

Luciana Gusmão de Andrade Lima Salomé

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE
VALOR PROGNÓSTICO EM TUMORES DE MAMA:
ANÁLISE DE UMA POPULAÇÃO DE CAMPINAS, SÃO PAULO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Anatomia Patológica.

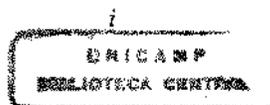
Campinas, 10 de novembro de 2000.

J. Vassallo
Prof. Dr. José Vassallo
Orientador

Campinas

Universidade Estadual de Campinas

2000



Luciana Gusmão de Andrade Lima Salomé

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE
VALOR PROGNÓSTICO EM TUMORES DE MAMA:
ANÁLISE DE UMA POPULAÇÃO DE CAMPINAS, SÃO PAULO

Dissertação de Mestrado apresentada no curso de
Pós-graduação em Medicina, área de
concentração Anatomia Patológica, Faculdade de
Ciências Médicas, Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP)

Orientador: Prof. Dr. José Vassallo

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz de Faria.

Campinas

Universidade Estadual de Campinas

2000

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
CHAMADA: T/ UNICAMP
59 36 2
Ex.
BO BC/ 44925
26-092102
R\$ 11,00
26/06/03
CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

400157803-9

Sa36u

Salomé, Luciana Gusmão de Andrade Lima

Utilização de marcadores imuno-histoquímicos de valor prognóstico em tumores de mama: análise de uma amostra pacientes de Campinas, São Paulo/ Luciana Gusmão de Andrade lima Salomé. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientadores : José Vassallo, Sérgio Luiz de Faria

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Carcinoma. 2. Patologia. I. José Vassallo. II. Sérgio Luiz de Faria. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. José Vassallo

Membros:

1. Fernando Jr - Prof. Dr. Fernando Senes
2. Paulo Alvares - Prof. Dr. Marcelo Alvares
3. Geraldo - Prof. Dr. José Vassallo

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10.11.2000

DEDICATÓRIA

Ao Marcelo, por tudo;

À Beatriz, a melhor parte de mim;

À Marisa, minha mãe, incansável incentivadora de todos os filhos.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. José Vassallo, orientador deste trabalho pela competência, paciência, estímulo e confiança.
- Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz de Faria, co-orientador deste trabalho, pelo entusiasmo e assistência.
- Ao Dr. Marcelo Alvarenga, pela cessão da maior parte dos blocos de parafina dos casos utilizados neste estudo e pela valorosa ajuda ao longo da sua realização.
- À direção e aos funcionários do Centro de Oncologia Campinas (COC), pela permissão para a utilização dos prontuários das pacientes incluídas neste estudo, e pela ajuda em procurá-las no arquivo.
- À equipe técnica do laboratório da pós graduação do DAP-FCM-UNICAMP, especialmente ao Ismael Vêncio, pelos maravilhosos cortes histológicos para a realização das reações imuno-histoquímicas e ao pessoal do laboratório de imuno-histoquímica, especialmente ao Paulo de Tarso, pelo apoio e boa vontade.
- À Dra. Terezinha Marques pelo incentivo, pelos palpites, e sobretudo pela amizade.
- Ao Renato Caldeira de Souza, funcionário do Laboratório Salomé, pelo indispensável auxílio na digitação dos textos.
- Ao Dr. Konradin Metze, pela importante colaboração na análise estatística dos nossos dados.
- A todos os demais inadvertidamente omitidos acima, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO/PALAVRAS CHAVE.....	xvii
SUMMARY/KEY WORDS.....	xxi
1- INTRODUÇÃO.....	25
2- ASPECTOS GERAIS SOBRE O CARCINOMA MAMÁRIO.....	25
2.1- FATORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMA MAMÁRIO.....	31
2.1.1- MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS.....	33
2.1.1.1- RECEPTOR DE ESTRÓGENO (RE).....	33
2.1.1.2- ANTÍGENO CARCINOEMBRIÔNICO (CEA).....	38
2.1.1.3- VIMENTINA.....	40
2.1.1.4- ONCOPROTEÍNA p53.....	42
2.1.1.5- ONCOPROTEÍNA C-erbB ₂ (NEU ou HER 2).....	45
2.1.1.6- PROTEÍNA bcl-2.....	47
3- JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO.....	51
4- OBJETIVOS.....	55
5- MATERIAL E MÉTODOS.....	59
5.1- CASUÍSTICA.....	59
5.2- MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	60
5.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
6- RESULTADOS.....	71
7- DISCUSSÃO.....	83
8- CONCLUSÕES.....	99
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
10- ANEXOS.....	131

RESUMO

-RESUMO-

Palavras- chave : Carcinoma mamário; imuno-histoquímica; prognóstico; receptor estrogênico; CEA; vimentina; p53; CerbB-2; proteína bcl-2.

