

MARCADORES MOLECULARES EM CÂNCER DE MAMA PREDITIVOS DE METÁSTASES AXILARES

VANESSA FORTES ZSCHABER MARINHO, KONRADIN METZE, FERNANDA SQUÁRCIO FERNANDES SANCHES, GISLENE FÁTIMA SILVA ROCHA, HELENICE GOBBI*

Trabalho realizado pelo Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG

RESUMO

OBJETIVO. Avaliar e relacionar fatores morfológicos e moleculares de câncer de mama preditivos de metástases em linfonodos axilares.

MÉTODOS. Selecionamos 123 casos de carcinomas mamários invasores subdivididos em três grupos de acordo com o status axilar (pacientes com macrometástases, com micrometástases e linfonodo-negativas). Avaliamos e correlacionamos a presença de metástases axilares com fatores morfológicos (tamanho do tumor, tipo e grau histológicos, invasão linfática e sanguínea em lâminas coradas pela hematoxilina e eosina) e moleculares do tumor primário (receptores de estrogênio e progesterona, Ki67, p53, E-caderina, Her2, e invasão linfática e sanguínea em lâminas coradas pela imunistoquímica, para D2-40 e CD31).

RESULTADOS. A ocorrência de metástases axilares esteve positivamente relacionada à embolização neoplásica em vasos linfáticos em lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (HE), quando analisamos os casos com metástases e sem metástases ($p=0,04$), e, quando eles eram analisados em três subgrupos ($p=0,002$). Também identificamos relação positiva e estatisticamente significativa entre a presença de metástases axilares e invasão de vasos sanguíneos em lâminas coradas pelo CD31 ($p=0,02$). As demais variáveis moleculares e morfológicas não mostraram relação estatisticamente significativa com a presença de metástases.

CONCLUSÃO. A invasão neoplásica em vasos linfáticos e sanguíneos identificadas em cortes histológicos corados pela HE e por marcadores imunistoquímicos relaciona-se positivamente com a ocorrência de metástases, e é preditivo de metástases em linfonodos axilares em câncer de mama.

UNITERMOS: Fatores preditivos. Câncer de mama. Metástases axilares. Hematoxilina e eosina. Imunistoquímica.

*Correspondência

Departamento de Anatomia Patológica
Faculdade de Medicina da UFMG
Av. Alfredo Balena, 190 - sala 305
Belo Horizonte - MG
CEP 30130-100
Tel: (31)34099118
Fax: (31)34099664

INTRODUÇÃO

A presença de metástases nos linfonodos axilares é um dos fatores mais importantes no estadiamento e avaliação prognóstica de pacientes com câncer de mama^{1,2}.

Diversas pesquisas relacionando características clínicas do paciente e morfológicas do tumor primário têm procurado selecioná-las e relacioná-las a maior potencial para metástases e pior prognóstico³. Dentre estas, destacam-se a idade da paciente, sendo os tumores de mulheres mais jovens (pré-menopausa) mais agressivos^{4,5}. O tamanho do tumor primário, o tipo e grau histológicos também são fatores importantes e associados a metástases. Tumores maiores que 2 cm têm maior chance de estarem associados a metástases em linfonodos no momento do diagnóstico⁶. Os carcinomas ductais sem tipo especial e os carcinomas micropapilares têm maior frequência de metástases linfonodais que tipos especiais puros, de boa evolução, como os tubulares e o colóide^{7,8,9}. Tumores com alto grau histológico apresentam maior tendência a metástases. O índice proliferativo do tumor avaliado por contagem mitótica, que é parte da avaliação do grau histológico, também está relacionado a maior propensão para metástases¹⁰.

No entanto, tumores de mesmo tipo histológico, mesma dimensão e estadiamento podem apresentar evoluções diferentes. Estudos avaliando marcadores moleculares no tumor primário têm tentado identificar características específicas do tumor que possam indicar prognóstico adverso. Além do maior conhecimento sobre a biologia e progressão tumoral, estes estudos visam também avaliar marcadores preditivos que permitam selecionar pacientes para tratamentos específicos e individualizados^{2,6,11}.

