

A IMPORTÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DOS MARCADORES TUMORAIS ESPECÍFICOS PARA O PROGNÓSTICO DE UM PACIENTE COM CÂNCER DE MAMA

THE IMPORTANCE OF LABORATORY IDENTIFICATION OF SPECIFIC TUMOR MARKERS FOR THE PROGNOSIS OF A PATIENT WITH BREAST CANCER

ANA CAROLINA FERNANDES MOREIRA^{1*}, KARLA LUANA APARECIDA¹, LUANA PAVIOTTE¹, VALÉRIA GUERRA¹, ARILTON JANUARIO BACELAR JUNIOR²

1. Acadêmicos do curso de Graduação de Biomedicina da faculdade Única; 2. Professor do Curso de Biomedicina e coordenador do Curso de Farmácia da Faculdade Única.

Rua Fortaleza, 515, Veneza, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. CEP: 35164-300. anacarolina.fermone@gmail.com

RESUMO

O câncer de mama se tornou uma neoplasia de extensa disseminação na população feminina, tendo maior incidência após os 50 anos. Caracteriza-se por apresentar formação de nódulos na região mamária, sendo estes benéficos ou não. Somente no estado de Minas Gerais segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são estimados 5.160 casos novos da doença no ano de 2017, uma taxa bruta de incidência de 48,19 % para cada grupo de 100 mil mulheres mineiras. A utilização dos marcadores tumorais vem se tornando uma alternativa relevante para o diagnóstico e posterior tratamento da doença, uma vez que direcionam o quadro clínico quanto às características apresentadas pela neoplasia e, até mesmo, quanto à observação da resposta medicamentosa e quimioterápica. Espera-se a maior utilização dessas técnicas de diagnóstico laboratoriais por patologistas e oncologistas para a elucidação dessas particularidades presentes no tumor, tendo como principal objetivo a melhora do prognóstico da paciente.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer, mama, marcadores tumorais, prognóstico, perfis moleculares

ABSTRACT

Breast cancer has become a neoplasm with extensive dissemination in the female population, with greater incidence in women older than age 50. It is characterized by the presence of nodules in the breast region, which can be benign or not. According to the Brazilian National Cancer Institute (INCA), only in the state of Minas Gerais, 5,160 new cases of the disease are estimated in 2017, which represents a gross incidence rate of 48.19% for each group of 100,000 women. The use of tumor markers has become a relevant alternative for the diagnosis and subsequent treatment of the disease, since they direct the clinical picture according to the characteristics presented by the neoplasm and even considering the observation of the drug and chemotherapeutic response. It is expected that the greater use of these laboratory diagnosis techniques by pathologists and oncologists will contribute to the elucidation of tumor particularities, and improve the patient's prognosis.

KEYWORDS: Breast, cancer, tumor markers, prognosis. molecular profile.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é caracterizado, dentre outros fatores, como neoplasia pelo surgimento de nódulos ou tumores, benéficos ou não, na região das mamas. A neoplasia de mama é o tipo de câncer mais comum entre a população feminina brasileira, depois do de pele não melanoma. Correspondendo a 28% dos casos novos¹.

O câncer de mama caracteriza-se por um aumento desordenado de células que adquiriram aspecto anormal, possivelmente por alterações no material genético das mesmas. Essa doença apresenta diversos tipos e subtipos e necessita passar por uma avaliação quanto sua extensão e disseminação².

Os marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele e em segundo momento pelo paciente em resposta a agregação estabelecida pelo tumor. A utilização dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico do câncer tem evoluído muito com o decorrer dos anos devido a sua reconhecida importância clínica. São utilizados primordialmente para diferenciar tecidos normais dos neoplásicos e quantificados através de procedimentos relativamente práticos³.

A identificação dos marcadores tumorais permite prever como irá decorrer sua progressão clínica, uma vez que podem apresentar extensa variabilidade⁴.

Os marcadores se subdividem entre diagnóstico, prognóstico, tratamento, e subgrupos de prevenção. Destes, os marcadores diagnósticos, também conhecidos como preditivos, baseiam-se na prevenção uma vez que detectam mutações chave e vias que estão envolvidas no processo de metástase tumoral⁵.

Portanto, este artigo, baseado em revisão de literatura, por meio de revisão de literatura, se objetiva em demonstrar as características e a importância da identificação desses marcadores tumorais na prática clínica para o prognóstico eficiente do paciente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho seguiu os princípios do estudo explicativo por meio da revisão de literatura sobre o tema a partir de análise de dados presentes no portal Capes e da Biblioteca virtual em saúde (LILACS, MEDLINE, PUBMED, SCIELO) abrangendo artigos entre 2007 e 2017 e bibliografia a partir de 2001. A pesquisa se enquadra no aspecto qualitativo, na qual as palavras chaves utilizadas na busca foram marcadores tumorais específicos do câncer de mama, técnicas laboratoriais de identificação, tratamento e prognóstico.

Os critérios de inclusão para os estudos encontrados se baseiam na descrição dos principais marcadores do câncer de mama, assim como as técnicas laboratoriais, relacionando-as ao diagnóstico e a influência dos mesmos no tratamento específico. Foram excluídos estudos no qual os marcadores tumorais são relacionados a outras patologias. Logo em seguida busca-se relacionar e compreender a importância da identificação laboratorial de marcadores específicos no prognóstico do paciente.

3. DISCUSSÃO

O câncer de mama é caracterizado, dentre outros fatores, como neoplasia pelo surgimento de nódulos ou tumores, benéficos ou não, na região das mamas. A neoplasia de mama é o tipo de câncer mais comum entre a população feminina brasileira, depois do de pele, tipo não melanoma. Correspondo a 28% dos casos novos. Acomete em menor proporção a população masculina representando cerca de 1% do total de casos. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 57.960 novos casos de câncer de mama em mulheres no ano de 2016. No Brasil as taxas de incidência da doença variam entre as regiões do país (Figura 1), entretanto quando analisadas em conjunto percebe-se que a mortalidade por câncer de mama representa a principal causa de morte por câncer na população feminina brasileira¹.

Os carcinomas invasivos ductais e lobulares são as formas mais comuns de câncer de mama. O câncer ductal invasivo apresenta uma incidência entre 50-75% e o carcinoma lobular invasivo de 5 a 15%. Existem outros tipos de carcinomas como o carcinoma mucinoso, medular, papilífero e inflamatório que como os de maior incidência caracterizam-se pela gravidade, entretanto esses tipos são diagnosticados de forma mais rara⁶.

