

Carcinoma mamário ductal invasor: correlação da expressão imunoistoquímica de AXL e β -catenina com a agressividade tumoral

Invasive ductal breast carcinoma: correlation of AXL and β -catenin immunohistochemical expression with tumor aggressivity

Lucas Gennaro¹, Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas¹, Rafael Koerich Ramos¹, Ana Maria Waaga-Gasser^{2,3}, Luiz Martins Collaço¹, Marcos Fabiano Sigwalt¹, Jurandir Marcondes Ribas-Filho¹, Luiz Fernando Kubrusly¹

RESUMO

Introdução: O carcinoma ductal invasor corresponde ao tipo histológico mais comum da mama coexistindo com formas diferentes de evolução clínica, graduação histológica, expressão de determinados marcadores teciduais e perfis genômicos que procuram melhor entendimento da doença.

Objetivo: Analisar a correlação dos marcadores β -catenina e AXL com a agressividade tumoral, tendo como referência a sobrevida global, progressão tumoral e fatores prognósticos histopatológicos.

Método: Foi realizado estudo de 101 amostras de carcinoma mamário ductal invasor. Foram incluídas aquelas com diagnóstico do tipo ductal, submetidas inicialmente à biópsia ou tratamento cirúrgico definitivo. Incluiu-se para fins de controle 20 amostras de carcinoma intraductal, 35 de fibroadenoma mamário e 10 de tecido mamário sem qualquer alteração. Foram excluídos os submetidos à quimioterapia neoadjuvante, que não tivessem amostra tumoral prévia ao tratamento quimioterápico, que perderam o seguimento, e com dados incompletos.

Resultado: Quando analisada a expressão da β -catenina, foi negativa. Quanto ao AXL foram observados diferentes graus de expressão sem significância estatística entre eles.

Conclusão: Quando analisados adenocarcinoma mamário do tipo ductal invasor em TMA não houve correlação na expressão de β -catenina e AXL quando comparados a sobrevida global, progressão tumoral e grau histológico.

PALAVRAS-CHAVE: Carcinoma ductal de mama. Imunoistoquímica. AXL. β -catenina.

Mensagem Central

O carcinoma ductal invasor corresponde ao tipo histológico mais comum da mama coexistindo com formas diferentes de evolução clínica, graduação histológica, expressão de determinados marcadores teciduais e perfis genômicos que procuram melhor entendimento da doença. Este estudo procurou analisar a correlação dos marcadores β -catenina e AXL com a agressividade tumoral, tendo como referência a sobrevida global, progressão tumoral e fatores prognósticos histopatológicos.

Perspectiva

Tendo em vista os dados atuais de incidência, prevalência e mortalidade pelo câncer de mama, faz-se necessário a busca por novos marcadores que possam ser utilizados como indicadores de gravidade ou evolução clínica desfavorável, orientando o uso de modalidades distintas de tratamento, bem como o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Sabe-se que β -catenina e AXL estão relacionadas aos processos de regulação e crescimento celular e, a expressão aberrante de ambos, relacionada a carcinogênese. Contudo, Quando analisados adenocarcinoma mamário do tipo ductal invasor em TMA não houve correlação na expressão de β -catenina e AXL quando comparados à sobrevida global, progressão tumoral e grau histológico.

ABSTRACT

Introduction: Invasive ductal carcinoma corresponds to the most common histological type of the breast, coexisting with different forms of clinical evolution, histological grading, expression of certain tissue markers and genomic profiles that seek a better understanding of the disease.

Objectives: To analyze the correlation of β -catenin and AXL markers with tumor aggressiveness, with reference to overall survival, tumor progression and histopathological prognostic factors.

Methods: A study of 101 samples of invasive ductal mammary carcinoma was performed. Those with a diagnosis of ductal type, initially submitted to biopsy or definitive surgical treatment, were included. For control purposes, 20 samples of intraductal carcinoma, 35 of breast fibroadenoma and 10 of breast tissue without any alteration were included. Those undergoing neoadjuvant chemotherapy, those without a tumor sample prior to chemotherapy, those lost to follow-up, and those with incomplete data, were excluded.

Results: When the β -catenin expression was analyzed, it was negative. As for AXL, different degrees of expression were observed without statistical significance between them.

Conclusion: When analyzing invasive ductal breast adenocarcinoma in TMA, there was no correlation in the expression of β -Catenin and AXL when compared to overall survival, tumor progression and histological grade.

KEYWORDS: Breast ductal carcinoma. Immunohistochemistry. AXL. β -Catenin.

¹Instituto Presbiteriano Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil;

²Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Molecular Oncology and Immunology and Renal Division, Boston, MA, USA;

³Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Conflito de interesse: Nenhum | Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001 | Recebido em: 29/07/2024 | Aceito em: 22/10/2024 | Correspondência: lcsgennaro@gmail.com | Editor Associada: Nerlan Tadeu Gonçalves de Carvalho

Como citar:

Gennaro L, Ribas CAPM, Ramos RK, Waaga-Gasser AM, Collaço LM, Sigwalt MF, Ribas-Filho JM, Kubrusly LF. Carcinoma mamário ductal invasor: correlação da expressão imunoistoquímica de axl e β -catenina com a agressividade tumoral. BioSCIENCE. 2024;82:e0069

INTRODUÇÃO

As neoplasias de forma geral ocorrem devido às mutações do material genético celular, alterando diversas funções e, desta forma, a divisão celular processa-se de modo anormal, dando origem aos tumores.¹ O câncer de mama, assim como os demais tumores, é doença heterogênea, podendo ser dividida em diferentes subtipos clínicos e histológicos.² Nas mulheres ele corresponde à principal neoplasia maligna (excetuando-se os tumores de pele não-melanoma). É importante notar que os dados publicados pelo Instituto Nacional de Câncer também alertam que o seu diagnóstico ocorre, na maioria dos casos, em estádios clínicos III (44,8%) e IV (16,3%),³ ou seja, em fases avançadas da doença. Considera-se esta realidade preocupante em razão da maior necessidade, nesses casos, de tratamentos agressivos e de alto custo que envolvem quimioterapia, radioterapia e operações radicais.^{4,5}