O presente trabalho é um estudo retrospectivo, que tem como objetivo avaliar a expressão de alguns marcadores imuno-histoquímicos- ER, CEA , vimentina, p53, cerbB-2 e bcl-2 - em casos de carcinoma mamário em relação ao seguimento clínico observado nas pacientes que compõem o grupo estudado, visando estabelecer o valor prognóstico de cada um destes marcadores, bem como uma possível relação entre suas expressões. Foram estudados 40 casos de carcinoma mamário, nos quais foi feita uma revisão do diagnóstico histopatológico e em seguida o estudo imuno-histoquímico, com classificação da reação segundo o percentual de células positivas. Para a análise estatística foram utilizados os testes Qui- quadrado, Kaplan- Meyer, regressão Cox e Cox- Mantel. Não houve relação estatisticamente significativa isolada de nenhum marcador com o prognóstico, apenas o C-erb-B2 mostrou uma tendência de associação entre sua expressão e melhor prognóstico ($p=0,09$). Não houve em nosso estudo nenhuma associação significativa entre a expressão dos marcadores estudados, porém observou-se uma tendência de relação inversa entre a expressão de vimentina e ER ($p=0,05$). Observamos ainda, embora não tenha sido estatisticamente significativa, uma tendência de associação da expressão do p53 com pior prognóstico, o que está em concordância com as conclusões observadas por outros autores.

SUMMARY

-SUMMARY-

Keywords: Mammary carcinoma; immuno- histochemistry; prognosis; estrogenic receptor; CEA; vimentin; p53; CerbB-2; bcl-2 protein.

The current work is a retrospective study, having as a goal to evaluate some immuno-histochemical markers' expression- ER, CEA, vimentin, p53, cerbB-2 and bcl-2 - in mammary carcinoma cases regarding the clinical follow-up observed in patients forming the studied group, aiming to establish the prognostic value of each one of these markers, as well as a possible connection between their expressions. 40 mammary carcinoma cases were studied, in which a review of the histopathologic diagnosis was made followed by the immuno-histochemical study, classifying the reactions according to the percentage of positive cells. For statistical analysis the Chi- square test, Kaplan- Meyer, Cox regression and Cox- Mantel were used. No statistical association was observed between immuno-histochemical markers and prognosis. Only the C-erb-b2 marker showed tendency to associate its positiveness to better prognosis ($p= 0,09$). There was no meaningful connection between the studied markers' expression in our study, however it was noticed an inverse correlation tendency between the expression of vimentin and ER ($p=0,05$). We have also observed, though it was not statistically meaningful, a trend for connection between p53's expression and worse prognosis, what is according to the findings of other authors.

INTRODUÇÃO

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE VALOR PROGNÓSTICO EM TUMORES DE MAMA: ANÁLISE DE UMA POPULAÇÃO DE CAMPINAS, SÃO PAULO.

INTRODUÇÃO

1. - ASPECTOS GERAIS SOBRE O CARCINOMA MAMÁRIO

A mama origina-se da glândula sudorípara, aparecendo no embrião quando este mede 8mm. No quinto mês de vida fetal, crescem os brotos epiteliais, com esboço dos ductos lactíferos, que no oitavo mês desenvolvem lúmen. Na puberdade, a evolução mamária se completa com o desenvolvimento dos ductos lactíferos secundários. Quinze a vinte lobos, cada um destes formados por um ducto principal e suas ramificações, constituem a mama. Este aparato glandular é permeado por tecido fibroadiposo e repousa sobre um coxim de tecido músculo-conjuntivo. O suprimento sanguíneo é feito por ramos das artérias mamária interna, mamária externa e intercostais. Os linfonodos axilares variam entre 10 a 30 e constituem 5 grupos: grupo da veia axilar, grupo mamário externo, grupo escapular, grupo central e grupo subclavicular. A inervação mamária provém do 2º ao 6º nervos intercostais e dos plexos cervical e braquial.

Os ductos lactíferos principais e secundários são revestidos por células colunares superficiais e células cuboidais profundas circundadas por uma camada de células mioepiteliais, que por sua vez é envolvida por uma lâmina fibroelástica. Os ácinos são compostos de células cuboidais parcialmente circundadas por células mioepiteliais descontínuas (Tavassoli, 1992).

A incidência do carcinoma mamário é extremamente elevada em vários países, ocupando o primeiro lugar dentre as neoplasias malignas em mulheres nos EUA e na Europa. Aproximadamente uma em cada nove mulheres americanas devem adquirir câncer mamário em algum momento da vida. Para o ano de 1994 foram estimados 182.000 novos casos de câncer de mama nos EUA, além de 46.000 óbitos causados pela doença. A maior parte dos casos ocorre em mulheres na fase da menopausa, em torno da 5ª e 7ª

década, sendo raro o seu aparecimento antes dos 25 anos de idade (Haagensen et al., 1981).

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 1998 foram estimados 269.000 novos casos de câncer, sendo 140.705 (52,3%) em mulheres. Em relação ao carcinoma mamário, foram registrados 32.695 (12,15%) casos novos, correspondendo a 44/ 100.000 mulheres, e 7.165 óbitos devido a esta doença, correspondendo a 9,6/ 100.000 mulheres. A taxa de mortalidade devido ao carcinoma mamário é maior nas mulheres com idade entre 40 e 79 anos.

Epidemiologicamente, há vários fatores relacionados ao risco aumentado de adquirir a doença (Rubin & Farber, 1988):

A) Fatores ambientais - Estudos mostraram que pacientes provenientes de países com baixa frequência da doença, atingem rapidamente um risco semelhante em adquirir a doença ao das mulheres do país para onde migraram, como por exemplo os EUA, onde o carcinoma de mama constitui uma das principais causas de óbito em mulheres.

B) Fatores genéticos - Principalmente quando há história de carcinoma em parentes de primeiro grau.

C) Paridade - Incidência aumentada nas mulheres que tiveram o primeiro parto após os 35 anos de idade.

Maior frequência em nulíparas do que em multíparas.

D) Duração da vida reprodutiva - Risco aumentado na menarca precoce e na menopausa tardia.