Os marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele e em segundo momento pelo paciente em resposta a agregação estabelecida pelo tumor. A utilização dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico do câncer tem evoluído muito com o decorrer dos anos devido a sua reconhecida importância clínica. São utilizados primordialmente para diferenciar tecidos normais dos neoplásicos e quantificados através de procedimentos relativamente práticos (RICH *et al* 2015). A identificação dos marcadores tumorais permite prever como irá decorrer sua progressão clínica, uma vez que podem apresentar extensa variabilidade⁴.

Em função da grande variabilidade na progressão clínica,

a identificação de marcadores que podem prever o comportamento do tumor é particularmente importante no câncer de mama⁷.

Os marcadores se subdividem entre diagnóstico, prognóstico, tratamento, e subgrupos de prevenção. Destes, os marcadores diagnósticos, também conhecidos como preditivos, baseiam-se na prevenção uma vez que detectam mutações chave e vias que estão envolvidas no processo de metástase tumoral⁵.

Marcadores Genéticos

A causa específica do processo tumoral ainda é desconhecida pelo meio científico, no entanto, sabe-se que a predisposição a carcinomas está diretamente relacionada com fatores externos de exposição ao organismo. Sabe-se ainda que os tumores podem se originar tanto de células diferenciadas, durante o ciclo celular, quanto de células tronco de tecidos normais, que acumulam mutações epigenéticas responsáveis pela malignidade do tumor. Normalmente, as células diferenciadas sofrem alterações que as tornam capazes de voltarem a possuir características de células tronco⁸.

O câncer de mama apresenta subtipos de classificação de acordo com as características moleculares do tumor. Essas classificações determinam a gravidade da neoplasia, a resposta ao tratamento e ao prognóstico do paciente. Cada subtipo molecular se especifica por diferenças na expressão genética. Esses subtipos foram identificados por meio de marcadores biológicos, dos quais podem possuir em sua estrutura, a presença ou não de receptores de estrogênio (ER +/ER -), progesterona (PR+/PR-) ou receptores do fator de crescimento epidérmico número 2 (HER2+/HER2-) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação e características dos subtipos de câncer de mama

Classificação	Incidência	Expressão	Prognóstico	Característica
Luminal A	40%	ER+/PR+/HER2-	Favorável	Subtipo mais comum, lento crescimento, menos agressivo.
Lumina B	10-20%	ER+/PR+/HER2+	Desfavorável	Altas taxas de proliferação.
Basal-símile	10-20%	ER-/PR-/HER2-	Desfavorável	"Tripla negativo", mutação no gene BRCA 1, prognóstico negativo.
HER2	10%	HER2 +	Favorável	Excesso de HER2+, agressivo.

Fonte: Câncer de mama triple negativo: uma enfermidade de difícil diagnóstico y tratamiento. (Zaharia; et al, 2013)³².

Tal método se encontra como um grande salto para a melhora nos casos clínicos de pacientes com carcinoma de mama, porém, não é recorrente na rotina laboratorial, pelo fato de a técnica (perfil de expressão gênica) ser de custosa e não disponível para uso clínico (fins de pesquisa)⁹.

A variação molecular HER2 é uma proteína de crescimento, na qual apresenta elevada divisão mitótica, característica que o torna agressivo de prognóstico um tanto desfavorável. Entretanto, ainda pode ser considerado como favorável pela eficácia do tratamento indicado com anticorpo monoclonal (anti-HER2). Além disso, o subtipo "Basal-símile", por se classificar como "triple negativo" também se considera como agressivo, tendem a afetar mulheres com idade inferior a 50 anos e afrodescendentes¹⁰.

Além disso, a positividade de HER2 está relacionada à resistência às terapias endócrinas, sendo específico para terapias moduladoras do receptor de estrógeno, como o tamoxifeno, e não para terapias relacionadas com a depleção de estrógeno, como os inibidores de aromatase. Terapias-alvo são mais eficazes tanto na fase inicial, quanto na fase metastática, com a utilização do trastuzumabe. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado capaz de reduzir o progresso da neoplasia e a melhora consequentes na sobrevivência do paciente, utilizado tanto isoladamente, quanto assimilado a quimioterapia. Esse anticorpo utilizado na fase inicial tende a reduzir o risco de recidiva à metade e a mortalidade em um terço (pacientes ainda no estágio primário da doença).¹¹

Os receptores hormonais de estrógeno e progesterona são proteínas localizadas em células mamárias, que a partir do momento que se ligam aos respectivos hormônios, desencadeiam respostas celulares que são favoráveis à detecção da neoplasia, como o evento da multiplicação celular, e consequentemente o desenvolvimento do tumor¹⁰.

De acordo com a expressão do receptor de estrógeno o tumor mamário pode ser classificado em RE positivo e RE negativo. Tumores RE positivos usam o hormônio estradiol como seu principal estímulo de crescimento, sendo assim o alvo direto de terapias endócrinas. 80% dos tumores são classificados como RE positivos, tendo uma relação direta com a melhora de prognóstico e maior capacidade de resposta às terapias⁸.

Quando o núcleo da célula expressa RP, este é dependente de RE. Há descrições na literatura que em pacientes com câncer de mama metastático a resposta ao tratamento antiestrogênico é melhor entre pacientes na qual a expressão tumoral apresenta RE e RP positivos versus aqueles com somente positividade em RE¹².

Pesquisa efetuada em 2004 por Colleoni *et al.* demonstrou que a presença elevada de ki67 está associada com a presença de pequenos nódulos (<1 cm). Em outra pesquisa realizada em 2010 por Mamounas *et al.* foi descoberto que cerca de 25% dos casos ER positivos, nódulos negativos de câncer de mama, possuíram índice de recorrência elevado, sendo que, ainda este grupo, foi apresentado um maior risco de recaída local quando comparado à tumores de baixo risco (16% em comparação a 4% respectivamente), portanto, mais um fato para a importância da identificação dos MT, que quando realizada antecipadamente, facilita ao sucesso na escolha do prognóstico do paciente¹³.