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

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

O ductal infiltrante corresponde a aproximadamente 75% dos casos. São relatadas massas ovaladas, lobuladas ou irregulares e com contornos variáveis que podem ser bem definidos, indefinidos ou ainda espiculados.⁶ Ele se manifesta, em geral, como massa espiculada e irregular associado a tecido fibroso denso no estroma, dando ao tumor consistência endurecida. Esse crescimento se apresenta na forma de nódulos, que à palpação pode revelar aderência às estruturas adjacentes ou à parede torácica, e retração da pele e mamilo, distorcendo a estrutura glandular.⁷

O lobular invasivo pode se apresentar de forma multicêntrica e bilateral. A maioria das pacientes tem apenas adensamento ou endurecimento local mal definido, por vezes, surgindo como área nodular palpável. Em lesões avançadas, pode haver retração de pele. Em relação ao prognóstico e ao padrão de comprometimento axilar, apresenta comportamento semelhante ao carcinoma ductal invasivo.⁸

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

Outros fatores prognósticos têm sido alvo de pesquisa nas últimas décadas. Dentre eles, pode-se destacar os receptores de hormônio (estrogênio e progesterona) e o receptor do fator de crescimento humano – 2 (Human Epidermal growth factor Receptor type 2, HER-2). Assim, lesões consideradas receptores de estrogênio e progesterona positivos predizem boa resposta dos tumores a algum tipo de terapia hormonal. No entanto, tumores receptores de estrogênio (RE) negativo,

apresentam maior taxa de recorrência nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. Já a superexpressão de HER-2 está associada ao prognóstico pior quando não consideradas as modalidades terapêuticas atualmente disponíveis.

Ainda assim, os parâmetros clínicos, histológicos, receptores hormonais e HER-2 nem sempre podem prever de forma adequada a evolução do câncer de mama. Dessa forma, fatores prognósticos adicionais têm sido pesquisados visando melhor estratificar os tumores do ponto de vista de agressividade, progressão e recorrência, a fim de individualizar condutas terapêuticas. Nesse sentido, a avaliação do perfil tumoral com base nos achados moleculares (Luminal A, Luminal B, HER-2 e basaloide), de expressão genética (Oncotype Dx, MammaPrint e Predictor Analysis of Microarray) e novos biomarcadores teciduais, entre eles, β -catenina e AXL, tem-se mostrado promissor.^{9,10}

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

MÉTODO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da IES, sob o parecer de número 1.999.671 e realizada em parceria com Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School Molecular Oncology and Immunology and Renal Division, Boston, USA, estando de acordo com os preceitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS). É estudo observacional, unicêntrico, analítico e retrospectivo.

Características da amostra

Trata-se da avaliação de 101 amostras de carcinoma mamário do tipo ductal invasor. Foram incluídas aquelas com diagnóstico do tipo ductal, submetidas inicialmente à biópsia ou tratamento cirúrgico definitivo (resseção segmentar ou mastectomia radical modificada); incluiu-se, também, para fins de controle 20 amostras de carcinoma intraductal, 35 de fibroadenoma mamário e 10 de tecido mamário sem qualquer alteração. Foram excluídas as submetidas à quimioterapia neoadjuvante, que não tivessem amostra tumoral prévia ao tratamento quimioterápico, que perderam o seguimento, e com dados incompletos

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

Materiais

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

Análise estatística

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

RESULTADO

A análise apresentada foi realizada com base nos dados de 87 pacientes com tumor ductal invasor e que preenchiam todos os critérios de inclusão. Outros subtipos foram excluídos. Foi feito o levantamento da idade ao diagnóstico, estadiamento tumoral, sobrevida livre de doença, sinais de progressão, recidiva e/ou morte pela doença. Também foram analisados fatores histopatológicos como graduação do tumor, expressão de receptores hormonais, HER2 e os chamados subtipos substitutos com base em classificação integrativa, que sabidamente são fatores prognósticos e têm estreita relação com a evolução clínica da doença. Do total geral de 87 pacientes, 33 (37,9%) tinham menos do que 50 anos e 54 (62,1%) mais que 50. A média de idade foi 55,7+/-12,8 (32-79).

Estadio clínico, avaliação de receptores, subtipos e evolução clínica

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

Classificação TNM

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

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

Variável	n	Classificação	Resultado*
Tipo tumoral	87	Ca ductal invasor	87 (100)
Grau	87	G1	4 (4,6)
		G2	38 (43,7)
		G3	45 (51,7)
Grau		G1/G2	42 (48,3)
(G1/G2 agrupados)		G3	45 (51,7)
T (Tamanho tumoral)	87	T1 (2 cm ou menos)	14 (16,1)
		T1c	3 (3,4)
		T2	36 (41,4)
		T3	13 (14,9)
		T4	13 (14,9)
		T4a	1 (1,1)
		T4b	2 (2,3)
		T4d	3 (3,4)
		Tx	2 (2,3)
T	85	T1	36 (42,4)
T agrupado/excluindo Tx		T2	13 (15,3)
		T3	17 (20,0)
		T4	19 (22,4)
N (metástase axilar regional)	87	N0	28 (32,2)
		N1	37 (42,5)
		N2	7 (8)
		N2a	3 (3,4)
		N3	7 (8)
		N3c	1 (1,1)
		Nx	4 (4,6)
N	83	N0	28 (33,7)
(N2/N3 agrupados e excluindo Nx)		N1	37 (44,6)
		N2/N3	18 (21,7)
M (Metástase à distância)	87	M0	73 (83,9)
		M1	7 (8)
		Mx	7 (8)
M	87	M0	80 (92,0)
(Mx/M0 agrupados)		M1	7 (8,0)
Tamanho (cm)	76		3,6±2,4 (0,8-15)
		<2	15 (19,7)
		2 a 5	45 (59,2)
		>5	16 (21,1)
Estadio clínico	85	IA	9 (10,6)
		IIA	23 (27,1)
		IIB	18 (21,2)
		IIIA	13 (15,3)
		IIIB	9 (10,6)
		IIIC	6 (7,1)
		IV	7 (8,2)
Estadio clínico	85	I	9 (10,6)
(Agrupados)		II	41 (48,2)
		III	28 (32,9)
		IV	7 (8,2)

