

Fatores prognósticos em câncer de mama

Prognostic factors in breast cancer

Farid Buitrago¹
 Gilberto Uemura²
 Maria Cristina Ferreira Sena³

RESUMO

O curso clínico do câncer de mama e a sobrevida variam de acordo com as características próprias do tumor e do paciente. Fatores prognósticos são parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditor da sobrevida do paciente. A inclusão de novos fatores preditivos certamente proporciona avanços que conduzem a uma seleção ainda melhor dos pacientes principalmente para terapias adjuvantes, podendo-se mesmo chegar a uma individualização da conduta terapêutica. Além dos fatores prognósticos clássicos de câncer de mama, a descoberta de biomarcadores moleculares, como o receptor de estrogênio e receptor de progesterona têm desempenhado um papel importante na seleção de pacientes que se beneficiam de terapia endócrina por muitos anos. Mais recentemente, o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) foi validado para ser não só um factor de prognóstico, mas também um preditor de resposta a terapia alvo. O diagnóstico mais precoce do câncer de mama devido à melhoria métodos de imagem e programas de rastreamento plantea a necessidade de novos fatores e combinações de biomarcadores para quantificar o risco individual e para indicar e adicionar novas estratégias de tratamento. O marcador de proliferação Ki67 surgiu recentemente como um importante marcador, devido a várias aplicações na terapia neoadjuvante. Com a introdução de tecnologias de assinaturas multigênica, foram identificados grupos que visam superar os marcadores tradicionais. Novos estudos são necessários para estabelecer o custo-benefício substancial e, assim, justificar seu uso rotineiro para tomada de decisão no tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: Biomarcador; Mortalidade; Neoplasia da mama; Prognóstico; Receptor.

ABSTRACT

The clinical course of breast cancer and survival vary with the characteristics of the tumor and the patient. Prognostic factors are pa-

¹Hospital Regional de Sobradinho da Secretaria de estado de Saúde do Distrito Federal. Brasília-DF, Brasil.

²Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP). Botucatu-SP, Brasil.

³Faculdade de Medicina da Escola Superior de Ciências da Saúde/FEPECS, da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. Brasília-DF, Brasil

Correspondência

Farid Buitrago
 SQN 215, bloco E apartamento 301, Asa Norte, Brasília-DF: 70874-050, Brasil.
 faridbuitrago@gmail.com

rameters to be measured at diagnosis and serve as a predictor of patient survival. The inclusion of new predictors certainly delivers advances that lead to an even better selection of patients for adjuvant therapies mainly, being able to even get an individualized therapeutic approach. Besides the classical prognostic factors of breast cancer, the discovery of molecular biomarkers such as estrogen receptor and progesterone receptor have played an important role in selecting patients who benefit from endocrine therapy for many years. More recently, the receiver of the human epidermal growth factor 2 (HER-2) was validated to be not only a prognostic factor, but also a predictor of response to targeted therapy. The early diagnosis of breast cancer due to improved imaging methods and tracking programs plant the need for new biomarkers and combinations of factors to quantify the individual risk and to indicate and add new treatment strategies. The proliferation marker Ki67 has recently emerged as an important marker, because of various applications in the neoadjuvant therapy. With the introduction of technologies multigene signatures have been identified groups that seek to overcome the traditional markers. New studios are needed to establish the cost-benefit substantially and thus justify its routine use for decision making in the treatment of breast cancer.

Keywords: Biomarker; Mortality; Breast Cancer; Prognosis; Receptor.

INTRODUÇÃO

No Brasil o câncer da mama é a patologia maligna de maior mortalidade na população feminina¹. Tem o seu quadro agravado pelo fato do diagnóstico ainda ser estabelecido, na maioria das vezes, numa fase tardia da doença o que diminui as possibilidades de cura do paciente.

As causas do diagnóstico tardio são múltiplas podem este atraso no diagnóstico pode ser o reflexo da inexistência de uma política consistente de controle da doença através do diagnóstico precoce, que tem na mamografia o seu instrumento fundamental².

A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida variam de paciente para paciente. Esta variação é determinada por uma série complexa de fatores, tais como a diferença na velocidade de duplicação tumoral, o potencial de metastatização do tumor e outros mecanismos, ainda não completamente compre-

endidos, relacionados com a condição imunológica, hormonal e nutricional do paciente³. Fatores prognósticos são parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditor da sobrevida do paciente. Infelizmente no Brasil o diagnóstico tardio da doença tem contribuído negativamente para o aumento da mortalidade e a impossibilidade de realizar cada vez com maior frequência os tratamentos cirúrgicos conservadores¹.

Apesar de certos aspectos anatômicos, como o tamanho do tumor primário e as condições dos linfonodos, continuarem sendo fatores importantes na avaliação prognóstica⁴⁻⁶, uma série de características histológicas e biológicas como grau nuclear, grau histológico, dosagem de receptores hormonais e outros fatores avaliados pela imunohistoquímica são determinantes para o prognóstico da evolução da doença^{7,8}.

Os principais fatores prognósticos e preditivos podem ser importantes na escolha do tratamento adequado e para determinar o risco de recorrência e de classificação de pacientes para ensaios clínicos.

METODOLOGIA

A revisão de artigos realizada adotou como critério inicial para seleção a consulta ao Index Medicus de seu sistema de busca e utilizando as palavra-chave “breast cancer” e “prognostic factor”. A opção por este banco de dados decorreu do fato de ser o mesmo uma das principais fontes de publicações científicas na atualidade, dado o rigor em seus critérios de avaliação de periódicos, incluindo contribuições originadas em periódicos com regularidade de edição e disponibilidade de conselhos científicos de avaliação dos artigos submetidos.

