

Punção Aspirativa por Agulha Fina de Gânglio Linfático Axilar em Doentes com Nódulo Mamário: Avaliação e Correlação de Variáveis

Marques R¹, Figueiredo JP², Almeida D³, Martins D^{1,4}, Sousa V^{3,5,6} e Agapito P^{1,3,5}

¹Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, Portugal

²Departamento de Ciências Complementares, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, Portugal

³Centro de Diagnóstico Anatómico-Patológico, Coimbra, Portugal

⁴I3S, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde

⁵Serviço de Anatomia Patológica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

⁶Instituto de Anatomia Patológica e Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Recebido: outubro 2019/ Publicado: dezembro 2019

***Autor correspondente:**

Rita Marques

rsmarques@gmail.com

RESUMO

Introdução A mama é uma glândula sensível à ação de hormonas, deste modo, dependendo da fase de vida da mulher, nomeadamente antes ou após a menopausa, a prevalência de diferentes tipos de lesões é variável. O carcinoma da mama é o que apresenta maior prevalência (34,6%) em mulheres portuguesas. A incidência do carcinoma da mama tem vindo a aumentar, sendo que afeta maioritariamente as mulheres pós-menopausa (75%). No entanto, as mulheres mais jovens apresentam tendencialmente pior prognóstico. A idade, tipo e grau histológico do carcinoma, metástase ganglionar e subtipo molecular são todos fatores importantes para seleção terapêutica, follow-up e prognóstico da doente.

Objetivo Esta investigação pretendeu correlacionar cinco variáveis: idade, metastização ganglionar, tipo e grau histológico e marcadores moleculares, em mulheres com nódulo mamário que foram submetidas a biópsia mamária e punção aspirativa de gânglio linfático axilar.

Material e Métodos A amostra inclui 41 doentes, que realizaram biópsia de nódulo mamário e punção aspirativa de gânglio linfático axilar. As amostras de tecido mamário foram coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina, permitindo a avaliação do tipo e grau histológico da lesão. Foram ainda realizadas técnicas imunohistoquímicas, para determinação de marcação dos recetores de estrogénio e/ou progesterona, expressão de HER-2 e de Ki67. Na citologia de gânglio linfático axilar, metade dos esfregaços foram corados pela técnica *May-Grünwald-Giemsa*, e a outra metade pela técnica de

Papanicolaou. Foi utilizado o Teste Exato de Fisher, com um nível de confiança de 95%, para um erro aleatório inferior 5%.

Resultados Identificou-se uma relação significativa entre o grau histológico do carcinoma e o subtipo molecular (valor-p=0,047) e com a expressão de Ki67 (valor-p=0,004). Todas as outras variáveis não demonstraram relação estatisticamente relevante.

Conclusão Assim, verificou-se que existe uma correlação entre o grau histológico do tumor com a expressão do marcador Ki67 e com o subtipo molecular do carcinoma.

Palavras-chave: Mama, Carcinoma da mama, Metástase ganglionar

INTRODUÇÃO

A glândula mamária é uma glândula sudorípara modificada cuja função principal é a produção de leite, esta é organizada em 15 a 20 lobos, cada um subdividido em unidade ducto-lobular terminal (UDLT) e em sistema de ductos¹⁻⁴. A unidade ducto-lobular terminal é constituída pelos lóbulos e pelas porções terminais de cada ducto, constituindo a unidade secretora e funcional da mama^{2,3}. A maioria das alterações fibroquísticas e dos carcinomas têm origem na UDLT².

Os lobos mamários são suportados por tecido conjuntivo denso, rico em colagénio com maior ou menor componente de tecido adiposo, designado estroma extralobular^{1,5}. Os componentes epiteliais dos lóbulos são rodeados por tecido conjuntivo laxo, designado estroma intralobular, que é sensível a hormonas, e por isso, a glândula mamária pode apresentar diferentes aspetos considerados normais, dependendo da fase da vida e idade da mulher^{1,2,4}.

As lesões da mama são bastante frequentes na população feminina, sendo o carcinoma da mama o cancro que apresenta maior prevalência a nível mundial (30,1%) e em mulheres portuguesas (34,6%)^{4,6,7}.

O cancro da mama afeta frequentemente mulheres pós-menopausa, sendo que 75% dos casos em Portugal são diagnosticados em mulheres com mais de 50 anos (≥ 50 anos). No entanto, apesar de ser menos comum em mulheres mais jovens (15-49 anos), constitui a neoplasia que mais se verifica nesta faixa etária (42,3%)^{7,8}. Está ainda descrita uma associação entre o carcinoma da mama em mulheres mais jovens a carcinomas mais agressivos e com pior prognóstico. Isto deve-se ao facto de serem neoplasias associadas a um maior grau histológico, subtipos moleculares menos sensíveis a terapêutica, crescimento tumoral acelerado e metastização ganglionar precoce^{9,10}. Além do mencionado

anteriormente, os programas de rastreio apenas são realizados em mulheres com mais de 50 anos, podendo haver uma relação entre a idade mais jovem e o diagnóstico tardio, feito em fases mais avançadas da neoplasia. Por outro lado, as mulheres mais jovens apresentam parênquima mamário mais denso que pode ocultar lesões tanto no diagnóstico clínico como imagiológico^{6,8,11}.

O carcinoma da mama está associado a fatores de risco não modificáveis como idade, género, histórico familiar e histórico menstrual. Verifica-se que o número de casos de carcinoma da mama tem vindo a aumentar, com provável relação com o aumento da idade da população e aumento de diagnóstico de lesões, no entanto, as alterações no estilo de vida também desempenham um forte papel no desenvolvimento desta patologia, nomeadamente, dieta rica em gordura e pobre em fibra, índice de massa corporal elevado, maior exposição a hormonas, primeira gravidez tardia, histórico de amamentação, tabagismo e consumo de álcool^{4,6,12,13}.

O diagnóstico de lesões da mama é realizado através do teste triplo, que inclui a palpação da mama no exame clínico, imagiologia e exame anatomopatológico, para obter um diagnóstico preciso com valor diagnóstico, para seleção terapêutica e follow-up da doente. Se forem identificados nódulos na palpação é realizado exame imagiológico e de acordo com o nível de risco de patologia maligna, tendo em consideração as características clínicas e imagiológicas, é determinada a necessidade de especificar o tipo de lesão em causa, por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) da mama para avaliação citológica ou por biópsia da mama para avaliação histológica em conjugação com PAAF do gânglio linfático axilar, em casos de atipia ganglionar no exame imagiológico. Quando os três exames do teste triplo são positivos o diagnóstico pode ser dado com uma confiança aproximada de 100%^{12,14-17}.