Outra observação importante para o prognóstico do câncer de mama se encontra no fato de o receptor HER2 ser considerado também como um marcador molecular, apresentando funções importantes por serem receptores transmembranares com domínio citoplasmático tirosina quinase, além de estarem diretamente envolvidos com a transdução de sinais, tanto proliferativos, quanto antiapoptóticos. A detecção deste marcador molecular se dá por meio de técnicas imunistoquímicas. Outros genes são essenciais para a detecção do tumor e seu desenvolvimento no organismo, dentre eles BRCA1/2, TP53 e CHECK2. Sendo que a expressão destes correlacionam-se diretamente com a classificação citada anteriormente na tabela. Especificamente para a neoplasia de

mama existem outros genes que, quando expressos erroneamente, podem se associar como marcadores genéticos favoráveis à detecção da neoplasia de câncer de mama, como o PPIL1 e as Proteínas F-BAR (CIP4, Toca1, FPB17). No entanto, serão abordados neste trabalho os três citados no parágrafo anterior.¹⁴

Em suma, a oncoproteína HER2, implica na maior agressividade tumoral e maior possibilidade de desenvolvimento de metástases. Sua expressão positiva indica um prognóstico mais destrutivo para a paciente. Possui valioso valor preditivo em relação aos benefícios clínicos a serem obtidos no tratamento alvo¹⁵.

Genes BRCA1 e BRCA2

Os genes BRCA's são os principais responsáveis pela ocorrência da neoplasia mamária. Tais genes podem se classificar como marcadores oncogênicos, que codificam proteínas e reparam erros que surgem durante as fases de divisão celular, atuando como supressores tumorais, reparando erros do DNA e programando assim, a morte celular quando o processo não é realizado com sucesso. No entanto quando encontram-se em estado de mutação, por fatores carcinogênicos, estes passam a não reparar mais os danos, permitindo que estes, não só passem para fases seguintes, como também se multipliquem, gerando assim, o desenvolvimento de tumores (Figura 1)⁴.

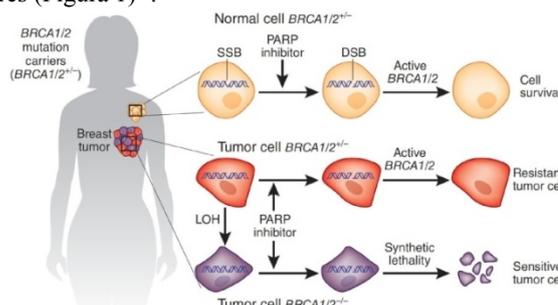


Figura 1. Comparação entre Marcadores Genéticos BRCA1 e BRCA2 em diferentes estados de reparação. **Fonte:** Marcadores Tumorais. Horário Oliveira, 2013

A mutação no gene BRCA1 tem se relacionado, além com o câncer de mama, com o câncer de ovário e também de próstata. Classificam-se como “caretakers”, por impedirem a evolução do tumor, quando em seu estado normal. O BRCA1 apresenta em sua estrutura duas regiões fundamentais, a N-terminal e a C-terminal. Onde a primeira interage com as proteínas do ciclo celular e a segunda, responde pela ativação da transcrição de proteínas, além de reparar danos no DNA e, consequentemente, suprimir tumores, aumentando o risco da neoplasia consideravelmente quando a mutação se instala nesta região causando o processo inverso¹⁰.

Quando se tratando em mutações nesses genes específicos, o risco de câncer de mama é de cerca de 50% a 85%, e quanto maior o tempo de vida, maior a probabilidade de desenvolvimento de tumor, além da grande chance de reincidência. O que cabe a uma estatística desfavorável de que a cada 100 mulheres com esse tipo de mutação, 60 poderão vir a ser acometidas pelo câncer⁸.

Com estes dados, faz-se necessário uma busca pelo diagnóstico preditivo, no qual uma análise específica nas mutações será realizada. No entanto, infelizmente, pelo fato de a técnica apresentar elevado custo, o diagnóstico ainda é restrito pela busca de histórico familiar de carcinomas. Quando a mutação é detectada, medidas preventivas devem ser estabelecidas, tais quais, rastreamento multimodal e cirurgia profilática⁴.

De acordo com o Instituto de Saúde Coletiva da UFF, em artigo publicado em setembro de 2015, por Rosana Melo, conforme resolução normativa da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), mais de 42 milhões de usuários serão beneficiados pelo novo rol de procedimentos e eventos na área da saúde, incluindo exames para a identificação na mutação dos genes BRCA1/BRCA2, além da síndrome hereditária de câncer de mama e ovário. Para pacientes do INCA, o sequenciamento dos genes é gratuito, no mercado o custo fica no valor entre R\$ 4mil e R\$ 5mil reais¹⁵

Mutações no gene BRCA1 também são responsáveis pela pré-disposição ao câncer de ovário, um tanto raro, mas com alta malignidade. Já o BRCA 2 está correlacionado com a com a neoplasia de pâncreas. Contudo, os genes BRCA1/2 são de extrema importância para o desenvolvimento embrionário, uma vez que tais genes quando são eliminados, por meio de engenharia genética, eliminam a chance de sobrevivência, como foi o caso de estudo com camundongos¹⁶.

A predisposição genética é responsável pelo acometimento da neoplasia em até 10% dos casos. Cerca de 1/3 dos casos de câncer de mama, bem como 30% a 40% dos casos aleatórios do acometimento da doença estão associados com a mutação no gene BRCA1. Mulheres que apresentam familiares de primeiro grau, que possuem a doença, apresentam risco superior a 4 vezes ao da população em geral, de serem afetadas pela neoplasia. O câncer de mama é comum em mulheres com idade acima ou igual a 40 anos, não excluindo, no entanto, a probabilidade de mulheres mais jovens virem a predispor da doença. Nessas, porém, o tumor apresenta maior grau histológico, maior invasão linfovascular, RE e RP negativos e aumento da expressão de HER2, uma maior chance de recidiva local e sistêmica, além de uma menor chance de sobrevivida¹⁷.

Avaliações sobre o prognóstico do câncer de mama revelaram que mulheres que possuem câncer de mama e são portadoras da mutação no gene BRCA em comparação com as não portadoras, demonstraram resultados significantes. Onde a histologia demonstra que o câncer de mama portador da mutação no gene BRCA1 possui tumores com expressão ausente de ER e PR e HER2 neu (triplo negativo), histopatologia medular, mutações TP53 somáticas, além de possuírem tendência a maior grau histológico quando em comparação a casos de câncer de mama esporádicos³.

Gene TP53

Outro marcador genético de elevada significância para a detecção e prognóstico da neoplasia é o gene TP53, responsável, dentre outras funções, por regular o crescimento celular. Mutação em sua expressão está relacionada com um tipo raro de câncer de mama, do qual, acomete cerca de 1% dos

casos, com probabilidade maligna considerável, com predisposição acima de 90%. Assim como o BRCA1/2, o gene TP53 regula a divisão celular reparando erros durante o processo⁴.