A seleção procurou alcançar os artigos em língua inglesa publicados no período compreendido entre 01 de janeiro de 2005 e 31 de dezembro de 2010. Foi realizada uma leitura cuidadosa de todos os arquivos selecionados e incluídos os artigos que atenderam aos seguintes critérios: apresentou resultados a partir de dados primários, amostra com elevado número de pacientes estudados (variação de 200 a 30.000 casos) e qualidade dos dados apresentados refletida através da validade estatística dos resultados. Também foram incluídos artigos de relevância histórica, revisões, consensos e diretrizes.

CLASSIFICAÇÃO DOS FATORES PROGNÓSTICOS

Após décadas de estudo dos fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama, os fatores clássicos como estadiamento, tipo e grau histológico, expressão de receptores hormonais e mais recentemente a superexpressão do HER-2, continuam a nortear as decisões terapêuticas.

O Colégio Americano de Patologistas em sua reunião de consenso classificou os fatores prognósticos em grupos (Fitzgibbons et al. 2000)⁹.

Alguns fatores prognósticos têm uma dupla função, além de exercer seu papel como fator prognóstico, tem um papel muito importante como fator preditivo permitindo assim o estabelecimento de terapias específicas para o tratamento do tumor. O re-

ceptor de estrogênio e a superexpressão do HER-2 se consolidaram como alvos terapêuticos⁵⁰⁻⁵¹.

Tabela 1

Fatores prognósticos em câncer de mama. (Fitzgibbons et al. 2000)

Fatores Prognósticos em câncer de mama – Consenso do Colégio Americano de Patologistas.	
	Estadiamento TNM
	Tipo Histológico
Categoria 1	Grau Histológico
	Contagem de Mitose
	Estado de Receptores Hormonais
	HER-2
	MIB-1
Categoria 2	Invasão vascular/linfática
	p53
	DNA fração S
	Ploidia de DNA
	Angiogênese tumoral
	Receptor para fator de crescimento epidérmico
Categoria 3	Fator de crescimento transformador α
	BCL-2
	pS2
	Catepsina D

A heterogeneidade dos carcinomas de mama é decorrente do envolvimento de diferentes genes, relacionados a atividade proliferativa, diferenciação e supressão de tumores, vários deles estudados isoladamente ou em pequenos grupos, quanto à seu papel na carcinogênese como também sua implicação como fatores prognósticos. A grande quantidade de fatores envolvidos e sua heterogeneidade dificultam sua interpretação. Com o surgimento recente de tecnologias de análise de genomas concomitante de milhares de genes, foi possível classificar os tumores de mama de acordo com seu perfil gênico intrínseco, recebendo as seguintes denominações: basal, HER-2, Luminais A, B, e tipo mama normal¹⁰.

FATORES PROGNÓSTICOS CLÁSSICOS

Tamanho do tumor

Historicamente o volume do tumor é um dos fatores mais importantes, sabemos que pacientes com tumores menores de 1,0 cm têm entre 10% a 20% de possibilidade de comprometimento linfonodal¹¹⁻¹² e que pacientes com tumores menores de 1,0 cm com linfonodos negativos têm uma sobrevivência livre de doença em 10 anos de 90%¹³. A avaliação correta do volume tumoral é muito importante para estadiamento das pacientes.

Variáveis a serem consideradas

Existe variação interobservador na medida do tamanho do tumor devido aos efeitos de confusão causados pela reação desmoplásica do estroma, coexistência de carcinoma ductal *in situ* e tumores multicentricos¹⁴.

Medição do tamanho do tumor, através de exame clínico versus avaliação dos tumores mediante exame microscópico¹⁵. Por exemplo o carcinoma lobular pode ser maior do que visualmente aparente, enquanto aqueles com extensa reação estromal podem ser menores do que o exame macroscópico poderia sugerir.

A Inclusão de carcinoma ductal *in situ* na medição do tamanho do tumor pode influenciar pois é conhecido que o tamanho do componente invasivo só determina o prognóstico¹⁶.

O diagnóstico através de rastreamento mamográfico tem sido capaz de identificar tumores cada vez menores, com identificação macroscópica imprecisa. A orientação do College of American Pathologist é a de que tumores pequenos sejam preferencialmente avaliados através de seu tamanho no corte histológico.

Estado linfonodal

O estado linfonodal é o fator prognóstico mais importante no câncer de mama e tem se mostrado repetidamente como o indicador mais importante de sobrevivência livre da doença e sobrevivência global de mama com câncer¹²⁻¹⁵. Apenas 20% a 30% dos pacientes com nódulo negativo irá desenvolver recidiva no prazo de 10 anos, em comparação com cerca de 70% dos pacientes com envolvimento ganglionar axilar. O número absoluto de linfonodos envolvidos é também de importância prognóstica; pacientes com 4 ou mais linfonodos envolvidos têm um prognóstico pior do que aqueles com menos de 4 linfonodos envolvidos¹⁷⁻¹⁸. A extensão extracapsular, embora de significado controverso, deve ser notificada⁹.

Macrometástases (> 0,2 cm no tamanho) têm demonstrado claramente significado prognóstico. Metástases menores (isto é, micrometástases e de células tumorais isoladas) não têm significado prognóstico quando o tratamento inicial dos linfonodos foi controlado e todas as macrometástases detectadas. O valor das séries e/ou imuno-histo-

química para detectar estas pequenas metástases permanece sob investigação.