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

Grau do carcinoma mamário

A classificação histológica derivou de 3 recursos morfológicos, cada um com pontuação de 1 a 3. Em cada bloco procurou-se a primeira característica morfológica com estruturas tubulares, com lúmen claro e visível;¹¹ a segunda, foi o pleomorfismo nuclear, e a terceira a atividade mitótica, que pôde ser vista preferencialmente na periferia do tumor, onde identificava-se crescimento ativo. Vários estudos sugeriram que o grau histológico dos tumores tem forte correlação com a diferenciação tumoral e seu prognóstico.^{11,12} O sistema de classificação Nottingham, que é uma modificação do Scarff-Bloom-

Richardson^{11,13} foi utilizado na classificação do grau histológico.¹⁴

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

Tamanho do tumor

O tamanho do tumor possui alto valor prognóstico e está relacionado à agressividade da doença. Em geral, tumores maiores têm maior probabilidade de comprometimento dos linfonodos axilares, já os de menor tamanho estão relacionados a melhor prognóstico, tanto para o tempo livre de doença, quanto à sobrevida global.^{11,13}

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

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

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

Linfonodos

O status linfonodal retrata o comprometimento ou não dos linfonodos axilares por células neoplásicas. Este é fator prognóstico importante do carcinoma invasor seja para análise da sobrevida global ou sobrevida livre da doença. Além disso, existe correlação direta entre o tempo de sobrevida com o número de linfonodos comprometidos¹⁶ (Tabela 2).

Metástases

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

Receptores hormonais e subtipos substitutos

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

TABELA 3 — Localização de metástase à distância (M1)

Variável	n	Classificação	n (%)
DM local	86	Não	52 (60,5)
		Sim	34 (39,5)
Local da DM	34	Local	4 (11,8)
		Cérebro	2 (5,9)
		Pulm	2 (5,9)
		Hep/osso	2 (5,9)
		Hep	2 (5,9)
		Local/lym	2 (5,9)
		Ossos/pulm/lym	1 (2,9)
		Per	1 (2,9)
		Hep/pulm/lym	1 (2,9)
		Hep/lym	1 (2,9)
		lym	1 (2,9)
		Ossos/pulm/cérebro	1 (2,9)
		Ossos	1 (2,9)
		Pulm/cérebro	1 (2,9)
		Ossos/cérebro	1 (2,9)
		Pulm/lym	1 (2,9)
		Local/pulm/lym	1 (2,9)
		lym/pulm	1 (2,9)
		Local/cérebro	1 (2,9)
		Cérebro/local	1 (2,9)
		Ossos/pulm/hep	1 (2,9)
		Hep/per	1 (2,9)
		Ossos/hep/cérebro/lym	1 (2,9)
		lym/pulm/ossos	1 (2,9)
		Hep/ossos/per	1 (2,9)
		Ossos/hep	1 (2,9)

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

Variável	n	Classificação	n (%)
HER2	65	Negativo	51 (78,5)
		Positivo	14 (21,5)
Estrógeno	66	Negativo	22 (33,3)
		Positivo	44 (66,7)
Progesterona	66	Negativo	29 (43,9)
		Positivo	37 (56,1)
Ki67%	66	≤ 14	35 (53)
		> 14	31 (47)
Subtipos moleculares substitutos	65	Luminal A	30 (46,2)
		Tripla negativo	14 (21,5)
		HER2 positivo	8 (12,3)
		Luminal B	7 (10,8)
Subtipos moleculares substitutos (considerando Luminal B/HER2 como HER2 positivo)	65	Luminal A	30 (46,2)
		Tripla negativo	14 (21,5)
		HER2 positivo	14 (21,5)
		Luminal B	7 (10,8)

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

Evolução clínica

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

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

TABELA 5 — Evolução clínica

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

Classificação R

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

TABELA 6 — Tumor residual após a operação

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

Avaliação da associação entre marcadores e variáveis demográficas e clínicas

Nas Tabelas 7 a 9 são apresentados as frequência e percentuais de acordo com as combinações das

classificações de cada variável e cada marcador. Também são apresentados os valores de p dos testes estatísticos (Observação: Os percentuais foram calculados em relação ao total nas linhas).

TABELA 7 — Padrão de marcação tecidual para o AXL e β-catenina

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

* Inconclusivo sem fragmento na lâmina (SF) (n = 11); inconclusivo sem tumor no fragmento (ST) (n = 10).
** Inconclusivo SF (n = 11); inconclusivo ST (n = 9); inconclusivo (n = 1)

TABELA 8 — Distribuição do AXL por idade, grau histológico e estadió clínico

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

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

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

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

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

Análise do tempo livre de progressão – Marcadores AXL e β -catenina

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

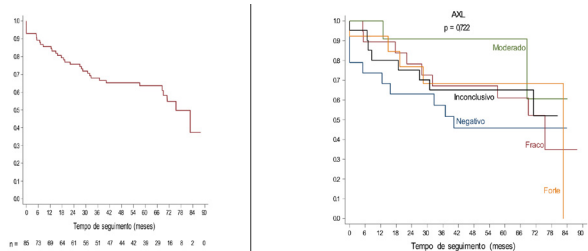


FIGURA 1 — Curvas de Kaplan-Meier para o tempo livre de progressão (geral)

Análise do tempo de sobrevida – Marcadores AXL e β -catenina

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

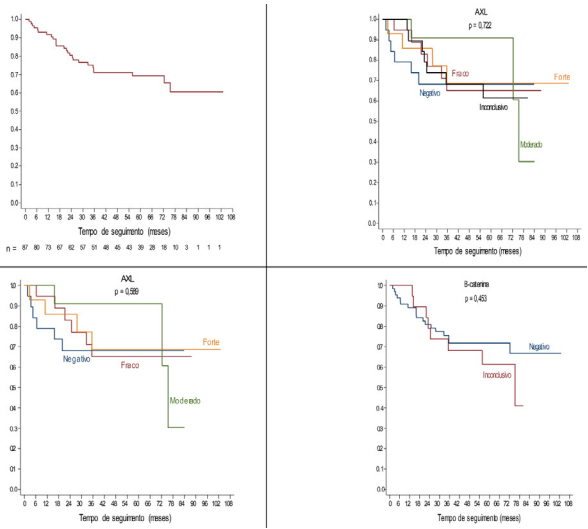


FIGURA 2 — Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida (geral): comparação dos grupos definidos pelo tipo de tumor em relação aos marcadores AXL e β -catenina