O resultado citológico da PAAF do gânglio axilar é um importante fator de prognóstico em mulheres com carcinoma da mama, sendo que, se a citologia dos gânglios linfáticos for negativa pode ser indicador de ausência de metástases axilares ou à distância, sugerindo um melhor prognóstico para a doente. Por outro lado, se a citologia do gânglio for positiva, é indicativa de pior prognóstico, nestes casos é desnecessária a realização de gânglio sentinela e deve realizar-se a dissecação axilar completa^{2,18-20}. Estão descritos diversos fatores preditores de metástase ganglionar axilar, nomeadamente idade mais jovem, localização tumoral retroareolar e lateral, tipo histológico, grau histológico mais agressivo e expressão de marcadores moleculares como recetores de estrogénio (RE), de progesterona (RP) e HER-2²¹⁻²³.

O objetivo desta investigação é correlacionar cinco variáveis, nomeadamente, idade, metastização ganglionar, tipo e grau histológico e marcadores moleculares, em mulheres com nódulo mamário que foram submetidas a biópsia mamária e PAAF de gânglio linfático axilar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

As amostras foram selecionadas no Centro de Diagnóstico Anatomo-Patológico de Coimbra, onde foram processadas e analisadas durante o período de sete meses (15 de outubro de 2018 a 15 de maio de 2019).

A amostra incluía 41 doentes do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 29 e 81 anos, com uma mediana de diagnóstico de 45 anos e média de 50 anos, que foram submetidas a biópsia mamária e PAAF de gânglio linfático axilar. Foi avaliada a presença ou ausência de metástase ganglionar, o tipo histológico, o grau histológico e os marcadores moleculares de rotina do carcinoma da mama (RE e/ou RP, HER-2 e Ki67).

Biópsia da mama

Quando é detetada uma lesão imagiologicamente suspeita de malignidade realiza-se uma biópsia da mama ecoguiada. A biópsia da mama é vantajosa em relação à PAAF, pois permite distinguir carcinoma in situ de invasivo, permite a avaliação histológica e realização de técnicas complementares de imunohistoquímica e moleculares¹⁴.

As amostras de tecido mamário depois de processadas e incluídas em parafina foram cortadas a 2 µm, coradas no equipamento *Tissue Tek® DRS TM 2000* pela técnica de Hematoxilina-Eosina, permitindo a classificação do carcinoma da mama de acordo com o tipo histológico (Classificação da Organização Mundial de Saúde)²⁴ e o grau histológico (Sistema de *Elston e Ellis*) (**Anexo I**).

Foi avaliada a expressão de RE, RP, HER-2 e Ki67, pois estes têm valor preditivo para a seleção de terapêutica e prognóstico^{19,24}. Para fins de orientação terapêutica, o carcinoma da mama é dividido em subtipos baseados nos marcadores moleculares (**Anexo II**). Para realização das técnicas de imunohistoquímica foram realizados cortes de tecido mamário a 3 µm. Foram utilizados tecidos de controlo, para os recetores de estrogénio e progesterona foi usado tecido mamário, para o HER-2 foi usado tecido de carcinoma mamário com expressão HER-2 1+ e HER-2 3+, e para o Ki67 foi usada amígdala. Os cortes foram depois secos a 60°C durante 60 minutos. Usou-se o equipamento Bench Mark GX Ventana e o sistema de deteção UltraView Universal DAB Detection Kit (Referência Ventana: 760-500) para a marcação imunohistoquímica dos cortes (**Anexo III**).

Citologia do gânglio linfático axilar

Para além da biópsia da mama, quando é detetada uma lesão imagiologicamente suspeita de malignidade, realiza-se ecografia da axila homolateral da mama com lesão suspeita^{20,25,26}. Se a ecografia demonstrar

gânglios com aspetos suspeitos como espessamento cortical superior a 3 mm, assimétrico ou excêntrico e ausência de hilo adiposo, deve ser realizada PAAF do gânglio linfático axilar, para confirmar ou excluir metástase ganglionar¹⁹.

Metade dos esfregaços foram secos ao ar e corados no equipamento Tissue Tek ® DRS TM 2000 pela técnica *May-Grünwald-Giemsa*. Os restantes esfregaços foram fixados com álcool a 95% e corados no equipamento Tissue Tek ® DRS TM 2000 pela técnica de *Papanicolaou*²⁷.

Análise estatística

A abordagem estatística foi feita utilizando o software *IBM SPSS Statistics 25*. Sendo realizado um estudo observacional, descritivo e transversal. O nível de conhecimento do estudo é nível II (descritivo-correlacional). Para a correlação das variáveis, usou-se o Teste Exato de *Fisher*. Foi utilizado um nível de confiança de 95%, para um erro aleatório inferior ou igual a 5%.

RESULTADOS

A amostra estatística incluía 41 casos de mulheres submetidas a biópsia de nódulo mamário e PAAF de gânglio linfático axilar.

Idade

Eram conhecidas as idades da maioria das mulheres com exceção de 4. As idades de diagnóstico variaram entre 29 anos e 81 anos, com uma mediana de diagnóstico de 45 anos e média de 50 anos. Das mulheres em que era conhecida a idade (n=37), 18 tinham 50 ou mais anos e 19 tinham menos de 50 anos.

Diagnóstico histológico

Foi diagnosticado carcinoma da mama em 35 mulheres (85,4%). O carcinoma *Not Otherwise Specified* (NOS) foi o diagnóstico mais comum nas mulheres avaliadas, com um total de 28 casos (68,3%), seguido do

carcinoma lobular, com 3 casos (7,3%), foram ainda diagnosticados 2 carcinomas com diferenciação apócrina (4,9%), 1 carcinoma mucinoso (2,4 %) e 1 carcinoma misto (2,4%). As restantes mulheres (n=6) apresentaram lesões benignas, duas destas diagnosticadas com fibroadenoma (4,9%), duas com processo inflamatório (4,9%), uma com adenose (2,4%) e uma com processo fibroso (2,4%).

Citologia do gânglio linfático axilar

Das mulheres que foram submetidas a punção aspirativa do gânglio axilar e diagnosticadas com carcinoma (n=35), 26 (74,3%) apresentavam metástase ganglionar de carcinoma e 9 (25,7%) apresentavam citologia negativa para doença metastática.

Grau Histológico

Foi avaliado o grau histológico dos carcinomas de todas as mulheres que apresentavam carcinoma da mama (n=35). Deste grupo 4 mulheres (11,4%) apresentavam grau histológico I, 19 grau histológico II (54,3%) e 12 grau histológico III (34,3%).