A grande maioria das pacientes encontrados com metástases linfonodais são candidatas à terapia sistêmica adjuvante. No entanto, determinar quais pacientes com linfonodos negativos devem receber terapia adjuvante é um desafio, especialmente porque a maioria são curados por excisão cirúrgica sozinha. O benefício para os pacientes que estão destinados a recidivar é mínima, e os custos e toxicidade dos tratamentos são significativas. Assim, pacientes com linfonodos negativos requerem avaliação adicional usando outros fatores prognósticos e preditivos.

Gradação histológica

A gradação histológica Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis conhecida como o Sistema de Classificação de Nottingham (SCN)²⁰ é o sistema de gradação recomendado por vários organismos profissionais a nível internacional como a Organização Mundial de saúde (OMS), American Joint Committee on Câncer (AJCC), da União Europeia (UE), e do Royal Colégio de Patologistas (RCPATH UK)²¹⁻²². A relevância e prognóstico do SCN em câncer de mama foi inicialmente demonstrada em 1991²⁰ e foi validado posteriormente, em vários estudos independentes²³⁻²⁶.

Vários estudos demonstraram que pacientes com grau histológico 1 tem melhor prognóstico como foi descrito na pesquisa de Henson et al.⁵⁶ que descreveu que pacientes com tumores de grau 1 e tumor menor de 2 cm de tamanho tinham um excelente prognóstico, com 99% de sobrevivência em 5 anos, mesmo quando apresentavam linfonodos axilares positivos. Estes resultados são apoiados por um estudo recente do grupo de Nottingham⁵⁷, que incluiu 2.219 casos de câncer de mama operáveis e seguimento a longo prazo.

O grau histológico mostrou ser um fator prognóstico de relevância seja independente ou em combinação com o estado linfonodal e tamanho tumoral como foi estabelecido no índice prognóstico de Nottingham²⁷ e índice prognóstico de Kalmar²³ no qual é dado uma maior ponderação ao grau histológico, Também foi incorporado em algoritmos como o Adjuvante On line²⁸ e orientações de consenso como as diretrizes de St. Gallen para determinar o uso de quimioterapia adjuvante²⁹.

Tipo Histológico

Pacientes portadoras de carcinoma ductal infiltrante apresentam normalmente um maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que aquele verificado nos pacientes com tipos menos freqüentes de carcinoma invasivo de mama^{30,31}. Variações histológicas conferem diferentes comportamentos biológicos e agressividade tumoral. O carcinoma lobular invasivo puro com padrão de crescimento pagetóide e núcleos de baixa densidade estão associados com um prognóstico melhor do que o câncer da mama normal ou outros subtipos de carcinoma lobular invasivo³².

O carcinoma tubular combinado com histologia de baixo grau mostra prognóstico particularmente favorável³².

A Identificação de carcinomas mucinosos puros são considerados historicamente como de melhor prognóstico³². A produção de mucina extracelular abundante é insuficiente para conferir o prognóstico favorável dos carcinomas mucinosos puros³³.

O carcinoma medular é uma variante rara de câncer de mama (cerca de 0,5% dos casos) associada a um melhor prognóstico do câncer de mama invasivo, particularmente para pacientes com linfonodos negativos. No entanto, esta melhora do prognóstico só é vista quando se encontram o arsenal completo de recursos de diagnóstico e terapêuticos³⁴.

No outro extremo esta o câncer de mama inflamatório que é uma forma rara e agressiva de câncer de mama invasivo que representa 2,5% de todos os casos de câncer de mama. É caracterizado por rápida progressão, metástases locais e distantes, idade de início mais jovem, e menor sobrevida global em comparação com outros cânceres de mama. Historicamente, o carcinoma inflamatório é uma doença letal, com uma sobrevida menor que 5% além dos 5 anos, quando tratados com cirurgia ou radioterapia. Devido à sua raridade o carcinoma inflamatório é muitas vezes diagnosticado como mastites ou dermatite generalizada.

BIOMARCADORES CLÁSSICOS

Receptores de Estrogênio

A expressão do receptor de estrogênio (RE) é sem dúvida o mais importante biomarcador em câncer

de mama, pois ele fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino.

Tumores RE-positivos usam o esteroide hormonal estradiol como seu principal estímulo para crescimento; RE é, portanto, o alvo direto das terapias endócrinas. Diferentes estudos confirmam que os pacientes com doença RE-negativo não têm nenhum benefício durante 5 anos tratamento adjuvante com tamoxifeno, mas algum benefício pode ser obtido no grupo de RE-negativo e tumores de mama que expressam o receptor de progesterona (RPg). O tratamento com tamoxifeno reduz a taxa anual de morte por câncer de mama em 31% na doença de RE positivo.

Embora a ausência ou a presença do RE é utilizado para obtenção de decisões sobre o tratamento, pouca atenção tem sido dada sobre o valor dos níveis de expressão quantitativa como um indicador preditivo. Evidências a partir de 1970 sugerem uma correlação direta entre os níveis de expressão dos RE e resposta à terapia endócrina³⁵. O Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group relatou que os níveis mais elevados de RE foram associados a um menor risco de recorrência quando receberam tamoxifeno adjuvante³⁶. Resultados similares foram obtidos no estudo NSABP-14 usando o ensaio de ligante e de expressão de mRNA do RE³⁷. Análises mais recentes de grandes ensaios prospectivos adjuvantes com tamoxifeno, anastrozol, isoladamente ou em combinação (ATAC) e BIG 1-98 (Letrozol versus Tamoxifeno), comparando inibidores da aromatase com o tamoxifeno não encontraram um subgrupo de pacientes RE-positivos que tenham um maior benefício dos inibidores da aromatase versus tamoxifeno³⁸⁻⁴⁰. Os ensaios revelaram, no entanto, que níveis mais altos de RE foram relacionadas à melhoria do resultado dos dois tratamentos endócrinos.