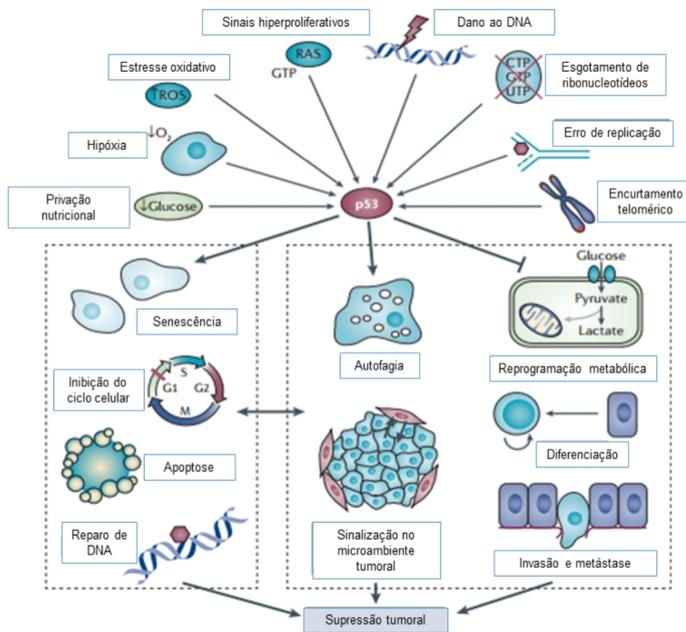


Figura 2. Visão dos processos envolvidos na supressão tumoral pela proteína P53. **Fonte:** Mutação Germinativa *tp53* p.arg337his e Câncer de Mama: Análise de Prevalência em Uma Série de Pacientes Provenientes de Um Hospital Público do Rio Grande do Sul. Eriza Cristina Hahn, 2017.

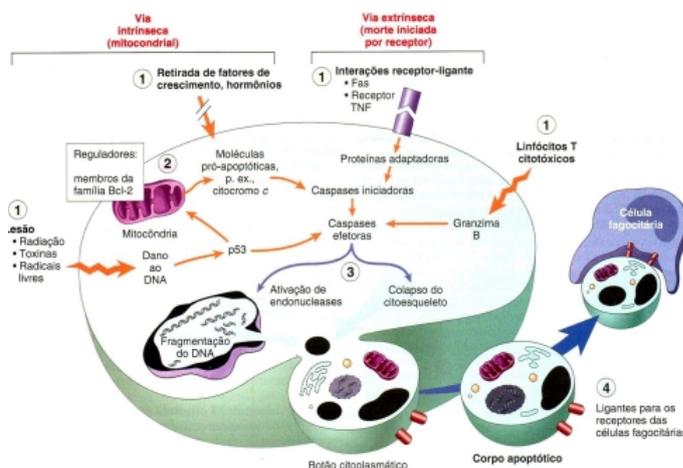


Figura 3. Vias e mecanismos apoptóticos. **Fonte:** Marcadores de Apoptose no Câncer de Mama Metastático. 2015.

É conhecido como TP53 por codificar uma proteína cujo peso molecular é de 53 KD; além disso, quando expresso sem a presença de um de seus alelos, este gene determina a síndrome de Li-Fraumeni, elevando a chance de neoplasias nas mamas e também na medula óssea. Por método de experiência em camundongos, foi detectado que o desenvolvimento da vida embrionária independe da presença deste gene, porém, a sobrevivência se torna impossível, devido a quantidade e variedade de tumores das quais as vítimas são acometidas¹⁶.

A função dessa proteína P53, produzida pelo gene TP53 se estabelece na fase G1 do ciclo da divisão celular (figura 4), a fim de reparar danos no DNA. Caso o erro não seja reparado a célula entra em estado de apoptose (morte celular programada), impedindo que esta se divida (figura 5). Com a mutação no gene, a célula perde o controle e desencadeia a divisão desordenada e com material defeituoso, instaurando assim no organismo, um possível tumor¹⁸.

Está localizado na região cromossômica 17p13.1 e é um dos genes supressores mais estudado atualmente em nível mundial. Possui cerca de 11 exons, sendo que os de número 2 ao 10 são responsáveis pela codificação da maior parte dos aminoácidos componentes da proteína P53.

As mutações neste gene correspondem a cerca de 50% das mutações presentes em tumores. Além disso, células que apresentam este tipo de mutação tendem a captar mais glicose, com o consequente aumento da fermentação láctica (principal forma de captação de energia em células tumorais), sendo estes processos favoráveis não somente para o desenvolvimento, como para o crescimento e manutenção do tumor¹⁹.

Além disso, o gene TP53 é um gene supressor de tumor mutado, que apresenta incidência de 30% a 50% nos mieloplasmas (tumor maligno no cérebro). Quando ocorre a mutação no gene TP53, observa-se também um aumento da sobrevivência da célula quando expostas a tratamentos radioativos ou quimioterápicos e diminuição da apoptose⁹

Micro RNA's

Os microRNAs (miRNA) moléculas endógenas dos quais possuem função de inibir a tradução do RNA mensageiro alvo (miRNA-alvo), causando um termo denominado "silenciamento pós-transcricional". Para o câncer de mama especificamente existem duas classificações para os Mirna: miRNAs supressores, que são os responsáveis pela inibição da tradução, além da super expressão de miRNAs, proteínas ou os receptores encarregados à proliferação do carcinoma. Pode estar associado à total degradação total dos RNAs-alvos.

