

**LUIZ CARLOS TEIXEIRA**

**DETECÇÃO E CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA DA  
CICLINA/PCNA NO CARCINOMA MAMÁRIO**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção  
do título de Doutor em Medicina**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina de Castro Bicudo Pisani**

**UNICAMP**

**1993**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Teixeira, Luiz Carlos *935*

T235d

Detecção e correlação prognóstica da ciclina/PCNA na detecção do carcinoma mamário/Luiz Carlos Teixeira. -- Campinas, SP: [s.n.], 1993.

Orientador: Regina de Castro Bicudo Pisani  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

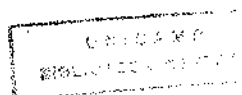
1. Mama-câncer. 2. PCNA-ciclina. 3. Mama-prognóstico.

- I. Pisani, Regina Célia de Castro Bicudo.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.  
III. Título

20. CDD - 616.994 49  
- 618.075 6  
- 618.190 75

Índices para Catálogo Sistemático:

1. Mama - Câncer 616.994 49  
2. PCNA - Ciclina 618.075 6  
3. Mama - Prognóstico 618.190 75



A minha esposa Yara  
Aos meus filhos Luiz Felipe e Guilherme  
Aos meus colegas e amigos do CAISM-UNICAMP

Ao professor José Aristodemo Pinotti,  
mestre da Medicina brasileira

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Regina de Castro Bicudo Pisani, uma amiga constante nas críticas a este trabalho

Ao professor Marcelo Alvarenga, que estudou os aspectos histológicos

Ao professor Paulo Cardoso de Almeida, que, pacientemente, colaborou na detecção do antígeno nuclear, motivo desta Tese

A todos os amigos e colaboradores do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - CAISM/UNICAMP, em particular à equipe da Assessoria Técnica e Científica - ASTEC

## ÍNDICE

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1. Considerações sobre a ciclina/PCNA .....	11
2. PROPOSIÇÃO .....	14
3. METODOLOGIA .....	15
3.1. Casuística .....	15
3.2. Técnica da quantificação do receptor de estrógeno .....	16
3.3. Avaliação imuno-histoquímica da ciclina/PCNA .....	17
3.4. Método de estudo, obtenção dos dados e análise estatística .....	23
3.5. Apêndice .....	25
4. RESULTADOS .....	29
5. DISCUSSÃO .....	51
6. CONCLUSÕES .....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

**RESUMO**

## RESUMO

---

Os carcinomas invasivos da mama de 68 pacientes com doença estágio II, tratadas entre 1975 a 1982, foram estudados pelo método imuno-histoquímico para a detecção do antígeno nuclear de proliferação ciclina/PCNA. Correlacionaram-se os resultados graduados por análise semiquantitativa com o estado da axila, grau histológico, grau nuclear e receptor de estrógeno. A ciclina/PCNA foi detectada em todas as amostras, sendo mais freqüente nos carcinomas das mulheres mais jovens (52,94%) e pré-menopausadas (64,71%). Não encontrou-se relação direta entre o antígeno e a axila, grau histológico, grau nuclear e receptor de estrógeno. Observou-se uma baixa taxa de recidiva nos casos sem metástase axilar e com ciclina/PCNA grau I, quando comparada com os graus III e IV ( $p=0,0686$ ). A melhor associação para avaliar o prognóstico foi com o grau nuclear e o receptor de estrógeno. Mau prognóstico foi observado em pacientes com ciclina/PCNA graus III-IV, grau nuclear I e sem receptor de estrógeno.



## **SUMMARY**

## SUMMARY

---

Invasive breast carcinoma of 68 patients were studied for the presence of Proliferative Cellular Nuclear Antigen - cyclin/PCNA by immunoperoxidase method.

The results of semiquantitative analysis were correlated with axillary status, histologic and nuclear grade and estrogen receptors attempts to identify the importance of this protein as a new prognostic factor.

Different grades of cyclin/PCNA were detected in all cases and superexpression is more frequent in young (52,94%) and premenopausal (64,71%) women.

No relation was observed between cyclin/PCNA and axillary lymphonodal involvement, histologic and nuclear grades and estrogen receptor.

There was a low recurrence rate in cyclin/PCNA grade I-II compared with grades III and IV in negative axilla cases ( $p=0,0686$ ).

The better association to evaluated the prognosis of breast carcinoma is nuclear grade and estrogen receptor. Bad prognosis was observed in cases with cyclin/PCNA grade III-IV, nuclear grade 1 and negative estrogen receptor in both negative and positive axilla cases.

## **INTRODUÇÃO**

## 1 . INTRODUÇÃO

---

O conhecimento da história natural do carcinoma mamário pode modificar as decisões terapêuticas e, conseqüentemente, influenciar decisivamente na evolução da doença. Até o fim da década de 60 adotava-se como tratamento a mastectomia e a radioterapia, reservando-se para as recidivas a hormonoterapia e a quimioterapia (MOORE et al., 1967). Esta conduta, segundo ALBERT, BELLE, SWANSON (1978), era lógica e amplamente aceita, mas não prolongava as sobrevidas das pacientes, conforme demonstraram CUTLER, MYERS, GREEN (1975).

Somente com o advento de estudos sobre as etapas evolutivas da doença, que trouxeram novos conceitos sobre os mecanismos de sua disseminação, foi possível racionalizar as abordagens terapêuticas e, progressiva e dramaticamente, aumentar as sobrevidas (HENDERSON & CANELLOS, 1980).

As experiências pioneiras desenvolvidas com o intuito de alterar essa evolução foram realizadas a partir do melhor conhecimento das características relacionadas com o tumor, como o grau histológico e nuclear, o estado dos linfonodos axilares e a presença de embolização vascular (FISHER, 1986).

As características tumorais passaram a ser os critérios essenciais de avaliação prognóstica, sendo utilizadas em vários estudos clínicos controlados que tinham como meta prolongar as sobrevidas das pacientes (FISHER, GREGORIO, FISHER, 1975).

O primeiro estudo desenvolvido com esse objetivo utilizava a quimioterapia transoperatória e foi realizado em 1957 (FISHER et al., 1968). A este tipo de tratamento seguiu-se a quimioterapia pós-operatória, mais tarde chamada adjuvante; e três grandes ensaios clínicos iniciados em 1958, 1961 e 1972, coordenados pelo National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP), mostraram que o tratamento sistêmico finalmente melhorava a quantidade e a qualidade de vida das pacientes com carcinoma mamário (FISHER et al., 1975).

Analisando essas experiências, conclui-se que a história natural do câncer da mama pode ser alterada através da intervenção médica, que deve ser específica e planejada a partir da análise dos fatores que medem a agressividade tumoral. Assim, um dos grandes desafios para a Oncologia contemporânea é definir estes fatores prognósticos. O conhecimento do risco para as recidivas é fundamental à definição do tratamento complementar.

Um dos fatores de risco que mais se estudou foi o estado dos linfonodos axilares. Os resultados alcançados pelos diferentes experimentos clínicos controlados demonstraram que a evolução do carcinoma mamário, principalmente em pacientes com metástase axilar, pode ser favoravelmente modificada pelo tratamento adjuvante, tanto hormonal quanto quimioterápico (FISHER et al., 1969; FISHER et al., 1975; BONADONNA et al., 1976; BONADONNA & VALAGUSSA, 1985).

Os trabalhos realizados pelo NSABP e pelo Instituto dei Tumori de Milano-Itália indicaram que, de acordo com a presença de metástases nos gânglios axilares, as pacientes podem ser agrupadas em: potencialmente curadas, de baixo risco para as recidivas e aquelas de alto risco (BONADONNA, VALAGUSSA, TANCINI, 1986; FISHER, WOLMARK, WICHERHAM, 1990).

Das pacientes potencialmente curadas, que compreendem aquelas sem envolvimento axilar, 70% não mais desenvolverão a doença após dez anos do tratamento primário. Por outro lado, menos de 40% das mulheres com metástase axilar estarão livres de doença, apesar da terapêutica complementar sistêmica (CARTER, ALLEN, HENSON, 1989).

Esses dados conduzem ao grande desafio de curar 30% das pacientes com neoplasia restrita à mama, e que potencialmente recidivarão, e aumentar a sobrevida de 70% das mulheres com tumores metastatizados para a axila.

Para vencer este desafio tem-se empregado, desde o início da década de 50, as características histológicas do tumor (BLOOM, 1950) e dos linfonodos regionais como fatores de avaliação prognóstica (FISHER et al., 1969). Posteriormente, NEMOTO et al. (1980) provaram que o prognóstico da doença poderia ser estabelecido a partir destes estudos, mas os fatores determinantes da agressividade tumoral estavam relacionados com o tipo e o grau histológico da neoplasia.

Outro determinante do prognóstico é o tamanho do tumor, que está diretamente relacionado com a positividade dos linfonodos regionais, ao alto risco para a recidiva e à morte (FISHER et al., 1969).

Um extenso estudo realizado por CARTER et al. (1989), em pacientes sem metástase linfonodal, mostrou que, após cinco anos do tratamento primário, as taxas de recidiva foram de 4,2% quando os tumores tinham até 2cm (T1) e de 15,4% quando mediam 2,1cm a 4,9cm. A mesma avaliação, após dez anos do tratamento inicial, indicou 25% de recidiva para os tumores T1.

A sobrevida livre da doença nos casos T1 após 20 anos de seguimento, segundo ROSEN et al. (1989), foi de 71,25% (59% a 88%), confirmando que o tamanho do tumor e o envolvimento axilar são de valor preditivo, embora esta relação seja imperfeita devido à interferência de variáveis como os critérios de estadiamento, a adequada análise dos gânglios axilares e o tipo de tratamento utilizado.

Por outro lado, grau histológico e nuclear fornecem informações significativas sobre a agressividade e a capacidade proliferativa do tumor, conforme os estudos de BLOOM & RICHARDSON (1957). Estes pesquisadores criaram um sistema de avaliação histocitológica fundamentado na capacidade de formação de ductos pelas células tumorais, na quantidade e variação do tamanho, na forma e estrutura do núcleo e no número de mitoses por campo de maior aumento. O grau histológico determina a estrutura da neoplasia, como a extensão de formações glandulares, e o grau de diferenciação nuclear determina a sua potencialidade proliferativa, avaliando indiretamente o índice mitótico (McGUIRE et al., 1990).

O grau nuclear foi considerado por HENDERSON & CANELLOS (1980) a variável que melhor caracterizava o prognóstico, enquanto FISHER et al. (1988) demonstraram sua relação direta com a sobrevida. Vários estudos confirmaram que os tumores sem extensão aos gânglios axilares e com grau nuclear favorável têm um baixo risco de recidivas (McGUIRE et al., 1990). Portanto, a graduação histológica

e citológica do carcinoma mamário pode ser utilizada como medida do prognóstico, mesmo sendo insuficiente para servir como guia de decisão terapêutica, sobretudo porque depende da análise do patologista, que normalmente utiliza critérios pessoais ou pouco definidos para estabelecer esta graduação (GILCHRIST, KALISH, GOULD, 1985).

A busca de métodos mais sensíveis de avaliação prognóstica iniciou-se a partir de 1970, com estudos que procuraram relacionar a diferenciação tumoral e a presença do receptor nuclear para o estradiol, função diferenciada das células lobulares e ductais.

WESTERBERG et al. (1980) analisaram esses estudos comprovando a inter-relação entre a celularidade tumoral, a presença do receptor de estrógeno e o prognóstico. Os carcinomas de boa evolução clínica tinham grande quantidade de células com a proteína receptora, sendo, freqüentemente, carcinomas bem diferenciados, conforme demonstraram LIPPMAN & ALLEGRA (1980); OSBORNE et al. (1980); CHEVALLIER et al. (1988); FISHER, SASS, FISHER (1987); TEIXEIRA (1990).

O valor preditivo da dosagem do receptor de estrógeno, entretanto, é limitado, principalmente em pacientes sem metástases axilar (THORPE et al., 1987), ainda que vários estudos tenham mostrado que a evolução da doença é pior nos casos de receptores negativos (PINOTTI et al., 1987). A diferença nas sobrevidas, porém, não é significativa, limitando o valor da análise do receptor como indicador da necessidade de qualquer forma de tratamento adjuvante (McGUIRE et al., 1990).



Até a metade da década de 80 foram essas as variáveis relacionadas com o carcinoma mamário utilizadas para definir o prognóstico e caracterizar a agressividade tumoral (GENTILI, SANFILIPPO, SILVESTRINI, 1981; MEYER et al., 1983; SILVESTRINI, DAIDONE, GASPARINI, 1985; TUBIANA et al., 1989).

A partir de 1985 introduziram-se na prática clínica, os chamados métodos avançados de avaliação prognóstica, como o índice de proliferação celular (KALLIONIEMI et al., 1987), a citometria de fluxo (KALLIONIEMI et al., 1988), os métodos imuno-histoquímicos para a detecção dos proto-oncogenes (SHIH et al., 1981; SCHECHTER et al., 1985) e os marcadores celulares da atividade tumoral (OSBORNE et al., 1981; MORRISSET, CAPONY, ROCHEFORT, 1986; CAPONY et al., 1989; LEWIS et al., 1990; FOEKENS et al., 1990; HENNESSY et al., 1991; THOR et al., 1991).

O índice de proliferação celular nos tecidos tumorais pode ser avaliado por várias técnicas. Algumas, como as que analisam o índice mitótico, são complexas e restritas aos laboratórios de pesquisas, devido à baixa reprodutibilidade e sensibilidade (BAAK et al., 1985). Outras, como a medida de incorporação da timidina triciada, são muito trabalhosas e só podem ser realizadas em tecidos frescos, impossibilitando seu uso rotineiro (STRAUSS & MORAN, 1980; MEYER et al., 1983; TUBIANA et al., 1984).

Recentemente, McGUIRE et al. (1990) demonstraram que, apesar dessas restrições, a incorporação da timidina é um importante indicador do prognóstico em pacientes sem metástases axilar.

Este estudo concluiu que baixos índices de incorporação correlacionam-se com pequena taxa de recidiva e prolongada sobrevida livre da doença, independentemente do tamanho do tumor, grau histológico e receptor de estrógeno.

Outro método de avaliação é a citometria de fluxo, que mede a quantidade da ploidia do DNA em cada célula, representando a taxa de divisão e crescimento celular. Este exame pode ser efetuado em material congelado, fixado em formol ou parafinado (HEDDLEY, FRIELANDER, TAYLOR, 1983).

Essa informação sobre a ploidia tumoral permite dividir os tumores em diplóides, que são de menor agressividade, e aneuplóides, de maior agressividade.

De acordo com MERKEL & OSBORNE (1989), a ploidia é a medida indireta do genoma tumoral exprimindo o rearrançamento, amplificação ou deleção da seqüência gênica relacionados com a proliferação celular e o prognóstico da doença (FALLENIOUS, FRANZEN, AUER, 1988).

Posteriormente, CLARK, DRESSLER, OWENS (1989) determinaram que a porcentagem de células na fase S<sub>2</sub> do ciclo celular caracteriza melhor o prognóstico que a ploidia. Isso confirmou os resultados de KALLIONIEMI et al. (1988), que relacionaram a fração de células na fase S<sub>2</sub> com o pior prognóstico dos tumores diplóides.

Em 1991, CLARK, OWENS, McGUIRE mostraram que a sobrevida aos cinco anos é pior nos casos diplóides e nos aneuplóides que tinham a fase S<sub>2</sub> muito expressiva.

Todos esses dados sugerem que a ploidia e a fração na fase S são de grande valor para a decisão quanto à terapêutica complementar (McGUIRE et al., 1990). Outros indicadores que têm sido utilizados são a catepsina D, a proteína pS2, os proto-oncogenes e os receptores dos fatores de crescimento celular.

A catepsina D é uma protease lisossômica de atividade normal nas proteínas endógenas (MORRISSET et al., 1986), estando presente em níveis elevados nos tumores aneuplóides e indiferenciados (VIGNON et al., 1986). Estes tumores são de má evolução, pois a catepsina D, além de atuar na membrana basal e na matriz extracelular, estimula o crescimento das células malignas (TANDON et al., 1989).

A proteína pS2, de função desconhecida, é controlada pelos estrógenos, estando associada a um maior risco de recidivas (FOEKENS et al., 1990; ELLEDGE, McGUIRE, OSBORNE, 1992). Pode ser utilizada para definir os casos de pior prognóstico e selecionar os tumores com receptor que responderão à endocrinoterapia (SCHWARTZ et al., 1991).

O fator epidérmico de crescimento é uma glicoproteína com 170 kilodaltons (kd) de peso molecular e atividade de tirosinoquinase. Estimula o crescimento das células carcinomatosas através de sua ligação com os receptores da superfície celular (OSBORNE et al., 1981; COHEN, USHIRO, STOSCHECK, 1982).

As pacientes, cujos tumores apresentam aumento na expressão dos receptores para o fator epidérmico de crescimento, têm uma menor sobrevida. Sua presença também está relacionada com a invasão axilar (BATTAGLIA et al., 1988); invasão dos vasos linfáticos da mama e ausência do receptor de estrógeno (TOI et al.,

1989); e com o grau histológico (GRIMAUX, ROMAIN, REMVIKO, 1989; MERKEL et al., 1989).