Receptor de Progesterona

A expressão do Receptor de Progesterona (RPg) é fortemente dependente do presença de RE. Tumores expressando RPg mas não o RE são incomuns e representam 1% de todos os casos de câncer de mama⁴⁰. Por esta razão, tumores com expressão RPg e falta de expressão do RE devem passar por um novo teste para avaliar o RE e eliminar a possibilidade de falso negativo. Nos raros casos de expressão apenas RPg, alguns benefícios limitados com uso de tamoxifeno foram descritos, por isto a terapia endócrina é ainda amplamente recomendada.

Há evidências de que no câncer de mama metastático a resposta ao tratamento anti-estrogênio é melhor entre pacientes com tumores que expressam tanto RE e RPg versus aqueles que apenas mostram positividade RE, mas falta a expressão RPg.

HER-2

O receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) pertence à família dos receptores de crescimento. A sua expressão tem sido associada a maior agressividade biológica do tumor e a resistência a alguns tipos de tratamento⁵⁰⁻⁵¹.

O HER-2 codifica uma proteína de membrana das células tumorais que faz que estas se desenvolvam mais rápido e aumentem a sua duplicação, tornando os tumores mais agressivos⁴²⁻⁴³. Diversos estudos têm sugerido que existe uma relação entre o estado HER-2 e a resistência hormonal⁴⁴⁻⁴⁵. A presença do HER-2 está associado a maior risco de recidiva tumoral⁴⁶ e desempenha um papel fundamental na transformação oncológica⁴²⁻⁴³. O receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) é amplificado em 15% a 25% dos casos de câncer de mama humano.⁴²⁻⁴⁷⁻⁴⁸. Amplificação do HER-2 ou superexpressão são reconhecidos como importantes marcadores de doença agressiva e são os alvos moleculares para terapias específicas, como trastuzumab e lapatinib⁴⁹.

A avaliação diagnóstica do estado HER-2 tem grande impacto nas decisões sobre o tratamento de pacientes com câncer de mama. Além do valor prognóstico de HER-2, ou seja, o comportamento mais agressivo dos tumores HER-2 positivo, a positividade possui um grande valor preditivo em relação aos benefícios clínicos a serem obtidos com tratamentos específicos⁴⁹.

BIOMARCADORES EMERGENTES

Ki67 e MIB-1

Ki-67 é uma proteína nuclear que não é expressada nas células em repouso (G0), mas pode ser detectada na fase G1 e M do ciclo celular. Sua utilização como um marcador de proliferação celular mostrou que o percentual de células positivas para Ki-67 pode ser usado para estratificar pacientes como de bom prognóstico ou grupos de mal prognóstico⁵²⁻⁵³. A anticorpo monoclonal MIB-1 reconhece o Ki-67, e pode ser usado em peças fixadas

em formalina, ou em seções do tecido de blocos de parafina. Vários estudos têm sugerido que o MIB-1 pode ter maior valor preditivo do que anti-Ki-67⁵⁴.

A proteína Ki67 é universalmente expressa entre as células em proliferação e ausente em células em repouso o que levou à maior avaliação do Ki67 como um marcador de proliferação. Embora pouco se saiba sobre a função exata da proteína na divisão celular, Ki67 é expressa durante as fases do ciclo celular G1, S, G2, com um pico durante o mitose e ausência na fase G0⁵⁴.

O Ki67 pode ser considerado como um fator de proliferação facilmente avaliado e reprodutível e pode ser uma alternativa ou complemento ao grau histológico como uma ferramenta de prognóstico e para a seleção de tratamento adjuvante⁵⁵. Foi demonstrado o valor prognóstico de Ki67 em pacientes com câncer de mama e linfonodos negativos, mas também revela que o impacto prognóstico é restrito a tumores RE positivos e grau histológico 2⁵⁵.

Existem muitos marcadores de proliferação, mas o Ki67 tem um preço acessível, uma técnica de fácil avaliação e reprodutível, e também tem a vantagem de que ele pode ser avaliado em blocos de parafina de material do tumor⁵⁵.

Ciclina D1

Segundo as atuais evidências disponíveis, a Ciclina D1 está solidamente estabelecida como um oncogene com um papel patogênico importante no câncer de mama e outros tumores humanos. No entanto, os mecanismos celulares através dos quais a Ciclina D1 aberrante se expressa nas neoplasias humanas não são bem estabelecidos. De fato, a evidência emergente sugere que a Ciclina D1 pode atuar, predominantemente, ou pelo menos em parte, através de vias que não envolvem a sua função amplamente aceita como um regulador do ciclo celular. Embora a exploração terapêutica do papel da Ciclina D1 como modulador molecular de câncer de mama é promissor, sugere-se também que a segmentação direta do gene Ciclina D1 ou produtos de genes pode revelar-se melhor sucedidas do que as abordagens que dependem de conhecimento, sem dúvida incompleta dos mecanismos oncogênicos da Ciclina D1⁵⁸.