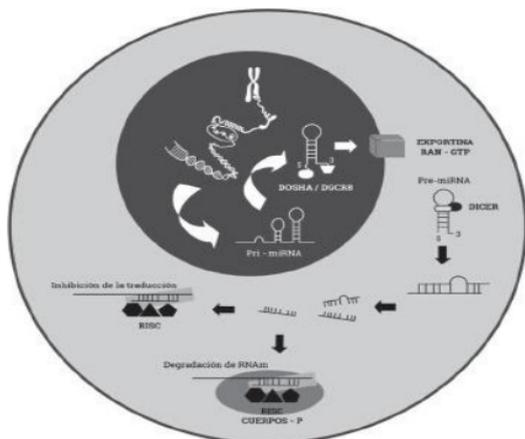


Figura 4. Síntese de mRNA no organismo. **Fonte:** Novas Técnicas da Biologia Molecular Para Detecção e Tratamento de Neoplasia de Mama. COSTA, Audrey; *Et al.* 2015

Além desse, há os miRNAs oncogênicos, que, além de regular os genes supressores de tumor, são capazes de controlar a diferenciação celular e os processos apoptóticos, a fim de controlar o desenvolvimento neoplásico. O silenciamento desse miRNA por meio do RNA de interferência (RNAi), apresenta ainda obstáculos que dificultam a atividade, como, por exemplo, a forma correta de administração dessas moléculas no organismo. E além dessas duas classificações, enquadram-se os shRNAs (short hairpin RNA), vetores genéticos, sintetizados por meio de alguns vírus específicos, que são responsáveis pela expressão dos miRNAs (figura 4)²⁰.

Marcador CA15-3

O antígeno CA 15-3 é considerado uma glicoproteína produzida por células epiteliais glandulares. Um marcador utilizado principalmente para avaliar a recidiva do câncer de mama (novo acometimento da neoplasia), no qual pode preceder o diagnóstico em até três meses. Sua dosagem é indicada em períodos que pré antecedem o tratamento quimioterápico e após tratamento cirúrgico (2 a 4 semanas antes), recomenda-se, no entanto, que a dosagem seja repetida em um período de 3 a 6 meses. O Valor sérico de referência se encontra na faixa de 25U/mL e cerca de 1,3% da população que se encontra na classificação "sadia", possui os níveis séricos de CA 15-3 elevados²¹.

A glicoproteína CA 15-3 é produto do gene MUC1, podendo ser encontrada além de nas células glandulares, no soro. Não é utilizado para fim de diagnóstico e triagem para o câncer de mama, se restringindo, portanto, ao acompanhamento no desenvolvimento da doença. As detecções seriadas são mais significativas do que apenas uma isolada, visto que os níveis do MT podem se encontrar elevados logo após as seções de quimioterapia. A sua sensibilidade varia de acordo com o tamanho do tumor e o seu estadiamento²².

Os valores séricos do MT CA 15-3 possuem diferentes referências de acordo com o estágio de estadiamento do paciente. No primeiro estágio, ou estágio I, este se encontra numa faixa de aumento entre 5% a 30%, no segundo estágio, ou estágio II, de 15% a 50%, e cerca de 60% a 70% e de 65% a 90% no estágio III e IV respectivamente. Na fase inicial da doença, cerca de 23% dos pacientes encontram este MT aumentado e a piora da sobrevida do paciente está diretamente relacionada com este aumento, assim como o aumento pode estar relacionado com uma possível metástase ou recidiva do câncer²⁴.

O diagnóstico precoce do câncer de mama requer outros métodos além da mamografia, por esta não ser tão específica. Por isso a relevância e importância da detecção do CA 15-3, sendo este considerado um dos melhores para a detecção precoce do câncer de mama. No entanto, sua baixa sensibilidade no início da neoplasia não permite que este seja detectado por alguns programas de detecção precoce¹³.

Uma elevação acima de 25% nos valores séricos, após os tratamentos (quimioterapia ou cirurgia), pode indicar em 84% dos casos, um novo desenvolvimento da neoplasia. Já a diminuição em cerca de 50% pode representar em cerca de 76% dos casos uma regressão do tumor. Níveis abaixo de 25%

tendem a indicar uma estabilidade no desenvolvimento da neoplasia²².

Marcador CHECK2

Outro agente molecular importante para a detecção e monitoramento do câncer de mama é a enzima multifuncional Check2 (Checkpoint quinase 2), sintetizada pelo gene CHECK2, no qual possui a função primordial, assim como nos outros dois supracitados, de reparar os danos no DNA durante o ciclo celular, com o intuito de ativar a apoptose, quando caso os danos permaneçam e se tornem nocivos para o organismo. O gene CHECK2 codifica uma cinase de serina-treonina que é ativada quando ocorrem quebras na molécula de DNA, agindo de forma corretiva, enviando sinal para proteínas de reparo. As mutações neste gene aumentam o risco da neoplasia de mama, além de tornar o prognóstico um tanto desfavorável ao padrão clínico, detectado em 5% dos pacientes que possuem a neoplasia⁴.

O oncogene CHECK2 apresenta peso molecular de 185Kd, pertencente a uma família de receptores celulares dos quais são expressos na membrana celular, podendo ser identificado, dosado em cultura ou liberado na circulação, sendo amplificado e expresso em elevados níveis em cerca de 20% a 40% dos casos de câncer de mama primário. No entanto, sua avaliação se estende em caso de análises de recidiva do tumor e à sobrevida dos pacientes. A expressão elevada e continua deste marcador é indicativo de um mau prognóstico, no entanto, pacientes com CHECK2 aumentado podem ter maiores benefícios com altas doses quimioterapia²³.

Além disso, o gene CHECK2 é responsável pela síntese da oncoproteína HER2, tal qual, dentre outras funções, citadas anteriormente, indica que o gene está amplificado, o que agrava a situação do prognóstico, relacionando a uma maior agressividade do tumor e uma maior chance de recidiva e metástase¹⁷.

Apesar de o MT CHECK2 não influenciar no estadiamento do câncer de mama e revelar um pior prognóstico, há uma correlação de 48% de positividade para o CHECK2, na maioria dos casos com nódulos em estágio avançado. Assim como sua positividade pode estar diretamente relacionada com a quantidade de linfonodos axilares comprometidos. Fato que comprova a relação entre a sua positividade com o alto grau de estadiamento⁶.

Geralmente, casos de câncer de mama positivados para a oncoproteína HER2, são caracterizados por uma super expressão do gene CHECK2, além de outros genes responsáveis pela proliferação celular. Os tumores nesse caso, possuem uma proliferação elevada, com cerca de 75% de atividade, possuindo um grau histológico elevado e mais de 40% em casos de mutação no gene P53. No entanto, é importante ressaltar que estes dados foram obtidos antes do manuseio do trastuzumab, reduzindo, portanto, o risco de recorrência local com o seu uso em andamento³.

Marcador CA27-29

MT amplamente utilizado para o diagnóstico da neoplasia de mama, seguindo para análises durante o acompanhamento do desenvolvimento do carcinoma e resultando em

tratamentos específicos para o paciente em questão. Muito similar ao antígeno CA 15-3, devido a sua baixa sensibilidade, uma vez que nem todos os tumores produzem quantidades relativas deste antígeno. No entanto, a correlação dos níveis séricos deste, com a atividade do tumor estabelecem significância no acompanhamento²³.