Quanto aos oncogenes, sabe-se que pacientes com tumores com superexpressão do erb-B-2 têm pior sobrevida (MERKEL et al., 1989). O erb-B-2 é um proto-oncogene HER-2/neu que foi inicialmente identificado como ponto de mutação nos neuroblastomas de ratas (SHIH et al., 1981). Codifica um receptor protéico de membrana de 185 kd com atividade da tirosinoquinase.

Os oncogenes são, funcionalmente, semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (LUPU et al., 1990), não sendo superexpressados no tecido mamário normal e nas doenças benignas, encontrando-se amplificados em cerca de 30% dos carcinomas da mama (SLAMON et al., 1987). Podem ser empregados como indicadores do prognóstico, sobretudo quando correlacionados com o receptor de estrógeno, o grau histológico e nuclear (PAIK et al., 1990; HEGG, 1992).

Todos esses conhecimentos e considerações provam que os fatores prognósticos ultrapassam os limites da definição de taxas de sobrevidas. Eles objetivam selecionar as pacientes que realmente serão beneficiadas com o tratamento adjuvante e a terapia sistêmica pré-cirúrgica.

A indicação terapêutica fundamentada nesses fatores ainda é restrita, embora existam evidências de que a resposta à quimioterapia esteja diretamente relacionada com a proliferação celular, característica dos tumores aneuplóides (BRIFOD et al., 1989) e com altas taxas de células na fase S (OSBORNE, 1989).

A complexidade e o custo dos procedimentos avaliatórios da proliferação tumoral e a necessidade de um método que definisse o prognóstico e estabelecesse a resposta à quimioterapia levaram o autor a desenvolver este estudo, analisando a presença, em cortes de tecidos parafinados, da ciclina ou antígeno nuclear de proliferação (PCNA).

A ciclina/PCNA é uma proteína não-histona com 36.000 daltons (36 kd) de peso molecular cuja produção é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular e à síntese do DNA (MIYACHI, FRITZLER, TAN, 1978; TAKASAKI, DENG, TAN, 1981; CELLIS et al., 1984; MATHEWS et al., 1984; BRAVO & MACDONALD-BRAVO, 1985). É detectada em grande quantidade no núcleo, durante a fase G1, elevando-se na fase S e declinando na fase G2 e na M (TAKASAKI et al., 1981; CELLIS & CELLIS, 1985). Portanto, está correlacionada com a síntese do DNA e a proliferação celular.

Com esses conhecimentos, pode-se afirmar que a porcentagem de células tumorais contendo a ciclina/PCNA é um parâmetro para a avaliação prognóstica dos carcinomas da mama (BOUZUBAR et al., 1989; VIELH et al., 1990; VERONESE & GAMBACORTA, 1991).

Além disso, a fração de células em proliferação seria aquela sensível à quimioterapia e provavelmente insensível à hormonoterapia, pois, segundo FISHER, FISHER, REDMOND (1986), as células muito proliferantes ou indiferenciadas não têm o receptor hormonal nuclear.

A combinação entre a taxa da ciclina/PCNA com os outros fatores rotineiramente avaliados, como o receptor de estrógeno, os graus de diferenciação

histológica e nuclear e o estado dos linfonodos axilares, poderia definir com maior acurácia o prognóstico e selecionar a terapêutica adjuvante, particularmente para pacientes cujos tumores não se estenderam aos gânglios axilares. A inexistência de trabalhos estabelecendo esta correlação em pacientes com longo seguimento tornou pertinente o estudo que desenvolvemos.

### **1.1. Considerações sobre a ciclina/PCNA**

A proliferação celular tem um papel considerável na classificação histológica e prognóstica dos carcinomas da mama, e uma maneira prática de mensurá-la é utilizar os anticorpos monoclonais que se ligam aos antígenos nucleares de proliferação.

Pode ser quantificada também pela síntese do DNA. Os principais métodos empregados são a auto-radiografia baseada na incorporação da timidina triciada (MILLER, 1970); a detecção de nucleosídeos halogenados através da imunofluorescência (GRAY, 1985); e a citometria de fluxo (EWERS, LANGSTREM, BADETORP, 1984).

Essas técnicas, além do alto custo, são trabalhosas e algumas impossíveis de serem realizadas em material parafinado, não permitindo estudos complementares em pacientes já tratadas.

A incorporação da timidina triciada apresenta dificuldades técnicas, pois requer uma amostra a fresco e viável; não há uniformidade na captação do isótopo,

devido à cinética celular em material incubado "in vitro"; é muito dispendiosa e de risco para o pesquisador, que manuseia substâncias radioativas.

A utilização da bromodeoxiuridina (BrdU), seguida pela imunofluorescência com anti-BrdU, elimina algumas dessas desvantagens, mas permanece a necessidade de material a fresco e viável.

Comparada com esses dois métodos, a citometria de fluxo tem muitas vantagens, sendo a principal permitir a análise em material fixado. Entretanto, há necessidade de se tratar o tecido com procedimentos que provocam ruptura nuclear com perda significativa dos dados de identificação celular. Além disso, a preparação histológica para o estudo citométrico inclui todas as células em proliferação. Conseqüentemente, corre-se o risco de avaliar também a fração de células inflamatórias e estromais não-tumorais.

A ciclina ou PCNA (Proliferative Cellular Nucleous Antigen) foi descrita por MIYACHI, FRITZLER, TAN (1978) em pacientes com lupus eritematoso sistêmico, e sua expressão em células proliferantes foi demonstrada por BRAVO & CELLIS (1980), após estudos bidimensionais com eletroforese em gel. É uma proteína nuclear associada à fase S do ciclo celular (TAKASAKI, FISCHWILD, TAN, 1984; OGATA et al., 1985) e, portanto, com a replicação do DNA (BRAVO & MACDONALD-BRAVO, 1985; BRAVO, 1986).

Em 1987, BRAVO et al. demonstraram que a ciclina/PCNA é um polipeptídeo complementar da DNA-polimerase-alfa. No mesmo ano, PRELICH et al. esclareceram que esta proteína complementa a atividade da DNA-polimerase-delta e

tem um grande papel na iniciação da proliferação celular, desencadeando o processo no fim da fase G1 e início da fase S do ciclo celular (JASKULSKI et al., 1986).

A avaliação rotineira desse peptídeo tornou-se possível em 1988, quando KURKI, OGATA, TAN desenvolveram um anticorpo monoclonal a partir de um hibridoma murino. Este hibridoma era obtido pela fusão de células esplênicas de camundongo, imunizadas com ciclina do timo de coelho, com células do mieloma P3 x 63 Ag 8.653.

O anticorpo monoclonal identifica a ciclina/PCNA presente nas células em proliferação, isto é, nas fases G1 e S (TAKASAKI, DENG, TAN, 1981). A sua quantificação dá uma medida indireta da agressividade tumoral e, conseqüentemente, do prognóstico da doença (CELLIS et al., 1984).

A pouca complexidade da avaliação imuno-histoquímica permite sua maior utilização quando comparada com os outros três métodos de medida da proliferação celular.

O anticorpo anti-ciclina/PCNA não destrói o núcleo, preservando a arquitetura do tecido e a relação intercelular. Pode ser utilizado em material fixado e parafinado, tendo, assim, grandes perspectivas de uso nos carcinomas da mama.



**PROPOSIÇÃO**

## **2 . PROPOSIÇÃO**

---

Este trabalho propôs-se a estudar a ciclina/PCNA em tumores de pacientes portadoras de carcinoma da mama estágio II (TNM-UICC), tratadas com mastectomia radical, objetivando:

2.1. Avaliar o método e estabelecer um sistema de quantificação;

2.2. Correlacionar a ciclina/PCNA com:

- . Comprometimento dos linfonodos da axila;
- . Grau histológico e nuclear;
- . Receptor de estrógeno;

2.3. Avaliar sua importância como fator prognóstico;

2.4. Definir os grupos de risco a serem submetidos a terapêutica sistêmica.

**METODOLOGIA**

### 3 . METODOLOGIA

---

#### 3.1. Casuística

Foram estudados os tumores de 68 portadoras de carcinoma da mama tratadas no período de junho de 1976 a junho de 1982 no Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (dez pacientes); na Clínica Ginecológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (18 pacientes); e na Clínica "J.A. Pinotti" (40 pacientes).

Todas as pacientes tinham o diagnóstico de carcinoma ductal infiltrativo estágio patológico II; 38 (55,88%) eram pré-menopausadas e 32 (44,12%) pós-menopausadas, com idade média de 51,51 anos (desvio-padrão de 11,68).

Os critérios para a seleção dos casos identificaram as pacientes:

- portadoras de carcinoma ductal infiltrativo com comprovação histológica;

- estadiadas como estágio II - T1N1; T2N0; T2N1 - conforme os critérios adotados à época do tratamento primário (classificação TNM - UICC, 1974);
- submetidas ao mesmo tipo de tratamento local, a mastectomia radical;
- com tumores estudados quanto ao receptor de estrogênio, pelo método bioquímico;
- seguidas desde a época do diagnóstico e do tratamento primário com realização periódica de radiografias do tórax, ecografias da mama e abdome, mamografias, cintilografias ósseas, hemogramas e dosagens de fosfatases alcalinas e gama glutamil transferases;
- com um seguimento mínimo de 120 meses (dez anos), para casos que sobreviveram.

### **3.2. Técnica da quantificação do receptor de estrogênio**

Considerando que esta técnica integra um estudo prospectivo realizado por este autor desde 1975 (TEIXEIRA, 1990), serão descritas apenas as principais etapas para o entendimento deste processo de avaliação:

- o fragmento do tecido tumoral, retirado no ato cirúrgico, foi congelado em nitrogênio líquido;

- o material foi então homogeneizado e centrifugado durante 30 minutos;
- a proteína receptora foi dosada por absorbância e quantificada pelo método de LOWRY et al. (1951);
- 200µl do citosol foi tamponado e incubado em quantidades crescentes de estradiol triciado;
- após 18 horas, acrescentou-se aos tubos a quantidade de 500µl de uma suspensão de carvão, agitando-se e centrifugando-se a amostra;
- após a centrifugação foram retirados 100µl do sobrenadante e colocados com 5ml do líquido de cintilação para a contagem da radioatividade;
- os resultados foram avaliados pelo método proposto por SCATCHARD (1949), considerando-se com receptor positivo as amostras com concentrações maiores que 5 fmoles/mg de proteína.

### **3.3. Avaliação imuno-histoquímica da ciclina/PCNA**

Os cortes histológicos foram corados pelo método da avidina-biotina-peroxidase descrito por HSU, RAINE, FANGER (1981), com as modificações descritas a seguir:

- Como anticorpo primário foi empregado o anticorpo monoclonal antiantígeno nuclear de proliferação celular da Dako Corporation, Santa Barbara, CA, USA.
- O anticorpo secundário, o complexo avidina-biotina-peroxidase e os soros normais utilizados foram os fornecidos nos "kits" Vector (Burlingame, CA).
- A solução-tampão empregada foi a salina-fosfatada (PSB), pH 7,3.
- A revelação da reação foi realizada com 3-3' tetraidrocloro de diaminobenzidina (DAB) da Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, que provoca o depósito de pigmentos de cor acastanhada na presença da peroxidase.
- Os controles positivos foram as neoplasias sabidamente positivas para o PCNA.
- Como controles negativos, os cortes em estudo foram corados substituindo-se o anticorpo primário por soro não-imune de camundongo.
- Após o teste com os controles positivos, verificou-se a diluição e o tempo de incubação ideais ao anticorpo primário. A diluição escolhida foi de 1:200 para um período de incubação de 30 minutos.

- A leitura da reação assim como a fotomicrografia foram feitas em microscópio óptico comum (Nikon, Labophot) adaptado a uma câmera de 35mm da mesma marca, com fotômetro automático.
- A positividade foi confirmada através da visualização microscópica de depósitos granulares no núcleo das células neoplásicas (FIGURA 1).



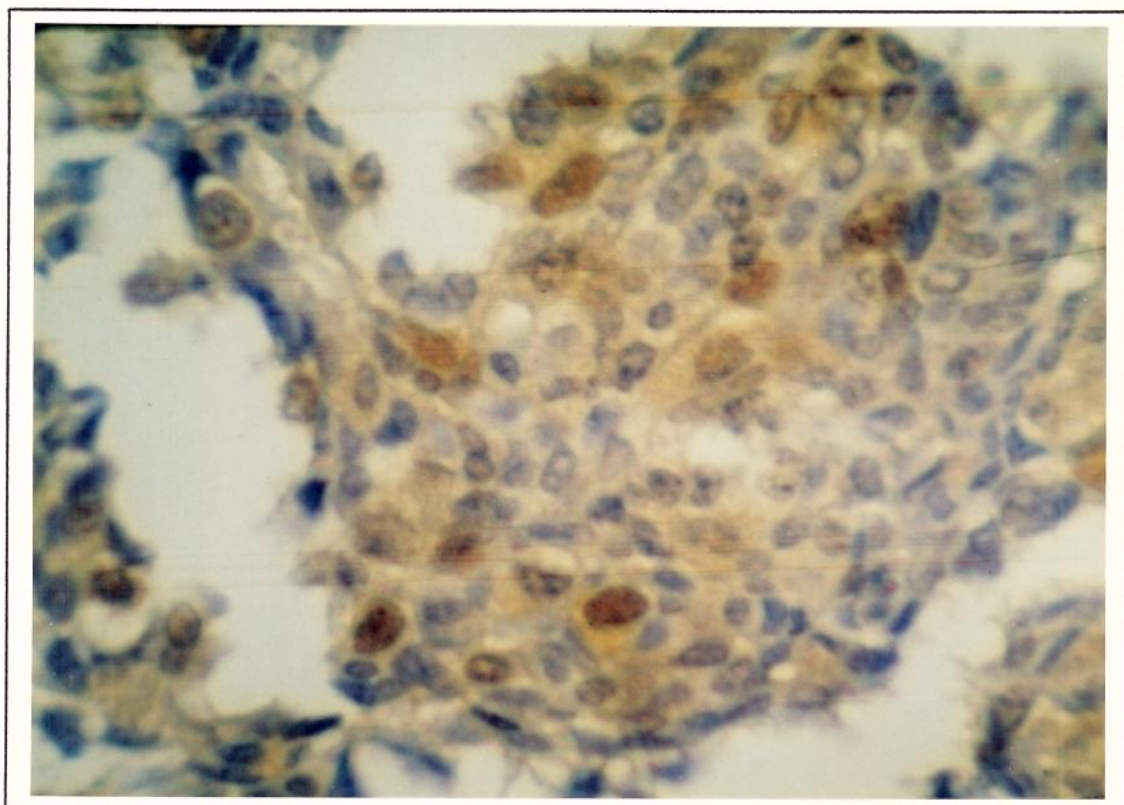


FIGURA 1. Presença da ciclina/PCNA no núcleo das células caracterizada pela coloração acastanhada.

### 3.3.1. Etapas da reação imuno-histoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase

- Hidratação dos espécimes em álcool etílico de concentração decrescente até água destilada;
- Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%, em metanol, por dez minutos;
- Lavagem em água corrente destilada e solução- tampão salino-fosfatada por cinco minutos;
- Bloqueio das reações inespecíficas com soro normal de cavalo a 10%, em tampão salino-fosfatado, por 20 minutos;
- Incubação, por 30 minutos, com anticorpo primário (anti-p185) à temperatura ambiente na diluição de 1:200, em tampão salino-fosfatado;
- Lavagem, em três banhos, com a solução-tampão salino-fosfatada, por cinco minutos;
- Incubação com anticorpo de cavalo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com biotina (anticorpo secundário) 1:200 em tampão, por 30 minutos, a 37<sup>o</sup>C, em câmara úmida;

- Incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase 1:150 em tampão salino-fosfatado, por 30 minutos, a 37<sup>0</sup> C, em câmara úmida;
- Lavagem, em três banhos, com a solução-tampão salino-fosfatada, por cinco minutos;
- Revelação com solução-substrato recém-preparada, contendo 1,2% de peróxido de hidrogênio 10 volumes e 0,03% da DAB, em tampão salino-fosfatado com o pH ajustado para 7,6, por cinco minutos, e sob controle microscópico, à temperatura ambiente;
- Lavagem em água corrente e destilada;
- Desidratação em álcool e montagem com bálsamo do Canadá.

### **3.3.2. Avaliação semiquantitativa**

A análise quantitativa foi realizada pelo método proposto por GARCIA, COLTRERA, GOWN (1989). Em cada um dos casos foi avaliado pelo menos cinco campos representativos de grande aumento. Os tumores foram graduados independentemente por dois observadores, que usaram uma escala semiquantitativa de um a quatro, correspondendo ao percentual de células com colorações nucleares (I = 0 a 25%; II = 26 a 50%; III = 51 a 75%; IV = 76 a 100%). Nos casos em que houve discrepância de resultados foi repetida a análise microscópica da lâmina pelos dois observadores, em conjunto, e uma graduação final de consenso foi atribuída.

### 3.4. Método de estudo, obtenção dos dados e análise estatística

Todos os diagnósticos histológicos foram revistos, sendo incluídos apenas os tumores ductais infiltrativos. A distribuição por grau histológico e grau nuclear seguiu a orientação proposta por BLOOM & RICHARDSON (1957), adaptada por ALVARENGA (1980). Foram considerados grau histológico I os carcinomas bem diferenciados, grau II os moderadamente diferenciados e grau III os poucos diferenciados, de acordo com a formação, ou não, de estruturas glandulares ou tubulares pelas células neoplásicas.