Ciclina D1 é abundante no mRNA e esta proteína é expressa em mais de 50% dos casos de câncer de mama, incluindo 15% em que existe uma ampli-

ficação do gene⁵⁹. Em particular, Ciclina D1 tem a capacidade de regular a proliferação das células estrogênio responsivos⁶⁰, e tem uma forte correlação com o receptor de estrogênio e receptor de progesterona⁶¹. É importante salientar que, embora haja fortes evidências que demonstram que a superexpressão de Ciclina D1 é um fator prognóstico de melhor resultado em câncer de mama invasivo, em particular entre os tumores receptores de estrogênio positivos⁶², a sua amplificação é associada com recidiva precoce e pior prognóstico⁶³. Um possível valor preditivo da Ciclina D1 em pacientes que tem tumores com receptores hormonais positivos foi mostrado recentemente, indicando que a superexpressão, bem como a amplificação é um preditor de má resposta aos tratamentos antiestrogênio⁶⁴. A Ciclina D1 merece maior investigação neste contexto.

Ciclina E

Ciclina E age de forma semelhante a Ciclina D1 como regulador positivo da transição do ciclo celular com níveis de pico de expressão da proteína e formação de complexo enzimático com ciclina quinase dependente, na fase G1⁶⁵.

Amplificação do gene da ciclina E tem sido detectado em várias linhas celulares de câncer de mama, e até o momento não há fortes indícios de que ciclina E tem um papel importante na tumorigênese⁶⁶.

Em relação ao papel da ciclina E no ciclo celular sugere-se que níveis mais elevados podem alterar a resposta a quimioterapia e a hormonioterapia. Foi demonstrado que os níveis alterados aumentam a sensibilidade das células de câncer de mama aos efeitos da cisplatina e paclitaxel⁶⁷, mas por outro lado, facilitam a resistência a antiestrogênios⁶⁸. Estes resultados devem ser validados em estudos prospectivos.

ER β

Descoberto pela primeira vez em 1996, o Receptor de estrogênio β (ER β) é frequentemente expresso em células de diferentes órgãos. Embora os dois subtipos do receptor de estrogênio são codificados por genes diferentes, localizadas em dois cromossomos diferentes, eles têm muito em comum estruturalmente. O ER β tem a capacidade de mediar efeitos, as vezes opostos ao Receptor de Estrogênio α (ER α) devido a diferentes regiões de ligação⁶⁹.

Um papel de ER β na tumorigênese tem sido sugerido devido à sua significativa regulação do câncer de mama em comparação com o tecido mamário normal, em contraste com ER α ⁷⁰. A forte regulação de c-myc, um regulador do ciclo celular e transcrição, pode ser observado na presença de ER β , o que pode explicar os efeitos antiproliferativos do ER β ⁷¹.

Com a disponibilidade de anticorpos específicos foi possível relacionar os níveis de proteína ER β com bom prognóstico, aumento da sobrevida livre de doença e resposta ao tamoxifeno⁷⁰. Além disso, a expressão ER β tem sido associada à expressão de ER α e Receptor de progesterona, e em casos câncer de mama com ER α negativo o ER β é expresso em cerca de 50% dos casos⁷². Neste cenário, ER β correlaciona positivamente com o marcador de proliferação Ki67. No entanto, mais estudos são necessários antes ER β possa ser usado como uma ferramenta de diagnóstico e possível alvo da terapia.

BCL-2

Foi demonstrado que o gene do BCL-2 (células B da leucemia / linfoma 2) esta associado com o desenvolvimento do câncer de mama. A proteína codificada pelo gene BCL-2 também conhecida com bcl-2 é um membro da família bcl que regulam apoptose. Seu potencial carcinogênico foi demonstrada em modelos animais.

A presença do bcl-2 é um marcador de bom prognóstico e indica uma boa resposta ao tamoxifeno. Nos estudos de Elledge et al⁷³ a presença de bcl-2 esta correlacionada com a presença de receptores de estrogênio e com uma maior sobrevida livre de doença e também com uma melhor resposta ao tratamento com tamoxifeno.

Um estudo realizado por Hellemans et al⁷⁵ não mostrou significado prognóstico para expressão do bcl-2 nos pacientes com linfonodos negativos, mas o bcl-2 negativo foi correlacionado com menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global entre os pacientes com linfonodos positivos.

AValiação Multigênica

A busca por fatores prognósticos mais adequados tem se direcionado ao campo da genética. Perfil de expressão gênica dos tumores permite a medição de milhares de transcrições de mRNA (Ácido Ribonucleico mensageiro) em um único experimento utilizando microarrays de DNA (Ácido desoxirribonucleico). A recente declaração de consenso de St Gallen fornece a visão que o uso de um ensaio validado multigênico de perfil é justificado como um adjuvante de alta qualidade de fenotipagem de câncer de mama em casos em que a indicação para quimioterapia adjuvante permanece incerto⁷⁶.

No câncer de mama, os resultados dos estudos de perfis multigênico indicaram a existência de um número de doenças neoplásicas molecularmente distintas, que parecem se originar de diferentes tipos celulares. Perou et al. (2000)¹⁰ foram os primeiros a distinguir quatro classes moleculares de câncer de mama com a sua classificação com base no receptor do hormônio e o estado do HER-2: câncer luminal, que são quase todos RE positivo, expressam citoqueratina 8 e 18 típica da glândula mamária, e são divididas em luminal A, que são na sua maioria grau histológico baixo, e luminal B, que tendem a ser de alto grau com um pior prognóstico; cânceres HER-2-positivo, que não expressam receptores hormonais e são de mau prognóstico; cânceres basallike de mama, que se apresentam com RE, RPg, e HER2-negativo (triplo negativos) tumores com um prognóstico pobre e expressão das citoqueratinas da camada basal epitelial (CK 5 / 6, CK 17)⁷⁷.