Para cada comparação de grupos e cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de que as distribuições sobre as classificações do marcador eram iguais nos grupos sob comparação, vs. a hipótese alternativa de distribuições diferentes (Tabelas 10 e 11)

TABELA 10 — Padrão de marcação do AXL por grupo tumoral: A) invasor, intraductal, fibroadenoma e controle não tumoral; B) ductal e controles não ductais; C) invasor e controles

	AXL	Grupo			
		Ductal	Intraductal	Não tumoral	Fibroadenoma
A	Negativo	19	2	2	1
		28,8%	28,6%	40,0%	71%
	Fraco	19	2	0	1
		28,8%	28,6%	0,0%	71%
	Moderado	14	2	1	6
		21,2%	28,6%	20,0%	42,9%
Total	Forte	14	1	2	6
		21,2%	14,3%	40,0%	42,9%
		66	7	5	14

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

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

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

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

$p = 0,130$ (teste de qui-quadrado, $p < 0,05$)

TABELA 11 — Padrão de marcação da β -catenina por grupo tumoral: A) invasor, intraductal, fibroadenoma e controle não tumoral; B) ductal e controles não ductais; C) invasor e controles

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

p = 0,074 (teste de qui-quadrado, p < 0,05)

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

p = 0,033 (teste de qui-quadrado, p < 0,05)

C	β -catenina	Grupo	
		Ductal	Intraductal / não tumoral / fibroadenoma
	Negativo	66 75,9%	32 55,2%

p = 0,011 (teste exato de Fisher, p < 0,05)

DISCUSSÃO

Diversos fatores associam-se ao maior risco de desenvolver o câncer de mama, dentre eles a idade, uma vez que 75% de todos os carcinomas mamários ocorrem em mulheres com idade superior a 50 anos. O fator hereditário também contribui com aumento do risco entre 1,5-3%. Além disso, também concorrem aspectos relacionados à dieta e hábitos de vida, uma vez que mulheres com índice de massa corporal superior ou igual a 31,1 têm risco 3,5 vezes maior de desenvolver a doença quando comparadas àquelas com IMC inferior ou igual a 22,6.^{2,17-19}

Quando consideram-se outros grupos etários, principalmente aqueles classificados como “jovens” (definidos com idade entre 25-40 anos), observam-se algumas particularidades nos aspectos de apresentação desse câncer e nos fatores de risco relacionados, que versam, por exemplo, sobre características biológicas e hormonais, influenciando diretamente o padrão específico tumoral.²⁰

Estudos com mulheres em faixa etária variando de 30-50 anos apontam que os grupos de idade de até 35 apresentam pior sobrevida quando comparados com outros grupos mais avançados, mas ainda em faixa de pré-menopausa,^{21,22} demonstraram o mesmo para o grupo entre 36-40 anos, também com maior frequência de metástases à distância. Esses dados podem ser justificados por estudos que relacionam o carcinoma mamário, em pacientes mais jovens, a pior prognóstico,^{23,24} muitas vezes por apresentarem tamanho tumoral maior ao diagnóstico, com menor grau de diferenciação histológica, maior acometimento linfonodal e diagnóstico em estágios mais avançados.²⁵⁻²⁸

Pacientes mais jovens também apresentam frequência de fenótipos moleculares mais agressivos,²⁷ como de HER2+ e triplo negativo e menor frequência de tumores de prognóstico mais favorável, como o Luminal A.²⁹ Por fim, e considerando os aspectos anteriormente descritos, observa-se que pacientes com menos de 40 anos também apresentaram maior taxa de morte por câncer de mama (80%) quando comparadas às mais velhas (49%) em período de acompanhamento de 15 anos.²⁵

β -catenina

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

Ao utilizar técnicas de marcação imunoistoquímica semelhante às aplicadas nesse estudo, pesquisadores avaliaram a correlação da β -catenina e seu valor prognóstico no câncer de mama, demonstrando que essa molécula de adesão se apresentava em menor quantidade no tecido mamário doente, quando comparado ao normal. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores também encontraram correlação positiva entre a expressão de β -catenina que era maior em estágios menos avançados de câncer de mama, tanto do ponto de vista da graduação histológica quanto na classificação TNM.³⁰

Segundo Li et al.³¹ as pesquisas que buscam correlacionar a expressão da β -catenina com a evolução do câncer de mama são muito controversas nos resultados. Eles a investigaram em diferentes subtipos de câncer de mama e os respectivos significados clínicos, obtendo como resultado expressão mais frequente e intensa da β -catenina no núcleo e citoplasma de células de tumores invasivos, enquanto a expressão membranosa, que era característica das células normais, estava reduzida. A expressão de β -catenina tanto no núcleo quanto citoplasma é indicativo de que a via de sinalização Wnt está ativa. No entanto, no presente estudo, as lâminas passíveis de análise não apresentaram nenhum padrão específico de marcação.

Quando analisada a expressão aberrante de β -catenina, ou seja, quando a molécula de adesão se expressou em maior quantidade no núcleo e citoplasma e comparou-se essa expressão aos subtipos de câncer de mama, em 78,95% das com subtipo triplo-negativo, apresentaram expressão aberrante da molécula, podendo indicar possível relação da β -catenina com esse subtipo da neoplasia. Uma importante hipótese sugerida pelo estudo é de que as discrepâncias entre os resultados de estudos anteriores podem estar relacionadas à falta de localização subcelular do sítio de expressão da β -catenina, uma vez que os estudos mais antigos focavam-se na expressão da molécula na membrana citoplasmática.³¹ Novamente, nesse estudo, mesmo ao avaliar o grupo correlato (tumores triplo-negativos) não foi observado qualquer marcação.