O grau nuclear 1 refere-se aos tumores que apresentam células com núcleo grande, nucléolo proeminente, cromatina grosseira e mitoses abundantes; grau 3, aqueles cujas células têm os núcleos bem diferenciados, pequenos, uniformes, cromatina frouxa, sem nucléolos ou mitoses. O grau nuclear 2 é o intermediário.

Com relação ao receptor de estrógeno, 19 pacientes tinham tumores com a proteína receptora (27,94%), 31 (45,59%) não tinham o receptor nas células tumorais e em 18 (26,47%) não foi realizada esta dosagem.

O índice de proliferação, medido através do percentual de células com coloração nuclear, permitiu agrupar as pacientes em:

**Grau I** - tumores com baixo índice de proliferação, de 0 a 25%;

**Grau II** - tumores com moderado índice de proliferação, de 26 a 50%;

**Grau III** - tumores com alto índice de proliferação, de 51 a 75%;

**Grau IV** - tumores com elevado índice de proliferação, mais de 75% das células apresentando a ciclina/PCNA.

Os parâmetros quantitativos foram comparados por análise de correlação linear através do teste t-Student (t) e a associação entre as variáveis foram analisadas através do teste Qui-Quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), adotando-se 5% (0,05) como nível de significância.

As curvas de sobrevida foram feitas através do método de KAPLAN-MEYER (1958) para a estimativa da função de sobrevida. Para o cálculo da significância estatística entre as curvas utilizou-se a prova de Wilcoxon generalizada (Breslow) e o teste de Mantel-Haenszel, conforme orientações gerais de LEE (1980); PETO et al. (1980).

### 3.5. Apêndice: relação das pacientes estudadas

PAC.	IDADE	EM	GH	GN	N	RE	PCNA	MR	REC	ÓBITO	VSD
1 AF	49	1	3	1	(+)	1	I	9/78	10/89	6/90	-
2 MGF	29	1	3	1	(+)	2	I	2/78	10/89	-	6/92
3 CSD	39	1	3	1	(+)	1	I	8/80	10/90	-	6/92
4 JPC	47	1	3	1	(-)	2	I	9/81	-	-	6/92
5 OO	56	2	3	1	(+)	2	I	3/81	4/84	12/87	-
6 DSO	40	1	3	1	(+)	2	III	5/82	-	-	6/92
7 IFM	56	2	3	1	(+)	1	I	4/82	-	-	6/92
8 MOC	43	1	3	1	(+)	2	I	6/82	-	-	6/92
9 OPC	72	2	3	1	(+)	2	II	4/82	12/85	2/86	-
10 SBB	66	2	3	1	(+)	1	III	3/82	-	-	6/92
11 CB	29	1	3	1	(+)	-	II	3/79	-	-	6/92
12 IB	58	2	3	1	(-)	-	IV	2/79	4/88	11/88	-
13 AM	64	2	3	1	(+)	-	II	11/79	3/87	9/87	-
14 CD	50	1	3	1	(-)	-	I	10/79	-	-	6/92
15 DG	49	1	3	1	(+)	-	I	9/79	4/87	12/87	-
16 DO	63	2	3	1	(-)	-	I	9/79	1/85	4/85	-
17 RS	40	1	3	1	(+)	-	II	8/80	10/89	5/90	-
18 YZ	61	2	1	3	(-)	-	I	9/80	2/89	6/89	-
19 MS	41	1	2	1	(+)	-	IV	6/80	10/81	5/82	-
20 EPD	64	2	3	1	(-)	-	II	12/79	1/88	5/88	-
21 AGS	50	2	3	1	(-)	-	III	9/80	11/84	1/85	-
22 BF	51	2	3	1	(+)	-	IV	3/81	1/83	5/83	-
23 AF	55	2	2	2	(-)	-	I	11/81	-	-	6/92

PAC.	IDADE	EM	GH	GN	N	RE	PCNA	MR	REC	ÓBITO	VSD
24 DO	56	2	1	3	(+)	-	I	2/81	10/90	-	6/92
25 EM	68	2	2	3	(+)	-	I	2/81	10/83	-	6/92
26 AS	39	1	2	2	(-)	-	III	3/82	5/88	10/88	-
27 MTC	47	1	3	1	(+)	-	III	6/82	6/90	5/91	-
28 FDV	49	1	2	3	(-)	-	I	5/82	-	-	6/92
29 DMND	71	2	3	1	(+)	2	I	12/76	5/79	5/81	-
30 JC	34	1	3	1	(-)	2	II	11/76	3/78	2/80	-
31 LA	50	1	3	1	(-)	2	III	11/76	7/80	1/81	-
32 JPOS	67	2	3	1	(+)	2	II	5/77	-	-	6/92
33 LP	45	1	3	1	(+)	2	III	10/77	11/80	3/82	-
34 LD	47	1	3	1	(+)	2	I	11/77	12/89	-	6/92
35 MCS	52	2	3	1	(+)	2	II	11/77	6/79	12/79	-
36 MDG	59	2	3	1	(+)	2	I	5/77	8/80	10/86	-
37 WFO	46	1	3	1	(-)	2	II	11/77	-	-	6/92
38 MMM	44	1	3	1	(-)	2	II	4/78	10/78	-	6/92
39 SM	35	1	3	1	(-)	1	II	3/78	6/79	7/82	-
40 EJB	55	2	2	2	(-)	1	II	9/79	-	-	6/92
41 MCC	66	2	3	1	(+)	2	II	5/79	11/79	12/83	-
42 ABF	57	2	3	2	(+)	1	III	2/80	-	-	6/92
43 AEB	54	1	3	2	(+)	1	I	3/80	-	-	6/92
44 AMCA	42	1	3	1	(+)	1	III	10/80	-	-	6/92
45 MAB	35	1	3	1	(+)	2	I	6/80	12/82	9/83	-
46 TJS	50	1	3	1	(+)	2	III	7/80	-	-	6/92
47 MJF	43	1	3	1	(+)	2	I	9/80	-	-	6/92
48 AZS	66	2	3	1	(-)	2	I	7/81	-	-	6/92

PAC.	IDADE	EM	GH	GN	N	RE	PCNA	MR	REC	ÓBITO	VSD
49 AB	29	1	3	1	(+)	2	I	10/81	5/86	-	6/92
50 CMSS	43	1	3	1	(+)	2	I	2/81	-	-	6/92
51 CDM	58	2	3	1	(+)	1	I	8/81	-	-	6/92
52 CVC	56	2	3	1	(+)	1	II	10/81	-	-	6/92
53 LCC	51	1	3	1	(-)	2	I	5/81	-	-	6/92
54 MFO	41	1	3	1	(-)	1	II	9/81	-	-	6/92
55 NFS	51	1	3	1	(+)	2	II	10/81	10/89	3/91	-
56 RFB	51	1	1	3	(-)	1	III	1/81	-	-	6/92
57 AFB	53	1	3	1	(+)	1	III	6/82	-	-	6/92
58 ETR	67	2	3	2	(+)	1	I	6/82	-	-	6/92
59 GGB	76	2	3	1	(-)	1	I	1/82	-	-	6/92
60 HT	64	2	3	1	(+)	1	III	6/82	10/89	10/90	-
61 MNMF	48	1	3	1	(-)	2	II	5/82	-	-	6/92
62 MAVB	75	2	2	2	(-)	1	II	5/82	-	-	6/92
63 MGL	31	1	3	1	(+)	2	III	6/82	12/83	2/84	-
64 MSP	69	2	3	1	(-)	2	I	1/82	-	-	6/92
65 MAA	33	1	3	1	(-)	2	I	2/82	-	-	6/92
66 OGM	55	1	3	1	(+)	2	II	1/82	-	-	6/92
67 REC	47	1	3	1	(+)	2	II	2/82	-	-	6/92
68 RSA	56	2	1	3	(-)	1	I	3/82	-	-	6/92

EM = Estado Menstrual  
GN = Grau Nuclear  
RE = Receptor de Estrógeno  
VSD = Viva Sem Doença

GH = Grau Histológico  
MR = Mastectomia Radical  
REC = Recidiva



Fichas clínicas das dez primeiras pacientes disponíveis no Ambulatório de Patologia Mamária do CAISM-UNICAMP, fone (0192) 39-7414.

Fichas clínicas de 11 a 28 disponíveis na Clínica Ginecológica da FMUSP - Serviço do "Prof. J. A. Pinotti", fone (011) 280-4824.

Fichas clínicas de 29 a 68 disponíveis na Clínica "Prof. J. A. Pinotti", fone (0192) 51-1197.

## **RESULTADOS**

## 4 . RESULTADOS

---

A ciclina/PCNA foi detectada em todas as amostras. A maioria dos casos (75%) tinha sua expressividade menor que 50%, isto é, ciclina/PCNA grau I e grau II. Embora sem significância, observou-se que os tumores com menores níveis da proteína foram mais freqüentes em pacientes idosas, conforme mostra a TABELA 1.

TABELA 1

Correlação entre os graus da ciclina/PCNA e a idade das pacientes

	Graus da ciclina/PCNA		
	I	II	III-IV
Nº casos (%)	32 (47,06)	19 (27,94)	17 (25,0)
Idade média	52,91	51,32	49,12
Desvio-Padrão	12,23	12,94	9,10

p= 0,5624

F= 0,58

A distribuição dos diferentes graus da ciclina/PCNA, considerando-se o estado menstrual (TABELA 2), evidenciou que os tumores grau III e grau IV foram freqüentes nas pacientes pré-menopausadas (64,71% vs. 35,29%), apesar de predomínio do grau I e do grau II em ambos os grupos.

TABELA 2

Correlação entre os graus da ciclina/PCNA e o estado menstrual

E. Menstrual	Graus da ciclina/PCNA (%)		
	I	II	III-IV
Pré	16 (50)	11 (57,89)	11 (64,71)
Pós	16 (50)	8 (42,11)	6 (35,29)
Total	32 (100)	19 (100)	17 (100)

$$x^2 = 1,02$$

$$p = 0,6013$$

Quanto às metástases ganglionares, não foi observada relação direta entre a presença da ciclina/PCNA e o envolvimento linfonodal axilar.

A TABELA 3 evidencia esta falta de relação onde 22/27 (81,48%) pacientes com axila negativa e 29/41 (70,73%) com metástases são grau I e grau II. O grau III e o IV são mais freqüentes quando a axila é positiva (29,41% vs. 70,59%).

TABELA 3

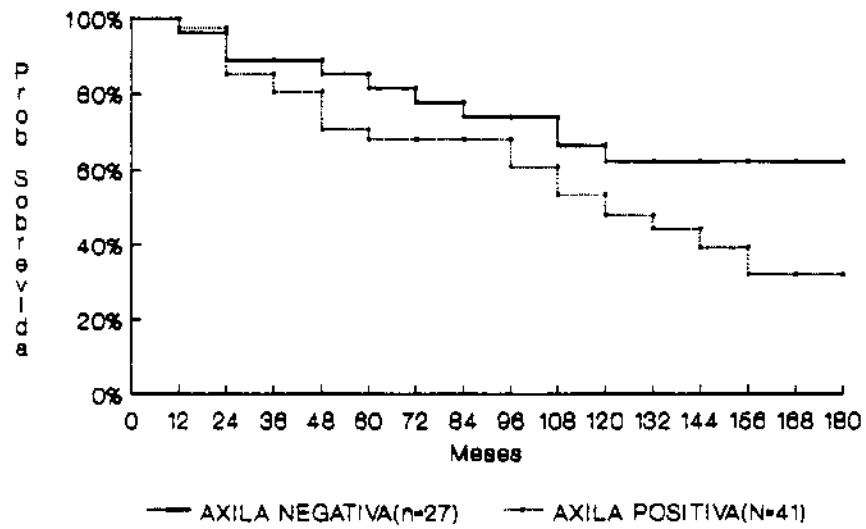
Relação entre os diferentes graus da ciclina/PCNA e a metástase axilar

Axila	Graus da ciclina/PCNA (%)		
	I	II	III-IV
Negativa	12(37,50)	10(52,63)	5(29,41)
Positiva	20(62,50)	9(47,30)	12(70,59)
Total	32(100)	19(100)	17(100)

$$\chi^2 = 2,14$$

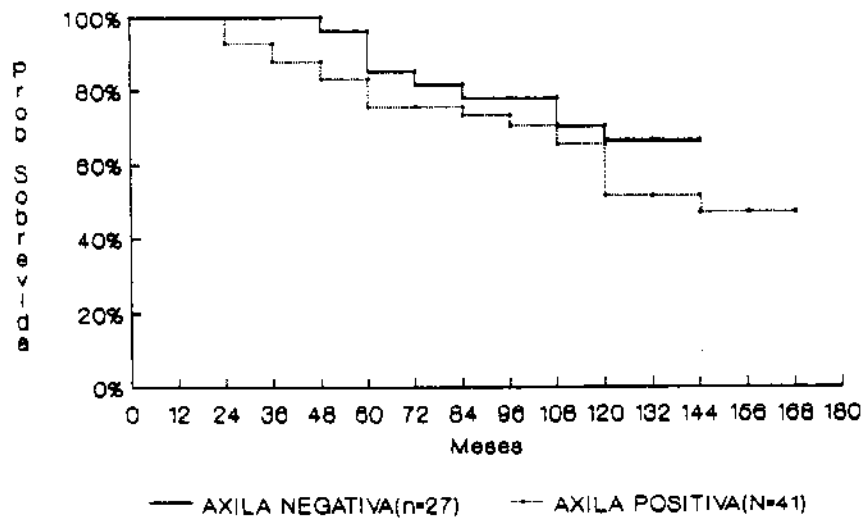
$$p = 0,3424$$

Considerando-se o estado da axila como variável prognóstica, a análise das curvas de sobrevida livre da doença e total (FIGURAS 2 e 3) não evidenciou diferença significativa entre as pacientes T2N0 e T2N1.



z = 1.28 p = 0.2031

FIGURA 2. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida livre de doença de acordo com o estado da axila.



z = 1.20 p = 0.2287

FIGURA 3. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida total de acordo com o estado da axila.

A presença da ciclina/PCNA no núcleo das células tumorais também não se relacionou com a diferenciação histológica do tumor, conforme mostra a TABELA 4.

TABELA 4

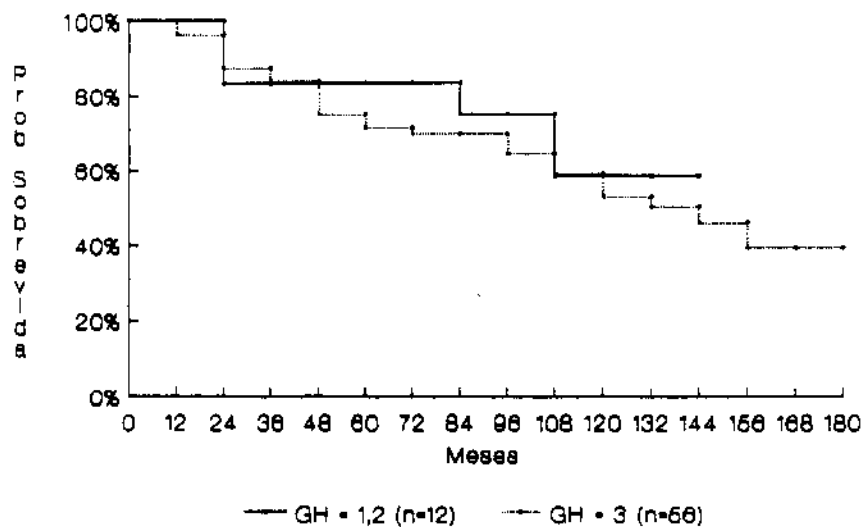
Relação entre os diferentes graus da ciclina/PCNA e o grau histológico do tumor

Grau histológico	Graus da ciclina/PCNA		
	I	II	III - IV
I - II	6(18,75)	3(15,78)	3(17,64)
III	26(81,25)	16(84,22)	14(83,36)
Total	32(100)	19(100)	17(100)

$$\chi^2 = 0,07$$

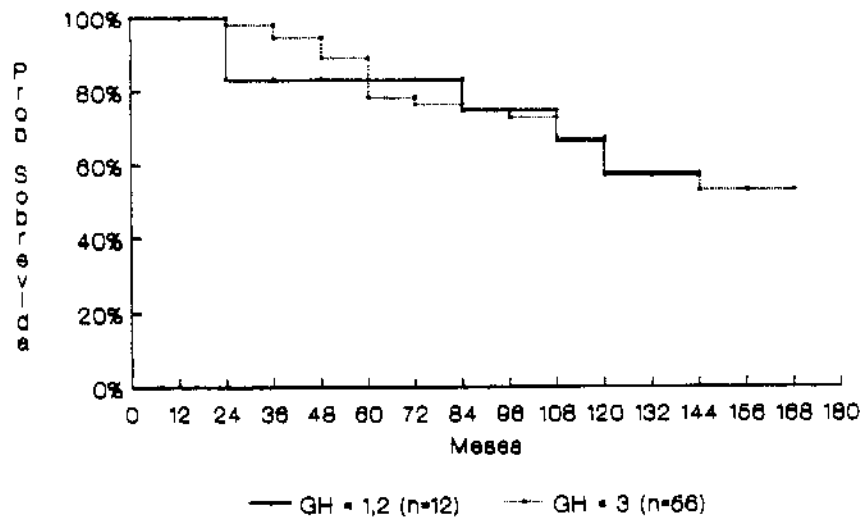
$$p = 0,9647$$

As sobrevidas, livre de doença e total, observadas nas FIGURAS 4 e 5, foram semelhantes quando consideramos apenas o grau histológico como variável prognóstica.



z = 0.49    p = 0.6247

FIGURA 4. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau de diferenciação histológica.



z = 0.04    p = 0.9708

FIGURA 5. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida total de acordo com o grau de diferenciação histológica.