Marcadores moleculares

Foi avaliada a expressão de marcadores moleculares por imunohistoquímica em 33 mulheres. Destas, 9 (27,3%) foram diagnosticadas com o subtipo molecular luminal A, 15 (45,5%) com o subtipo luminal B, dentro deste grupo 7 (46,7%) apresentavam o subtipo luminal B/HER-2- e 8 (53,3%) o subtipo luminal B/HER-2 +, com o subtipo molecular rico em HER-2 foram diagnosticados 2 casos (6,1%) e com o subtipo triplo negativo 7 casos (21,2%) (**Anexo IV**).

Correlacionando as variáveis idade e diagnóstico histológico, verificou-se que a mediana e a média de idades das mulheres que apresentavam carcinoma da mama e de que eram conhecidas as idades (n=31) era de 53 anos. Verificou-se ainda que 45,2% das mulheres com carcinoma tinham até 45 anos (**Anexo V**).

No grupo etário com idade superior ou igual a 50 anos foi realizado o diagnóstico histológico de fibroadenoma numa mulher (5,6%), e nas restantes (n=17) foi feito o diagnóstico de carcinoma invasor NOS em 13 casos (72,2%), de carcinoma lobular invasor em 3 casos (16,7%) e de carcinoma misto lobular e ductal num caso (5,6%). Na classe de mulheres com idade inferior a 50 anos (n= 19), as idades de diagnóstico variaram entre 29 e 45 anos. Foi feito o diagnóstico de um fibroadenoma, o diagnóstico de um processo fibroso (5,3%), de uma adenose (5,3%) e o diagnóstico de processo inflamatório em duas mulheres (10,5%). Nas restantes mulheres deste grupo (n=14), diagnosticaram-se 11 casos (57,9%) de carcinoma invasor NOS, 2 casos (10,5%) de carcinoma com diferenciação apócrina e 1 (5,3%) carcinoma mucinoso (**Tabela 1**).

Correlacionando as variáveis idade e grau histológico verificou-se que no grupo de mulheres diagnosticadas com carcinoma com idade superior ou igual a 50 anos (n=17), 4 (23,5%) apresentavam carcinoma de grau histológico I, 9 (52,9%) de grau histológico II e 4 (23,5%) grau histológico III. Nos 14 casos de mulheres mais jovens com carcinoma, em 8 (57,1%) foi feito o diagnóstico de carcinoma invasor de grau histológico II e 6 (42,9%) com grau III. Não se identificaram carcinomas de grau histológico I neste grupo etário (**Tabela 1**).

Quanto à relação entre as variáveis idade e subtipo molecular de carcinoma, na classe etária ≥ 50 anos, verificou-se que 4 doentes (26,7%) apresentavam carcinoma de subtipo luminal A, 7 (46,7%) apresentavam carcinoma do subtipo luminal B, uma doente (6,7%) apresentava o subtipo HER-2 e 3 doentes (20,0%) o subtipo triplo negativo. Na classe [15-49] anos, 4 doentes (28,6%) apresentavam carcinoma de subtipo luminal A, 5 (35,7%) apresentavam carcinoma do subtipo luminal B, uma doente (7,1%) apresentava o subtipo HER-2 e 4 doentes (28,6%) o subtipo triplo negativo (**Tabela 1**).

Correlacionando as variáveis idade e citologia do gânglio, dentro da classe etária ≥ 50 anos com carcinoma, 11 mulheres (64,7%) apresentaram citologia do gânglio positiva e 6 (35,3%) apresentaram citologia negativa. No grupo de mulheres com idades variando entre [15-49] anos com carcinoma, 12 mulheres (85,7%) apresentaram citologia do gânglio positiva para metástase de carcinoma e 2 (14,3%) apresentaram citologia negativa (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características tumorais de acordo com a classe etária dos pacientes

| Caraterísticas | 15-49 | >50 | p |
|--------------------------------|-----------|-----------|-------|
| Diagnóstico Histológico | | | |
| C.NOS | 11(57,9%) | 13(72,2%) | |
| C.Lobular | 0 | 3(16,7%) | |
| C.Apócrino | 2(10,5%) | 0 | |
| C.Mucinoso | 1(5,3%) | 0 | |
| C.Misto | 0 | 1(5,6%) | 0,111 |
| Fibroadenoma | 1(5,3%) | 1(5,6%) | |
| Processo Inflamatório | 2(10,5%) | 0 | |
| Processo Fibroso | 1(5,3%) | 0 | |
| Adenose | 1(5,3%) | 0 | |
| Grau Histológico | | | |
| I | 0 | 4(23,5%) | |
| II | 8(57,1%) | 9(52,9%) | 0,145 |
| III | 6(42,9%) | 4(23,5%) | |
| Subtipo Molecular | | | |
| Luminal A | 4(28,6%) | 4(26,7%) | |
| Luminal B | 5(35,7%) | 7(46,7%) | 0,942 |
| Her-2+ | 1(7,1%) | 1(6,7%) | |
| Triplo Negativo | 4(28,6%) | 3(20,0%) | |
| Citologia Gânglio | | | |
| Positiva | 12(85,7%) | 11(64,7%) | 0,240 |
| Negativa | 2(14,3%) | 6(35,3%) | |

Não se identificaram diferenças estatisticamente significativas entre a idade da mulher e o tipo e grau histológico do carcinoma, subtipo molecular, nem quanto à probabilidade de metastização ganglionar tendo em consideração estes dois grupos etários (valor- $p \geq 0,05$) (**Tabela 1**).

Correlacionando as variáveis grau histológico e citologia do gânglio, verificamos que no conjunto de mulheres que apresentam

metastização ganglionar, uma mulher (3,8%) foi diagnosticada na biópsia mamária com carcinoma de grau histológico I, 16 (61,5%) com grau histológico II e 9 (34,6%) com grau histológico III. Quanto às mulheres que apresentam citologia de punção aspirativa de gânglio linfático axilar negativa, 3 mulheres (33,3%) apresentam carcinoma da mama de grau histológico I, 3 (33,3%) de grau histológico II e 3 (33,3%) de grau histológico III (**Tabela 2**).