Ainda sobre o câncer de mama triplo-negativo, Xu et al.³² investigaram através de ensaios in vivo e in vitro o comportamento tumoral das células do câncer de mama e o papel desempenhado pela β -catenina neste processo. Segundo os autores, a ativação do caminho de sinalização Wnt é mais intensa no câncer de mama triplo negativo e está associada à redução na sobrevida global dos pacientes. Os pesquisadores observaram que, através do silenciamento e knock-out da β -catenina, havia redução na população celular tumoral e na expressão de genes relacionados à células-tronco. De uma forma geral, os dados obtidos na pesquisa sugerem que a β -catenina é necessária para o desenvolvimento dos

cânceres de mama triplo-negativo por controlar diversas propriedades relacionadas ao tumor, como a migração, quimiossensibilidade e o crescimento independente de ancoragem.³²

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

Sun et al.³³ avaliaram a expressão de ALDH1A1, da β -catenina e as respectivas expressões combinadas nos pacientes com câncer de mama tratados com ciclofosfamida. Novamente a expressão citoplasmática de β -catenina se mostrou mais relacionada ao câncer de mama além de estar mais expressa em tumores com maior expressão de ALDH1A1. Quando analisada isoladamente, a expressão aumentada de ALDH1A1 e da β -catenina citoplasmática, ambas mostraram-se associadas à metástase linfonodal e a pior prognóstico clínico, especialmente nos pacientes em tratamento com ciclofosfamida.³³ No presente estudo, ao analisar grupo de características semelhantes (com metástases linfonodais e/ou subgrupo de mau prognóstico), não foram observadas marcações relacionadas a expressão da β -catenina.

Além dos tumores triplo-negativos, em pesquisa anterior avaliou-se a localização da expressão de β -catenina em pacientes com outro importante subtipo de câncer de mama, o HER2 positivo. Observou-se nas que apresentavam expressão de β -catenina mais proeminentemente localizada na membrana, tinham sobrevidas livre da neoplasia e global significativamente maior. O estudo também avaliou o comportamento da β -catenina e a expressão de HER2 quanto à exposição das células ao estresse (induzido com a administração de cádmio). Essa indução fez com que a β -catenina e o HER2 mudassem sua localização em direção ao citoplasma e regiões perinucleares, dado esse já demonstrado na literatura e que relaciona a localização subcelular da β -catenina ao pior prognóstico do tumor.³⁴ Novamente, ao selecionar amostra semelhante de tumores HER2 superexpressos, nesse estudo não foram observadas marcações relacionadas à β -catenina.

Ao considerar-se também outros sítios de tumores além da mama, a expressão da β -catenina tem-se mostrado relacionada ao pior prognóstico e menor sobrevida global nos casos de carcinoma de células renais e de

células escamosas no pulmão. Em carcinomas renais, a β -catenina demonstrou ser fator prognóstico independente e relacionada a risco 4 vezes maior de mortalidade, podendo inclusive ser utilizada como ferramenta auxiliar na estratificação de risco desses pacientes.^{35,36}

Ainda sobre os carcinomas renais, Kovacs et al.³⁶ investigaram em 488 pacientes com diagnóstico de carcinoma de células renais a possível relação da expressão da β -catenina como biomarcador específico de sobrevida e concluíram que a expressão citoplasmática da β -catenina pode representar fator de mau prognóstico independente relacionado ao maior risco de progressão de doença após tratamento cirúrgico e morte relacionada ao tumor.

Conforme discutidos nos estudos acima e com base nos dados amplamente validados em outras pesquisas, a imunoistoquímica, apesar de ser método relativamente simples e disponível, possui certas particularidades que devem ser respeitadas nas diferentes etapas do processamento do material, pois a avaliação dos resultados é diretamente influenciada por fatores como a fixação inicial do espécime, a escolha adequada dos anticorpos a serem utilizados para análise bem como e, por fim, a interpretação ou leitura das lâminas.³⁷

Estudos semelhantes a esse desenvolvido - que também trazem relatos sobre falhas dos métodos de imunomarcção, ou ainda, situações em que a imunoistoquímica não contribuiu para a resolução de problemas diagnósticos - trazem, muitas vezes alguns fatores em comum. De acordo com Leong e Wright,³⁸ dentre as principais razões para que a imunoistoquímica não contribuisse para o diagnóstico final, incluíram, por exemplo, os resultados inespecíficos de determinadas colorações em alguns tumores e a fixação inadequada dos espécimes.³⁸ Outros autores também apontaram a fixação inadequada em formol como um dos principais fatores complicadores, no entanto em diferentes percentuais na avaliação global comparativamente às demais falhas relacionadas à imunomarcção. Essas diferenças possivelmente decorrem da evolução das técnicas com o passar dos anos (feitas mais recentemente de maneira automatizada), bem como dos avanços nos mecanismos de recuperação antigênica que, atualmente, são realizados de forma mais específica para cada anticorpo, reduzindo parcialmente a importância da condição de preservação do tecido e dos epítomos antigênicos na qualidade das reações imunoistoquímicas.

Ainda assim, mesmo com a evolução das técnicas relacionadas às diferentes etapas no processo de imunomarcção, os cuidados básicos com o material são essenciais e devem ser respeitados desde o início do processo. Nesse sentido, de modo geral, utiliza-se como principal solução no processo de fixação, o formol tamponado à 10%, contendo formaldeído (4%). Nessa etapa, a principal modificação molecular induzida pelo formaldeído é a formação de cross-links entre as proteínas entre si ou entre proteína e ácidos nucleicos do tecido.³⁹ A formação dessas ligações possivelmente é uma das responsáveis pelo mascaramento dos epítomos por alterar a conformação tridimensional das proteínas; no entanto, a estrutura secundária das proteínas fixadas

ainda se mantém da mesma maneira quando previamente à fixação.⁴⁰

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

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

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

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

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

na periferia, a depender do anticorpo utilizado e se o epítomo recuperado foi utilizado ou não.

Para evitar situações semelhantes, amostras de espécimes cirúrgicas destinadas a imunoistoquímica devem preferencialmente ser processadas, em fatias finas (cerca de 3 mm) e fixadas por período de 24 h para garantir a otimização na formação de cross-links em toda extensão do tecido. Para pequenos fragmentos (como nos casos de biópsias) em que a fixação por 24 h nem sempre é factível; um período mínimo de 100 min deve ser então respeitado, pois pelo menos metade da capacidade máxima de ligação do formaldeído já foi atingida.

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

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

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

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

AXL

A família de receptores tirosinaquinases (Tyro 3, Axl, MerTK) é assim definida porque cada membro dessa família possui 1 combinação extracelular de 2 domínios similares a imunoglobulinas e 2 repetições de fibronectina tipo III, sendo 1 porção transmembrana e 1 região intracelular com atividade intrínseca de tirosinaquinase.