Em estudo anterior do nosso grupo, avaliamos a relação entre características clínicas das pacientes e anátomo-patológicas dos carcinomas mamários primários e a ocorrência de micrometástases. Não identificamos relação entre as características clínicas (idade, status menopausal) e morfológicas do tumor primário (tamanho do tumor, tipo e grau histológicos) e a ocorrência de micrometástases. Além disso, não observamos diferenças na sobrevida global e livre de doença entre as pacientes linfonodo-negativas e as pacientes com micrometástases^{12,13}.

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar e relacionar fatores moleculares de câncer de mama preditivos de metástases em linfonodos axilares.

MÉTODOS

Foram selecionados 123 casos de carcinomas mamários invasores de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico (mastectomia radical, quadrantectomia ou mastectomia modificada com esvaziamento axilar), no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no período de 1990 a 2004. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade. Todos os casos selecionados tinham lâminas e blocos de parafina do tumor primário e dos linfonodos axilares disponíveis para estudo imunohistoquímico. Os casos foram divididos em três grupos: I - Grupo 1 (41 casos): pacientes com linfonodos axilares negativos para metástases; II - Grupo 2 (41 casos): pacientes com linfonodos axilares com micrometástases (definidas pelo *American Joint Committee on Cancer*, como depósitos celulares neoplásicos medindo entre 0,2 mm e ≤ 2 mm)¹⁴; III - Grupo 3 (41 casos): pacientes com linfonodos axilares com macrometástases (definidas pelo *American Joint Committee on Cancer*, como depósitos celulares neoplásicos medindo > 2 mm)¹⁴. Não foram incluídos, neste trabalho, casos de células tumorais isoladas em linfonodos. Os casos com micrometástases foram selecionados consecutivamente e pareados com os casos com macrometástases e linfonodo-negativos. A idade, tamanho do tumor primário, tipo e grau histológico de cada grupo foram similares. Somente casos que continham tecido peritumoral normal suficiente para avaliação da embolia neoplásica linfática e/ou sangüínea em vasos peritumorais foram incluídos neste estudo.

Estudo morfológico dos tumores primários

As características do tumor primário analisadas foram: tamanho do tumor, segundo o sistema TNM¹⁴; grau histológico, segundo o sistema de gradação de Nottingham¹⁵; tipo histológico, segundo as recomendações de Page et al.⁷ e do Colégio Americano de Patologistas¹⁶. O diâmetro do campo microscópico usado para a contagem mitótica foi de 0,44 mm. Em cada caso foi examinada uma área representativa da neoplasia e toda a secção histológica foi analisada para avaliação de embolia vascular. A avaliação de invasão vascular foi realizada nas áreas peritumorais¹⁷. Analisamos invasão de vasos linfáticos (IVL) e/ou invasão de vasos sangüíneos (IVS) no tecido adjacente ao tumor primário (área peritumoral), em aumento de 200X, com análise seqüencial pelo mesmo observador conforme recomendações do *First International Consensus on the Methodology of Lymphangiogenesis in Solid Human Tumors*⁸.

A IVL e/ou IVS era considerada evidente quando pelo menos um ninho de células tumorais foi claramente visível no interior do lúmen vascular. Consideramos os critérios de Yamauchi et al. para a definição de embolia neoplásica¹⁹. Segundo este autor, considera-se êmbolo quando o endotélio é evidente, sendo excluída a possibilidade de artefato de retração entre ninhos de células tumorais e estroma. Neste estudo, definimos IVL em lâminas coradas pela HE, quando ninhos de células tumorais eram vistos em espaços envoltos por endotélio, sem músculo liso ou elástico ao redor, preenchidos ou não por fluido linfático. IVS foi definida nas lâminas coradas pela HE como ninhos de células no interior de espaços revestidos por endotélio, com ou sem músculo liso, e contendo hemácias¹⁹. A avaliação do tipo e grau histológicos, a IVL e IVS foi feita pela mesma patologista (VFZM), sendo

que todas as dúvidas, os casos positivos e 10% dos casos negativos para invasão vascular foram analisados por duas patologistas (HG e VFZM), utilizando-se microscópio de dupla observação.