O CA 27-29, quando utilizado para a finalidade de monitoramento de câncer de mama, possui uma sensibilidade de 58% e especificidade de 98%, sendo seu valor de referência de até 38U/mL³, ficando, portanto, limitado a essa neoplasia. A sua maior vantagem se estabelece na detecção precoce do carcinoma, permitindo vantagem de tempo na análise do melhor tratamento, considerado melhor que o MT CA 15-3 nesta finalidade. Sua correlação ao decorrer da doença é significativa, uma vez que há um parâmetro entre os níveis séricos e a atividade da doença²².

Marcador CEA

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é considerado o marcador mais específico, produzido pelas células da mucosa gastrointestinal, fazendo parte da família das imunoglobulinas com o valor de referência entre 3 a 7ng/ML de acordo com a classificação da população em fumantes e não fumantes respectivamente. Sua elevação varia em neoplasias colorretais, pancreáticas, e tem um aumento de 25% a 50% em carcinomas mamários e gástricos. O seu nível de elevação está diretamente relacionado com o tamanho da massa tumoral²¹.

Quando ocorre um crescente aumento nos níveis de CEA, a recidiva do tumor é uma provável ocasião, sendo que a doença é detectável clinicamente quando os valores séricos deste encontram-se alterados. Os valores do CEA são indicados também para o monitoramento de um possível tratamento em casos de câncer de mama metastático²³.

Marcador ki67

O MT ki67 é considerado como um fator proliferativo de alta relevância para completar o grau histológico, sendo utilizado como ferramenta positiva para o prognóstico, bem como, para a avaliação do melhor tratamento. O valor prognóstico do ki67 foi demonstrado em pacientes com câncer de mama, se restringindo a tumores com o receptor de estrogênio positivo e com grau histológico 2. É indicado no meio clínico por possuir fácil recriação e não exigir técnicas complexas de avaliação, podendo ser avaliados em blocos de parafina²⁵.

O alto risco de recaída local, avaliada na classificação Luminal B dos tipos de câncer de mama é avaliado pelo MT ki67. Estudos comprovam que o tipo luminal B é o segundo tipo mais comum na população, com 35% dos tumores com ER e PR positivos e HER2 negativos. Além disso, são associados com um maior risco de recidiva local e regional²⁶.

Considerado também como uma proteína nuclear, presente em células durante a fase da divisão celular, o Ki67 é um marcador da proliferação celular. Estabelece correlação com o grau histológico (alto ou baixo) da neoplasia de mama, favorecendo a um menor tempo de sobrevida longe da doença. É utilizado na prática clínica, antes, durante e depois a

terapia, a fim de medir a eficácia dos mesmos, favorecendo a um melhor prognóstico¹⁷.

Marcador de proliferação celular é uma proteína nuclear encontrado somente quando as células se apresentam em fase de divisão celular. Estabelece correlação com o alto ou baixo grau histológico, possibilita a análise de taxas de proliferação celular. A apresenta aplicações no prognóstico, auxiliando na dinâmica de melhora de tratamento em amostras obtidas antes, durante e após a terapia neoadjuvante²⁷.

Identificação de Marcadores Tumorais

O método imunohistoquímico é o mais utilizado na prática clínica da anatomia patológica, usando amostras fixadas no formol e submersas em cassetes de parafina, no qual fornece informações precisas prognósticas e preditivas. O comitê de Consenso da OMS considera fundamental que a prática da imunohistoquímica nos laboratórios clínicos, seja padronizada em todas as três fases, pré-analítica, analítica e pós-analítica, além da necessidade de participar dos programas de controle de qualidade internos e externos².

A técnica de imunohistoquímica, técnica tecidual *in situ*, tem como objetivo visualizar reações antígeno – anticorpo específico. É geralmente utilizada para um diagnóstico preciso a partir da análise morfológica. Os marcadores mais utilizados nesse método são os receptores hormonais (receptores de estrógeno e progesterona), marcadores de proliferação como o Ki67, marcadores do ciclo celular como a p53, marcadores de angiogênese como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)²⁸.

A Imunohistoquímica é utilizada na detecção do perfil de expressão protéica, extremamente necessária, por ser menos complexa e financeiramente viável. A técnica e si, se baseia na análise do corte anatômico (biópsia), por meio de reação antígeno-anticorpo, com o objetivo de marcar a proteína desejada, no caso, os MT's, com o intuito final de direcionar o melhor tratamento para o paciente. Normalmente os primeiros MT's a serem encontrados na técnica de imunohistoquímica para o câncer de mama, são os receptores de estrógeno e progesterona²⁵.

Na atualidade a expressão imunohistoquímica de marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama, tem se revelado uma valiosa alternativa para a rotina diagnóstica e de pesquisa. Nesse campo, a expressão progressiva de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos diretamente associados à patologia de mama, vem permitindo o maior conhecimento sobre a referida neoplasia. Esses estudos buscam individualizar o comportamento do carcinoma de mama pelas características próprias do tumor, tentando dessa forma prever se o mesmo responderá ou não ao tratamento quimioterápico²⁹.

A utilização de marcadores para o prognóstico de pacientes acometidos pelo câncer de mama, desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, é realizada baseada em seis fatores principais: acometimento de linfonodos axilares, subtipo histológico, tamanho do tumor, grau nuclear ou histológico, presença ou ausência de receptores hormonais e índices proliferativos. Os fatores de prognóstico avaliam as características clínicas, patológicas e biológicas

específicas de cada paciente assim como seus respectivos tumores, que permitem prever a evolução clínica da patologia e o tempo de sobrevida sem que se tenha recebido tratamento após o diagnóstico inicial, em contrapartida os fatores preditivos permitem com base nos dados clínicos, patológicos e biológicos direcionar tratamentos específicos e individualizados. Poucos marcadores são avaliados apenas levando em consideração o prognóstico, a maioria deles é considerada de prognóstico e preditiva²⁸.

Além disso, a imunohistoquímica possui vantagem por ser capaz de avaliar a expressão de proteínas de acordo com a morfologia do tumor, podendo ser aplicada pela técnica de biópsias, em laboratórios clínicos e de pesquisa, revelando uma prática de baixo custo, menor tempo de execução e alta confiabilidade. Características relevantes para países com recursos limitados como o Brasil¹¹.