Expressão aumentada de AXL tem sido frequentemente detectada em vários tipos de neoplasias e seu papel na manutenção da tumorigênese tem sido bem reconhecido. Dessa forma, AXL tem-se relacionado ao crescimento tumoral e à disseminação por meio de efeitos positivos com relação a sobrevivência celular, proliferação, migração e invasão tumoral. Além disso, a sinalização do AXL também está envolvida em outros processos que envolvem mecanismos desde a diferenciação celular, proteção dos vasos sanguíneos contra injúria, remoção de células apoptóticas, hematopoiese, agregação de plaquetas e regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias.⁴¹⁻⁴³

Neste estudo, a análise da expressão do AXL no carcinoma ductal invasor de mama foi realizada com a presença de controles que eram compostos por tecido mamário normal, fibroadenoma (lesão benigna) e carcinoma intraductal (lesão in situ). Além disso, a análise de expressão do AXL nos tecidos foi categorizada de forma semiquantitativa em diferentes padrões, definidos como ausente, fraco, moderado e forte. Assim, ao considerar os percentuais de marcação dentre todas as amostras tumorais avaliadas, obteve-se a seguinte distribuição: negativo (28,8%); fraco (19%); moderado (21,2%); e forte (14%).

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

Inicialmente, quando se compara o padrão de expressão do AXL entre o grupo tumoral e controles, observa-se predomínio de marcações do tipo negativo ou fraco no grupo tumoral (58%), enquanto nos grupos-controle o predomínio foi de padrão moderado ou forte (70%). Esses dados contrapõem-se às informações disponíveis na literatura, pois conforme alguns autores, o AXL apresenta-se largamente distribuído nos tumores sólidos, incluindo o carcinoma mamário e seus níveis se correlacionam com a maior ocorrência de metástases.^{44,45} Além disso, diversos estudos têm mostrado que a expressão aberrante do AXL está ligada à ativação de vias sinalizadoras da oncogênese, incluindo as vias PI3K/Akt e/ou MAPK/Erk e que, além disso, estão entre as principais vias envolvidas na manutenção de características agressivas das células tumorais, dentre elas a resistência a drogas e o comportamento metastático.⁴⁶

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

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

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

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

Em contrapartida a esses dados, Ahmed et al.⁴⁷ sugeriram que a expressão aumentada de AXL associa-se à maior agressividade do câncer de mama, dado, entre outros, por menor grau de diferenciação tumoral e maior acometimento linfonodal. No entanto, Jin et al.⁴⁸ não encontraram qualquer correlação significativa entre a expressão de AXL e alguns dos fatores prognósticos acima descritos, que incluem idade, tamanho do tumor e metástases em linfonodos. Apesar disso, estes autores reportaram correlação significativa entre a expressão de AXL e o grau histológico tumoral, assim como com a expressão de ER e de PR.⁴⁸

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

Esses achados são também confirmados por análises de dados de sequenciamento de RNA que revelaram que somente o subtipo TNBC expressa altos níveis de AXL. Entretanto, a análise dos níveis de expressão de AXL em diferentes amostras de pacientes levou a dados conflitantes.⁴⁸

Outros autores avaliaram a expressão AXL ao nível proteico, utilizando anticorpos AXL em amostras de tumores mamários humanos, correlacionando essas informações aos dados clínicos. Estas análises revelaram que a expressão de AXL pode ser detectada em diversos subtipos moleculares, assim como encontrado no presente estudo e os níveis de expressão podem estar relacionados à evolução clínica. Assim, em pacientes com o subtipo HER2+, nos quais a existência de complexos de proteínas AXL/HER2 colocalizadas na membrana plasmática estejam em altos níveis, observa-se maior ocorrência de metástases no pulmão e cérebro.⁴⁹

Por fim, considerando-se o desfecho clínico e a progressão ou não de doença, que é caracterizada por recorrência local ou evolução com metástases nas

pacientes com desfecho clínico favorável, ou seja, sem sinais de progressão de doença, o padrão de expressão predominante foi negativo ou fraco (64,1%). Aquelas com desfecho clínico desfavorável, isto é, com evidência de progressão de doença, não apresentaram diferenças percentuais nestes padrões. Assim, novamente, esses achados apresentam-se parcialmente discordantes de publicações anteriores que correlacionam a alta expressão da proteína de AXL com evolução clínica desfavorável em todos os subtipos de carcinoma mamário. Em contrapartida, baixos níveis de expressão de AXL foram associados à maior sobrevida, o que, em parte, está de acordo com os percentuais identificados nesta pesquisa.⁴⁹ No entanto, outros pesquisadores não encontraram qualquer associação entre a expressão de AXL e a sobrevida livre de doença ou sobrevida global.⁴⁸ Estes resultados mostram, portanto, associações conflitantes entre a expressão do AXL e o comportamento biológico do câncer de mama, assim como também observado em publicações anteriores. D’Affonso et al.⁵⁰ investigaram 569 casos de câncer de mama e sugeriram que não há relação entre a expressão de AXL e o nível de expressão ER; Berclaz et al.⁵¹ sugeriram que a expressão de AXL era significativamente associada com o nível de ER, assim, a expressão de AXL era confinada aos tumores ER positivo, entretanto nem todos os tumores ER positivos expressaram a proteína AXL. Nesse sentido, estes autores hipotetizaram que ER regula a ativação de AXL, também inibindo a apoptose celular pela superexpressão de Bcl-3 (gene anti-apoptótico), o que levaria à algumas das características de comportamento agressivo observada nestas células tumorais.⁵¹

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

Considerações finais, limitações e perspectivas futuras

Tendo em vista os dados atuais de incidência, prevalência e mortalidade pelo câncer de mama, faz-se necessário a busca por novos marcadores que possam ser utilizados como indicadores de gravidade ou evolução clínica desfavorável, orientando o uso de modalidades distintas de tratamento, bem como o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Limitações maiores a este estudo foram ter sido ele avaliado retrospectivamente, por meio da coleta de dados em prontuários e blocos histológicos, das pacientes com diagnóstico de câncer de mama atendidas em hospital universitário único. Foram feitas buscas para coleta dos respectivos blocos de parafina com a amostra tumoral (biópsia ou cirurgia). Vale ressaltar que nessa etapa houve perda significativa de amostras, seja pela fragmentação de dados em prontuários, ausência de segmento clínico adequado, inexistência dos blocos histopatológicos correspondentes, ou terem sido eles insuficientes para as análises que se deseja fazer.