Estudo imunohistoquímico dos tumores primários e linfonodos axilares

Avaliamos os fatores moleculares do tumor primário através de método imunohistoquímico, analisando receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP), Her2, E-caderina, p53, e Ki67. Fez-se ainda estudo com marcadores de endotélio vascular (CD31) e marcador seletivo de endotélio linfático (D2-40).

O estudo imunohistoquímico foi feito em cortes histológicos seqüenciais, com 5 μ m de espessura, utilizando-se anticorpos monoclonais (Tabela 1) e o método da estreptavidina-biotina peroxidase. Todos os cortes foram submetidos à reativação antigênica com calor úmido em panela a vapor, em tampão citrato, pH 6,0, por 25 minutos, exceto nos casos corados pelos anticorpos D2-40 e CB11. As reações foram reveladas com diaminobenzidina e as lâminas contracoradas com hematoxilina de Harris. Todas as colorações imunohistoquímicas foram processadas manualmente.

Os linfonodos classificados como negativos e os com micrometástases foram submetidos a cortes seqüenciais que foram corados pela imunohistoquímica com anticorpo monoclonal antipancitoqueratina (Tabela 1).

As lâminas dos tumores primários e dos linfonodos axilares coradas pela imunohistoquímica foram avaliadas pela mesma patologista (VFZM). Todos os linfonodos positivos, dúvidas e 10% dos linfonodos negativos foram reavaliados por duas patologistas (VFZM e HG), utilizando-se microscópio de dupla observação.

Análise dos marcadores moleculares

Para análise de RE e RP, utilizamos método de escore que avalia a proporção de células coradas e a intensidade da coloração, segundo Allred et al.^{20,21}. As lâminas coradas para Her2 foram classificadas de acordo com o sistema de escore do HercepTestTM²². Os casos foram classificados como p53 positivos quando mais de 10% das células neoplásicas exibiam coloração nuclear¹⁶. A avaliação do escore do Ki67 foi feita obtendo-se a porcentagem de células neoplásicas que mostram coloração nuclear na área de maior proliferação celular ("hot spot"). Os tumores eram agrupados em quatro categorias: $< 10\%$, 10% - 25% , 25% - 50% e $> 50\%$ das células neoplásicas coradas²³. A imunomarcagem da E-caderina foi feita utilizando-se sistema de escore semiquantitativo. O tumor foi graduado como "0" quando não havia evidência de coloração de células neoplásicas, "1+" quando 1% a 25% das células mostrava reatividade; "2+" quando 26% a 49% das células exibiam marcação; "3+" quando 50% a 74% das células estavam marcadas; e, "4+", quando mais de 75% das células eram reativas²⁴.

Para análise de IVL e/ou IVS, os vasos foram considerados como linfáticos quando o endotélio era marcado com ambos os anticorpos CD31 e D2-40 e não continham hemácias no interior do lúmen. Os vasos eram considerados como sangüíneos quando o endotélio vascular estava marcado pelo anticorpo monoclonal CD31, tinha marcação endotelial negativa para o anticorpo D2-40 e não continha hemácias no lúmen.

Tabela 1 - Anticorpos primários, diluições, recuperação antigênica e fabricantes dos anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico

Anticorpo	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Fabricante
RE	6F-11	1:100	Sim	Novocastra/Reino Unido
RP	PgR 312	1:100	Sim	Novocastra/Reino Unido
Her2	CB11	1:80	Não	Novocastra/Reino Unido
p53	DO7	1:400	Sim	Dako/EUA
Ki67	MIB-1	1:50	Sim	Immunotech/França
E-caderina	NCH-38	1:50	Sim	Dako/EUA
CD31	JC/70A	1:50	Sim	Dako/EUA
D2-40	D2-40	1:100	Não	Signet/EUA
Citoqueratina	AE1/AE3	1:100	Sim	Dako/EUA

Tabela 2 - Características clínico-patológicas de 123 casos de carcinoma mamário invasor segundo o status linfonodal axilar