E) Obesidade - Risco aumentado devido à síntese de estrógeno pelos depósitos de gordura.

F) Estrógeno exógeno - O risco aumenta com o uso de altas doses de hormônios administrados no tratamento dos sintomas da menopausa.

O uso de contraceptivos orais não se associa a um aumento comprovado do risco, devido aos baixos teores hormonais dos medicamentos atuais.

G) História de doença fibrocística anterior, sobretudo nos casos de hiperplasia ductal e lobular atípica.

H) Carcinoma da mama contralateral e carcinoma de endométrio- risco aumentado.

Quanto à etiologia e patogênese, três fatores de influência são importantes: (1)fatores genéticos; (2)desequilíbrios hormonais; e (3)fatores ambientais.

A predisposição genética é comprovada, estando em estudo um gene responsável pela susceptibilidade ao carcinoma mamário, chamado BRCA1 (breast carcinoma 1), que também está relacionado ao câncer do ovário.

O desequilíbrio hormonal tem papel importante, e muitos fatores de risco relacionam-se a altos níveis estrogênicos. Tumores ovarianos funcionantes que sintetizam estrógenos estão associados ao câncer mamário em mulheres pós-menopausadas. Estudos recentes confirmam associação entre excesso de estrógeno urinário frequência da ovulação, idade na menarca e risco aumentado de câncer de mama. Existem indícios de como os estrógenos podem agir. O epitélio normal da mama possui receptores para estrógeno e progesterona e estes têm sido identificados em alguns, mas não todos os carcinomas mamários.

Vários promotores e inibidores de crescimento são secretados pelas células tumorais da mama (fator alfa de transformação do crescimento -TGF- alfa, fator de crescimento epitelial - EGF-, fator de crescimento derivado de plaquetas -PDGF, e fator de crescimento de fibroblasto- FGF). Muitos estudos sugerem que eles estão envolvidos em um mecanismo próprio de progressão tumoral. A produção destes fatores de crescimento é dependente do estrógeno e pensa-se que as interações entre estes hormônios circulantes, receptores hormonais das células tumorais e fatores autócrinos de crescimento, induzidos pelas células tumorais estão envolvidos na progressão do câncer de mama.

Influências ambientais são sugeridas pela incidência variável de câncer em grupos geneticamente homogêneos e pelas diferenças geográficas quanto à incidência. Entre os fatores alimentares, questiona-se o papel da dieta rica em gorduras, cafeína e uso de álcool. As viroses também são outro fator estudado, desde que foi descoberto o MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus). Muito pesquisado tem sido o papel dos oncogenes e dos genes de supressão tumoral, sobretudo a amplificação do gene erb B2/neu (similar ao gene receptor de EGF), que tem sido observada em 5 a 30% dos tumores, associado com a super-expressão do produto protéico do gene de células carcinomatosas (p185 erb B2). Esta super-expressão do produto genético associa-se a pior prognóstico em pacientes com carcinoma mamário metastático em linfonodos. A inserção de um oncogene erb B2/neu ativado em ratos transgênicos resulta na formação de adenocarcinomas mamários. A amplificação dos genes int.-2 (homólogo ao FGF, C-ras e C-myc) tem sido descrita em câncer de mama. Finalmente, mutações somáticas dos genes

supressores p53 e Rb ocorrem em 50% e 20% dos casos de câncer mamário respectivamente.

A mama esquerda é mais acometida que a direita. O câncer é bilateral ou seqüencial na mesma mama em 4% ou mais. Quanto ao sítio de origem, cerca de 50% surgem no quadrante superior externo, 10% em cada um dos quadrantes restantes e cerca de 20% na região central ou subareolar. O sítio de origem influencia consideravelmente o padrão de metastatização ganglionar. Os ductos terminais parecem ser o local de origem da maior parte dos carcinomas mamários, apresentando um grau de sensibilidade e atividade celular bastante peculiar.

A classificação histológica, baseada na classificação da OMS (1981), é a seguinte (Apud Tavassoli, 1992):

***NÃO - INVASIVO**

Carcinoma intra- ductal

Doença de Paget sem carcinoma invasor da mama

Carcinoma lobular in situ

***INVASIVO (Infiltrante)**

Carcinoma ductal invasivo

Carcinoma ductal invasivo com doença de Paget

Carcinoma lobular invasivo

Carcinoma medular

Carcinoma colóide (mucinoso)

Carcinoma tubular

Carcinoma adenóide cístico

Carcinoma apócrino

Carcinoma papilífero invasivo

O carcinoma ductal invasivo é, de longe, o mais comum, seja puro (52,6%), ou combinado a outros tipos histológicos (22%). Em seguida, vêm os tipos lobular e medular.

Alguns aspectos clínicos são comuns aos tumores invasivos:

- Aderência a planos profundos;
- Retração e enrugamento da pele (“pele de laranja”);

- Linfedema de causa obstrutiva;
- Retração mamilar;
- Carcinoma inflamatório (edema, hiperemia e dor), por acometimento linfático da derme;
- Microcalcificações;
- Disseminação linfática (sobretudo para linfonodos axilares).

Quanto à capacidade de originar metástases, os tumores podem ser:

- Não- metastatizantes : Intraductal ou lobular in situ;
- Metastatizantes incomuns: Mucinoso puro, carcinoma medular, adenocarcinoma tubular, carcinoma adenóide cístico;
- Moderada ou altamente metastatizantes : Todos os outros tipos.