Não houve correlação entre os diferentes graus da ciclina/PCNA e o grau de diferenciação citológica. Tanto as amostras com pouca expressão quanto as com grande expressão de proteína foram sempre mais frequentes nos tumores de grau nuclear 1, conforme mostra a TABELA 5.

**TABELA 5**

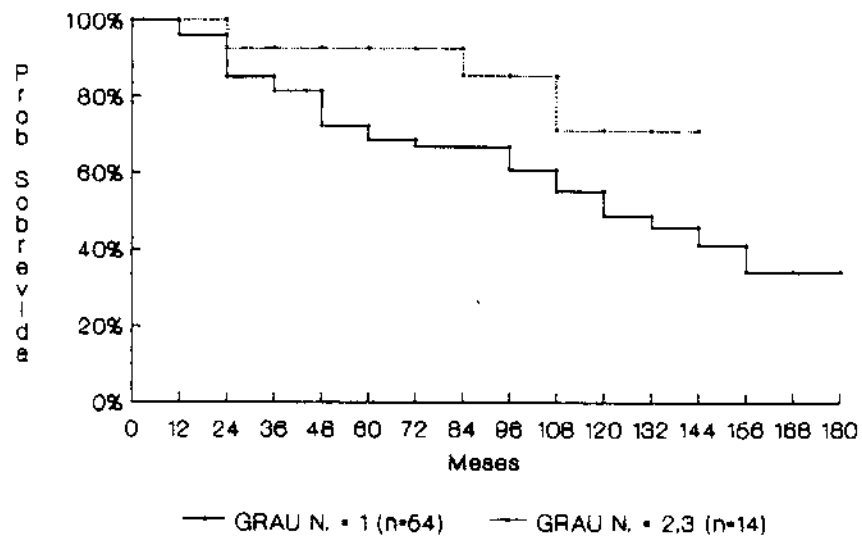
**Relação entre os diferentes graus da ciclina/PCNA e o grau nuclear das células tumorais**

Grau Nuclear	Graus da ciclina/PCNA (%)		
	I	II	III-IV
1	24(75,0)	16(84,21)	14(82,35)
2 - 3	8(25,0)	3(15,79)	3(17,65)
<b>Total</b>	<b>32(100)</b>	<b>19(100)</b>	<b>17(100)</b>

$$\chi^2 = 0,74$$

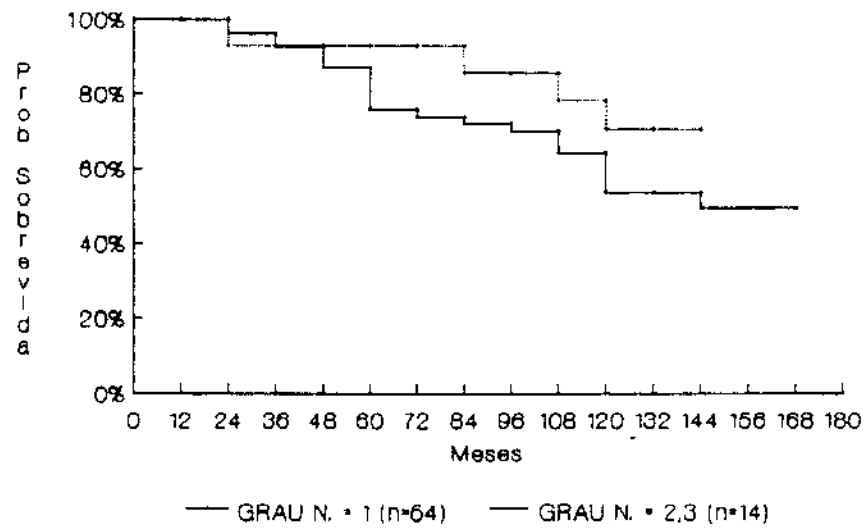
$$p = 0,6912$$

A análise das sobrevidas, considerando-se o grau nuclear como variável prognóstica, evidenciou uma tendência para melhor sobrevida livre da doença nos casos de maior diferenciação citológica, conforme mostram as FIGURAS 6 e 7.



z = 1.74 p = 0.0808 #

FIGURA 6. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau nuclear.



z = 1.22 p = 0.2210

FIGURA 7. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida total de acordo com o grau nuclear.

A presença de receptor de estrógeno também não dependeu do grau da ciclina/PCNA. A TABELA 6 demonstrou que diferentes graus do antígeno nuclear estiveram uniformemente presentes nos tumores com e sem os receptores estrogênicos.

**TABELA 6**

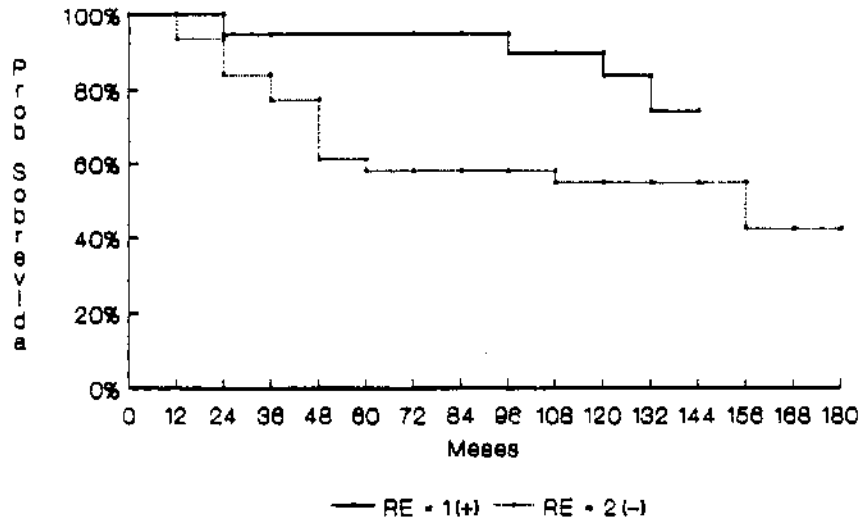
**Relação entre os diferentes graus da ciclina/PCNA e a presença do receptor de estrógeno**

Receptor	Grau da ciclina/PCNA (%)		
	I	II	III - IV
Positivo	8 (33,33)	5 (33,33)	6 (54,55)
Negativo	16 (66,87)	10 (66,67)	5 (45,55)
Total	24 (100)	15 (100)	11 (100)

$$\chi^2 = 1,64$$

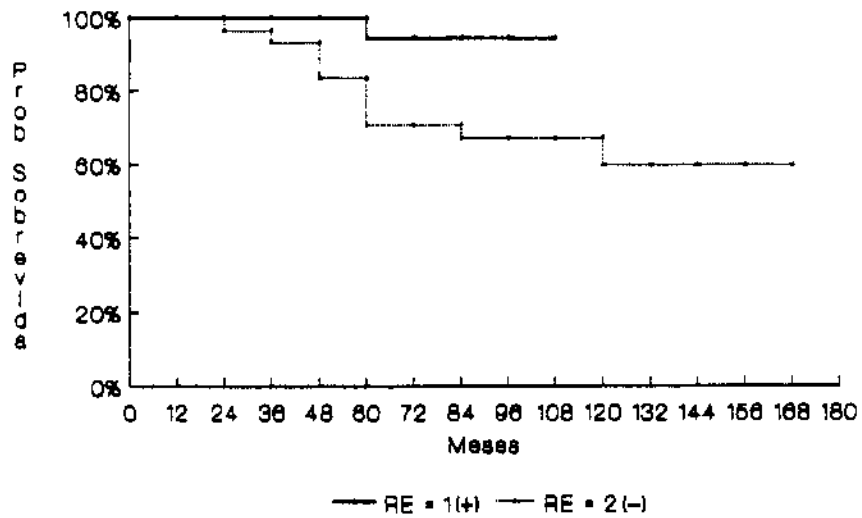
$$p = 0,4407$$

As sobrevidas, livre de doença e total, tomando-se como variável apenas o receptor, foram significativamente melhores nos casos em que havia o receptor de estrógeno, conforme mostram as FIGURAS 8 e 9.



z = 2.03 p = 0.0481 \*

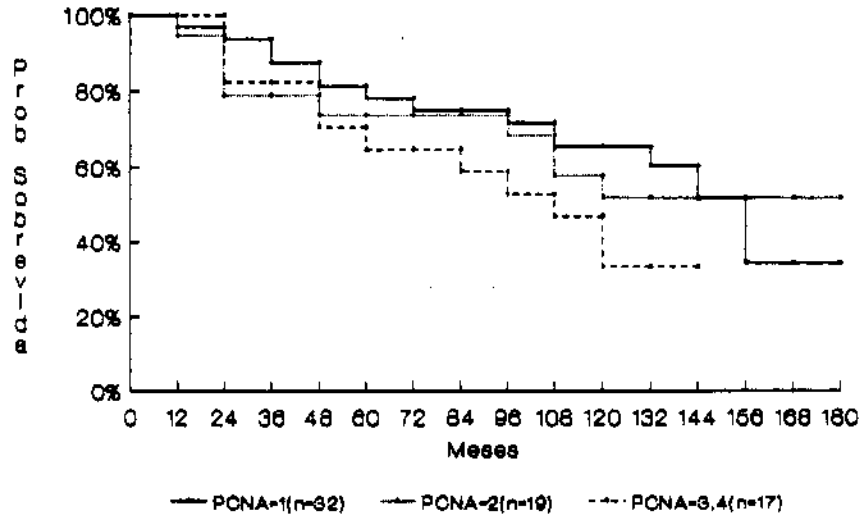
FIGURA 8. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida livre de doença de acordo com o receptor de estrógeno.



z = 2.19 p = 0.0332 \*

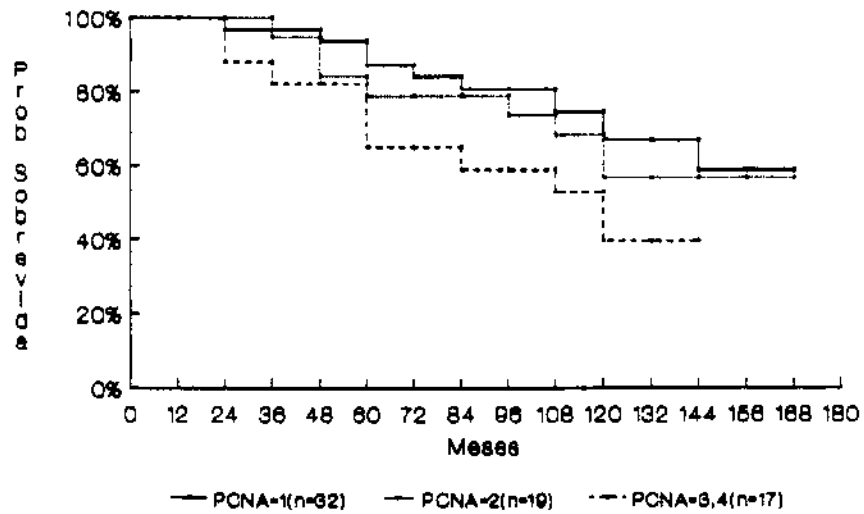
FIGURA 9. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida total de acordo com o receptor de estrógeno.

As sobrevidas, livre de doença e total, não foram significativamente diferentes quando considerado o grau da ciclina/PCNA, embora pacientes com tumores de baixo grau tenham sempre melhores sobrevidas quando comparadas com portadoras de tumores com alta taxa de proteína. Esta tendência é observada nas diferentes análises comparativas, conforme mostram as FIGURAS 10 a 15.



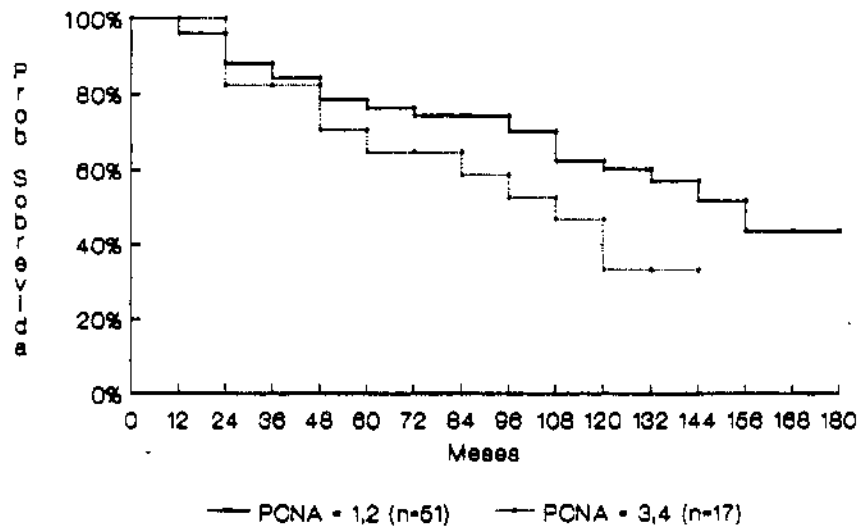
$\chi^2 = 2.87$   $p = 0.2626$

FIGURA 10. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA. PCNA I x II x (III + IV).



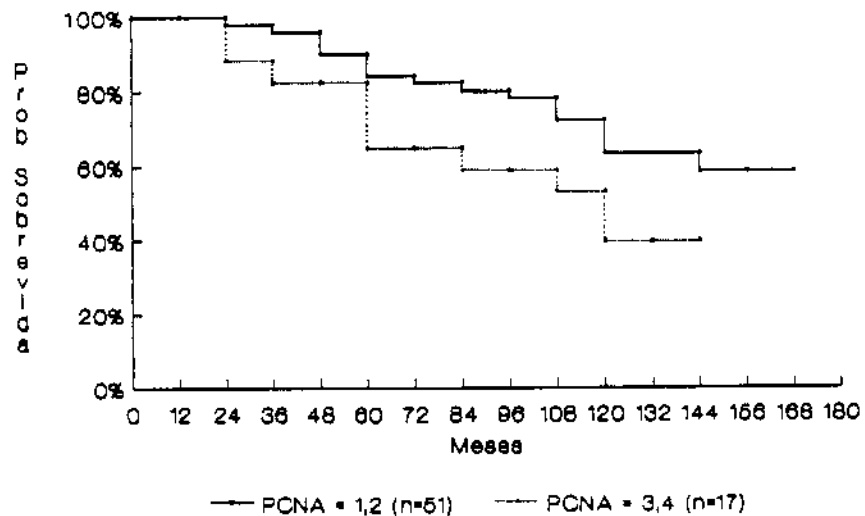
$\chi^2 = 3.80$   $p = 0.1498$

FIGURA 11. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida total de acordo com o grau da ciclina/PCNA. PCNA I x II x (III + IV).



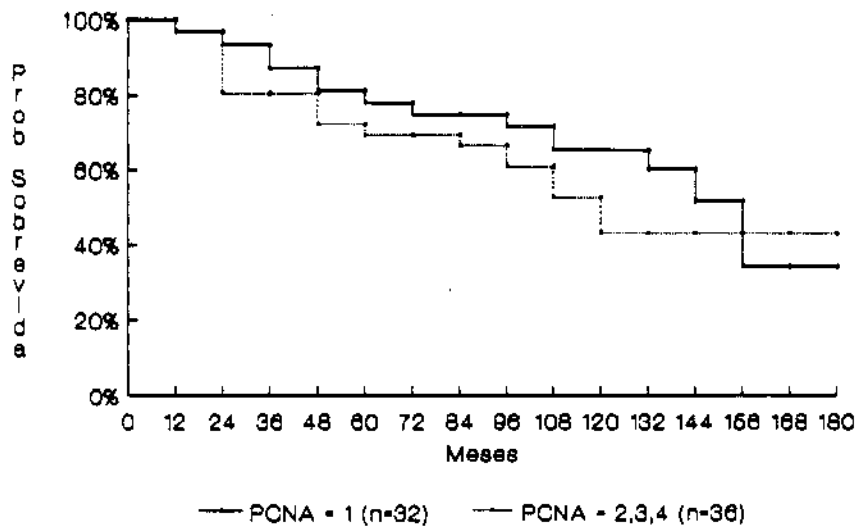
z = 1.44    p = 0.1482

FIGURA 12. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA. PCNA (I + II) x (III + IV).



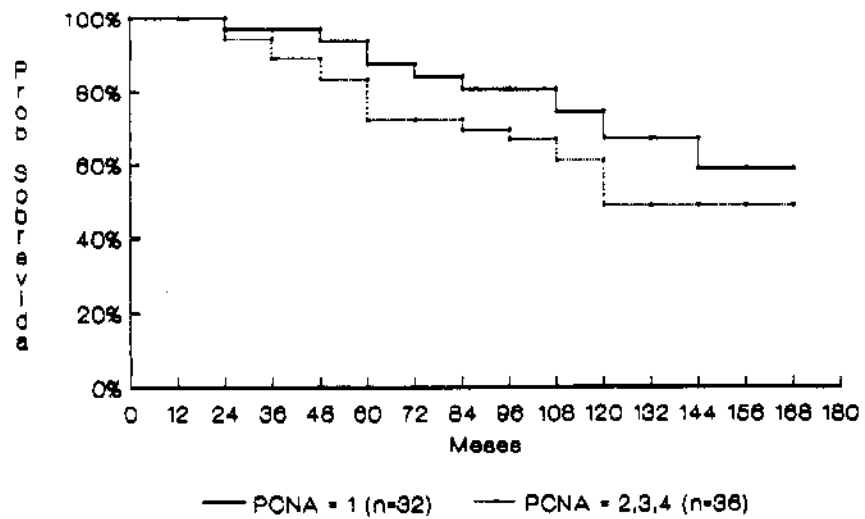
z = 1.84    p = 0.0653 (# Marginal)

FIGURA 13. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida total de acordo com o grau da ciclina/PCNA. PCNA (I + II) x (III + IV).