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

Apesar dos resultados conflitantes com os dados disponíveis na literatura, sabe-se que β -catenina e AXL estão relacionadas aos processos de regulação e crescimento celular e, a expressão aberrante de ambos, relacionada a carcinogênese. Além disso, alguns estudos ao analisar o padrão de expressão desses marcadores, correlacionando-os aos padrões de resposta em diferentes tipos de neoplasias malignas, sugerem possível papel preditivo e prognóstico de ambos como potenciais biomarcadores de agressividade, bem como eventuais alvos para terapias anticâncer. Novos esforços devem ser direcionados para maior esclarecimento da relação desses e de outros marcadores para que em futuro próximo, novos fatores preditores de evolução de doença e agentes terapêuticos alvo-específicos sejam desenvolvidos, individualizando ainda mais o tratamento do câncer de mama para que um novo

horizonte de maior sobrevida e melhor qualidade de vida seja revelado.

CONCLUSÕES

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

Contribuição dos autores

Conceituação: Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas

Análise formal: Luiz Martins Collaço

Investigação: Lucas Gennaro, Rafael Koerich Ramos

Supervisão: Ana Maria Waaga-Gasser

Redação (esboço original): Marcos Fabiano Sigwalt

Redação (revisão e edição): Todos os autores

REFERÊNCIAS

1. Wilkes GM. Targeted therapy: attacking cancer with molecular and immunological targeted agents. *Asia Pac J Oncol Nurs*. 2018;13(2):137-55. https://doi.org/10.4103/apjon.apjon_79_17
2. Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harisis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates Surg*. 2017;69:313-7. <https://doi.org/10.1007/s13304-017-0424-1>
3. Peregrino AAF, Vianna CM de M, de Almeida CEV, Gonzáles GB, Machado SCF, Costa e Silva FV, et al. Análise de custo-efetividade do rastreamento do câncer de mama com mamografia convencional, digital e ressonância. *Cien Saude Colet*. 2012;17(1):215-22. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012000100023>
4. Majewski JM, Lopes ADF, Davoglio T, Leite JC de C. Quality of life of women recovering from breast cancer after being subjected to mastectomies compared with those who had conservative surgery: a review of the literature. *Cien Saude Colet*. 2012;17(3):707-16. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232012000300017>
5. Cosac OM, Soares DA dos S, Daher LMC, Ribeiro-Junior I, Moura LG, Galdino MCA, et al. Surgical treatment of complications resulting from adjuvant radiotherapy: a case report. *Rev Bras Cir Plást*. 2016;31(4):591-5. <https://doi.org/10.5935/2177-1235.2016RBCP0098>
6. Uchôa DM, Cruz DB, Schaefer PG, Pêgas KL, Camcruzzi E. Myofibroblastoma arising in mammary hamartoma: a case report. *Patholog Res Int*. 2010;1:726829. <https://doi.org/10.4061/2010/726829>