A imunocitoquímica, processo semelhante à imunohistoquímica, é um procedimento de identificação de antígenos, por meio da ligação que se dá entre anticorpos e antígenos no tecido biológico, em amostras de esfregaço ou tecido. Quando o complexo se forma é possível visualizar essa ligação por meio dos marcadores ao microscópio óptico, ao de fluorescência ou ao microscópio eletrônico. O desenvolvimento da técnica se subdivide em dois métodos, direto e indireto. Nos métodos diretos o complexo pode ser formado entre um anticorpo e um corante fluorescente (fluoresceína ou rodamina), ou o anticorpo pode ser marcado por substância radioativa (trício), em outros casos o anticorpo é ligado à enzima peroxidase, com a detecção feita por meio da diaminobenzidina, na presença de peróxido de hidrogênio, e por último, o complexo pode ser formado por meio da ligação do anticorpo com a ferritina, no entanto, o método direto possui baixa sensibilidade. Nos métodos indiretos o complexo é formado com a introdução de um novo anticorpo marcado (a ligação é amplificada), podendo ser detectada por meio da fluorescência ou radioautografia¹⁸.

A expressão de receptores hormonais [receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP)] e a magnificação da expressão do fator de crescimento humano epidérmico receptor-2 (HER2) foram identificados como importantes fatores preditivos entre pacientes com câncer de mama. Na rotina clínica são avaliados para definição de tratamento, estabelecimento de prognóstico da doença tendo associação clínica e patológica, tais como o envolvimento de linfonodos, tamanho do tumor, tipo histológico, grau do tumor e margens cirúrgicas. A definição do perfil imuno- histoquímico é avaliado a partir da manifestação dos RE e RP, superexposição de HER2 e o índice de proliferação celular Ki67³⁰.

Os marcadores citados anteriormente permitem a identificação dos seguintes subtipos moleculares de carcinoma mamário: *Lumial A*, *Lumial B*, *Superexpressão de HER2*, *Basáloide* e *triplo negativo não basalóide*. Essas características moleculares proporcionam a análise da melhor forma de tratamento a ser realizado³¹.

4. CONCLUSÃO

Como apresentado, o câncer de mama é uma patologia de abrangência extensa entre a população feminina, sua gravidade vai estar

diretamente relacionada com as características genéticas apresentadas pelo tumor. Assim sendo se enfatiza a importância da pesquisa dos marcadores tumorais, através dos diagnósticos laboratoriais tendo como objetivo um tratamento direcionado e individualizado para cada paciente, visando melhor resposta do organismo. Entretanto, o valor acentuado de alguns diagnósticos impossibilita sua utilização na rotina clínica. Ressalta-se que se a pesquisa de marcadores tumorais for corretamente realizada ao ser associada a tratamentos convencionais como medicamentosa e quimioterápica pode representar um prognóstico benéfico para a paciente colaborando para o sucesso do tratamento.

REFERÊNCIAS

- [01] INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. www.inca.gov.br, 2016.
- [02] Gobbi H. Classificação dos tumores de mama: Atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *Bras. Patol. Med, Lab., Minas Gerais*, v. 488, n. 6, p. 463 - 474m dez. 2012. [acesso em 22 de abril de 2017]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v48n6/v48n6a13.pdf>>.
- [03] Rich TA, *et al.* Síndromes Hereditárias de Câncer de Mama e Testes Genéticos. *Journal of Surgical Oncology*, 2015; 111(5):66-80. [acesso em 05 de junho de 2017]. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jso.23791/epdf?r3_referrer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED>.
- [04] Cardoso M, *et al.* Avaliação do Marcadores de Pacientes com Carcinoma Mamário: Uma Revisão. *Revista Saúde Integrada ISSN 2447-7079.2*, 2016. [acesso em 11 de abril de 2017]. Disponível em: <local.cneccs.ed.br/revista/index.php/saude/articulo/download/229/197>.
- [05] Santos G. Câncer de mama e derrame pleural neoplásico: características morfológicas e marcadores tumorais. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2016. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<https://repositorio.ufcspa.edu.br/jspui/bitstream/123456789/193/1/Santos%2c%20Giovana%20Tavares%20dos.pdf>>.
- [06] Gonçalves L, *et al.* Câncer de mama feminino: aspectos clínicos e patológicos dos casos cadastrados de 2005 a 2008 num serviço público de oncologia de Sergipe. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant. Recife*. 2012; 12(1):47-54. [acesso em 11 de abril de 2017]. Disponível em: <<http://www.producao.usp.br/bitstream/handle/BDPI/40073/S1519-38292012000100005.pdf?sequence=1>>.
- [07] Hirata, B.K.B., *et al.* Marcadores moleculares para câncer de mama: previsão do comportamento tumoral. *DisMarkres*, 2014. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/dm/2014/513158/abs/>> .
- [08] Lopez JR. Avaliação da ação da melatonina em células tronco tumorais mamárias repositivas tratadas com disruptores estrogênicos: Verificação da via do receptor de estrogênio mediada pelo gene OCT 4. UNESP. São José do Rio Preto 2016. [acesso em 10 de maio de 2017]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138337/lopes_jr_dr_sjrp_int.pdf?sequence=4&isAllowed=y>.
- [09] Santiago R. Diagnóstico do Câncer de Mama através de Marcadores Tumorais Séricos: Uma Revisão Sistemática de Literatura. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. Salvador, 2016. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufba.br:8080/ri/bitstream/ri/20747/1/Rodrigo%20Pimentel%20Santiago%20-%20Vers%C3%A3o%20Final%20Monografia.pdf>>.
- [10] Andrade I, *et al.* BRCA1, BRCA2, Família ALDH e ADH: Genes Relacionados ao Etilismo e ao Câncer de Mama Feminino. Sociedade de Patologia do Tocantins. 2017. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/patologia/article/view/2426/9553>>.
- [11] Cirqueira M, *et al.* Subtipos Moleculares do Câncer de Mama. *FE-MINA*. 2011; 39(10). [acesso em 11 de abril de 2017]. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2011/v39n10/a2965.pdf>>
- [12] Farid B, *et al.* Fatores prognósticos em câncer de mama. *Com. Ciências Saúde*. 2011. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/fatores_prognosticos.pdf>.
- [13] Bayo J, *et al.* Analysis of blood markers for early breast cancer diagnosis. *Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO)* 2017. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Analysis+of+blood+markers+for+early+breast+cancer+diagnosis+J.+Bayo>>.
- [14] Cerqueira O. Avaliação de Marcadores de Prognóstico no Câncer de Mama e Análise Funcional de CIP4. Universidade De São Paulo, Instituto de Química. 2014 [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-01102014-082217/pt-br.php>>.
- [15] Melo R. Rastreamento Genético Mais acessível. Instituto de Saúde Coletiva da UFF. *Revista Rede Câncer – Inca*. 2015. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <http://www.uff.br/isc/site_2_5/index.php/noticias/todas-as-noticias/183-rastreamento-genetico-mais-acessivel>.
- [16] Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular* 9ª edição. Editora Guanabara koogan S.A. página 299, capítulo 16. A célula cancerosa. 2012. Disponível em: <<https://issuu.com/guanabarakoogan/docs/junqueira-bcm9-amstras-red>>.
- [17] Fernandes AP. Estudo da expressão imuno-histoquímica da E-cadherina e N- cadeia em câncer de mama. Porto Alegre 2016. [acesso em 11 de abril de 2017]. Disponível em: <https://repositorio.ufcspa.edu.br/jspui/bitstream/123456789/407/1/Fernandes%2C%20Ana%20Paula%20da%20Silva_Dis-serta%C3%A7%C3%A3o.pdf>.
- [18] Robertis EMF De, HibJ. *Bases da biologia celular e molecular*. 3ª Ed. Editora Guanabara koogan, 2001; 22-23:380-393.
- [19] Hahn E. *Mutação Germinativa TP53 p.Arg337His e Câncer de Mama: Análise de Prevalência em Uma Série de Pacientes Provenientes De Um Hospital Público do Rio Grande do Sul*. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre, 2017. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/163678>>.
- [20] Costa A, *et al.* Novas Técnicas da Biologia Molecular para Detecção e Tratamento de Neoplasia de Mama. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://revista.uniluz.edu.br/index.php/ruep/article/view/675/u2016v13n30e675>>.
- [21] Castro G. Perfil dos marcadores tumorais e correlação hematológica. Universidade Estadual da Paraíba. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Campina Grande, 2017. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/13503>>.
- [22] *Help de Exames*, Laboratório Hermes Pardini, 2016. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://www.labhparadini.com.br/scripts/mgwms32.dll?MGWLPN=HPHOS-TBS&App=HELPE&EXAME=S%7C%7CCA15>>.
- [23] Almeida J, *et al.* Marcadores tumorais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007. [acesso em 11 de abril de 2017]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao1.pdf>.
- [24] Sousa G, *et al.* Principais marcadores mucínicos utilizados na prática clínica: uma revisão de literatura. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 2017. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<https://www.uninter.com/web/revistasauade/index.php/saude-desenvolvimento/article/view/689/368>>.
- [25] Andrade L. Diagnóstico imunohistoquímico de câncer de mama em hospitais públicos do nordeste brasileiro – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e de Saúde, 2015.