$z = 1.43$   $p = 0.1534$

FIGURA 14. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA. PCNA I x ( II + III + IV).



$z = 1.54$   $p = 0.1245$

FIGURA 15. Carcinoma da mama estágio II. Sobrevida total de acordo com o grau da ciclina/PCNA. PCNA I x ( II + III+IV).



A avaliação combinada dos diferentes fatores prognósticos mostrou um pior desempenho nos casos com axila positiva, grau histológico III e nuclear 1. Esta tendência torna-se mais evidente se o tumor for receptor de estrógeno negativo e com alto grau da ciclina/PCNA, conforme mostra a TABELA 7.

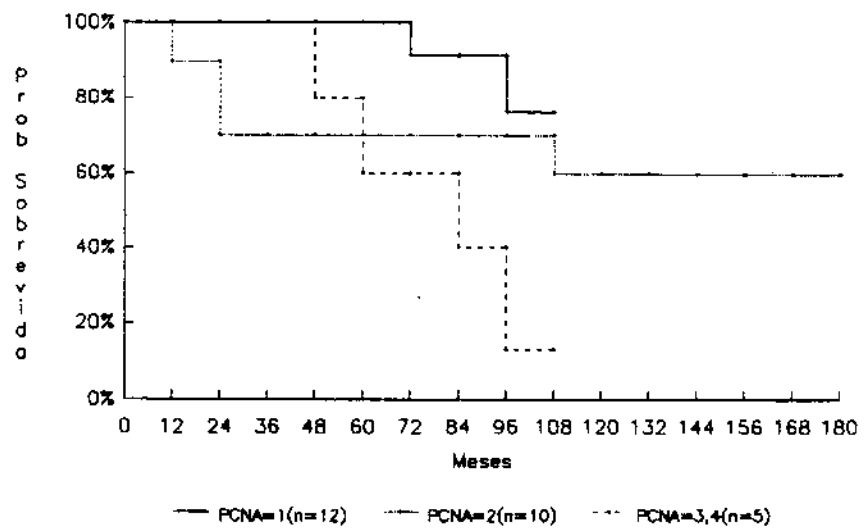
**TABELA 7**

**Análise combinada dos fatores prognósticos no carcinoma da mama estágio II**

Fator prognóstico	Sobrev. livre da doença		Sobrev. Total	
	z	p	z	p
N0 x N1	1,28	0,203	1,20	0,228
GH(I) x GH(II, III)	0,49	0,624	0,04	0,970
GN(1) x GN (2,3)	1,74	0,080	1,22	0,221
RE(+) x RE (-)	2,03	0,048	2,13	0,033
PCNA (I) x PCNA (II,II,IV)	1,43	0,153	1,54	0,124

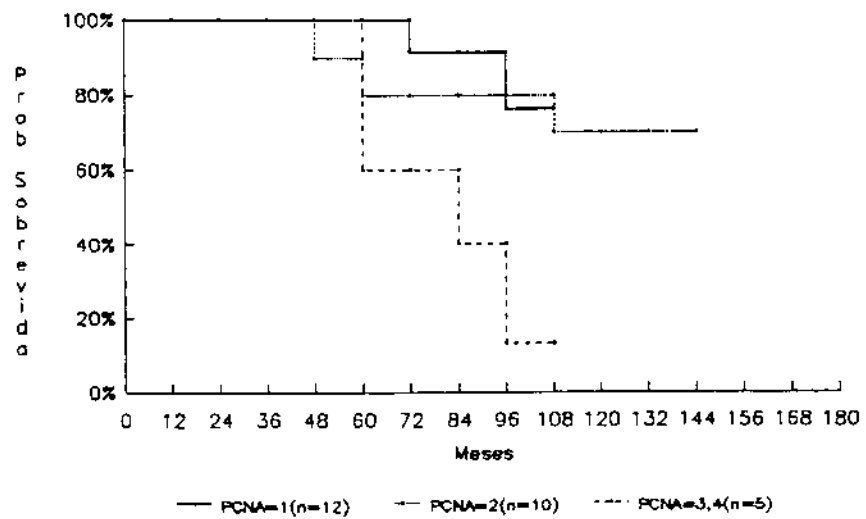
-----  
**Teste utilizado = Wilcoxon generalizado**

Como a axila ainda é o fator clínico e patológico mais utilizado para medida de prognóstico da doença, analisamos a importância da graduação da ciclina/PCNA nos tumores sem metástases ganglionares. As FIGURAS 16 a 21 mostram que as pacientes T2N0, com alta expressão do antígeno, têm elevadas taxas de recidivas e óbitos.



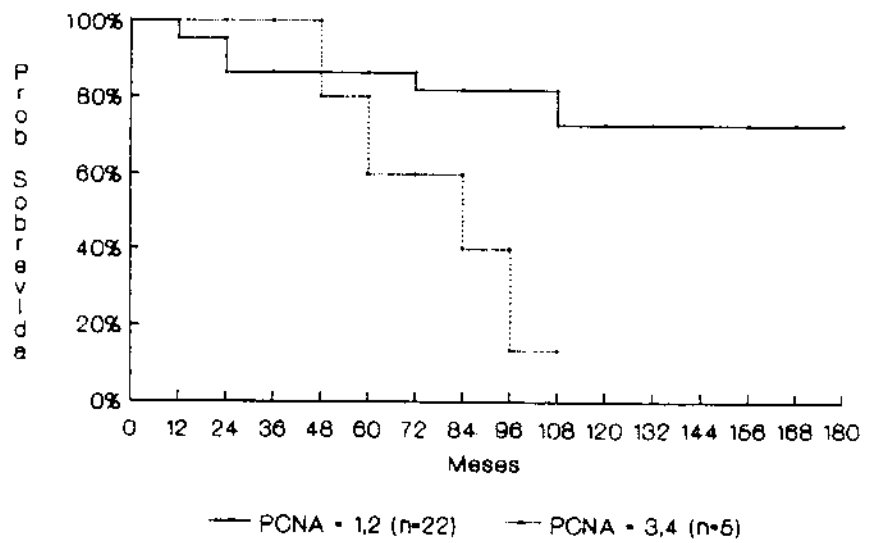
$\chi^2 = 5.36$   $p = 0.0686$  # (Marginal)

FIGURA 16. Carcinoma da mama estágio II - T2N0. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



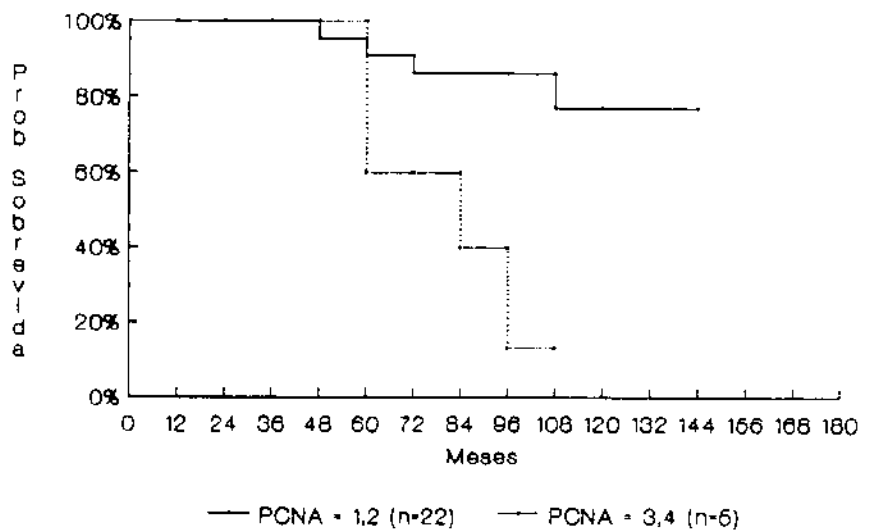
$\chi^2 = 5.73$   $p = 0.0570$  # (Marginal)

FIGURA 17. Carcinoma da mama estágio II - T2N0. Sobrevida total de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



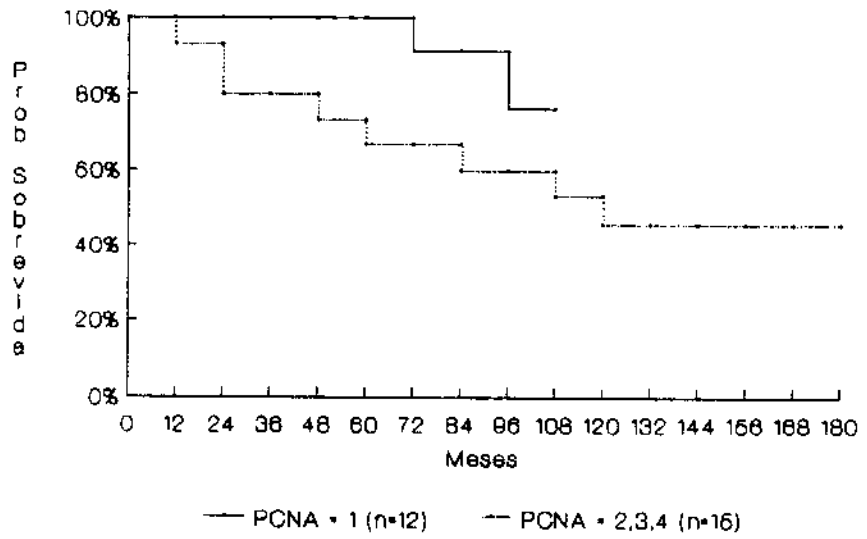
z = 1.80 p = 0.0717 #

FIGURA 18. Carcinoma da mama estágio II - T2N0. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



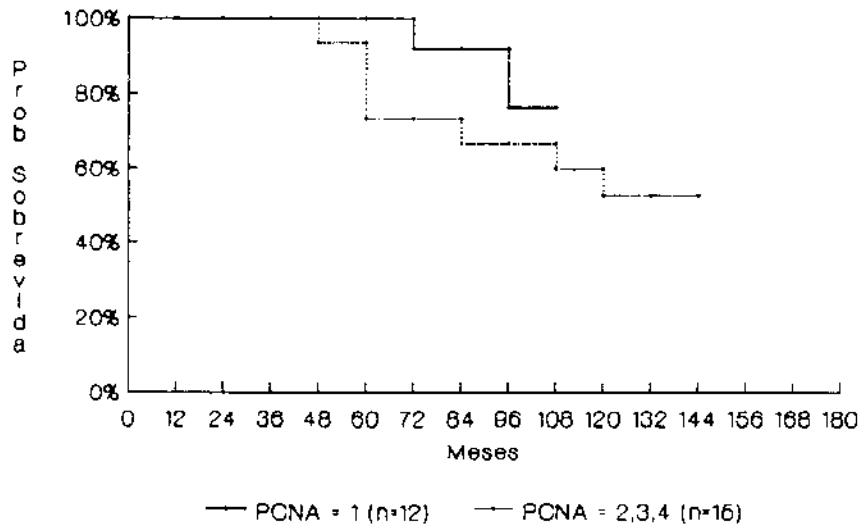
z = 2.26 p = 0.0245 \*

FIGURA 19. Carcinoma da mama estágio II - T2N0. Sobrevida total de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



z = 2.08    p = 0.0372 \*

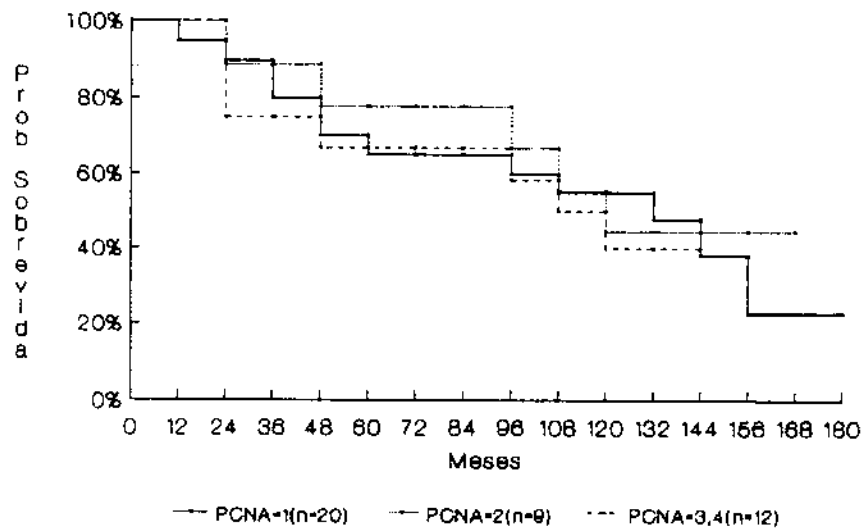
FIGURA 20. Carcinoma da mama estágio II - T2N0. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA (I) vs. (II, III, IV).



z = 1.70    p = 0.0892 #

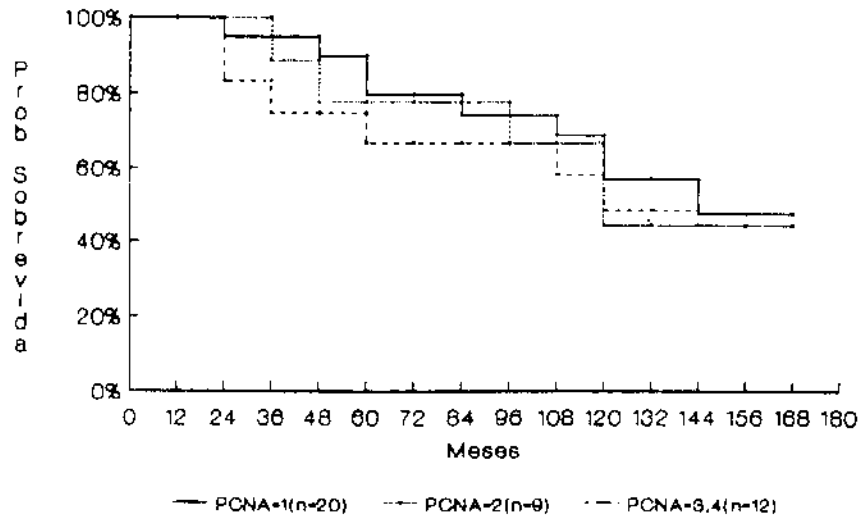
FIGURA 21. Carcinoma da mama estágio II - T2N0. Sobrevida total de acordo com o grau da ciclina/PCNA (I) vs. (II, III, IV).

Esta diferença de sobrevidas observada nos casos N0 não foi encontrada quando havia metástases nos linfonodos da axila, apesar das pacientes com tumores de baixo grau terem sempre uma melhor sobrevida, conforme mostram as FIGURAS 22 a 27.



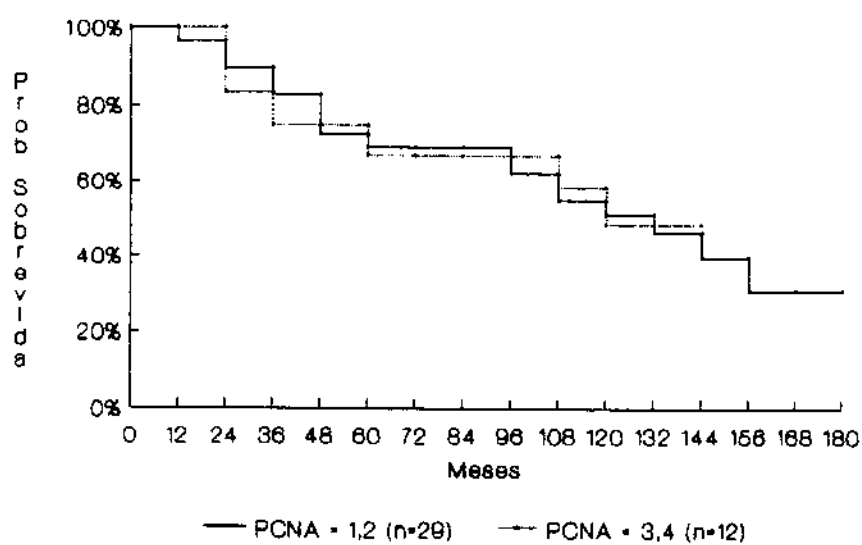
$\chi^2 = 0.34$      $p = 0.8409$

FIGURA 22. Carcinoma da mama estágio II, axila positiva. Sobrevida livre de doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



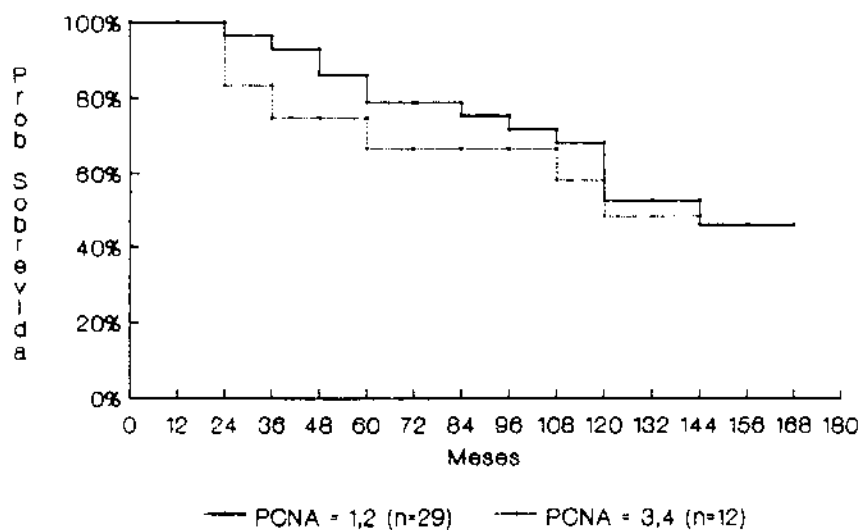
$\chi^2 = 0.61$      $p = 0.7376$

FIGURA 23. Carcinoma da mama estágio II, axila positiva. Sobrevida total de acordo com o grau na ciclina/PCNA.



