brg 1. **Oncogene**, v. 27, p. 4044-4055, 2008.
- THULER, L. C. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 4, 2003.
- TORRES, L.F.B. et al. A contribuição da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica: experiência de 10 anos. **Rev. Med. Paraná**, v.56, n.2, p.31-8, 1998.
- TOTHILL, R. W.; MARCHIONNI, L. Impact of gene expression profiling test on breast cancer outcomes. **Evidence Report / Technology Assessment**, n. 160, 2009.
- TSAI, H.; et al. Differential microRNA expression. In breast câncer with diferente onset age. **Plos One**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2018.
- VICH, P.; et al. Update of breast cancer in primary care (I/V). **Semergen**, v. 40, n. 6, p. 326-333, 2014.
- VIEIRA, R. A. The value of patients' expectation on breast oncoplastic surgery. **Breast J.**, v. 20, n. 6, p. 676-8, nov-dec. 2014.
- VILLAREAL-GARZA, C.; et al. Breast Cancer in Young women in Latin America: Na unmet, growing burden. **The Oncologist**, p. 26-34, 2013.
- VISVADER, J. E. Keeping a breast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. **Genes Dev**, v. 23, p. 2563-2577, 2009.
- VOURI, M.; et al. Axl-EGFR receptor tyrosine kinase hetero-interaction provides EGFR with access to pro-invasive signalling in cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, n. 10, p. e266, 2016.
- VOURI, M.; HAFIZI, S. TAM receptor tyrosine kinases in cancer drug resistance. **Cancer Res.**, v. 77, n. 11, p. 2775-2778, 2017.
- VUKOSAVLJEVIC, N. D.; et al. Natural course of node-negative breast cancer: high risk-related subgroups. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 22, n. 4, p. 543-549, 2003.
- VUORILUOTO, K.; et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. **Oncogene**, v. 30, p. 1436-1448, 2011.
- WASIELEWSKI, R; et al. Effects of antigen retrieval by microwave heating in formalin-fixed tissue section on a broad panel of antibodies. **Histochem. J.**, v.102, p.1065-1072, 1994.
- WASIELEWSKI, R; et al. Influence of fixation, antibody clones and signal amplification on steroid receptor analysis. **Breast J.** v.4, p. 33-40, 1998.
- WEBER, J.; HABERKORN, U.; MIER, W. Cancer stratification by molecular imaging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 4918-4946, 2015.
- WEINBERG, J.; VIEIRA, V.; ASCHENGRAU, A. Community – and individual-level socioeconomic status and breast cancer risk. **Environ Health Perspect**, v. 116, n. 8, 2008.
- WENER, M; CHOTT, A; FABIANO, A. Effect of Formalin Tissue Fixation and processing on Immunohistochemistry. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.24, p.1016-1019, 2000
- WILKES, G. M. Targeted therapy: attacking cancer with molecular and immunological targeted agents. **Asia Pacific J. Oncol. Nurs**, v. 13, n. 2, p. 137-155, 2018.
- WILLETT, W. C.; et al. **Epidemiologia e causas não genéticas do câncer de mama**. In: HARRIS, J. R.; et al. Doenças da mama. 2ª. ed. Belo Horizonte: Medsi, 2002. p. 205-259.
- WILSON, C.; et al. AXL inhibition sensitizes mesenchymal cancer cells to antimetabolic drugs. **Cancer Res.**, v. 74, p. 5878-5890, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Classification of Breast Tumours**. Fifth Edition, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Classification of Breast Tumours**. Third Edition, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer prevention and control**, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/nmh/a5816/en/>. Acesso em: 19 jun., 2019.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer fact sheets**. [Internet], 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, 2003.
- WU, X.; et al. Global phosphotyrosine survey in triple-negative breast cancer reveals activation of multiple tyrosine kinase signaling pathways. **Oncotarget**, v. 6, p. 29143-29160, 2015.
- XU, J.; et al. B-Catenin Is Required for the Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1-11, 2015.
- YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 412-424, 2014.
- YOUSEF, E. M.; et al. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. **BMC Cancer**, v.14, p. 609, 2014.
- YU, H.; et al. Axl receptor tyrosine kinase is a potential therapeutic target in renal cell carcinoma. **Br. J. Cancer**, v. 113, p. 616-625, 2015.
- ZANCHIN, F. C.; et al. Food consumption and nutritional status of women with breast cancer treated in a breast service in the countryside of Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. HCPA**, v. 31, n. 3, 2011.
- ZHANG, R.; et al. Reproducibility of the Nottingham modification of the Scarff-Bloom-Richardson histological grading system and the complementary value of Ki-67 to this system. **Chin. Med. J. (Engl.)**, v. 123, n. 15, p. 1976-1982, 2010.

## Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.