O estadiamento clínico é assim dividido (Apud Tavassoli, 1992):

- Estádio I - Tumor menor que 2 cm., sem envolvimento nodal ou metástases;
- Estádio II - Tumor menor que 5 cm., com acometimento de nodos axilares (porém móveis) e sem metástases à distância; ou tumores iguais ou maiores que 5 cm., sem envolvimento nodal ou metástases.
- Estádio III - Tumor de qualquer tamanho com acometimento da pele, parede torácica e envolvimento nodal, incluindo cadeias axilar e mamária interna, fixos , mas sem metástases disseminadas.
- Estádio IV - Qualquer forma de carcinoma mamário com ou sem envolvimento nodal, fixação peitoral, ulceração cutânea ou fixação da parede torácica, com metástases disseminadas.

Quanto ao tratamento cirúrgico, os primeiros procedimentos, por volta de 1880, tinham resultados altamente mutilantes, e muitas vezes fatais. Não havia o recurso do diagnóstico microscópico, sendo comum a recorrência local em parede torácica. Nesta época, Halsted introduziu a chamada mastectomia radical (Fechner, 1993).

Atualmente, há duas possibilidades: a mastectomia radical e o tratamento conservador, com exérese apenas do tumor ou do quadrante correspondente, seguida de radioterapia adjuvante. Trabalhos recentes têm evidenciado que a sobrevida atinge números semelhantes nas duas condutas (Faria & Amalfi, 1993). Há ainda outros tratamentos adjuvantes que incluem terapêutica hormonal e quimioterapia.

Até meados de 1940, praticamente toda a literatura americana sobre patologia mamária era escrita por cirurgiões.

A Anatomia Patológica cirúrgica como especialidade começou a ganhar impulso a partir de 1922, com a fundação da Sociedade Americana de Patologistas Clínicos (Fechner, 1993). A definição de “carcinoma intraductal” foi provavelmente descrita pela primeira vez em 1935 por Muir, patologista escocês que percebeu que “as células epiteliais ductais proliferantes adquiriam características essenciais de neoplasia maligna antes mesmo de transgredir sua delimitação usual”. Stewart, em 1950, utilizou pela primeira vez o termo carcinoma intraductal. Em 1982, um importante artigo foi publicado por Lagios et al., que estudando espécimes de mastectomia de casos de carcinoma in situ, concluíram que carcinomas deste tipo de pequeno volume (< 2,5 cm.) estão associados a menor risco de multicentricidade e de carcinoma invasivo oculto associado. O carcinoma ductal in situ cujo maior diâmetro não ultrapasse 2,5 cm., após mastectomia não apresentaria indícios de invasão. A presença de necrose seria considerado um indício de tendência a invasão.

Quanto ao tratamento conservador, um dos protocolos do National Surgical Adjuvant Breast Project comparou casos de carcinoma invasivo tratados com tumorectomia com ou sem radioterapia adjuvante. A recorrência local foi de 23% nos casos tratados apenas com exérese, enquanto que nos casos tratados com exérese associada à radioterapia, a recorrência foi de apenas 7%. O seguimento médio destes casos foi de 30 meses (Fisher et al., 1990).

2 - FATORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMA MAMÁRIO

O prognóstico é reconhecidamente associado a alguns fatores clínicos e patológicos já bem estabelecidos:

- Tamanho do tumor - tumores menores que 2 cm. apresentam melhor prognóstico (Garne et al., 1994);

- Envolvimento ganglionar e número de linfonodos com metástase - A sobrevida de 5 anos é observada em cerca de 80% dos casos sem envolvimento ganglionar, cai para 50% nos casos onde há de 1 a 3 linfonodos positivos, e passa a 21% naqueles onde há 4 ou mais linfonodos acometidos (Fisher et al., 1983).

- Tipo histológico - A identificação do tipo histológico pode fornecer importantes informações quanto ao prognóstico. Os tipos histológicos ditos especiais (tubular, cribriforme e mucinoso), e o carcinoma túbulo- lobular apresentam prognóstico excelente; os tipos tubular e ductal associados a tipos histológicos especiais têm um bom prognóstico; os tipos lobular clássico e pleomórfico, e o tipo medular têm um índice de sobrevida em 5 anos variando em média entre 30 - 50%, enquanto que os tipos lobular sólido e ductal invasivo apresentam prognóstico relativamente pobre. Deve-se lembrar, no entanto, que cerca de 25% dos casos de carcinoma mamário podem ser mistos, e neste grupo o significado prognóstico do tipo histológico não é bem definido.

Destaca-se ainda a importância de associar à informação do tipo histológico do tumor a sua graduação histológica, não apenas pelas implicações prognósticas e conseqüentemente terapêuticas, mas também como um indicador da qualidade do laudo anátomo- patológico.

A graduação histológica é geralmente feita utilizando-se o método de Bloom & Richardson, publicado em 1957, e que se baseia em 3 aspectos histopatológicos : grau de formação tubular, regularidade no tamanho , forma e coloração dos núcleos, e atividade mitótica. Este parâmetro no entanto é questionado quanto à sua valorização excessiva por tratar- se de um método subjetivo, acarretando problemas quanto à sua consistência e reprodutibilidade. Porém, há trabalhos evidenciando a correlação significativa

entre grau histológico e prognóstico em casos com seguimento prolongado (Carter et al, 1989).