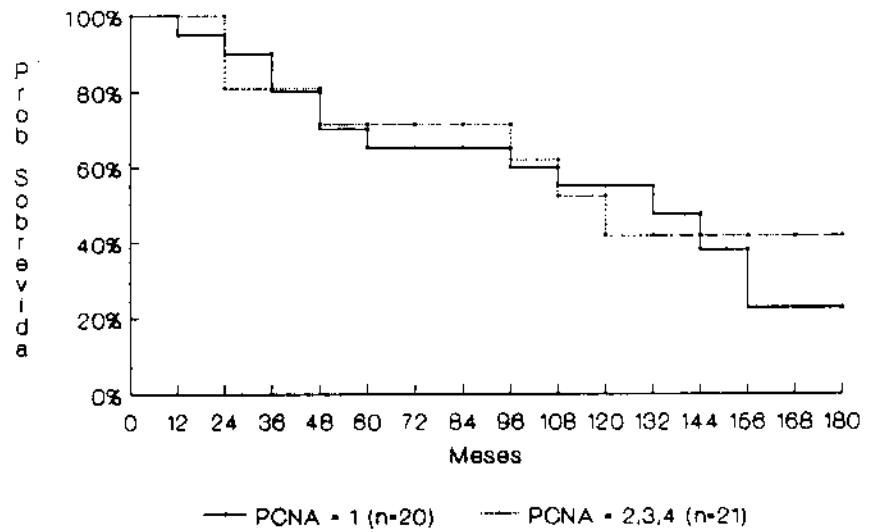
z = 0.57    p = 0.6864

FIGURA 24. Carcinoma da mama estágio II, axila positiva. Sobrevida livre da doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



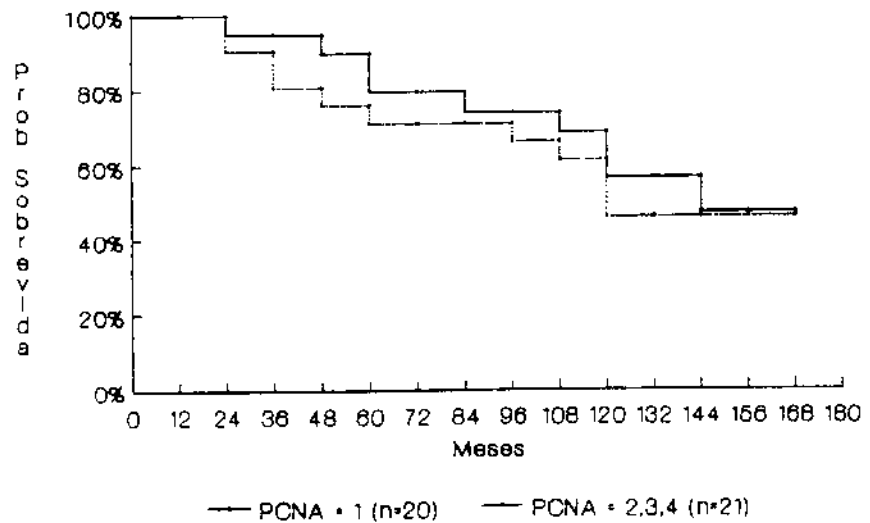
z = 0.66    p = 0.6080

FIGURA 25. Carcinoma da mama estágio II, axila positiva. Sobrevida total de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



z = 0.28 p = 0.7936

FIGURA 26. Carcinoma da mama estágio II, axila positiva. Sobrevida livre da doença de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



z = 0.73 p = 0.4623

FIGURA 27. Carcinoma da mama estágio II, axila positiva. Sobrevida total de acordo com o grau da ciclina/PCNA.



**DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

---

O objetivo fundamental deste estudo foi o de avaliar a importância de um novo marcador nuclear de proliferação celular na definição do prognóstico do carcinoma mamário, estabelecendo os grupos de risco para as recidivas.

O reconhecimento desses grupos e de seus prognósticos facilitará a indicação do tratamento primário e complementar, pois, nos últimos 20 anos, têm sido cada vez mais adotadas as abordagens multidisciplinares com intuito curativo (EARLY BREAST CANCER TRIALIST'S COLLABORATIVE GROUP, 1990).

Seguindo essa tendência, vimos desenvolvendo estudos para a modificação da terapêutica tradicional, acrescentando, à época do diagnóstico, o tratamento medicamentoso sistêmico (TEIXEIRA et al., 1991).

Seria, obviamente, pouco prudente utilizar esse tipo de tratamento, de morbidade às vezes elevada e de alto custo em todas as pacientes (MANSOUR, EUDEY, SHATILA, 1990; FISHER, WOLMARK, WICHERHAM, 1990), já que

somente seriam beneficiadas as portadoras de tumores de má evolução (BONADONNA et al., 1991).

Vários critérios têm sido empregados para selecionar essas pacientes (SIGURDSSON et al., 1990), geralmente definidos através das biópsias ou após o tratamento cirúrgico loco-regional, compreendendo o estado dos linfonodos axilares, o envolvimento dos vasos da mama, a graduação histológica, os receptores hormonais, os oncogenes e os índices de proliferação celular (McGUIRE et al., 1990).

Desde 1977 estamos utilizando, para definição do tratamento adjuvante ou complementar, as informações obtidas pelo exame anatomopatológico e da dosagem bioquímica do receptor de estrógeno.

Essas informações selecionam parcialmente as pacientes que devem ser tratadas sistematicamente, conforme demonstraram DAVIS et al. (1986); FISHER et al. (1988), embora nossos trabalhos nesta área tenham mostrado um benefício significativo nas sobrevidas daquelas que receberam hormônio ou quimioterapia coadjuvantes (PINOTTI et al., 1986).

Em geral, consideramos que o prognóstico da doença depende das características relacionadas com o tumor, mas, segundo McGUIRE (1986), elas são insuficientes para definirmos as mulheres a serem tratadas, sobretudo se portadoras de tumores pequenos e sem metástases axilares.

Novos fatores de prognóstico têm sido recentemente descritos, todos procurando melhorar a definição da evolução e seleção dos grupos de risco. Um destes

fatores é a ciclina/PCNA, proteína nuclear responsável pela polimerização do DNA, que indica o grau de proliferação tumoral.

Devido à relativa facilidade de sua avaliação, quando comparada com outros métodos, a ciclina/PCNA pode ser utilizada com um menor custo. Isoladamente, não é um fator decisivo para a indicação terapêutica. Quando combinada com as características da axila, grau histológico e nuclear e o receptor de estrógeno, representa um importante guia para delinear o prognóstico e o tratamento.

Sendo a ciclina/PCNA uma proteína demonstrada recentemente (MIYACHI et al., 1978), sua relação com o carcinoma da mama ainda não está definida (ROBBINS et al., 1987). Neste trabalho, procuramos definir sua importância e correlacioná-la com as outras medidas prognósticas. A sistemática de avaliação adotada, que seguiu as orientações gerais de GARCIA et al. (1989), possibilitou a análise do material sem maiores dificuldades.

Optamos pelo sistema de graduação semi-quantitativa a fim de evitarmos os resultados subjetivos observados quando se utiliza o critério de definição que agrupa os tumores com grande, média e pequena quantidade de ciclina/PCNA (ROBBINS et al., 1987).

A proteína foi detectada em todos os casos, comprovando sua função nas células em proliferação. Os trabalhos de BRAVO & MAC DONALD-BRAVO (1985); BRAVO (1986); BRAVO & MAC DONALD-BRAVO (1987); OGATA et al. (1987); ROBBINS et al. (1987); NISHIDA, REINHARD, LINN (1988) mostraram que a ciclina/PCNA é uma proteína importante para a iniciação da proliferação celular,

devendo estar presente em menor ou maior grau de expressão conforme a atividade tumoral.

Das pacientes que avaliamos, 32 (47,06%) tinham tumores com baixo grau da ciclina/PCNA, isto é, baixo índice de proliferação e, portanto, com melhor evolução, o que realmente foi demonstrado, conforme evidenciam as curvas de sobrevida das FIGURAS 10 a 15.

As pacientes mais jovens, com idade média de 49,12 anos, tinham tumores com altos graus de expressão da ciclina/PCNA, ou seja, eram portadoras de tumores mais proliferantes. De certa forma este achado pode ser correlacionado com a indiferenciação celular, ausência dos receptores de estrógeno e maior agressividade, conforme demonstraram SILVESTRINI, DAIDONE, Di FRONZO (1979).

Essas mulheres têm, então, tumores mais proliferantes e, portanto, de pior evolução. Este achado explicaria a experiência clínica que vivenciamos no dia-a-dia da prática oncológica, quando observamos recidivas precoces e prognósticos piores em pacientes jovens, conforme demonstraram FALKSON, GELMAN, PRETORIUS (1986).

Outro aspecto ainda não relatado na literatura refere-se à distribuição da concentração da ciclina/PCNA considerando-se o estado menstrual. Das 17 pacientes (25%) com tumores grau III e IV, 11 (64,71%) eram pré-menopausadas, reforçando os resultados descritos. Assim, mulheres jovens, pré-menopausadas, apresentam tumores com alta taxa de proliferação, denotando maior agressividade e requerendo uma abordagem terapêutica complementar também mais agressiva.

Com relação ao estado dos linfonodos axilares, os trabalhos de MOORE et al. (1967); FISHER et al. (1969); CLARK & McGUIRE (1988) apontaram que ele deve ser considerado como um dos principais indicadores do prognóstico, pois guarda, em cerca de 75% das vezes, relação direta com as sobrevidas (CARTER et al., 1989).

A análise dos casos, conforme demonstram as FIGURAS 2 e 3, está em consonância com os trabalhos acima referidos, entretanto as sobrevidas não são significativamente melhores.

Acreditamos que a pequena diferença entre as sobrevidas, livre de doença e total, nestas pacientes deveu-se à intervenção médica, outro fator extrínseco essencial à definição do prognóstico (BONADONNA et al., 1991). Todas as pacientes com axila positiva foram tratadas com quimioterapia, o que certamente melhorou a evolução destes casos.

Uma inferência direta desses resultados seria a de se aplicar a quimioterapia e hormonoterapia a todas as pacientes, independentemente do estado de axila. Devemos, contudo, agir criteriosamente na seleção das mulheres que receberão o tratamento adjuvante. O acréscimo de um outro fator como a ciclina/PCNA poderia ser de grande utilidade.

Dessa maneira, esperávamos que a presença de grande quantidade da proteína nas células tumorais, associada com uma maior agressividade, correspondesse a uma maior invasividade ganglionar regional. Esta relação, entretanto, não ficou estabelecida em nosso material, havendo uma distribuição uniforme da ocorrência de metástase axilar quando consideramos os diferentes graus da ciclina/PCNA, conforme mostra a TABELA 3.

A axila e a ciclina/PCNA seriam, portanto, fatores independentes do prognóstico, e sua combinação definiria melhor o grupo de pacientes com maior risco para recidiva.

Quanto à importância do grau de diferenciação histológica na definição do prognóstico, existem muitas controvérsias. FISHER et al. (1986) atribuíram um pior prognóstico para os casos de metástase axilar em tumores pouco diferenciados, enquanto outros estudos só consideraram relevantes esta avaliação para os casos iniciais (FISHER et al., 1988; ROSEN et al., 1989).

Em nosso material, conforme análise das FIGURAS 4 e 5, não existiu diferença nas sobrevidas. Apesar de freqüentemente citado como um significativo fator prognóstico, acredito que sua utilidade seja duvidosa, principalmente devido às diferenças nos critérios de graduação adotados pelos patologistas (GILCHRIST, KALISH, GOULD, 1985).

Para melhor estabelecer a importância dessa variável, estudamos a correlação entre os diferentes graus histológicos e os da ciclina/PCNA. Esperávamos que esta relação fosse direta, pois os tumores pouco diferenciados deveriam ter uma maior expressão de antígenos. No entanto, a distribuição das taxas da ciclina foi homogênea em todos os graus de diferenciação, em especial nos tumores pouco diferenciados (TABELA 4). Poderiam, então, ser utilizados como medidas independentes do prognóstico.

Com relação ao grau de diferenciação celular ou nuclear, os primeiros trabalhos demonstrando sua importância como fator prognóstico foram os de BLOOM (1950); BLACK, SPEER, OPLER (1965). Em nosso estudo encontramos diferença

significante nas sobrevidas (FIGURAS 6 e 7). Este achado permitiu-nos dizer que o grau nuclear poderá ser utilizado para definir o grupo de pacientes com maior risco de recidivas. Por outro lado, não encontramos relação entre o grau nuclear e os diferentes graus da ciclina/PCNA, havendo uma distribuição homogênea em todos os subgrupos de diferenciação citológica (TABELA 5).

Assim, o grau nuclear e a ciclina/PCNA avaliam independentemente o prognóstico, e os tumores pouco diferenciados citologicamente não são necessariamente grandes produtores da ciclina/PCNA.

Com relação ao receptor de estrógeno, é aceito como de relevância prognóstica (McGUIRE et al., 1977; MEYER et al., 1989; OSBORNE et al., 1980; GODOLPHIN, ELWOOD, SPINELLI, 1981; PINOTTI et al., 1986; FISHER et al., 1988; TEIXEIRA, 1990), o que confirmamos no presente estudo. A análise das FIGURAS 8 e 9 mostra esta diferença significativa com melhor sobrevida livre de doença e total para os casos de tumores com o receptor.

É possível deduzir que tumores receptores negativos são constituídos por células sem a capacidade diferenciada de produzir a proteína receptora, sendo mais agressivos, conforme demonstraram RAYMOND & LEONG (1989).

Admitindo-se que tumores com altos graus de ciclina/PCNA são mais proliferantes e diferenciados, seria de se esperar que eles não tivessem o receptor nuclear para o estradiol. Observamos, porém, que tumores com altos graus de ciclina/PCNA (TABELA 6) estão distribuídos homogeneamente entre os casos receptores positivos e negativos (54,55% e 45,55% respectivamente), sugerindo que o receptor de estrógeno é um fator independente da ciclina/PCNA.



Todas essas correlações levam à conclusão de que a ciclina/PCNA é um novo e independente marcador da agressividade tumoral. Sua dosagem e associação com os outros clássicos fatores pode melhor definir o prognóstico e orientar a terapêutica sistêmica. A aplicação desta conclusão foi observada quando estudamos a relação entre a presença da ciclina e a evolução clínica dos casos T2N0 e T2N1.

Ao considerarmos os diferentes graus da ciclina, conforme mostram as FIGURAS 10 e 11, encontramos uma diferença significativa nas sobrevidas quando comparado o grupo de mulheres com ciclina/PCNA grau I e grau III e IV, isto é, tumores menos ou mais proliferantes. Logo, 75% das mulheres que tinham carcinomas com ciclina/PCNA grau I permaneceram sem doença após dez anos do tratamento primário, enquanto menos de 40% daquelas com ciclina/PCNA III e IV não tiveram recidiva após o mesmo período de seguimento, havendo realmente uma diferença considerável nestes números.

É evidente que o número de pacientes da nossa amostragem não permite fazermos afirmações definitivas. Permitimo-nos, todavia, concluir que existe diferença entre as sobrevidas quando comparados os tumores com baixas e altas taxas da proteína de proliferação.

Outro aspecto ainda não totalmente definido na literatura é a forma mais adequada de se quantificar a ciclina no tecido tumoral. Agrupamos os tumores em graus por julgarmos ser esta a maneira mais objetiva e prática, facilitando a leitura da lâmina. Pela análise das tabelas e figuras anteriores, notamos que os tumores podem ser reunidos em dois grupos: tumores com baixa e tumores com alta expressão da proteína, que são aqueles onde mais de 50% das células contêm a ciclina/PCNA. As FIGURAS 12 e 13 mostram as sobrevidas quando considerados estes dois níveis da proteína.

Novamente não observamos diferença entre as sobrevidas, mas foi clara uma tendência à significância, principalmente se consideradas as sobrevidas tardias. Assim, a divisão em dois grandes grupos tem grande relevo na avaliação prognóstica.