Ao correlacionar as variáveis grau histológico e subtipo molecular verifica-se que 4 mulheres foram diagnosticadas com carcinoma de grau histológico I, destas todas elas apresentaram um subtipo molecular luminal, 2 (66,7%) com subtipo luminal A, e 1 (33,3%) com subtipo luminal B. Foi avaliada a expressão de Ki67 neste grupo, 2 mulheres (66,7%) revelaram baixa expressão de Ki67 e 1 (33,3%) elevada expressão para o marcador. No grupo de mulheres com carcinoma de grau histológico II (n=19), 7 (38,9%) mulheres apresentaram carcinoma luminal A, 8 (44,4%) carcinoma luminal B, 1 (5,6%) carcinoma rico em HER-2 e 2 (11,1%) carcinoma triplo negativo. A expressão de Ki67, foi avaliada em 16 destas mulheres, 7 (43,8%) apresentaram baixa expressão, e 9 (56,3%) apresentaram elevada expressão. Nas doentes com carcinoma de grau histológico III (n=12), nenhuma apresenta o subtipo molecular luminal A, metade apresentaram o subtipo luminal B, 1 (8,3%) o subtipo rico em HER-2 e 5 (41,7%) o subtipo triplo negativo. Todos os casos de carcinoma de grau histológico III apresentaram uma expressão elevada de Ki67 (**Tabela 2**).

Verificou-se uma relação estatisticamente significativa entre o grau histológico e o subtipo molecular (valor-p=0,047) e entre o grau histológico e a expressão de Ki67 (valor-p=0,004). Não se identificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grau histológico e as restantes variáveis (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características tumorais de acordo com o grau histológico da lesão

| Caraterísticas | Grau I | Grau II | Grau III | p |
|--------------------------|----------|-----------|----------|-------|
| Citologia Gânglio | | | | |
| Positiva | 1(3,8%) | 16(61,5%) | 9(34,6%) | 0,064 |
| Negativa | 3(33,3%) | 3(33,3%) | 3(33,3%) | |
| Subtipo Molecular | | | | |
| Luminal A | 2(66,7%) | 7(38,8%) | 0 | 0,047 |
| Luminal B | 1(33,3%) | 8(44,4%) | 6(50%) | |
| Her-2+ | 0 | 1(5,6%) | 1(8,3%) | |
| Triplo | 0 | 2(1,1%) | 5(41,7%) | |
| Negativo | | | | |
| Expressão de Ki67 | | | | |
| Baixa | 2(66,7%) | 7(43,8%) | 0 | 0,004 |
| Elevada | 1(33,3%) | 9(56,3%) | 12(100%) | |

Do grupo de mulheres que foram diagnosticadas com carcinoma NOS, foi avaliada a expressão de marcadores moleculares em 27. Destas, 9 (33,3%) apresentavam o subtipo luminal A, 11 (40,7%) o subtipo luminal B, 1 (3,7%) o subtipo rico em HER-2 e 6 (22,2%) o subtipo triplo negativo. No grupo de doentes com diagnóstico histológico de carcinoma lobular, foram avaliados marcadores moleculares em 3 casos, dos casos em que foi possível determinar o subtipo molecular, a totalidade (n=2) correspondeu ao subtipo luminal B (**Tabela 3**).

Quanto à correlação entre a citologia do gânglio e o subtipo molecular, observou-se que nas mulheres com citologia de gânglio positiva para metástase, 5 (20%) apresentam carcinoma da mama do subtipo molecular luminal A, 13 (52,0%) o subtipo molecular luminal B, 2 (8,0%) o subtipo HER-2 e 5 (20%) o subtipo triplo negativo. Nas mulheres com gânglio negativo para metástase, 4 (50,0%) apresentam carcinoma da mama do subtipo molecular luminal A, 2 (25,0%) o subtipo molecular luminal B, 0 o subtipo HER-2 e 2 (25,0%) o subtipo triplo negativo (**Tabela 3**).

Não se identificaram diferenças estatisticamente significativas entre o subtipo

molecular e a metástase ganglionar ou o tipo histológico do carcinoma (valor- $p \geq 0,05$).

Tabela 3. Subtipo molecular em função do tipo histológico do carcinoma

| Tipo Histo-lógico | Luminal A | Luminal B | HER-2+ | Triplo Neg. | p |
|--------------------------|-----------|-----------|----------|-------------|-------|
| NOS | 9(33,3%) | 11(40,7%) | 1(3,7%) | 6(22,2%) | 0,341 |
| Lobular | 0 | 2(100%) | 0 | 0 | |
| Apócrino | 0 | 0 | 1(50,0%) | 1(50,0%) | |
| Mucinoso | 0 | 1(100%) | 0 | 0 | |
| Misto | 0 | 1(100%) | 0 | 0 | |
| Citologia Gânglio | | | | | |
| Positiva | 5(20%) | 13(52,0%) | 2(8,0%) | 5(20%) | |
| Negativa | 4(50,0%) | 2(25,0%) | 0 | 2(25,0%) | |

DISCUSSÃO

De acordo com os dados da GLOBOCAN, em Portugal, o número total de novos casos de doenças oncológicas em 2018 foi de 58.199⁷. O cancro da mama é o que apresenta maior prevalência e incidência no sexo feminino perfazendo um total 34,6% dos casos num período de 5 anos e 27,1% dos casos diagnosticados em 2018. A taxa de incidência tem aumentado ao longo dos anos, em provável relação com o envelhecimento da população e alterações no estilo de vida²⁸.

O carcinoma da mama está associado a um aumento da incidência com a idade, por conseguinte, 75% dos casos são diagnosticados em mulheres com idade superior a 50 anos^{7,8,24}. Apesar de ser uma situação menos frequente em mulheres mais jovens, o carcinoma da mama está a aumentar e constitui a neoplasia mais comum nesta classe etária⁸. A amostra estudada apresentou uma distribuição diferente da população portuguesa, sendo que, aproximadamente metade (45,2%) apresentou carcinoma da mama com idade inferior ou igual a 45 anos, e as restantes com idade superior a 50 anos. Esta discrepância, entre os resultados obtidos e a distribuição descrita na literatura, pode dever-se ao facto de ter sido usada uma amostra

reduzida e de mulheres que já apresentava nódulo mamário, aumentando assim a probabilidade das mulheres apresentarem carcinoma da mama.

Verificou-se que a maioria das patologias benignas da mama, com exceção de um caso, foram diagnosticadas na classe etária mais jovem, indo de encontro ao descrito na literatura, as mulheres mais jovens têm maior incidência de patologias benignas da mama comparativamente às mulheres com idade superior a 50 anos^{13,24} (**Anexo VI**).