7. Matheus VS, Kestelman FP, Canella E de O, Djahjah MCR, Koch HA. Carcinoma medular da mama: correlação anátomo-radiológica. *Radiol Bras.* 2008;41(6):379-83. <https://doi.org/10.1590/S0100-39842008000600007>
8. Oliveira LB, Figueira MAAK. Biomarcadores no câncer. In: Saito RF, et al. *Fundamentos de oncologia molecular*. São Paulo: Editora Atheneu; 2015. p. 315-27.
9. Gopinathk KS, Kumari SJ, Gopinath S, Bhat A, Kundu TK, Swamy S. Chromatin dynamics meet cancer: chromatin protein PC4 in genome organization and breast cancer manifestation. *J Clin Oncol.* 2014;32(15):e22073. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.e22073
10. Bahadır EB, Sezginürk MK. Label-free, ITO-based immunosensor for the detection of a cancer biomarker: receptor for activated C kinase 1. *Analyst.* 2016;141:5618-26. <https://doi.org/10.1039/c6an00694a>
11. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19:403-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
12. Elston CW. The assessment of histological differentiation in breast cancer. *Aust N Z J Surg.* 1984;54:11-5. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1984.tb06677.x>
13. Zhang R, Chen HJ, Wei B, Zhang HY, Pang ZG, Zhu H, et al. Reproducibility of the Nottingham modification of the Scarff-Bloom-Richardson histological grading system and the complementary value of Ki-67 to this system. *Chin Med J (Engl).* 2010;123(15):1976-82.
14. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs D, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>
15. Vukosavljevic ND, Kanjer K, Markicević M, Todorovic-Rakovic N, Vukotic D, Nesković-Konstantinović Z. Natural course of node-negative breast cancer: high risk-related subgroups. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003;22(4):543-9.
16. Follana P, Barrière J, Chamorey E, Largillier R, Dadone B, Mari V, et al. Prognostic factors in 401 elderly women with metastatic breast cancer. *Oncology.* 2014;86(3):143-51. <https://doi.org/10.1159/000357781>
17. Sun R, Gao CL, Li DH, Li BJ, Ding YH. Expression status of PIWIL1 as a prognostic marker of colorectal cancer. *DisMarkers.* 2017;2017:1204937. <https://doi.org/10.1155/2017/1204937>
18. Akinyemiju T, Wiener H, Pisu M. Cancer-related risk factors and incidence of major cancers by race, gender, and region: analysis of the NIH-AARP diet and health study. *BMC Cancer.* 2017;17(1):597. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3557-1>
19. Hayes DF, Ethier S, Lippman ME. New guideline for reporting tumor marker studies in breast cancer research and treatment. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;100:237-8. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9253-5>
20. Cancellò G, Maisonneuve P, Mazza M, Montagna E, Rotmensz N, Viale G, et al. Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: how much is "very young"? *Breast.* 2013;22:1046-51. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.08.006>
21. Han W, Kang SY, Korean Breast Cancer Society. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119(1):193-200. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0388-z>
22. Sabiani L, Houvenaeghel G, Heinemann M, Rey F, Classe JM, Cohen M, et al. Breast cancer in young women: pathologic features and molecular phenotype. *Breast.* 2016;29:109-16. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.07.007>
23. Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, Orlando L, Viale G, Renne G, et al. Very young women (<35 years) with breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol.* 2002;13:273-9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf039>
24. Han W, Kim SW, Park IA, Kang D, Kim SW, Yoon YK, et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer.* 2004;4:82. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-82>
25. Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, Sweet A, White N, Margenthaler JA. Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. *J Am Coll Surg.* 2009;208:341-7. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2008.12.001>
26. Morrison DH, Rahardja D, King E, Peng Y, Sarode VR. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2012;107(2):382-7. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.219>
27. Fredholm H, Magnusson K, Lindström LS, Tobin NP, Lindman H, Bergh J, et al. Breast cancer in young women and prognosis: how important are proliferation markers? *Eur J Cancer.* 2017;84:278-89. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.07.044>
28. Martínez MT, Olira SS, Peña-Chilet M, Alonso E, Hernando C, Burgues O, et al. Breast cancer in very young patients in a Spanish cohort: age as an independent bad prognostic indicator. *Breast Cancer Basic Clin Res.* 2019;13:1178223419828766. <https://doi.org/10.1177/1178223419828766>
29. Cancellò G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Ann Oncol.* 2010;10:1974-81. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq072>
30. Pang H, Lu H, Song H, Meng Q, Zhao Y, Liu N, et al. Prognostic values of osteopontin-c, E-cadherin and β -catenin in breast cancer. *Cancer Epidemiol.* 2013;37(6):985-92. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.08.005>
31. Li S, Li S, Sung Y, Li L. The expression of β -catenin in different subtypes of breast cancer and its clinical significance. *Tumour Biol.* 2014;7693-8. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1975-0>
32. Xu J, Prosperi JR, Choudhury N, Olopade OI, Goss KH. β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0117097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117097>
33. Sun M, Zhao H, Xiao Q, Yu Z, Song Z, Yao W, et al. Combined expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 and β -catenin is associated with lymph node metastasis and poor survival in breast cancer patients following cyclophosphamide treatment. *Oncol Rep.* 2015;34(6):3163-73. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4273>
34. Cuello-Carrión FD, Shortrede JE, Alvarez-Olmedo D, Cayado-Gutiérrez N, Castro GN, Zoppino FCM, et al. HER2 and β -catenin protein location: importance in the prognosis of breast cancer patients and their correlation when breast cancer cells suffer stressful situations. *Clin Exp Metastasis.* 2015;32(2):151-68.
35. Kovacs G, Billfeldt NK, Farkas N, Dergez T, Javorhazy A, Banyai D, et al. Cytoplasmic expression of β -catenin is an independent predictor of progression of conventional renal cell carcinoma: a simple immunostaining score. *Histopathology.* 2017;70(2):273-80. <https://doi.org/10.1111/his.13059>
36. Kim Y, Jin D, Lee BB, Cho EY, Han J, Shim YM, et al. Overexpression of β -catenin and cyclin D1 is associated with poor overall survival in patients with stage IA-IIA squamous cell lung cancer irrespective of adjuvant chemotherapy. *J Thorac Oncol.* 2016;11(12):2193-201. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.07.021>
37. Jaffer S, Bleiweiss JJ. Beyond hematoxylin and eosin: the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest.* 2004;22(3):445-65. <https://doi.org/10.1081/cnv-200034896>
38. Leong A, Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathology.* 1987;11(12):1295-305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1987.tb01874.x>
39. Helander K. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem.* 1994;69:177-9. <https://doi.org/10.3109/10520299409106282>
40. Mason J, O'Leary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem.* 1991;39:225-9. <https://doi.org/10.1177/39.2.1987266>
41. Hafizi S, Dahlbäck B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:295-304. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.04.004>
42. Corno C, Gatti L, Lanzi C, Zaffaroni N, Colombo D, Perego P. Role of the receptor tyrosine Axl and its targeting in cancer cells. *Curr Med Chem.* 2016;23:1496-512. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160405112954>
43. Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylinositol-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2014;14:769-85. <https://doi.org/10.1038/nrc3847>

-
44. Yu H, Liu R, Ma B, Yen HY, Zhou Y, Krasnoperov V, et al. Axl receptor tyrosine kinase is a potential therapeutic target in renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2015;113:616-25. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.237>
45. Lozaneanu L, Pincioli P, Ciobanu DA, Carcangiu ML, Canevari S, Tomassetti A, et al. Computational and immunohistochemical analyses highlight AXL as a potential prognostic marker for ovarian cancer patients. *Anticancer Res*. 2016;36:4155-63.
46. Cassinelli G, Zucco V, Gatti L, Lanzi C, Zaffaroni N, Colombo D, et al. Targeting the Akt kinase to modulate survival, invasiveness and drug resistance of cancer cells. *Curr Med Chem*. 2013;20(15):1923-45. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990106>
47. Ahmed L, Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Micklem DR, Akslen LA. Increased tumor cell expression of Axl is a marker of aggressive features in breast cancer among African women. *APMIS*. 2015;123:688-96. <https://doi.org/10.1111/apm.12403>
48. Jin G, Wang Z, Wang J, Zhang L, Chen Y, Yuan P, et al. Expression of Axl and its prognostic significance in human breast cancer. *Oncol Lett*. 2017;13:621-8. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5524>
49. Goyette MA, Duhamel S, Aubert L, Pelletier A, Savage P, Thibault MP, et al. The receptor tyrosine kinase Axl is required at multiple steps of the metastatic cascade during HER2-positive breast cancer progression. *Cell Rep*. 2018;23:1476-90. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.019>
50. D'Alfonso TM, Hannah J, Chen Z, Liu Y, Zhou P, Shin SJ. Axl receptor tyrosine kinase expression in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2014;67:690-6. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-202161>
51. Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Kieffer I, Dreher E, Andres AC. Estrogen-dependent expression of the receptor tyrosine kinase Axl in normal and malignant human breast. *Ann Oncol*. 2001;12:819-24. <https://doi.org/10.1023/a:1011126330233>