Características clínico-patológicas	Mac-Met n (%)	Mic-Met n (%)	LN n (%)	Total n (%)
Status menopausal				
Pré-menopausa	20 (48,8)	18 (43,9)	20 (48,8)	58 (47,2)
Pós-menopausa	21 (51,2)	23 (56,1)	21 (51,2)	65 (52,8)
Tamanho do tumor				
T1	10 (24,4)	17 (41,5)	17 (41,5)	44 (35,8)
T2	24 (58,5)	23 (56,1)	18 (43,9)	65 (52,8)
T3	7 (17,1)	1 (2,4)	6 (14,6)	14 (11,4)
Tipo histológico				
Ductal SOE	35 (85,4)	37 (90,2)	33 (80,5)	105 (85,4)
Tipo especial	6 (14,6)	4 (9,8)	8 (19,5)	18 (14,6)
Grau histológico				
Grau I	9 (22)	14 (34,1)	13 (31,7)	36 (29,3)
Grau II	21 (51,2)	18 (43,9)	19 (46,3)	58 (47,2)
Grau III	11 (26,8)	9 (22)	9 (22)	29 (23,6)
IVL (HE)	12 (29,3)	3 (7,3)	2 (4,9)	17 (13,8)
IVS (HE)	2 (4,9)	1 (2,4)	2 (4,9)	5 (4,1)
Total	41 (100)	41 (100)	41 (100)	123 (1000)

Mac-Met= macrometástases; Mic-Met= micrometástases; LN= linfonodo negativo n= número de casos; SOE= sem outra especificação; IVL= invasão de vasos linfáticos; IVS= invasão de vasos sanguíneos; HE= hematoxilina e eosina

Para análise estatística, empregamos o teste de McNemar e Kappa de Cohen para concordância entre os diferentes métodos usados para avaliar invasão vascular. Aplicamos coeficientes de correlação entre variáveis de acordo com Pearson ou Spearman. As comparações entre os três grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis. O valor de p, considerado estatisticamente significativo, foi < 0,05. Para as análises e preenchimento do banco de dados, usamos os programas Epi-Info 6.04, SPSS e WinStat.

RESULTADOS

A idade das pacientes variou entre 27 e 88 anos (média= 55,9 anos e mediana= 52 anos). As características clínico-patológicas dos 123 casos de carcinoma mamário invasor encontram-se descritas na Tabela 2.

Os resultados da análise imunoistoquímica, com estratificação em três grupos segundo o status linfonodal, estão resumidos na Tabela 3.

Quando agrupamos os casos com macrometástases e micrometástases em um único grupo definido como “com presença de metástases”, observamos relação positiva e estatisticamente significativa entre a presença de metástases e a ocorrência de IVL nas lâminas coradas pela HE (p= 0,04). Esta relação também era observada quando os três grupos eram analisados separadamente (p= 0,002). De modo semelhante, observamos relação positiva e estatisticamente significativa entre a presença de metástases (macrometástases e micrometástases) e a presença de IVS detectada pela IIQ, tanto quando foram analisados em três grupos, como quando eram agrupados em “com metástases e sem metástases” (p= 0,02).

As demais variáveis (RE, RP, Her2, Ki67, p53, E-caderina) não mostraram relação estatisticamente significativa (positiva ou negativa) com a presença de metástases, quando analisadas em três grupos distintos ou quando agrupamos os casos em “com e sem metástases” (p> 0,05).

DISCUSSÃO

A identificação apropriada de fatores prognósticos e parâmetros preditivos de responsividade a tratamentos específicos continua a ser um desafio na individualização da melhor terapêutica para cada paciente¹. Uma série de recomendações para a seleção de terapias sistêmicas adjuvantes foi recentemente proposta na 9th *International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer*, em Saint Gallen, Suíça²⁵.

A ocorrência de metástases em linfonodos axilares é o mais poderoso e independente parâmetro prognóstico em mulheres com câncer de mama recentemente diagnosticado. Como avaliado pela Conferência de Consenso de St. Gallen, o número de linfonodos axilares envolvidos é determinante na avaliação do risco²⁵.