Em ambas as classes etárias estudadas, o carcinoma NOS é o mais prevalente, à semelhança dos dados da Organização Mundial de Saúde²⁹. Todos os casos de carcinoma lobular invasor foram diagnosticados em mulheres com mais de 50 anos, correspondendo à idade média descrita na literatura (57-65 anos) de doentes com carcinoma lobular³⁰.

Vários autores descreveram anteriormente uma relação entre carcinoma da mama em mulheres mais jovens e maior agressividade do mesmo, quando comparado a mulheres com mais idade^{8,10,31,32}. No presente estudo, apesar de não terem sido obtidos resultados estatisticamente significativos (valor- $p=0,145$) na correlação da idade com o grau histológico, verificou-se que existe uma tendência para as mulheres mais jovens apresentarem grau histológico mais agressivo, visto todos os casos estudados neste grupo apresentarem grau histológico II ou III. Em ambas as classes etárias o grau histológico mais frequente foi o grau II ($n=19$). Para além disso, o carcinoma em mulheres mais jovens associa-se a subtipos moleculares mais agressivos, como o subtipo rico em HER-2 e triplo negativo⁶. Neste estudo verificou-se que o subtipo mais comum na classe etária mais jovem é o luminal B (35,7%), seguido, em igual frequência, pelo luminal A e triplo negativo (28,6%). Ainda que os subtipos luminais constituam a maioria deste grupo, verificou-se

uma elevada incidência de carcinoma triplo negativo, este associado a pior prognóstico.

Em mulheres de grupo etário mais alto está descrita uma relação entre o aumento da idade e o aumento da incidência dos subtipos luminal A e B, e diminuição do subtipo rico em HER-2 e triplo negativo³³. Este estudo vai de encontro a esses dados, apesar de não haver uma variação estatisticamente significativa, verificou-se maior incidência dos subtipos luminal A e B, e menor do subtipo rico em HER-2 e triplo negativo, em relação às mulheres mais jovens.

O resultado citológico da PAAF do gânglio linfático axilar é um importante fator de prognóstico em mulheres com carcinoma da mama e a metastização ganglionar mais precoce e mais frequente associa-se a mulheres com idade mais jovens^{8,31}. Na amostra estudada não foi estabelecida relação entre a presença ou ausência de metastização e a idade, mas verificou-se que nas mulheres mais jovens com carcinoma 85,7% dos casos apresentaram metastização ganglionar, enquanto nas mulheres com mais idade a percentagem é de 64,7%.

Foram identificadas metástases ganglionares em 74,2% dos casos de carcinoma da mama. *Aitken* e *Osman* demonstraram que os subtipos lobulares e mistos de carcinoma estão associados a maiores taxas de metastização ganglionar²¹, outros autores descrevem não haver relação significativa entre as variáveis^{22,34}. À semelhança dos últimos, neste estudo não foi encontrada relação entre as variáveis.

A metástase ganglionar de carcinoma da mama está associada a fatores preditivos como o grau histológico da lesão^{21,22} e o subtipo molecular²³. Observou-se uma relação entre maior grau histológico e a presença de metástase ganglionar, ainda que não seja estatisticamente significativa (valor-p=0,064), verificou-se que a maioria dos casos de citologia de gânglio positiva para metástase ganglionar

(96,1%) apresentavam um tumor primário com grau histológico II ou III, indicando que maior grau histológico está correlacionado com maior probabilidade de metastização ganglionar^{21,22}. Em relação ao subtipo molecular, o seu impacto como fator preditivo de metastização ganglionar é mais controverso, He et al., demonstraram que os subtipos luminal apresentavam maior risco de metastização quando comparados com o subtipo triplo negativo²³. Neste estudo, à semelhança de outros²¹, não foi encontrada relação significativa entre o subtipo molecular e a taxa de metastização, ainda que se tenha observado que doentes com carcinoma de subtipo luminal B apresentavam mais frequentemente metástases ganglionares.

Constatou-se que existe uma relação entre o grau histológico do tumor e a expressão de Ki67, marcador de proliferação tumoral (valor-p=0,004). A expressão da proteína Ki67 permite a avaliação do índice de proliferação tumoral, sendo que expressão inferior a 20% indica baixo índice de proliferação e expressão superior a 20% indica elevado índice proliferativo^{19,35}. *Zhen et al.* mostraram que o marcador molecular Ki67 se correlacionava positivamente com o grau histológico, estes concluíram ainda que os subtipos moleculares que apresentavam positividade para RE e/ou RP, relacionavam-se inversamente com o grau histológico³⁶. Com os dados obtidos neste estudo verificamos que existe uma relação entre o grau histológico e o subtipo molecular do tumor (valor-p=0,047). Observa-se a relação inversa descrita pelos autores anteriormente referidos, a totalidade dos carcinomas com grau histológico I são do subtipo luminal, que apresentam um melhor prognóstico. Quanto aos carcinomas de grau histológico II, apresentam distribuição por todos os subtipos moleculares, mas a maioria (83,2%) são luminais. Em relação aos carcinomas de grau histológico III, nenhum apresenta o subtipo molecular luminal A, metade apresentaram o subtipo luminal B, seguido de uma grande

percentagem (41,7%) do subtipo triplo negativo e do subtipo rico em HER-2 (8,3%), os subtipos moleculares apresentados nos carcinomas de grau histológico III, são todos menos sensíveis às terapêuticas direcionadas comparativamente ao subtipo luminal A, estando por isso, associados a um pior prognóstico.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 70 a 80% dos carcinomas NOS evidenciam positividade para recetores hormonais e cerca de 15% para HER-2²⁹, estes dados vão de encontro aos resultados obtidos, 74,1% das mulheres diagnosticadas com carcinoma NOS mostravam expressão para RE e/ou RP e 25,9% para HER-2.

O carcinoma lobular geralmente apresenta um prognóstico mais favorável, associado a baixo grau histológico, positividade para recetores hormonais e baixo índice proliferativo³⁰. Neste caso, verificou-se que a totalidade das doentes diagnosticadas com carcinoma lobular expressavam RE e/ou RP e uma expressão de HER-2. Contrariamente ao descrito na literatura, das duas mulheres em que foi determinada a expressão de Ki67, ambas evidenciaram elevado índice de proliferação, contudo o número de casos estudados com este tipo de carcinoma foi reduzido para poder relacionar as variáveis.

Quanto aos carcinomas de subtipo apócrino, as doentes avaliadas apresentavam ausência de expressão de recetores hormonais e uma delas apresentava expressão de HER-2, estas informações são concordantes com o descrito, sendo que os carcinomas apócrinos apresentam geralmente positividade para HER-2 e ausência de recetores hormonais³⁷.