Esse mesmo resultado também foi encontrado quando analisamos os grupos de pouca expressão para a ciclina/PCNA com aqueles com quantidades maiores que 25% (FIGURAS 14 e 15). A diferença não foi estatisticamente significativa, entretanto a análise das sobrevidas aos 120 meses indicou novamente diferentes evoluções nestes grupos de pacientes.

O presente estudo demonstra que as portadoras de tumores com pequena quantidade da ciclina/PCNA no núcleo das células têm uma melhor sobrevida livre de doença e total. Esta diferença entre as sobrevidas é mais evidente em pacientes com tumores com menos de 25% de expressão da ciclina/PCNA do que naqueles onde a proteína está presente difusamente.

Quando esses fatores foram combinados, obtivemos uma melhor medida do prognóstico da doença. A TABELA 7 mostra esta análise. Pudemos observar que o receptor de estrógeno foi isoladamente o fator que melhor definiu o prognóstico, conclusão que havíamos chegado em trabalhos anteriores (TEIXEIRA, 1990).

Fazendo um escalonamento da importância desses fatores, verificamos que o receptor de estrógeno, grau nuclear, ciclina/PCNA, axila e grau histológico são, pela ordem decrescente, os melhores medidores do prognóstico. Teriam, assim considerando, pior prognóstico: as pacientes com grau histológico III, axila positiva, ciclina/PCNA grau III e grau IV, grau nuclear 1 e sem receptor de estrógeno.

Acreditamos que a grande contribuição deste trabalho refere-se à abordagem terapêutica adjuvante para os casos onde não há metástase axilar.

Há muito tempo a axila é considerada o melhor indicador do prognóstico, tanto clínico como patológico (FISHER et al., 1981). Porém, somente após os resultados definitivos e favoráveis da quimioterapia adjuvante (HENDERSON & SHAPIRO, 1991), passou a ser a questão primária na decisão da terapêutica complementar à cirurgia.

As pacientes com envolvimento axilar deveriam ser tratadas com quimioterapia ou hormonoterapia e aquelas sem metástases para os linfonodos axilar receberiam apenas o tratamento loco-regional. Esta é a conduta adotada na maioria dos Serviços e Centros especializados em câncer mamário, mas a partir de 1981 iniciaram-se as tentativas para tratar as mulheres sem metástases, com o objetivo de reduzir as taxas de recidiva neste grupo de pacientes. Estes estudos foram desenvolvidos pelo Ludwig Breast Cancer Study Group (LUDWIG BREAST CANCER STUDY GROUP, 1989), pelo Eastern Cooperative Oncology Group (MANSOUR et al., 1989) e pelo NSABP (FISHER et al., 1989a; FISHER et al., 1989b).

Em nosso Serviço passamos a empregar este método terapêutico em 1984 (TEIXEIRA et al., 1991), com resultados bastante animadores. O percentual de pacientes beneficiadas com este tratamento tóxico, contudo, não justificava a sua utilização em todos os casos. O grande desafio passou a ser selecionar as pacientes com doença limitada à mama e que poderiam ser beneficiadas com a quimioterapia adjuvante.

É certo que essa busca passou por uma etapa inicial - a avaliação metanalítica dos resultados da literatura. O que acontecia com as pacientes que não tinham metástases na axila e que foram tratadas apenas com a cirurgia complementada, ou não, pela radioterapia? A surpresa foi que, dependendo do estágio, 15% a 25% destas mulheres, após dez anos do tratamento primário, estavam mortas em consequência da doença (CARTER et al., 1989). O argumento de que este número não era estatisticamente significativo contra-indicava a quimioterapia e a hormonoterapia e este grupo de mulheres que morria em decorrência desta omissão.

Em 1990 os estudos concentraram-se exatamente no grupo de pacientes que não tinha metástase para axila. Era consenso, na época (NORTON, 1991), que as mulheres com tumores estágio I, T1N0, teriam melhor prognóstico, embora a recidiva ocorresse em cerca de 15% delas após dez anos do tratamento primário (CARTER et al., 1989). Já as pacientes com tumores estágio II, T2N0, tinham um maior risco para as recidivas, pois o tamanho do tumor estava diretamente correlacionado com o envolvimento da axila (FISHER et al., 1969).

Era necessário, portanto, serem estabelecidos os critérios de seleção para a indicação do tratamento complementar adjuvante, a fim de ser obtida a cura ou a redução substancial das recidivas.

Neste nosso estudo incluímos somente as pacientes com tumores estágio II, T2N0 e T2N1 mais freqüentes e com um maior risco de recidiva, permitindo, pois, uma melhor avaliação num menor intervalo de tempo.

Levando-se em conta a axila e o grau da ciclina, observamos, nas FIGURAS 16 a 21, uma diferença significativa quando comparadas as pacientes sem

metástases na axila, ciclina/PCNA grau I versus ciclina/PCNA grau II, II e IV. O número de pacientes estudado foi pequeno, o que prejudicou afirmações definitivas a partir destes dados, mas há uma evidente diferença tanto na sobrevida livre da doença quanto na total.

As melhores sobrevidas são observadas no grupo de pacientes com axila negativa e com pouca expressão da ciclina/PCNA. Esta medida poderá selecionar as mulheres com pior evolução e que deverão ser tratadas. Assim, o estudo deste marcador da proliferação celular nos casos de axila negativa será primordial e certamente contribuirá para o esclarecimento da questão sobre a necessidade do tratamento adjuvante. Acreditamos até que esta avaliação será um novo marco na escolha da terapêutica, dado que o receptor de estrógeno, também significativo no nosso estudo, está sujeito a críticas, em especial quanto ao método da dosagem e sua utilidade nas mulheres pré-menopausadas (McGUIRE, 1991).

O tratamento adjuvante para as pacientes com axila negativa não deve ser considerado uma abordagem experimental, conforme podemos deduzir da análise das FIGURAS 22 a 27, onde não se observaram diferenças nas sobrevidas das pacientes que tinham metástases na axila.

As pacientes com axila positiva e com ciclina/PCNA grau III e grau IV, por conseguinte de pior prognóstico, têm evolução semelhante à das mulheres com axila positiva e ciclina/PCNA grau I. Este resultado decorre, sem dúvida, da eficácia da interferência médica, pois, como já comentamos, estas pacientes foram tratadas com quimioterapia.

A análise das figuras mostra a importância da integração médica na mudança do prognóstico das mulheres com carcinoma mamário e com axila positiva. Conseqüentemente, se a intervenção médica mudou para melhor o prognóstico destes casos, seguramente mudará para melhor o prognóstico das pacientes sem metástases e que tenham maior risco para as recidivas.

A ciclina/PCNA é uma medida importante desse risco, podendo ser utilizada como guia da terapêutica complementar (ROBBINS et al., 1987). Os estudos nos carcinomas da mama e em outros tumores sólidos são poucos (MOTTOLESE et al., 1991; del GIGLIO et al., 1992; SHIN et al., 1992; BLEIBERG, MORRET, GALAND, 1993), mas é evidente, conforme demonstramos, que esta proteína, pela facilidade de utilização e pela possibilidade de avaliação em cortes parafinados, contribuirá para melhor definir os critérios de risco e de indicação terapêutica.

Certamente as pacientes que têm metástases na axila ou tumor maior que 5cm não serão beneficiadas com esta quantificação, uma vez que seu prognóstico já está definido (FISHER et al., 1975). As grandes beneficiadas serão as mulheres com pequenos tumores e, quiçá, aquelas portadoras de carcinoma "in situ". Se a ciclina/PCNA estiver presente no núcleo em mais de 50% das células, estes tumores serão potencialmente mais agressivos e de maior risco para a recidiva.

Todas essas considerações permitem-nos afirmar que a ciclina/PCNA é um novo fator de medida prognóstica do carcinoma da mama e, quando utilizado em combinação com os fatores já conhecidos, define a maneira mais racional para tratar e acompanhar as pacientes portadoras desta doença.

**CONCLUSÕES**

## 6 . CONCLUSÕES

---

6.1. O método da avaliação da ciclina/PCNA pela técnica da imunoperoxidase é simples e pouco oneroso;

6.2. A presença da ciclina/PCNA no carcinoma mamário pode ser graduada de acordo com a distribuição do pigmento nos núcleos das células;

6.3. Não houve relação direta entre os diferentes graus da ciclina/PCNA e o comprometimento axilar, grau histológico, grau nuclear e receptor de estrógeno;

6.4. Os tumores com baixa expressão da ciclina/PCNA têm um melhor prognóstico;

6.5. Uma baixa expressão da ciclina/PCNA associada a uma axila negativa, grau nuclear 2 e 3 e receptor de estrógeno positivo caracterizam as pacientes com doenças de bom prognóstico;



**6.6. Uma alta expressão da ciclina/PCNA em tumores sem metástase axilar define o grupo de maior risco para recidivas.**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

---

ALBERT, S.; BELLE, S.; SWANSON, G.M. - Recent trends in the treatment of primary breast cancer. *Cancer*, 41:2399-404, 1978.

ALVARENGA, M. - Anatomia Patológica da Mama. In: PINOTTI, J.A. (ed). - *Diagnóstico em Mastologia*. Ed. Manole, São Paulo, 1980. p.135-65.

BAAK, N.P.A.; van DOP, H.; KURVER, P.H.J.; HERMANS, J. - The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer*, 56:374-82, 1985.

BATTAGLIA, F.; SCAMBIA, G.; ROSSI, S.; PANCINI, P.B.; BELTANTONE, R.; POLIZZI, G.; QUERZOLI, P. NEGRINI, R.; IACOBELLI, S.; CRUCITTI, F.; MANCUSO, S. - Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid receptors and axillary node involvement. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 24:1685-90, 1988.

BLEIBERG, H.; MORRET, M.; GALAND, C. - Correlation between (3H) thymidine and proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin indices in archival, formaldehyde-fixed human colorectal tissues. *Eur. J. Cancer*, 29:400-3, 1993.

BLOOM, H.J.G. - Prognosis in carcinoma of the breast. *B. J. Cancer*, 4:259-89, 1950.

BLOOM, H.J.G. & RICHARDSON, W.W. - Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 11:359-77, 1957.

BONADONNA, G.; BRUSSAMOLINA, M.; VALAGUSSA, P.; ROSSI, A.; BRUGNATELLI, L.; BRAMBILLA, C.; DE LENA, M.; TANCINI, G.; BAJETTA, E.; MUSUMECI, R.; VERONESI, U. - Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 294:405-10, 1976.

- BONADONNA, G. & VALAGUSSA, P. - Current systemic therapy for resectable breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 3:259-75, 1985.
- BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P.; TANCINI, G. - Current status of Milan adjuvant chemotherapy trials for node-positive and node-negative breast cancer. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1:45-9, 1986.
- BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P.; BRAMBILLA, C.; MOLITERNI, A.; ZAMBETTI, M.; FERRARI, L. - Adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer with chemotherapy and/or endocrine therapy. *Semin. Oncol.*, 18:515-24, 1991.
- BOUZUBAR, N.; WALKER, K.J.; GRIFFITHS, K.; ELLIS, I.O.; ELSTON, C.W.; ROBERTSON, J.F.R.; BLAMEY, R.W.; NICHOLSON, R.I. - Ki-67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br. J. Cancer*, 59:943-7, 1989.
- BRAVO, R. & CELLIS, J.E. - A search for differential polypeptide synthesis through the cell cycle of HeLa cells. *J. Cell. Biol.*, 84:795-802, 1980.
- BRAVO, R. & MACDONALD-BRAVO, H. - Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, 4:655-61, 1985.
- BRAVO, R. - Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp. Cell. Res.*, 163:287-93, 1986.
- BRAVO, R. & MACDONALD-BRAVO, H. - Existence of two population of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J. Cell. Biol.*, 105:1549-54, 1987.
- BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P.A.; MACDONALD-BRAVO, H. - Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase alpha. *Nature*, 326:515-7, 1987.
- BRIFFOD, M.; SPYRATOS, F.; TUBIANA-HULIN, M.; PALLUD, C.; MAYRAS, C.; FILLEUD, A.; ROUESSE, J. - Sequential cytopunctures during preoperative chemotherapy for primary breast carcinoma. *Cancer*, 63:631-7, 1989.
- CAPONY, F.; ROUGEOT, C.; MONTCOURRIER, S.G.; ROCHEFORT, H. - Increased secretion altered processing and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res.*, 49:3904-9, 1989.

- CARTER, C.L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E. - Relationship of tumor size, lymph node status, and survival in 24,700 breast cancer cases. *Cancer*, 63:181-7, 1989.
- CELLIS, J.E.; BRAVO, R.; LARSEN, P.M.; FEY, S.J. - A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well transformed cells. *Leuk. Res.*, 8:143-57, 1984.
- CELLIS, J.E. & CELLIS, A. - Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. - USA*, 82:3262-6, 1985.
- CHEVALLIER, B.; HEINTZMANN, F.; MOSSE, R.; DANCE, J.P.; BATIST, P.; GRAIC, Y.; BRUNELLE, P.; BASUYAN, J.P.; COMEZ, M.; ASSELAIN, B. - Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in operable breast cancer. *Cancer*, 62:2517-24, 1988.
- CLARK, G.M. & McGUIRE, W.L. - Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Sem. Oncol.*, 15:20-5, 1988.
- CLARK, G.M.; DRESSLER, L.G.; OWENS, M.A. - Prediction of relapse or survival in patients with node negative breast cancer by DNA flow cytometry. *New Engl. J. Med.*, 30:627-33, 1989.
- CLARK, G.M.; OWENS, M.A.; McGUIRE, W.L. - A new s-phase model predicts recurrence for aneuploid as well as diploid node-negative breast cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 10:44, 1991 (Abstract).
- COHEN, S.; USHIRO, H.; STOSCHECK, C. - A native 170.000 daltons epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 257:1523-31, 1982.
- CUTLER, S.J.; MYERS, M.H.; GREEN, S.B. - Trends in survival rates of patients with cancer. *New Engl. J. Med.*, 293:122-4, 1975.
- DAVIS, B.W.; GELBER, R.D.; GOLDHIRSCHI, A.; HARTMANN, W.H.; LOCKER, G.W.; REED, R.; GOLONH, R.; SÄVE-SÖDERBERGH, J.; HOLLOWAY, L.; RUSSEL, I.; RUDENSTAM, C.M. - Prognostic significance of tumor grade as clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer*, 58: 2622-70, 1986.

del GIGLIO, A.; O'BRIEN, S.; FORD, R.; SAYA, H.; MANNING, J.; KEATING, M.; JOHNSTON, D.; KHETAN, R.; EL NAGGAR, A.; DEISSEROTH, A. - The prognostic value of Proliferative Cell Nucleous Antigen (PCNA) expression in chronic lymphoid leukemia (CLL). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 11:269, 1992 (Abstract).

EARLY BREAST CANCER TRIALIST'S COLLABORATIVE GROUP - Treatment of early breast cancer: volume 1 - Worldwide evidence in 1985-1990. Oxford University Press, Oxford, 1990. 207p.

ELLEDGE, R.M.; McGUIRE, W.L.; OSBORNE, C.K. - Prognostic factors in breast cancer. *Sem. Oncol.*, 19:244-53, 1992.

EWERS, S.B.; LANGSTREM, E.; BADETORP, B. - Flow-cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry*, 5:408-19, 1984.

FALKSON, G.; GELMAN, R.S.; PRETORIUS, F.J. - Age as a prognostic factor in recurrent breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 4:663-71, 1986.

FALLENIUS, A.G.; FRANZEN, S.A.; AUER, C.U. - Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. *Cancer*, 62:521-30, 1988.

FISHER, B.; RAVDIN, R.G.; AUSMAN, R.K.; SLACK, N.H.; MOORE, G.E.; NOER, R.J. - Surgical adjuvant chemotherapy in cancer of the breast. Results of a decade of cooperative investigations. *Ann. Surg.*, 168:337-56, 1968.

FISHER, B.; SLACK, N.H.; BROSS, I.D.J., and cooperating investigators. - Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer*, 24:1071-80, 1969.

FISHER, B.; SLACK, N.; KATRYCH, D.; WOLMARK, N. - Ten-year follow-up results of patients with carcinoma of the breast in a cooperative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 140:528-34, 1975.

FISHER, E.R.; GREGORIO, R.M.; FISHER, B. - The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project. *Cancer*, 36:1-85, 1975.

FISHER, B.; WOLMARK, N.; BAUER, M.; REDMOND, C.; GEBHARDT, M. - The accuracy of clinical nodal staging and limited axillary dissection as a determinant of histologic nodal status in carcinoma of the breast. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 152:765-72, 1981.