Vários grupos compreenderam o desafio de desenvolver testes com base no perfil genômico com a expectativa de que isto poderia prever melhor o resultado clínico que os marcadores clínicos e patológicos (Tabela 2). A assinatura de 70 genes chamada MammaPrint foi desenvolvida utilizando amostras congeladas de um grupo de 78 pacientes. Estes foram selecionados, retrospectivamente, com linfonodo negativo, câncer de mama com menos de 5 cm, sem quimioterapia adjuvante e menores de 55 anos⁷⁸. O estudo dos 70 genes permitiu classificar os tumores com precisão em tumores de mal ou bom prognóstico, dados que foram significativamente correlacionados com os resultados clínicos (metástases a distancia no prazo de 5 anos). A assinatura foi validada retrospectivamente em um conjunto de 295 pacientes, incluindo ambos os linfonodos positivos e negativo.

FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; RE, receptor de estrogênio; MD, Metástase a distancia; IA, inibidor da aromatase.

Tabela 2

Parâmetros multigênicos em câncer de mama.

Assinatura Gênica	Número de genes estudados	Tipo de Tecido	Aplicação	Trials
MammaPrint	70	Fresco congelado	Prognóstico para recorrência dentro de cinco anos em todas as pacientes linfonodo-negativo e linfonodo-positivo	MINDACT
Oncotype DX	21	FFPE	Risco residual de MD em pacientes RE-positivos tratadas com tamoxifeno ou IA e preditiva de benefício de quimioterapia nas pacientes com linfonodos-negativos e RE-positivos.	TAILORx
Genomic-grade index	97	Originalmente Fresco congelado, Validado por FFPE	Previsão de prognóstico de recaída no tratamento endócrino dos casos RE-positivos	
Molecular grade index	5	FFPE	Prevê mau resultado, apesar da terapêutica endócrina em casos de câncer de mama com RE-positivos	
Rotterdam signature	76	Fresco congelado	Prognóstico para desenvolvimento de MD dentro de cinco anos	

O FDA (Food and Drug administration) aprovou o MammaPrint para uso clínico como um teste prognóstico para as mulheres com idade de 61 anos ou menos com qualquer RE-positivo ou RE-negativos e linfonodos negativos, mais um estudo prospectivo para validação e determinar sua utilidade clínica está a recrutando pacientes. Este estudo em doentes com linfonodos negativos pode evitar quimioterapia adjuvante (MINDACT). Espera-se que se incluam 6.000 pacientes com câncer de mama que terão uma avaliação de risco utilizando fatores clinicopatológicos (Adjuvant! Online) e do perfil dos 70 genes. Pacientes receberão quimioterapia adjuvante se ambos os testes predizerem alto risco e se ambos indicam um baixo risco não será prescrito nenhuma quimioterapia. Em caso de discordância de resultados, os pacientes serão randomizados para seguir um ou outro tratamento⁷⁹.

A assinatura Oncotype DX foi projetada para prever melhor o risco de recorrência distante em pacientes com RE-positivo câncer de mama precoce recebendo tamoxifeno. Este teste é baseado na medição em tempo real da expressão de 16 genes com significado conhecido na câncer de mama e de 5 genes de referência (Tabela 3). A pontuação de recorrência (PR) é calculado por um algoritmo matemático, que foi desenvolvido e criado utilizando amostras dos braços do tamoxifeno NSABPB20 e B-14⁸⁰. A PR é uma medição contínua de risco, mas geralmente tem sido usada para identificar três grupos com um baixo, intermediário, e alto risco de recorrência à distância, que foram associados a 10%, 10-30%, e >30% de taxas de recorrência em 10 anos entre as pacientes tratadas com tamoxifeno. A PR tem sido descrita para ser preditivo de sobrevida global e metástase a distância independente de idade e do tamanho do tumor.

Tabela 3

Listagem dos 21 genes usados pelo Oncotype DX para calcular o índice de recorrência : 16 genes relacionados com câncer e 5 genes de referência.

Factor	Gene
Proliferação	Ki67
	STK15
	Survivin
	Cyclin B1
	MYBL2
Estrogênio	ER
	RPg
	BCL2
	SCUBE2
Invasão	Stromelysin 3
	Cathepsin L2
HER-2	GRB7
	HER2
Outros	GSTM1
	CD68
	BAG1
Referência	b-Actin
	GADPH
	RPLPO
	GUS
	TFRC

CONCLUSÃO

O fato de que o câncer de mama não é um câncer homogêneo, mas consiste em vários subtipos diferentes com diferentes perfis moleculares, comportamento biológico, e vários perfis de risco representa um desafio para o manejo clínico.

Fatores prognósticos e preditivos constituem ferramentas importantes para a individualização da terapia do câncer de mama objetivando fornecer tratamentos eficientes a pacientes com excelente perfil de baixo risco evitando assim indesejáveis efeitos colaterais e muitas vezes tratamentos excessivos.

Os marcadores clinicopatológicos estabelecidos, e especialmente o RE e o HER-2, têm claramente definidos sua aplicabilidade clínica, porém deficiências nas metodologias de avaliação podem ainda afetar a sua utilização. Ferramentas adicionais são necessárias para facilitar a tomada de decisões clínicas por este motivo os avanços mais recentes apontam na direção de estabelecer o perfil gênico dos tumores classificando as pacientes de acordo com o risco que tem para o desenvolvimento de metástase a distância ou de acordo com a resistência a terapêutica atualmente disponível.