Em nosso estudo avaliamos fatores morfológicos e moleculares que pudessem ser preditivos de metástases em linfonodos axilares, dividindo as pacientes em três subgrupos de acordo com o status linfonodal. Em nosso estudo, a presença de metástases esteve positivamente relacionada à IVL e IVS em lâminas coradas pela HE. Colleoni et al.¹⁷ também mostraram relação positiva entre invasão linfo-vascular e a ocorrência de metástases axilares. Estes autores consideraram invasão linfo-vascular fator importante no prognóstico das pacientes e deve ser fornecido na avaliação histopatológica de rotina. Nosso estudo mostrou ainda que a detecção de êmbolos neoplásicos em vasos linfáticos e sanguíneos através do método imunoistoquímico também esteve relacionada positivamente à ocorrência de metástases axilares, nos dois subgrupos de pacientes, com macrometástases e micrometástases. Nossos resultados são semelhantes aos de outros autores que também avaliaram embolização neoplásica e ocorrência de metástases de carcinoma da mama utilizando marcadores imunoistoquímicos^{26,27}. A invasão neoplásica vascular tem sido considerada um “espelho” da disseminação de células tumorais para os linfonodos axilares e também para órgãos distantes¹⁸. A detecção de embolização neoplásica, especialmente

Tabela 3 - Características imunoistoquímicas de 123 casos de carcinoma mamário invasor segundo o status linfonodal axilar

Características imunoistoquímicas	Mac-Met n (%)	Mic-Met n (%)	LN n (%)	Total n (%)
IVL (IIQ)	16 (39)	10 (24,4)	9 (22)	35 (28,5)
IVS (IIQ)	6 (14,6)	11 (26,8)	2 (4,9)	19 (15,4)
RE				
Positivo	31 (75,6)	35 (85,4)	34 (82,9)	100 (81,3)
Negativo	10 (24,4)	6 (14,6)	7 (17,1)	23 (18,7)
RP				
Positivo	25 (61)	29 (70,7)	28 (68,3)	82 (66,7)
Negativo	16 (39)	12 (29,3)	13 (31,7)	41 (33,3)
Score Her2				
0 e 1+	35 (85,4)	32 (78)	36 (87,8)	103 (83,7)
2+	1 (2,4)	1 (2,4)	1 (2,4)	3 (2,4)
3+	5 (12,2)	8 (19,5)	4 (9,8)	17 (13,8)
P53				
Positivo	17 (41,5)	11 (26,8)	10 (24,4)	38 (30,9)
Negativo	24 (58,5)	30 (73,2)	31 (75,6)	85 (69,1)
Score Ki67				
<10%	16 (39)	23 (56,1)	16 (39)	55 (44,7)
10%-25%	11 (26,8)	9 (22)	13 (31,7)	33 (26,8)
25%-50%	10 (24,4)	6 (14,6)	8 (19,5)	24 (19,5)
>50%	4 (9,8)	3 (7,3)	4 (9,8)	11 (8,9)
Score E-caderina				
0 (negativo)	2 (4,9)	1 (2,4)	2 (4,9)	5 (4,1)
1+	3 (7,3)	3 (7,3)	2 (4,9)	8 (6,5)
2+	0 (0)	2 (4,9)	1 (2,4)	3 (2,4)
3+	8 (19,5)	6 (14,6)	4 (9,8)	18 (14,6)
4+	28 (68,3)	29 (70,7)	32 (78)	89 (72,4)
Total	41 (100)	41 (100)	41 (100)	123 (100)

Mac-Met= macrometástases; Mic-Met= micrometástases; LN= linfonodo negativo n= número de casos; IVL= invasão de vasos linfáticos; IVS= invasão de vasos sanguíneos; IIQ= imunoistoquímica; RE= receptor de estrógeno; RP= receptor de progesterona

em vasos linfáticos, através de método imunoistoquímico, está relacionada a pior prognóstico e sobrevida das pacientes^{19,28,29}. A detecção imunoistoquímica de embolia linfática e correlação com pior prognóstico também foi observada em carcinomas gástricos³⁰.