- FISHER, E.R. - Prognostic and therapeutic significance of pathological features of breast cancer. **Natl. Cancer Inst. Monogr.**, 1:29-34, 1986.
- FISHER, B.; FISHER, E.R.; REDMOND, C. - Tumor nuclear grade, estrogen receptor, and progesterone receptor as an indicator of outcome following adjuvant therapy for breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, 7:147-60, 1986.
- FISHER, E.R.; SASS, R.; FISHER, B. - Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project: correlations with concordant and discordant estrogen and progesterone receptors. **Cancer**, 59:1554-9, 1987.
- FISHER, B.; REDMOND, C.; FISHER, E.R.; CAPLAN, R. - Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients. Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. Protocol B.06. **J. Clin. Oncol.**, 6:1076-87, 1988.
- FISHER, B.; REDMOND, C.; DIMITROV, N.V.; BOWMAN, D.; LEGAULT-POISSON, S.; WICKERHAM, L.; WOLMARK, N.; FISHER, E.R.; MARGOLESE, R.; SUTHERLAND, C.; GLASS, A.; FOSTER, R.; CAPLAN, R. - A randomized clinical trial evaluating sequential methotrexate and fluorouracil in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-negative tumors. **New Engl. J. Med.**, 320:473-8, 1989a.
- FISHER, B.; CONSTANTINO, J.; REDMOND, C.; POISSON, R.; BOWMAN, D.; COUTURE, J.; DIMITROV, N.V.; WOLMARK, N.; WICKERHAM, D.L.; FISHER, E.R.; MARGOLESE, R.; ROBIDOUX, A.; SHIBATA, H.; TERZ, J.; PATERSON, A.H.G.; FELDMAN, M.I.; FARRER, W.; EVANS, J.; LICKLEY, H.L.; KETNER, M. - A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patient with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. **New Engl. J. Med.**, 320:479-84, 1989b.
- FISHER, B.; WOLMARK, N.; WICKERHAM, D.L. - Current NSABP trial of adjuvant therapy for breast cancer. In: SALMON, S.E. (ed) - **Adjuvant therapy of cancer VI**. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1990, p.275-85.
- FOEKENS, J.A.; RIO, M.C.; SEGUIN, P.; van LUTTER, W.L.J.; FAUQUE, J.; NAP, M.; KLIJIN, J.G.M.; CHAMBON, P. - Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. **Cancer Res.**, 50:3832-7, 1990.
- GARCIA, R.L.; COLTRERA, M.D.; GOWN, A.M. - Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed embedded tissues. **Am. J. Pathol.**, 134: 733-9, 1989.

- GENTILI, C.; SANFILIPPO, O.; SILVESTRINI, R. - Cell proliferation and its relationship to clinical features and relapse in breast cancer. **Cancer**, 48:974-9, 1981.
- GILCHRIST, K.W.; KALISH, L.; GOULD, V.E. - Interobserver reproducibility of histopathological features in stage II breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, 5:3-10, 1985.
- GODOLPHIN, W.; ELWOOD, J.M.; SPINELLI, J.J. - Estrogen receptor quantification and staging as complementary prognostic indicators in breast cancer: a study of 583 patients. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, 288:677-83, 1981.
- GRAY, J.W. - Monoclonal antibodies against bromodeoxyuridine. **Cytometry**, 6:499-505, 1985.
- GRIMAUX, M.; ROMAIN, S.; REMVIKO, V.M. - Prognostic value of epidermal growth factor receptor in node-positive breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, 14:77-90, 1989.
- HEDDLEY, D.W.; FRIELANDER, M.C.; TAYLOR, I.W. - Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. **J. Histochem. Cytochem.**, 31:1333-5, 1983.
- HEGG, R. - **Superexpressão do oncogene HER-2/NEU em carcinomas da mama. Análise clínica e imunohistoquímica.** São Paulo, 1992. (Tese de Livre-Docência, USP).
- HENDERSON, I.C. & CANELLOS, G.P. - Cancer of the breast. The past decade. **N. Engl. J. Med.**, 302:17-30, 1980.
- HENDERSON, I.C. & SHAPIRO, C.L. - Adjuvant chemotherapy: an overview. In: POWLES, T.J. & SMITH, I.E. (eds). **Medical management of breast cancer.** Cambridge, Martin Dunitz, 1991. p.197-215.
- HENNESSY, C.; HENRY, J.A.; MAY, F.E.B.; WESTLEY, B.R.; ANGUS, B.; LENNARD, T.W.J. - Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. **J. Natl. Cancer Inst.**, 83:281-5, 1991.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. - Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, 29:577-80, 1981.



- JASKULSKI, D.; DEL RIEL, J.K.; MERCER, W.E.; COLABRETTA, B.; BASERGA, R. - Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA/cyclin. *Science*, 240:1544-6, 1986.
- KALLIONIEMI, O.P.; BLANCO, G.; ALAVAikko, M.; HIETANEN, T.; MATTILA, J.; LAUSLAHTI, K.; KOIVULA, T. - Tumor DNA ploidy as an independent prognostic factors in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 56:637-42, 1987.
- KALLIONIEMI, O.P.; BLANCO, G.; ALAVAikko, M.; HIETANEN, T.; MATTILA, J.; LASLAHTI, K.; LEHTINEN, M.; KOIVULA, T. - Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. *Cancer*, 62:2183-90, 1988.
- KAPLAN, G. & MEYER, P. - Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.*, 53:457-81, 1958.
- KURKI, P.; OGATA, K.; TAN, E.M. - Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 109:49-59, 1988.
- LEE, E.T. - Statistical methods for survival data analysis. Belmont, California, Lifetime Learning publications, 1980.
- LEWIS, S.; LOCKER, A.; TODD, J.H.; BELL, J.A.; NICHOLSON, R.; ELSTON, C.W.; BLAMEY, R.W.; ELLIS, I.O. - Expression of epidermal growth factors receptor in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 43:385-9, 1990.
- LIPPMAN, M.E. & ALLEGRA, J.C. - Quantitative estrogen receptor analysis: the response to endocrine and cytotoxic chemotherapy in human breast cancer and the disease-free interval. *Cancer*, 46:2829-34, 1980.
- LOWRY, O.H.; ROSENBOUCH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. - Protein measurement with the folin phenolreagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
- LUDWIG BREAST CANCER STUDY GROUP - Prolonged disease-free survival after one course of perioperative adjuvant chemotherapy for node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 320:491-6, 1989.
- LUPU, R.; COLOMER, R.; ZUGMAIER, G.; SARUP, J.; SHEPARD, M.; SLAMON, D.; LIPPMAN, M.E. - Direct interaction of a ligand for the erb-B2 oncogene product with the EGF receptor and p185 erb-B2. *Science*, 249:1552-5, 1990.

- MANSOUR, E.G.; GRAY, R.; SHATILA, A.H.; OSBORNE, C.K.; TORMEY, D.C.; GILCHRIST, K.W. - Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 320:485-90, 1989.
- MANSOUR, E.G.; EUDEY, L.; SHATILA, A.H. - Adjuvant therapy of node-negative breast cancer. Is it necessary for all patients? An intergroup study. In: SALMON, S.E. (ed) - Adjuvant therapy of cancer VI. Philadelphia, W.B., Saunders Co., 1990. p.169-73.
- MATHEWS, M.B.; BERNSTEIN, R.M.; FRANZE, B.R.; GERRELS, J.I. - The identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 309:374-6, 1984.
- McGUIRE, W.L.; HORWITZ, K.B.; PEARSON, O.H.; SEGALLOF, A. - Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer*, 39:2934-47, 1977.
- McGUIRE, W.L. - Prognostic factors in primary breast cancer. *Cancer Surv.*, 5:527-36, 1986.
- McGUIRE, W.L.; TANDON, A.K.; ALLRED, D.C.; CHAMNESS, G.C.; CLARK, G.M. - How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1006-15, 1990.
- McGUIRE, W.L. - Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer patients. ASCO-Educational Book. p.11-18, 1991.
- MEYER, J.S.; FRIEDMAN, E.; McCRATE, M.M. BAUER, W.C. - Prediction of early course of breast cancer carcinoma by thymidine labelling index. *Cancer*, 51:1879-86, 1983.
- MEYER, J.S.; RAO, B.R.; STEVENS, S.C.; WHITE, W.L. - Low incidence of estrogen receptor in breast carcinoma with rapid rates of cellular replications. *Cancer*, 40:2290-8, 1989.
- MERKEL, D.E. & OSBORNE, C.K. - Prognostic factors in breast cancer. *Hemat. Oncol. Clin. N. Am.*, 4:641-52, 1989.
- MILLER, O.J. - Autoradiography in human genetics. *Adv. Hum. Genet.*, 2:35-42, 1970.
- MIYACHI, K.; FRITZLER, M.J.; TAN, E.M. - Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, 121:2228-34, 1978.

- MOORE, F.D.; WOODROW, S.I.; ALIAPOLIUS, M.S.; WILSON, R.E. - Carcinoma of the breast: a decade of new results with old concepts. *N. Engl. J. Med.*, 227:293-6, 1967.
- MOTTOLESE, M.; CARAPPELLA, G.M.; SALZANO, M.; RAUS, L.; BENEVOLO, M.; BIGOTTI, A.; NATALI, P.G. - Proliferating cell nucleous antigen (PCNA) as prognostic marker in neuro-ectodermal brain tumors. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 11:152, 1991.
- MORRISSET, H.; CAPONY, F.; ROCHEFORT, H. - Processing and estrogen regulations of the 52-kilodaltons protein inside MCF-7 breast cancer cell. *Endocrinology*, 119:2773-82, 1986.
- NEMOTO, T.; VANA, J.; BEDWANI, R.N.; BAKER, H.W.; MCGREGOR, F.H.; MURPHY, G.P. - Management and survival of female breast cancer: results of a National Survey by the American College of Surgeons. *Cancer*, 45:2917-24, 1980.
- NISHIDA, C.; REINHARD, P.; LINN, S. - DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polimerase delta. *J. Biol. Chem.*, 263:501-10, 1988.
- NORTON, L. - Adjuvant systemic therapy of node-negative breast cancer: data from the NIH Consensus Development Conference, June, 1990. *ASCO Educational Book*, 7-10, 1991.
- OGATA, K.; OGATA, Y.; NAKAMURA, R.M.; TAN, E.M. - Purification and N-terminal amino acid sequence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin and development of ELISA for anti-PCNA antibodies. *J. Immunol.*, 135:2623-7, 1985.
- OGATA, K.; KURKI, P.; CELIS, J.E.; NAKAMURA, R.M.; TAN, E.M. - Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp. Cell Res.*, 168:476-86, 1987.
- OSBORNE, C.K.; YOCHMOWITZ, M.G.; KNIGHT, W.A.; MCGUIRE, W.L. - The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*, 46:2884-8, 1980.
- OSBORNE, C.K.; HAMILTON, B.; TITUS, G.; LIVINGSTON, R.B. - Epidermal growth factor stimulation, on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res.*, 40:2361-6, 1981.
- OSBORNE, C.K. - DNA flow cytometry in early stage breast cancer: a step in the right direction. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81:1344-5, 1989.

- PAIK, S.; HAZAN, R.; FISHER, E.R.; SASS, R.E.; FISHER, B.; REDMOND, C.; SCHLESSINGER, J.; LIPPMAN, M.E.; KING, C.R. - Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erb-B-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 8:103-12, 1990.
- PETO, R.; PIKE, M.C.; ARMITAGE, P.; BRESLOW, N.E.; COX, P.R. - Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. III - Analysis and examples. *Br. J. Cancer*, 35:1-39, 1980.
- PINOTTI, J.A.; PISANI, R.C.B.; TEIXEIRA, L.C.; BASTOS, S.R. - Estrogen receptors in benign and malignant breast diseases. In: HOLMANN, K.H. & VERLEY, J.M.(eds). - *New frontiers in mammary pathology*. Martinus Nijhoff Publishers, New York, 1986. p.157-72.
- PINOTTI, J.A.; TEIXEIRA, L.C.; PISANI, R.C.B.; BASTOS, S.R. - Estrogen receptor and breast cancer prognosis. *Breast Dis. Senologie*, 2:59-65, 1987.
- PRELICH, G.; TAN, C-K.; KOSTURA, M.; MATHEWS, M.B.; SO, A.G.; DOWNEY, K.M.; STILLMAN, B. - Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*, 326:517-20, 1987.
- RAYMOND, W.A. & LEONG, A.S.Y. - The relationship between growth fractions and oestrogen receptors in human breast carcinoma as determined by immunohistochemical staining. *J. Pathol.*, 8:203-11, 1989.
- ROBBINS, B.A.; de la VEGA, D.; OGATA, K.; TAN, E.M.; NAKAMURA, R.M. - Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Med.*, 111:841-5, 1987.
- ROSEN, P.P.; GROSHEN, S.; SAIGO, P.E.; KINNE, D.W.; HELLMAN, S. - Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J. Clin. Oncol.*, 7:1239-51, 1989.
- SCATACHARD, G. - The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51:660-72, 1949.
- SCHECHTER, A.L.; HUNG, M-C.; VAIDYANATHAN, L.; WEINBERG, R.A.; YANG-FENG, T.S.; FRANCKE, U.; ULLRICH, A.; COUSSENS, L. - The neu gene: an erb-B homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptors. *Science*, 229:976-8, 1985.

- SCHWARTZ, L.H.; KOERNER, F.C.; ADYERTON, S.M.; SAWICKA, J.M.; RIO, M.C.; BELLOCQ, J.P.; CHAMBON, P.; THOR, A.D. - pS2 expression and responses to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res.*, 51:624-8, 1991.
- SHIH, C.; PADHY, L.C.; MURRAY, M.; WEINBERG, R.A. - Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced in to mouse fibroblasts. *Nature*, 290:261-4, 1981.
- SHIN, D.M.; VORAVUD, N.; RO, J.Y.; LEE, J.S.; CWEREN, S.; HONG, W.K.; HITTELMAN, W.N. - Sequential dysregulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in head and neck carcinogenesis. A potential biomarker. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 11:95, 1992 (Abstract).
- SIGURDSSON, H.; BALDETORP, B.; BORG, A.; DALBERG, M.; FERNO, M.; KILLANDER, D.; OLSSON, H. - Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 322: 1045-53, 1990.
- SILVESTRINI, R.; DAIDONE, M.G.; Di FRONZO, G. - Relationship between proliferative activity and estrogen receptors in breast cancer. *Cancer*, 44:665-70, 1979.
- SILVESTRINI, R.; DAIDONE, M.G.; GASPARINI, G. - Cell kinetics as a prognostic marker in node-negative breast cancer. *Cancer*, 56:1982-7, 1985.
- SLAMON, D.J.; CLARK, G.M.; WONG, S.G.; LEVIN, W.J.; ULRICH, A.; McGUIRE, W.L. - Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. *Science*, 235:177-82, 1987.
- STRAUSS, M.J. & MORAN, R.E. - The cell cycle kinetics of human breast cancer. *Cancer*, 46:2634-9, 1980.
- TAKASAKI, Y.; DENG, J.S.; TAN, E.M. - A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: Its distribution in synchronized cells. *J. Exp. Med.*, 154:1899-909, 1981.
- TAKASAKI, Y.; FISCHWILD, D.; TAN, E.M. - Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by auto antibodies in lupus sera. *J. Exp. Med.*, 159:981-92, 1984.
- TANDON, A.K.; CLARK, G.M.; CHAMNESS, G.C.; ULLRICH, A.; McGUIRE, W.L. - HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 7:1120-8, 1989.

- TEIXEIRA, L.C. - **Estudo clínico sobre a importância do receptor de estrógeno no carcinoma mamário. Campinas, 1990.** (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP).
- TEIXEIRA, L.C.; AGUIAR, L.F.; HEGG, R.; TEIXEIRA, Y.A.C.; NISIDA, A.C.T. - Adjuvant CMF chemotherapy for N0 breast carcinoma. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 267, 1991 (Abstract).
- THOR, A.; BENZ, C.; MOORE, D.; GOLDMAN, E.; EDGERTON, S.; LANDRY, J.; SCHWARTZ, L.; MAYALL, B.; HICKEY, E.; WEBER, L.A. - Stress response protein (srp-27) determination in primary human breast carcinomas: clinical, histologic and prognostic correlations. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83:170-8, 1991.
- THORPE, S.M.; ROSE, C.; RASMUSSEN, H.T.; MOURIDSEN, H.T.; BAYER, T.; KEIDING, N. - Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node-negative breast cancer. *Cancer Res.*, 47:6126-33, 1987.
- TOI, M., NAKAMURA, Y.; MUKAIDA, H.; SUCHIRO, S.; WADA, T.; TOGE, T.; NIIMOTO, M.; HATTORI, T. - Immunocytochemical and biochemical analysis of epidermal growth factor receptor expression a human breast cancer tissues: relationship to estrogen receptor and lymphatic invasion. *Int. J. Cancer*, 43:220-5, 1989.
- TUBIANA, M.; PEJOVIC, M.H.; CHAVANDRA, N.; CONTESSO, G.; MALAISE, E.P. - The long-term prognostic significance of thymidine labelling index in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 33:441-5, 1984.
- TUBIANA, M; PEJOVIC, M.H.; KOSCIELNY, S.; CHAVANDRA, N.; MALAISE, E. - Growth rate, kinetics of tumor cell proliferation and long-term outcome in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, 44:17-22, 1989.
- UNION INTERNATIONALE CONTRA LE CANCER - TNN: classification of malignant tumours. 2.ed., Geneve, 1974, 108p.
- VERONESE, S.M. & GAMBACORTA, M. - Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, 95:30-4, 1991.
- VIELH, P.; CHEVILLARD, S.; MOSSERI, V.; DOMATINI, B.; MAGDELENAT, H. - Ki-67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.*, 94:681-6, 1990.

VIGNON, F.; CAPONY, F.; CHAMBON, M.; FREISS, G.M.; ROCHEFORT, H. - Autocrine growth stimulation by the MCF-7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52 kd protein. *Endocrinology*, 118:1537-45, 1986.

WESTERBERG, H.; GUSTAFSON, S.A.; NORDENSKIÖLD, B.; SILFVERSWÄRD, C.; WALLGREN, A. - Estrogen receptor level and other factors in early recurrence of breast cancer. *Int. J. Cancer*, 26:429-33, 1980.

\* HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. São Paulo, BIREME, 1990. 45p.