Na literatura, o subtipo luminal A é descrito como o mais comum, seguido do subtipo luminal B, do triplo negativo, e do subtipo rico em HER-2³⁸⁻⁴¹. Na amostra estudada verificou-se que o subtipo luminal B (45,5%) e o triplo negativo (21,2%) aparecem com elevada frequência comparativamente à literatura. O subtipo luminal A é o segundo mais frequente

(27,3%) e o subtipo rico em HER-2 o menos frequente (6,1%).

CONCLUSÃO

A patologia da mama tem um forte impacto na população feminina, em especial o carcinoma da mama, pois é o carcinoma mais comum nas mulheres portuguesas e mundialmente, e é evidente um aumento do mesmo em mulheres mais jovens.

Com este estudo, foi possível averiguar que existe uma relação entre o grau histológico do carcinoma da mama e a expressão da proteína Ki67, e entre o grau histológico e o subtipo molecular do carcinoma, indicando que carcinomas da mama com maior grau histológico apresentam maior índice proliferativo e menor sensibilidade à terapêutica direcionada.

Apesar de não ser estatisticamente significativa, observou-se uma tendência para os carcinomas de maior grau histológico, associados a maior expressão de Ki67, apresentarem maior risco de metastização ganglionar. A elevada expressão do marcador Ki67 é característica do carcinoma de subtipo luminal B, sendo este o subtipo molecular que apresentava com mais frequência metastização ganglionar e o mais frequente em mulheres mais jovens, embora sem significância estatística.

É importante referir que este estudo apresenta algumas limitações como o reduzido tamanho da amostra (n=41). Para replicação do estudo no futuro, deve-se aumentar a amostra estatística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stevens A, Lowe J, Scott I. Breast Disease. In: Core Pathology. 3rd ed. Elsevier Ltd; 2009. p. 441–51.

2. Rosai J. Breast. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th ed. Elsevier Ltd; 2011.
3. Seeley R, Stephens T, Tata P. Aparelho Reprodutor. In: Anatomia & Fisiologia. 8a. McGraw-Hill Companies, Inc.; 2008. p. 1080–3.
4. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. Biol Res. 2017 Dec 2;50(1):1–23.
5. Koeppen B, Stanton B. Sistemas Reprodutores Masculino e Feminino. In: Berne and Levy Physiology. 6th ed. Elsevier Ltd; 2009. p. 799–801.
6. Assi HA, Khoury KE, Dbouk H, Khalil LE, Mouhieddine TH, Saghir NS El. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. J Thorac Dis. 2013;5(1):1–8.
7. GLOBOCAN. Cancer Today - Globocan 2018 [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2018 [cited 2018 Nov 24]. Available from: <http://gco.iarc.fr/>
8. Eugênio DSG, Souza JA, Chojniak R, Bitencourt AG V., Graziano L, Souza EF. Breast cancer features in women under the age of 40 years. Rev Assoc Med Bras. 2016 Nov;62(8):755–61.
9. Greer LT, Rosman M, Charles Mylander W, Liang W, Buras RR, Chagpar AB, et al. A Prediction Model for the Presence of Axillary Lymph Node Involvement in Women with Invasive Breast Cancer: A Focus on Older Women. Breast J. 2014 Mar;20(2):147–53.
10. Gewefel H, Salhia B. Breast Cancer in Adolescent and Young Adult Women. Clin Breast Cancer. 2014 Dec;14(6):390–5.
11. Tice JA, Miglioretti DL, Li C, Vachon CM, Gard CC, Kerlikowske K. Breast Density and Benign Breast Disease: Risk Assessment to Identify Women at High Risk of Breast Cancer. J Clin Oncol. 2015 Oct;33(28):3137–43.
12. Jana S, Jagani R, Mukherjee D, Basak U, Singh E. Evaluation of the diagnostic role of P63 immunostaining in aspiration cytology by smear or cell block preparation for the characterisation of breast lesions. In: Exploratory Animal and Medical Research. 2014. p. 131–47.
13. Hiremath BV, Hegde N. Spectrum of breast disease in an urban general surgical centre in India. Breast Dis. 2015 Jul 31;35(3):179–86.
14. Bibbo M, Wilbur D. Breast. In: Comprehensive Cytopathology. 3rd ed. Elsevier Inc; 2008. p. 712–72.
15. Tse G, Tan PH, Schmitt F. Basic Histopathology of Breast Lesions. In: Fine Needle Aspiration Cytology of the Breast. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 7–29.
16. Madubogwu CI, Ukah CO, Anyanwu SNC, Onyiaorah GCI and Anyiam DCD. Sub-classification of Breast Masses by Fine Needle Aspiration Cytology. Eur J Breast Heal. 2017 Sep 27;13(4):194–9.
17. Lukong KE, Ogunbolude Y, Kamdem JP. Breast cancer in Africa: prevalence, treatment options, herbal medicines, and socioeconomic determinants. Breast Cancer Res Treat. 2017 Nov 4;166(2):351–65.
18. Abbas AK, Kummar V, Aster J. Sistema Genital Feminino e Mama. In: Robbins Patologia Básica. 9th ed. Elsevier Ltd; 2013. p. 681–714.
19. Saudade A. Caracterização e classificação de subtipos de cancro da mama. In: 100 Perguntas chave no cancro da mama. Permanyer Portugal; 2015. p. 1–6.
20. Coordenação Nacional de Doenças Oncológicas. Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro da mama. 2007.
21. Aitken E, Osman M. Factors Affecting Nodal Status in Invasive Breast Cancer: A Retrospective Analysis of 623 Patients. Breast J. 2010 Feb 23;16(3):271–8.
22. Yoshihara E, Smeets A, Laenen A, Reynders A, Soens J, Van Ongeval C, et al. Predictors of axillary lymph node metastases in early breast cancer and their applicability in clinical practice. Breast. 2013;22(3):357–61.