A invasão vascular peritumoral, especialmente a invasão linfática, foi incluída como fator prognóstico adverso nas recomendações para terapias sistêmicas adjuvantes pós-operatórias nas pacientes com carcinoma da mama em estágios mais precoces pelo *International Consensus Panel during St Gallen Conference, 2005*²⁵. A presença de invasão vascular peritumoral também definiu um risco intermediário para as pacientes linfonodo-negativas com carcinoma mamário, mas seu valor para as pacientes linfonodo-positivas ainda é considerado incerto ou insuficiente¹⁸. Em uma série de 4.351 casos consecutivos, de pacientes tratadas cirurgicamente para carcinoma da mama e com biópsia de linfonodo sentinela, Viale et al. identificaram que o tamanho do tumor e a invasão peritumoral de vasos eram os mais poderosos e independentes fatores preditivos de metástases em linfonodos sentinela²⁷. Em particular, a invasão de vasos peritumorais está associada a

aumento de 5,3 vezes no risco de acometimento de linfonodo sentinela, reforçando ser um dos mais poderosos fatores preditivos de metástases em linfonodos axilares¹⁷.

Em nosso trabalho, observamos também relação positiva e significativa entre invasão de vasos sanguíneos e a presença de metástases, confirmando ser este, fenômeno importante na disseminação neoplásica.

Em nosso estudo não identificamos relação estatisticamente significativa entre os demais fatores morfológicos (tamanho do tumor, tipo e grau histológicos) ou moleculares (RE, RP, Her2, Ki67, p53, E-caderina) e a ocorrência de metástases. Outros autores, porém, mostraram relação entre a ocorrência de metástases e estes fatores. O tamanho tumoral, tipo e grau histológicos relacionam-se positivamente com a ocorrência de metástases. No entanto, a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona mostrou relação inversa, ou seja, tumores que expressam receptores hormonais têm menor tendência a metástases⁶. É possível que o número de casos incluídos em nosso estudo tenha sido insuficiente para confirmar estas correlações relatadas por outros autores.

CONCLUSÃO

A invasão neoplásica em vasos linfáticos e sanguíneos identificada em cortes histológicos corados pela HE e por marcadores imunoistoquímicos é fator preditivo de metástases em linfonodos axilares em câncer de mama.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPEMIG.

Conflito de interesse: não há

SUMMARY

MOLECULAR FEATURES OF BREAST CANCER PREDICTIVE OF LYMPH NODE METASTASES

OBJECTIVES. The aim of our study was to analyze morphologic and molecular markers of breast cancer relating them to the presence of metastases in axillary lymph nodes.

METHODS. We selected 123 cases of invasive mammary carcinomas stratified into three subgroups: with macrometastases, with micrometastases, and lymph node negative. Presence of metastases was evaluated relating them with morphologic factors (size of primary tumor, type and grade, presence of lymphatic and blood vessel invasion in hematoxylin and eosin-stained slides) and molecular factors of primary tumor (estrogen and progesterone receptors, E-cadherin, Ki67, p53, Her2 expression, and the presence of lymphatic and blood vessel invasion in immunostained sections for D2-40 and CD31).

RESULTS. Axillary lymph node metastases were positively related to the presence of lymphatic vessel invasion in hematoxylin and eosin (H&E)-stained slides, when analyzed with or without metastases ($p=0.04$) and when analyzed in the three subgroups ($p=0.002$). Lymph node metastases were also positively related to presence of blood vessel invasion identified by immunohistochemistry (IHC) for CD31 ($p=0.02$). However other morphologic and molecular factors were not related to the presence of axillary node metastases.

CONCLUSION. Lymphatic and blood vessel invasion identified in H&E and IHC-stained slides are positively related to the metastatic status of

axillary lymph nodes and are predictive of axillary lymph node metastases in breast cancer. [Rev Assoc Med Bras 2008; 54(3): 203-7]

KEY WORDS: Predictive factors. Breast cancer. Axillary metastases. Hematoxylin and Eosin. Immunohistochemistry.