A graduação histológica combina aspectos da morfologia celular (pleomorfismo nuclear) com parâmetros de diferenciação (formação tubular) e avaliação de proliferação celular (contagem de mitoses), podendo-se considerar que, potencialmente, a graduação histológica forneceria uma visão panorâmica de alguns eventos moleculares que se refletem na morfologia histológica. As evidências de que esta informação compara-se favoravelmente aos índices de diferenciação cinética e bioquímica justificam a importância deste dado nos laudos histopatológicos de todos os casos de carcinoma mamário. Posteriormente, Bloom (1950) demonstrou que o seu valor preditivo é ampliado pelo conhecimento do status ganglionar.

Page et al. (1991) estudaram grupos de pacientes com sobrevida longa e sobrevida curta (óbito dentro de 10 anos), e confirmaram a correlação entre tipo histológico e sobrevida. Observaram ainda que a presença de elastose, necrose tumoral e invasão vascular e linfática é mais frequente em casos de sobrevida curta. O tamanho do tumor também mostrou estar relacionado ao prognóstico, mas esta associação parece ser válida apenas nos primeiros 5 anos de doença, diminuindo progressivamente a partir desta fase .

Muitos trabalhos tentaram correlacionar parâmetros clínicos ao prognóstico, incluindo idade, status menopausal, tamanho do tumor, tipo e graduação histológica, porém o parâmetro clínico mais largamente aceito é o acometimento metastático dos linfonodos, e é neste que se baseia a decisão de se fazer uma terapia adjuvante ao tratamento cirúrgico (Carter et al., 1988; Chevallier et al., 1988; Ellis et al., 1990; Elston & Ellis; Esteban et al., 1994; Faria et al., 1994; Fechner, 1993; Todd et al., 1987).

Sabe-se, no entanto, que 20- 30% das pacientes com linfonodos negativos ao diagnóstico apresentam recorrência da neoplasia e vão a óbito em 10 anos. Sabe-se ainda que as metástases podem estar presentes num estágio precoce da doença, e que a intervenção terapêutica em casos de carcinoma recorrente ou metastático é ineficaz em grande número deles, reforçando a idéia de que o tratamento hormonal adjuvante deveria ser iniciado o mais precocemente possível. Surge então um novo questionamento: A terapia adjuvante, sendo benéfica, o seria para todas as pacientes ? Alguns tumores não estão biologicamente capacitados a responder ao tratamento hormonal, e uma vez identificados não deveriam recebê-la. Em suma, a partir deste

momento consegue-se perceber a natureza individual de cada caso de carcinoma mamário, ao invés de considerar o mesmo tipo de tratamento adequado a todos eles, o que constitui o princípio fundamental da biologia tumoral. Impõe-se, portanto, a busca de parâmetros adicionais que identifiquem os casos de maior risco, baseados na atividade proliferativa das células tumorais. Uma vez selecionadas precocemente, estas pacientes com risco aumentado receberiam terapia adjuvante com ou sem o envolvimento de linfonodos axilares. Há ainda a necessidade de marcadores capazes de avaliar a resposta à terapêutica instituída.

A evolução dos métodos diagnósticos e terapêuticos tem suscitado grande interesse em estabelecer novos indicadores prognósticos, resultando em grande número de publicações que visam testar o valor de diversos marcadores através das mais variadas técnicas. A evolução dos métodos imuno-histoquímicos possibilita o estudo destes marcadores em material fixado em formalina e incluído em parafina, permitindo a realização de estudos retrospectivos com a utilização de material de arquivo e a comparação destes resultados com os aspectos clínicos observados em cada caso.

Realizamos a seguir uma revisão bibliográfica da utilização de 6 destes marcadores imuno-histoquímicos - ER (receptor de estrógeno), CEA (antígeno carcinoembriônico), Vimentina, p53, C-erbB 2 e Bcl-2 - , os quais têm sido largamente estudados quanto ao seu valor prognóstico no carcinoma mamário.

2.1 - MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

2.1.1- RECEPTOR DE ESTRÓGENO (ER)

A identificação de receptores de estrógeno nas células tumorais data da década de 60, estabelecendo-se a partir daí uma relação entre a expressão de ER no tumor primário e a resposta à terapêutica hormonal. A habilidade do epitélio mamário em sintetizar ER pode ser entendida como uma manifestação de diferenciação bioquímica e manutenção do controle regulatório.

Vários estudos observaram uma relação negativa entre volume celular e nuclear e a concentração de ER. A heterogeneidade da reatividade tumoral

pode ser responsável por casos falso-positivos, quando representarem uma minoria da população tumoral.