23. He ZY, Wu SG, Yang Q, Sun JY, Li FY, Lin Q, et al. Breast cancer subtype is associated with axillary lymph node metastasis. *Med (United States)*. 2015;94(48):1–7.
24. Colditz G, Chia KS. Invasive breast carcinoma: Introduction and general features. In: *World Health Organization Classification of Tumours*. 4a. World Health Organization; 2012. p. 14–31.
25. Gipponi M, Fregatti P, Garlaschi A, Murelli F, Margarino C, Depaoli F, et al. Axillary ultrasound and Fine-Needle Aspiration Cytology in the preoperative staging of axillary node metastasis in breast cancer patients. *The Breast*. 2016 Dec;30:146–50.
26. Maráz R, Zombori T, Ambrózay É, Cserni G. The role of preoperative axillary ultrasound and fine-needle aspiration cytology in identifying patients with extensive axillary lymph node involvement. *Eur J Surg Oncol*. 2017 Nov;43(11):2021–8.
27. Cibas E, Wakely P. Lymph Nodes. In: *Cytology - Diagnostic Principles and Clinical Correlates*. 3rd ed. Elsevier Inc; 2009. p. 319–54.
28. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Lisboa: Direção-Geral da Saúde; 2017.
29. Ellis IO, Collins L, Ichiara S, MacGrogan G. Invasive carcinoma of no special type. In: *World Health Organization Classification of Tumours*. 4a. World Health Organization; 2012. p. 34–8.
30. Lakhani S, Rakha E, Simpson PT. Invasive lobular carcinoma. In: *World Health Organization Classification of Tumours*. 4a. World Health Organization; 2012. p. 40–2.
31. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, et al. Young Age at Diagnosis Correlates With Worse Prognosis and Defines a Subset of Breast Cancers With Shared Patterns of Gene Expression. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3324–30.
32. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. *Cancer*. 1996 Oct 15;78(8):1838–43.
33. Jenkins EO, Deal AM, Anders CK, Prat A, Perou CM, Carey LA, et al. Age-Specific Changes in Intrinsic Breast Cancer Subtypes: A Focus on Older Women. *Oncologist*. 2014 Oct 1;19(10):1076–83.
34. Vandorpe T, Smeets A, Van Calster B, Van Hoorde K, Leunen K, Amant F, et al. Lobular and non-lobular breast cancers differ regarding axillary lymph node metastasis: a cross-sectional study on 4,292 consecutive patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jul 12;128(2):429–35.
35. Abraúl E, Raimundo D. Tratamento médico no cancro da mama. In: *Manual de Ginecologia*. Permanyer Portugal; 2011. p. 289–301.
36. Zhen H, Yang L, Li L, Yu J, Zhao L, Li Y, et al. Correlation analysis between molecular subtypes and Nottingham Prognostic Index in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(43):74096–105.
37. Lakhani S., Eusebi V, O'Malley F. Carcinomas with apocrine differentiation. In: *World Health Organization Classification of Tumours*. 4a. World Health Organization; 2012. p. 53–4.
38. Elidrissi Errahhali M, Elidrissi Errahhali M, Ouarzane M, El Harroudi T, Afqir S, Bellaoui M. First report on molecular breast cancer subtypes and their clinico-pathological characteristics in Eastern Morocco: series of 2260 cases. *BMC Womens Health*. 2017 Dec 9;17(1):3.
39. Cirqueira M, Amaral M, Soares L, Freitas-Junior R. Subtipos moleculares do câncer da mama. *Fem Rev da Fed Bras das Soc Ginecol e Obs*. 2011;39(10).
40. Caldarella A, Crocetti E. Female Breast Cancer Status According to ER , PR and HER2 Expression : A Population Based Analysis. *Pathol Oncol Res*. 2011;(17):753–8.
41. Puig-vives M, Sánchez MJ, Sánchez-cantalejo J, Torrella-ramos A, Martos C, Ardanaz E. Gynecologic Oncology Distribution and

prognosis of molecular breast cancer subtypes defined by immunohistochemical biomarkers in a Spanish population-based study. *Gynecol Oncol.* 2013;130(3):609–14.

Anexos

Anexo I. Sistema de *Elston e Ellis* para avaliação do grau histológico

| Caraterística Histológicas | Pontuação |
|---|------------------|
| Formação Glandular | |
| Maioria do tumor (>75%) | 1 |
| Grau moderado (10-75%) | 2 |
| Pouco ou nada (<10%) | 3 |
| Grau de Pleomorfismo Nuclear | |
| Células pequenas e uniformes | 1 |
| Aumento moderado do tamanho e variabilidade | 2 |
| Evidente pleomorfismo | 3 |
| Índice Mitótico | |
| Variável consoante o campo microscópico | 1-3 |
| Grau Histológico Final | |
| Grau I | 3-5 |
| Grau II | 6 ou 7 |
| Grau III | 8 ou 9 |

Nota: Adaptado de Colditz G, Chia KS. *Invasive breast carcinoma: Introduction and general features*. Em: *World Health Organization Classification of Tumours*. 4ª Edição. 2012.

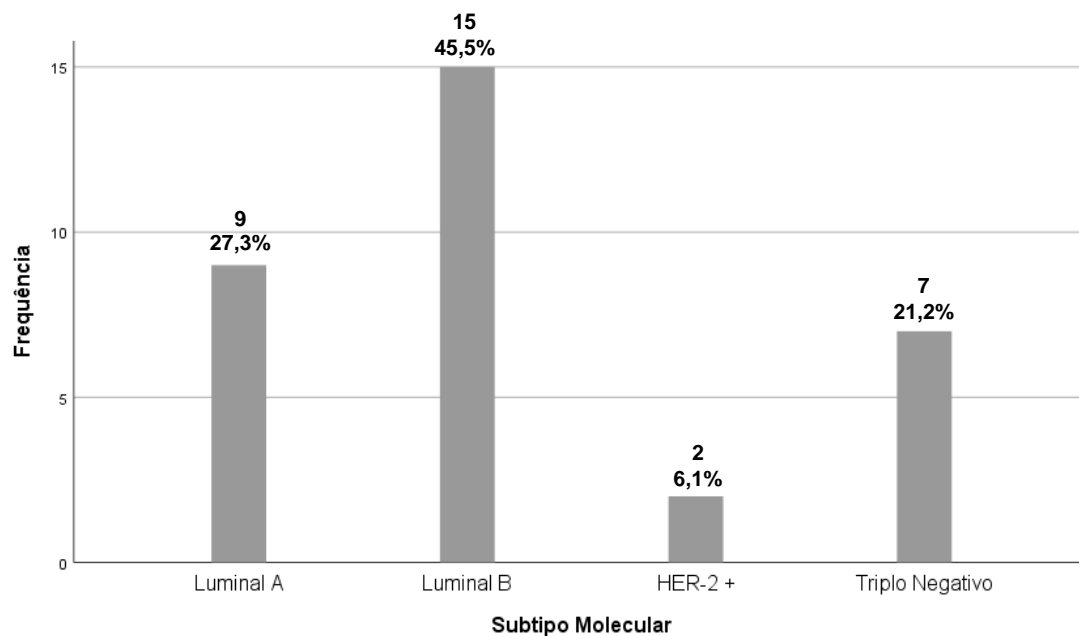
Anexo II. Subtipo molecular de carcinoma da mama de acordo com a sua expressão de marcadores moleculares^{19,24}

| Subtipo Molecular | Marcadores Moleculares | | | | |
|-------------------|------------------------|-----|------------|-------|------|
| | RE | RP | RE e/ou RP | HER-2 | Ki67 |
| Luminal A | +/- | +/- | + | - | - |
| Luminal B | +/- | +/- | + | +/- | + |
| Rico em HER-2 | - | - | - | + | +/- |
| Triplo Negativo | - | - | - | - | +/- |