REFERÊNCIAS

1. Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Orlando L, Ghisini R, et al. Role of endocrine responsiveness and adjuvant therapy in very young women (below 35 years) with operable breast cancer and node negative disease. *Ann Oncol.* 2006;17:1497-503.
2. Ponzone R, Maggiorotto F, Mariani L, Jacomuzzi ME, Magistris A, Mininanni P, et al. Comparison of two models for prediction of nonsentinel node metastases in breast cancer. *Am J Surg.* 2007;193:686-92.
3. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5367-74.
4. Bollet MA, Sigal-Zafrani B, Mazeau V, Savignoni A, de la Rochefordière A, Vincent-Salomon A, et al. Age remains the first prognostic factor for loco-regional breast cancer recurrence in young (< 40 years) women treated with breast conserving surgery first. *Radiother Oncol.* 2007;82:272-80.
5. Finek J, Holubec L Jr, Topolcan O, Elgrova L, Skalova A, Pecen L. The importance of prognostic factors in premenopausal women with breast cancer. *Anticancer Res.* 2007;27:1893-6.
6. Brenin DR, Manasseh D, El-Tamer M, Troxel A, Schnabel F, Ditzhoff BA, et al. Factors correlating with lymph node metastases in patients with T1 breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2001;8:432-7.
7. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;51:195-208.
8. Pettinato G, Manivel CJ, Panico L, Sparano L, Petrella G. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. Clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:857-66.
9. Kim MJ, Gong G, Joo HJ, Ahn SH, Ro JY. Immunohistochemical and clinicopathologic characteristics of invasive ductal carcinoma of breast with micropapillary component. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129:1277-82.
10. Tawfik O, Kimler BF, Davis M, Stasik C, Lai S, Mayo MS, et al. Grading invasive ductal carcinoma of the breast: advantages of using automated proliferation index instead of mitotic count. *Virchows Arch.* 2007;450:627-36.
11. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:1069-74.
12. Marinho VF, Zagury MS, Caldeira LG, Gobbi H. Micrometástases de carcinoma da mama em linfonodos axilares: detecção imunoistoquímica versus hematoxilina e eosina. *J Bras Patol Med Lab.* 2004;40:127-32.
13. Marinho VF, Zagury MS, Caldeira LG, Gobbi H. Relationship between histologic features of primary breast carcinomas and axillary lymph node micrometastases: detection and prognostic significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14:426-31.
14. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, et al. Breast. In: Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, et al, editors. *AJCC Cancer Staging Manual.* 6th ed. New York: Springer; 2002. p.223-40.
15. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19:403-10.
16. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:966-78.
17. Colleoni M, Rotmensz N, Maisonneuve P, Sonzogni A, Pruneri G, Casadio C, et al. Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer. *Ann Oncol.* 2007;18:1632-40.
18. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer.* 2006;95:1611-25.
19. Yamauchi C, Hasebe T, Iwasaki M, Imoto S, Wada N, Fukayama M, et al. Accurate assessment of lymph vessel tumor emboli in invasive ductal carcinoma of the breast according to tumor areas, and their prognostic significance. *Hum Pathol.* 2007;38:247-59.
20. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11:155-68.
21. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allews DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17:1474-81.
22. Dako Herceptest™: A manual for interpretation. Carpinteria: Dako Corp.; 1999.
23. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-Phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol.* 1995;104:42-9.
24. Gupta A, Deshpande CG, Badve S. Role of E-Cadherins in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer.* 2003;97:2341-7.
25. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol.* 2005;16:1569-83.
26. Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ, Hanna K, Daly JM, Osborne MP. Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients. *J Am Coll Surg.* 2000;191:1-6.
27. Viale G, Zurrida S, Maiorano E. Predicting the status of axillary sentinel lymph nodes in 4351 patients with invasive breast carcinoma treated in a single institution. *Cancer.* 2005;103:492-500.
28. Acs G, Dumoff KL, Solin LJ, Pasha T, Xu X, Zhang PJ. Extensive retraction artifact correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis and predicts poor outcome in early stage breast carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:129-40.
29. Arnaout-Alkarain A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol.* 2007;20:183-91.
30. Yonemura Y, Endou Y, Tabachi K, Kawamura T, Yun HY, Kameya T, et al. Evaluation of lymphatic invasion in primary gastric cancer by a new monoclonal antibody, D2-40. *Hum Pathol.* 2006;37:1193-9.

Artigo recebido: 11/12/07
Aceito para publicação: 31/12/07