A dosagem dos receptores de estrógeno foi a medida biológica mais precocemente introduzida na prática clínica, reconhecidamente relacionada a aspectos do comportamento tumoral, na previsão da resposta, relação ao grau histológico, e em relação ao prognóstico, sobretudo durante o tratamento da doença avançada. A importância da presença dos receptores estrogênicos nos tumores de mama seria a de que estes tumores apresentariam maior índice de resposta à terapêutica hormonal adjuvante, apresentando melhor prognóstico tanto nos casos de doença avançada quanto na fase inicial, em relação aos tumores ER negativos. Há inúmeros trabalhos avaliando o valor deste método como parâmetro prognóstico, os quais, no entanto, utilizam diferentes métodos para sua detecção. Inicialmente utilizava-se o método bioquímico, que empregava um macerado celular obtido de um fragmento do tumor, o que exigia uma quantidade significativa de material, além de apresentar difícil reprodutibilidade, evidenciada nos estudos em que foi utilizado (Alexiev et al., 1993; Graham et al., 1991; Querzoli et al., 1992). Mais tarde, McCarty et al. (1985) demonstraram a eficácia de um anticorpo monoclonal específico utilizado em cortes de tecidos congelados, possibilitando o desenvolvimento de uma técnica semi-quantitativa de avaliação, com correlação satisfatória com o método bioquímico. Ainda na década de 80, o método imunohistoquímico tornou-se possível em material fixado em formalina e incluído em parafina. Os resultados mostraram-se extremamente satisfatórios no que se refere à especificidade e sensibilidade, além de elevada correlação com o método bioquímico, e oferecendo ainda algumas vantagens adicionais, como possibilitar a análise de material proveniente de punção, pequenas lesões, ou ainda lesões inicialmente não suspeitas de malignidade, das quais não foi colhido material a fresco. Permite ainda o uso de material de arquivo para estudos retrospectivos. Por preservar a estrutura do tecido, possibilita a localização topográfica dos receptores, que ocupam o núcleo da célula, reduzindo a margem de erro de avaliação, e torna viável a correlação de sua presença ou ausência com aspectos morfológicos do tumor. A heterogeneidade da reação é uma característica frequente, sendo dificilmente visto um caso com positividade de 100% das células tumorais. Ela pode ser explicada pela presença de estrógeno endógeno, que resulta em níveis imunohistoquimicamente não detectáveis, o que não implica necessariamente em

que estes tumores não respondam ao tratamento hormonal. A resposta à terapêutica endócrina parece estar ligada a outras variáveis além da expressão de receptores de estrógeno (Andersen & Poulsen, 1989; Ellis & Gown, 1990; Graham et al. 1991; Hawkins, 1985; Hsu et al. 1981; McCann et al., 1991; Ohri et al., 1992; Shintaku & Saib, 1987; Snead et al., 1993).

As conclusões a partir da utilização deste marcador são variadas. A positividade para ER foi associada à idade, status menopausal e ao tipo histológico do tumor, predominando nos tipos ductal invasivo e lobular, e desaparecendo no tipo medular e na variante comedocarcinoma. Estaria ainda correlacionado ao grau de diferenciação histológica, cujos parâmetros abrangem formação tubular, atipia nuclear e figuras de mitose, e a melhores índices de sobrevida geral. Skoog et al. (1987) concluíram que a diferença entre os tumores ER+ e ER- atinge o máximo após cerca de 4 anos, período no qual a maioria dos casos ER- com metástases axilares teria ido a óbito. Ruder et al. (1989) constataram melhores índices de sobrevida nos casos ER+, sobretudo nos estágios mais avançados da doença. Bur et al. (1992) observaram relação entre a expressão de ER nos casos de carcinoma in situ e a coexistência de componente invasivo. Barnes & Masood (1990) constataram positividade semelhante nos casos de carcinoma in situ com ou sem componente invasivo, contudo a intensidade da reação era maior nas lesões menos agressivas. Alexieva - Figusch et al. (1989), e Thorpe et al. (1987), comparando ER e PR (receptor de progesterona), concluíram que a medida de PR seria de maior valor prognóstico, porém não recomendaram a sua avaliação isolada.

Butler et al. (1985) e Andry et al. (1989), no entanto, não confirmaram o valor prognóstico do ER. Kurtz et al. (1990) consideraram que a avaliação de ER isoladamente não é um fator suficientemente forte para fundamentar a escolha da conduta terapêutica, e que este parâmetro precisaria estar combinado a outros fatores prognósticos.

Os tecidos que respondem a hormônios esteróides contêm uma proteína específica para se ligar ao hormônio, formando com ele um complexo que migra para o núcleo celular onde se associam a uma proteína da cromatina e ao DNA, estimulando a RNA- polimerase e resultando no aumento da síntese de RNAm e RNAr. No pequeno percentual de casos ER+ que não respondem à terapêutica hormonal, haveria uma provável incapacidade dos receptores estrogênicos em estimular a transcrição.