- [26] Barnato S, *et al.* Biological Subtypes Of Breast Cancer. Medical Radiology. Radiation Oncology. 2015. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/174_2014_1043>.
- [27] Jinzhong S, *et al.* Associations and indications of Ki67 expression with clinicopathological parameters and molecular subtypes in invasive breast cancer: A population-based study. *Oncol Lett.* 2015. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4533668/>>.
- [28] Zanetti J, *et al.* Câncer de mama: de perfis moleculares a células tronco. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações.* 2011; 9(1):277-292. [acesso em 05 de julho de 2017]. Disponível em: <<http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/102/pdf>>.
- [29] Victorasso BJ. Avaliação da Glutatinona e suas enzimas como marcadores prognósticos e preditivos do cancer de mama. São José do Rio Preto. 2011. [acesso em 05 de maio de 2017]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92529/jardim_bv_me_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [30] Cintra JR, *et al.* Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. Associação Médica Brasileira. 2012. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302012000200013>.
- [31] Pinheiro J. Marcadores de Apoptose no Câncer de Mama Metastático. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015. [acesso 10 de maio de 2017]. Disponível em: <https://repositorio.ufcspa.edu.br/jspui/bitstream/123456_789/381/1/Pinheiro%2C%20Jaqueline%20Lessa_Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>.
- [32] Bagci O, Kurtgoz S. Amplificação de Oncogenes Celulares em Tumores Sólidos. *North Am.* 2015; 7(8):341-346. [acesso em 11 de abril de 2017]. Disponível em: <<http://www.najms.org/article.asp?issn=1947-714;year=2015;volume=7;issue=8;epage=341;epage=346;aulast=Bagci>>.
- [33] Cadoo KA, *et al.* Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Q J MED MOL Imaging.* 57: 312-321. [acesso em 11 de abril de 2017]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24322788>>.
- [34] Hsiao YH, *et al.* Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. *J Cancer.* 2010; 1:6-13, 2010. ISSN 1837-9664. [acesso em 22 de abril de 2017]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20842218>>.
- [35] INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. www.inca.gov.br, 2003.
- [36] INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. www.inca.gov.br, 2014.
- [37] Lin F, Chen Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Dec;138(12):1564-77. [acesso em 10 de maio de 2017]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25427038>>.
- [38] Snoussi K, *et al.* Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer.* 2010; 10:283. ISSN 1471- 2407. [acesso em 05 de junho de 2017]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20540789>>.
- [39] Sicchieri R. Marcadores de células tronco tumorais no câncer de mama localmente avançado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2013. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17145/tde-17062015-133031/pt-br.php>>.
- [40] Help de Exames, Laboratório Hermes Pardini, 2016. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://www.labhpar-dini.com.br/scripts/mgwms32.dll?MGWLPN=HPHOS-TBS&App=HELPE&EXAME=S%7C%7CCA15>>.
- [41] Help de Exames, Laboratório Hermes Pardini, 2016. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://www.labhpar-dini.com.br/lab/imunologia/marctumr.htm#CA15>>.
- [42] Oliveira H. Doença de Crohn: Novas Perspectivas. Marcadores Tumorais. 2013. [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://ddcnovasperspectivas.blogspot.com.br/2013/01/marcadores-tumorais-os.html>>.
- [43] Zeharia M, *et al.* Câncer de Mama Triple Negativo: Uma Enfermedad de Difícil Diagnóstico y Tratamiento. *Rev Peru Med Exp-Salud Publica.* 2013; 30(4). [acesso em 15 de agosto de 2017]. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rpmesp/v30n4/a18v30n4.pdf>>.