Anexo III. Protocolo da técnica de imunohistoquímica

| | RE | RP | HER-2 | Ki-67 |
|---|---|--|--|--|
| Desparafinação | EZ Prep 10x (Ventana ref: 950-102) | | | |
| Lavagem entre etapas | Reaction Buffer 10x (Ventana ref: 950-300) | | | |
| Lamela líquida | LCS (Ventana ref: 650-010) | | | |
| Recuperação antigénica | CC1 Standard - 60min - 95°C (Ventana ref: 950-124) | CC1 Standard - 60min - 95°C (Ventana ref: 950-124) | CC1 Curto - 30min - 95°C (Ventana ref: 950-124) | CC1 Standard - 60min - 95°C (Ventana ref: 950-124) |
| Incubação do anticorpo | Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, CONFIRM. (Ventana Ref: 790-4324) - 26min – 37°C | Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, CONFIRM. (Ventana Ref: 790-2223) - 28min – 37°C | HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, VENTANA. (Ventana Ref: 790-4493) - 28min – 37°C | Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, CONFIRM. (Ventana Ref: 790-4286) - 20min – 37°C |
| Contraste | Hematoxilina (Ventana ref: 790-2208) - 8min | | | |
| Pós-Contraste | Bluing (Ventana ref: 760-2037) - 4min | | | |
| Lavagem de lâminas em água com detergente | | | | |
| Desidratação, diafanização e montagem | | | | |

Anexo IV. Frequência de subtipos moleculares de carcinoma da mama

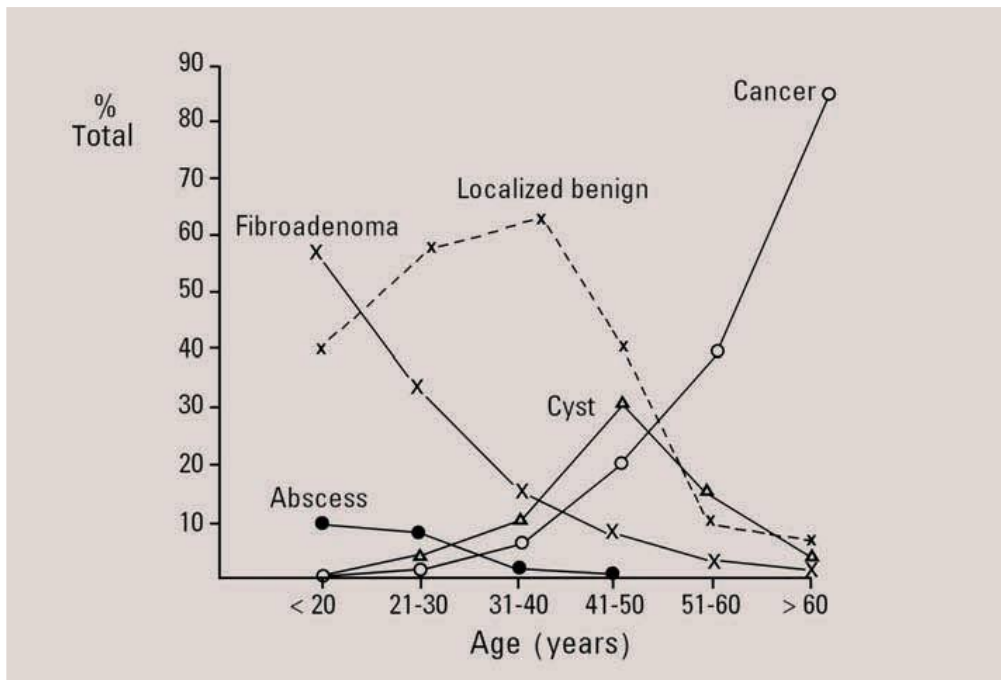


Anexo V. Frequência de idades de mulheres com carcinoma da mama

| Idade | Frequência Absoluta | Frequência Relativa | Frequência Relativa Acumulada |
|--------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|
| 29 | 1 | 3,2 | 3,2 |
| 31 | 1 | 3,2 | 6,5 |
| 33 | 1 | 3,2 | 9,7 |
| 35 | 1 | 3,2 | 12,9 |
| 36 | 1 | 3,2 | 16,1 |
| 38 | 3 | 9,7 | 25,8 |
| 39 | 1 | 3,2 | 29,0 |
| 40 | 1 | 3,2 | 32,3 |
| 41 | 1 | 3,2 | 35,5 |
| 42 | 1 | 3,2 | 38,7 |
| 45 | 2 | 6,5 | 45,2 |
| 50 | 1 | 3,2 | 48,4 |
| 53 | 1 | 3,2 | 51,6 |
| 54 | 2 | 6,5 | 58,1 |
| 56 | 1 | 3,2 | 61,3 |
| 58 | 1 | 3,2 | 64,5 |
| 61 | 1 | 3,2 | 67,7 |
| 63 | 1 | 3,2 | 71,0 |
| 65 | 1 | 3,2 | 74,2 |
| 67 | 1 | 3,2 | 77,4 |
| 70 | 1 | 3,2 | 80,6 |
| 72 | 1 | 3,2 | 83,9 |
| 73 | 2 | 6,5 | 90,3 |
| 78 | 1 | 3,2 | 93,5 |
| 79 | 1 | 3,2 | 96,8 |
| 81 | 1 | 3,2 | 100,0 |
| Total | 31 | 100,0 | |

| Idade | |
|------------------|-------|
| N Válido | 31 |
| N Omisso | 10 |
| Média | 52,81 |
| Mediana | 53,00 |
| Percentis | |
| 25 | 38,00 |
| 50 | 53,00 |
| 75 | 67,00 |

Anexo VI. Distribuição de lesões benignas e malignas da mama em função da idade



Nota: Adaptado de Colditz G, Chia KS. *Invasive breast carcinoma: Introduction and general features*. Em: *World Health Organization Classification of Tumours*. 4ª Edição. 2012.