Estatísticas mais recentes têm identificado um aumento na incidência de carcinomas mamários em mulheres de diferentes faixas etárias e raças, levando à formulação de hipóteses que possam justificar este fenômeno. Uma destas, propostas por Pujol et al. (1994), associa as alterações no padrão epidemiológico do carcinoma mamário a mudanças na sua etiologia, constatando que o aumento de incidência nos últimos 20 anos corresponde a carcinomas mamários ER+. Os autores consideram a etiologia hormonal a melhor explicação para tal mudança no perfil desta neoplasia, justificada pelo aumento do uso de contraceptivos orais e da terapêutica de reposição estrogênica.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Raymond, W. A. & Leong, A. S. Y.	1989	- Confirma valor prognóstico do ER.
• Querzoli, P. et al.	1992	- Valor prognóstico e preditivo.
• Hurlimann, J. et al.	1993	- Valor prognóstico nos primeiros cinco anos e valor preditivo em relação ao tratamento hormonal.
• Robertson, J. F. R. et al.	1994	- Valor preditivo e prognóstico, sobretudo no estadio III.
- Rich, M. A. et al. The Breast Cancer Prognostic Study Surgery and Pathology Associates.	1978	- Relação com o grau histológico. Positividade para ER relaciona-se a menor índice de recorrência e maior intervalo livre de doença, porém não há correlação com metástases axilares.
• McGuire, W. L. & Clark, G. M.	1992	- Para valor prognóstico de sobrevida livre é melhor combiná-lo a outros parâmetros prognósticos; mais importante é seu valor preditivo de resposta a tratamento hormonal.
• Veronese, S. M. et al.	1995	- Valor preditivo para seleção de pacientes para tratamento hormonal.
• Chevallier, B. et al.	1988	- ER tem valor prognóstico, sobretudo na indicação de terapêutica adjuvante ao tratamento cirúrgico.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Gaskell, D. J. et al.	1989	- Valor preditivo do ER na seleção de casos para tratamento com Tamoxifen.
• Knight, W. A. et al.	1977	- Resposta ao ER tem relação com tempo de sobrevida e com instituição de tratamento adjuvante.
• Mascarel, I. et al.	1995	- Correlação com tamanho do tumor, status nodal, grau histológico e dosagem de progesterona, porém o ER não parece um marcador com valor prognóstico independente.
• McGuire, W. R. et al.	1982	- O ER tem valor na seleção de pacientes para terapêutica hormonal, mas a análise sugere que o PR é melhor marcador neste sentido.
• Stebbings, W. S. L. et al.	1989	- O nível de ER e PR diminui com a progressão da doença; níveis elevados de ER relacionam-se com melhor resposta à terapêutica hormonal.
• Hawkins, R. A. et al.	1996	- Utilizando dosagem do ER como uma variável contínua, concluem que este marcador tem importante valor prognóstico no seguimento clínico inicial (1-3 anos), associado a parâmetros clínicos (presença de metástases axilares e grau histológico).
• Esteban, J. M. et al.	1994	- Associado ao CEA, o ER foi fator preditivo mais importante na caracterização de um subgrupo de pacientes com melhor prognóstico (CEA -/ER +).
• Clark, G. M.	1994	- ER com valor preditivo para instituição de terapêutica hormonal.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• De Luca, L. A. et al.	1993	- Expressão do ER associa-se com grau de diferenciação celular, presença de elastose, ausência de infiltração linfocitária e ausência de necrose. Sua expressão tem valor reduzido em casos com estadiamento avançado.
• Goulding, H. et al.	1995	- A pesquisa do marcador ER com o anticorpo DAKO 1D5 apresenta maior percentual de positividade e maior intensidade da reação com comprovação do seu valor preditivo em relação à instituição de terapêutica hormonal.
• Butler, J. A. et al.	1985	- Não confirmam o valor prognóstico do ER.
• Andry, G; et al.	1989	- Não confirmam o valor prognóstico do ER.
• Kurtz, J. M. et al.	1990	- A avaliação isolada do ER não é suficiente para orientar a escolha terapêutica, sendo necessária sua combinação com outros fatores prognósticos.

2.1.2 - ANTÍGENO CARCINOEMBRIÔNICO (CEA)

O CEA é um dos antígenos oncofetais normalmente produzidos por células fetais normais, que pode também ser produzido por células adultas malignas de origem epitelial. Sua presença é associada a capacidade de crescimento rápido, disseminação e propriedade de escapar da destruição pela resposta do hospedeiro. Inicialmente foi detectado em carcinomas do cólon,

sendo em seguida associado a outras neoplasias, como o carcinoma mamário, e também a processos benignos (Isaacson & Judd, 1978).

Foi observada uma correlação inversa entre a sua positividade e a concentração de receptores de estrógeno, indicando que CEA e ER seriam marcadores tumorais opostos. Shousha et al.(1979), estudando a distribuição do CEA nos carcinomas mamários, observaram relação entre CEA e o prognóstico da doença, com índices de sobrevida em 5 e 10 anos significativamente melhores nos casos CEA negativos, independentemente de outros parâmetros, como presença de metástases e tipo histológico do tumor. Nos casos CEA- positivos o prognóstico tenderia a piorar de modo proporcional à intensidade da reação. Foi vista ainda associação entre a positividade para o CEA e a presença de metástases ganglionares, estabelecendo a utilidade deste marcador como índice prognóstico. Mansour et al.(1983) confirmaram esta hipótese em seu trabalho. Walker (1980) porém, constatou associação do CEA apenas com o grau de diferenciação histológica do tumor, não correlacionando este a outros fatores prognósticos, como metástases e recorrências. Nap et al.(1983) questionaram o valor prognóstico da avaliação do CEA, ressaltando a existência de glicoproteínas CEA- like que podem produzir reações cruzadas, resultando em um alto índice de casos falso- positivos, na ordem de 40% . Em trabalho posterior(1984), os mesmos autores confirmaram a reatividade cruzada deste marcador, e destacaram a necessidade do uso de um anticorpo monoclonal na tentativa de melhorar este aspecto. Em 1983, Kuhajda et al. já haviam ressaltado o risco da variação de reatividade deste marcador, no entanto concluíram que sua utilização poderia ajudar na distinção entre proliferações epiteliais malignas e benignas .

Em trabalho recente, Schmitt & Andrade (1994) observaram que a sua positividade não estaria restrita aos casos malignos, ocorrendo também em casos de hiperplasia ductal atípica, sugerindo que nestes haveria um risco aumentado de transformação maligna. Lee et al.(1985), ao contrário, não conseguiram estabelecer nenhuma correlação entre o CEA e quaisquer parâmetro clínico, morfológico ou epidemiológico .