Ainda falta muito para conhecer sobre a função específica dos marcadores biológicos presentes nos casos de cancer de mama entretanto o conhecimento adquirido nos últimos anos será de grande valor para criar terapias alvo específicas que possam individualizar o tratamento do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer (INCA), Ministério da Saúde. Estimativa 2010, Incidência do Câncer no Brasil. INCA 2010
2. Kock HA, Peixoto JE, Neves ALE. Análise da infra-estrutura para a mamografia. *Radiol Bras* 2000;33:23-9.
3. Clark GM. Prognostic and predictive factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editors. *Diseases of breast*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.461-70.
4. Andreopoulou E, Hortobagyi GN. Prognostic Factors in Metastatic Breast Câncer: Successes and Challenges Toward Individualized Therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:3660–2.
5. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Thun, MJ. Câncer statistics, 2009. *Câncer J Clin*. 2009;59:225–49.
6. Masood S. Prognostic/predictive factors in breast câncer. *Clin Lab Med*.2005;25:809–25.
7. Jensen EV, Jacobson HI. Biological activities of steroids in relation to câncer. In Pincus G, Vollmer EP (eds): *Fate of Steroidal Estrogens in Target Tissues*. New York: Academic Press 1962; 161-74
8. Thorpe SM. Estrogen and progesterone receptor determinations in breast câncer. *Technology, biology and clinical significance*. *Acta Oncol* 1988; 27: 1-19.
9. Fitzgibbons et al. Prognostic Factors in Breast Câncer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*—Vol 124, July 2000
10. Perou CM, et al. Molecular Portraits of Human Breast Tumor. *Nature* 2000;406 (6797):747-752
11. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node estado, and survival in 24,740 breast câncer cases. *Câncer*. 1989;63:181–187.
12. Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, et al. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast câncer (T1a,b N0 M0). *Câncer*. 1995;76:2266–2274.
13. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow up. *J Clin Oncol*. 1993;11:2090–2100.
14. Sloane JP. National coordinating group for breast screening pathology: consistency of histopathological reporting of breast lesions detected by screening. *Eur J Câncer*. 1994;30A:1414–1419.
15. Cady B. Use of primary breast carcinoma characteristics to predict lymph node metastases. *Câncer*. 1997;79:1856–1861.
16. Seidman JD, Schnaper LA, Aisner SC. Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis. *Câncer*. 1995;75:65–71.
17. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project Protocol B-06: 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Câncer*. 1993;71:2507–2514.
18. Veronesi U, Galimberti V, Zurrada S, et al. Prognostic significance of number and level of axillary nodal metastases in breast câncer. *Breast*. 1993;2:224–228.
19. Rakha EA, et al. Breast câncer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Câncer Res*. 2010;12(4):207.
20. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast câncer I. The value of histological grade in breast câncer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 19:403-410.
21. Pathology Reporting of Breast Disease: A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's Guidelines for pathology Reporting in Breast Câncer Screening and the Second Edition of The Royal College of Pathologists' Minimum Dataset for Breast Câncer Histopathology. Sheffi eld; NHS Câncer Screening Programmes and The Royal College of Pathologists; January 2005.
22. Tavassoli FA, Devilee P: World Health Organization classification of tumours. In *Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2003:19-23.
23. Sundquist M, Thorstenson S, Brudin L, Nordenskjold B: Applying the Nottingham Prognostic Index to a Swedish breast câncer population. South East Swedish Breast Câncer Study Group. *Breast Câncer Res Treat* 1999, 53:1-8.

24. Saimura M, Fukutomi T, Tsuda H, Sato H, Miyamoto K, Akashi-Tanaka S, Nanasawa T: Prognosis of a series of 763 consecutive node-negative invasive breast cancer patients without adjuvant therapy: analysis of clinicopathological prognostic factor. *J Surg Oncol* 1999, 71:101-105.
25. Lundin J, Lundin M, Holli K, Kataja V, Elomaa L, Pylkkanen L, Turpeenniemi-Hujanen T, Joensuu H: Omission of histologic grading from clinical decision making may result in overuse of adjuvant therapies in breast cancer: results from a nationwide study. *J Clin Oncol* 2001, 19:28-36.
26. Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, Pandya KJ, Page DL, Robert NJ: Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol* 2000, 18:2059-2069.
27. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO: The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992, 22:207-219.
28. Mook S, Schmidt MK, Rutgers EJ, van de Velde AO, Visser O, Rutgers SM, Armstrong N, van't Veer LJ, Ravdin PM: Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2009, 10:1070-1076.
29. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ: Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009, 20:1319-1329.
30. Adair F, Berg J, Joubert L, Robbins GF: Long term follow-up of breast cancer patients: the 30 year report. *Cancer* 1974;33:1145-50.
31. Ketterhagen JP, Quakenbush SR, Haushalter RA: Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 1984;158:120-3.
32. Diab SG, Clark GM, Osborne CK, Libby A, Allred DC, Elledge RM: Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol*.1999;17:1442-1448.
33. Page DL, Jensen RA, Simpson JF: Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Br Cancer Res Treat*. 1998;51:195-208.
34. Wong SL, Chao C, Edwards MJ, et al. Frequency of sentinel lymph node metastases in patients with favorable breast cancer histologic subtypes. *Am J Surg*. 2002;184:492-498.
35. Byar DP, Sears ME & McGuire WL: Relationship between estrogen receptor values and clinical data in predicting the response to endocrine therapy for patients with advanced breast cancer. *European Journal of Cancer* 1979; 15 299-310.
36. Anonymous: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998; 351 1451-1467.
37. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2004; 351 2817-2826.
38. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hockin-Boes G, Houghton J, Locker GY, Tobias JS et al. Results of the ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005; 365 60-62.
39. Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C, Cuzick J, Houghton J, Williams N, Mallon E et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the arimidex, tamoxifen, alone or in combination trial. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26 1059-1065.
40. Viale G, Regan MM, Maiorano E, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, Rasmussen BB, Raffoul J, Neven P, Orosz Z, Bray S et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25 3846-3852.

41. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, Ravdin P, Martino S & Osborne CK Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (RPg), by ligandbinding assay compared with ER, RPg and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *International Journal of Cancer* 2000; 89 111–117
42. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
43. Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, Hazan R, Ullrich A, King CR, Schlessinger J, Aaronson SA. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 1987; 51:1063-1070
44. Benz CC, Scott GJ, Sarup JC et al: Estrogen-dependent tamoxifen-resistant Tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER-2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 24:85-95
45. Fernandez MJ, Farina GJ, Arangoncillo BP: Immunohistochemical expression of p-53 and c-ERβ-2 in breast carcinoma: relation with epidemiologic factors, histologic features and prognosis. *Gen & Diagnostic Pathol* 1997; 142: 289-96
46. Press MF, Berstein L, Thomas PA et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997;15[8]:2894-2904.
47. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230:1132-1139
48. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang H-J, Beryt M, Seshadri R, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor positive primary breast cancer. *J Natl Cancer inst* 2003; 95: 142-153.
49. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-1672.
50. Ferrero-Pous M, Hacene K, Bouchet C et al. Relationship between c-ERβB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin. Cancer Res* 2000; 6:4745–4754.
51. Toikkanen S, Helin H, Isola J Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992;10: 1044–1048.
52. Brown RW, Allred DC, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. Prognostic value of Ki67 compared to S phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2:585–592.
53. Molino A, Micciolo R, Turazza M, et al. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: association with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer.* 1997;74:433–437.
54. Connor AJM, Pinder SE, Elston CW, et al. Intratumoral heterogeneity of proliferation in invasive breast carcinoma evaluated with MIB-1 antibody. *Breast.* 1997;6:171–176.
55. Marie K., Par-Ola B., Dorthe G., Kristina L., Per M., Marten F, for the South Sweden Breast Cancer Group. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor estado and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. *Modern Pathology.* 2010; 23, 251–259
56. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M: Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer* 1991, 68:2142-2149.
57. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, Blamey RW, Ellis IO: Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008, 26:3153-3158.
58. Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 2005 Jun 20;23(18):4215-24.

59. Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R, Daly RJ & Sutherland RL 2003 Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 78. 323–335.
60. Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaker R, van der Sman J, Bernardis R & Michalides RJ 1997 CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88 405–415.
61. Jares P, Rey MJ, Fernández PL, Campo E, Nadal A, Muñoz M, Mallofré C, Muntané J, Nayach I, Estapé J et al. 1997. Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status. *Journal of Pathology* 182 160–166.
62. Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G & Barnes D 1996 Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *International Journal of Cancer* 69 92–99.
63. Bièche I, Olivi M, Nogue's C, Vidaud M & Lidereau R 2002 Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays. *British Journal of Cancer* 86 580–586.
64. Jirstrom K, Stendahl M, Ryde'n L, Kronblad A, Bendahl PO, Sta'pl O & Landberg G 2005 Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Research* 65 8009–8016.
65. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR & Roberts JM 1992 Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257 1689–1694.
66. Bortner DM & Rosenberg MP 1997 Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. *Molecular and Cellular Biology* 17 453–459.
67. Smith ML & Seo YR 2000 Sensitivity of cyclin E-overexpressing cells to cisplatin/taxol combinations. *Anticancer Research* 20 2537–2539.
68. Akli S & Keyomarsi K 2004 Low-molecular-weight cyclin E: the missing link between biology and clinical outcome. *Breast Cancer Research* 6 188–191.
69. Liu Y, Gao H, Marstrand TT, Stro'm A, Valen E, Sandelin A, Gustafsson JA & Dahlman-Wright K 2008 The genome landscape of ER α - and ER β -binding DNA regions. *PNAS* 105 2604–2609.
70. Skliris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, Lane S, Horgan K, Lansdown MR, Parkes AT, Hanby AM, Markham AF et al. 2003 Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *Journal of Pathology* 201 213–220.
71. Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J & Gustafsson JA 2004 Estrogen receptor beta inhibits 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *PNAS* 101 1566–1571.
72. Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH & Murphy LC 2006 Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *British Journal of Cancer* 95 616–626.
73. Elledge RM, Green S, Howes L, et al. bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1997;15:1916–1922.
74. Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, et al. Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 1995;72:354–360.
75. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B & Senn H-J 2009 Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Annals of Oncology* 20 1319–1329.
76. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS et al. 2001 Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 98 10869–10874.
77. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT et al. 2002 Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 530–536.

78. Bogaerts J, Cardoso F, Buyse M, Braga S, Loi S, Harrison JA, Bines J, Mook S, Decker N, Ravdin P et al. 2006 Gene signature evaluation as a prognostic tool: challenges in the design of the MINDACT trial. *Nature Clinical Practice. Oncology* 3 540–551.
79. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T et al. 2004 A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen treated, node-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine* 351 2817–2826.
-