Finalmente Esteban et al.(1994), estudando uma série de 202 casos de carcinomas mamários, utilizaram anticorpos monoclonais para CEA e ER, e concluíram que o CEA isoladamente não é um bom marcador prognóstico, porém identificaram uma associação altamente significativa entre a expressão de CEA e ER nos casos de estágio I e II, apontando um subgrupo de pacientes

com risco mais alto de recorrência ou óbito. Concluíram ainda que a associação de 2 ou mais parâmetros de significado preditivo sinérgico pode traçar perfis do tumor de valor clínico relevante, que complementem os parâmetros clínicos clássicos .

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Esteban, J. M; et al.	1994	- O CEA associado ao ER foi considerado o fator preditivo mais importante na caracterização de um subgrupo de pacientes com melhor prognóstico (CEA -/ER +).
• Tormey, D. C. et al.	1977	- Níveis elevados de CEA ocorrem na maioria dos pacientes com doença metastática, nos quais tem importância prognóstica.
• Shousha et al.	1979	- Relação significativa entre a expressão do CEA e prognóstico independente do status nodal e do tipo histológico do tumor, com negatividade associada a melhor prognóstico.
• Mansour, E. G. et al.	1983	- Confirmam o valor prognóstico do CEA.
• Walker, R. A.	1980	- Observou associação do CEA apenas com o grau histológico, sem correlação com metástases e recidiva da doença.
• Lee, A. K. et al.	1985	- Não observaram correlação do CEA com nenhum parâmetro clínico, morfológico ou epidemiológico.

2.1.3 - VIMENTINA

Constitui uma das cinco classes de filamentos intermediários, principais componentes do citoesqueleto de mamíferos. A princípio era considerado um marcador específico de células mesenquimais, o que o

tornava útil na distinção entre neoplasias de origem epitelial ou não-epitelial. Posteriormente, foi demonstrado que a possibilidade de coexpressão de vimentina e queratina era muito comum. “A coexpressão de queratina e vimentina em neoplasias epiteliais tem sido associada a alterações de forma e motilidade das células transformadas” (Henzen - Longmans et al., 1987). A expressão de vimentina em tumores epiteliais tem sido atribuída a uma reversão celular a tipos mais primitivos ou embrionários. Azumi & Battifora (1987) observaram positividade para vimentina em cerca de 10% dos casos de carcinoma mamário estudados e concluíram que este marcador poderia ser utilizado combinado a outros marcadores, constituindo um painel de valor prognóstico. Esta positividade foi verificada sobretudo em casos de carcinoma ductal pouco-diferenciado (grau histológico 3), geralmente neoplasias ER negativas, com altos valores para fatores de crescimento, medidos pelo marcador de proliferação Ki-67, indicando comportamento agressivo e pior prognóstico. Cattoretti et al.(1988) observaram evidências da relação inversa entre ER, vimentina e outros marcadores (p53 e EGF-R), indicando que esta baseia-se no status proliferativo da célula tumoral. A presença deste marcador sugeriria um ciclo celular ativo em uma célula com níveis reduzidos de ER, ou com uma necessidade reduzida de ER para o seu crescimento. Raymond & Leong (1989) consideraram a hipótese de que a positividade para vimentina seria proporcional à redução do contato célula-célula, explicando o alto índice de positividade nas células descamadas.

Outros autores, no entanto, consideraram que a vimentina não funciona como um marcador independente dos critérios convencionais, como Domagala et al.(1990), sugerindo que esta positividade marcaria a passagem destes tumores de hormônio-dependentes a hormônio-independentes, aumentando a positividade para vimentina proporcionalmente à diminuição de positividade para ER. A expressão de vimentina indicaria uma regulação de crescimento falha, favorecendo a replicação das células tumorais e resultando consequentemente em pior prognóstico.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Gould, V. E. et al.	1990	- A frequência da expressão de vimentina foi maior no epitélio hiperplásico e neoplásico do que no epitélio normal.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Domagala, W. et al.	1990	- Expressão da vimentina preferencialmente nos casos ER - ou com baixa positividade do ER e com alto grau histológico (GH III), sugerindo que sua expressão associa-se a indicadores de pior prognóstico.
• Raymond, W. A. & Leong, A. S. Y.	1989	- A expressão da vimentina parece estar associada a comportamento mais agressivo e pode ter valor prognóstico para o Ca. ductal invasor, independente do status nodal e do grau histológico.
• Cattoretti, G. et al.	1988	- Evidências de relação inversa entre vimentina e ER.

2.1.4- ONCOPROTEÍNA p53

O p53 é um gene de localização nuclear presente nas células normais, com função regulatória no ciclo celular, inibindo a sua progressão e funcionando como supressor tumoral. Participa do reparo do DNA e da morte celular através da apoptose. Em caso de dano ao DNA, o p53 provoca paralisação do ciclo na fase G1, permitindo o reparo do DNA. Se este não ocorre, o p53 desencadeia o processo de apoptose para prevenir a proliferação de células alteradas (Rosen, 1996).

Sua detecção imuno-histoquímica em estado normal é difícil devido à sua labilidade. Em caso de alteração do gene, ocorre inibição de suas funções normais e acúmulo de seus produtos nas células tumorais, facilitando sua detecção. Mutações no gene p53 constituem a anormalidade genética mais frequente nas neoplasias humanas, incluindo o carcinoma mamário. A expressão da proteína p53 é caracterizada pela coloração do núcleo das células tumorais.

Em relação ao carcinoma mamário, há numerosos trabalhos publicados avaliando a associação da expressão da proteína p53 com aspectos clínicos e histológicos. Estes utilizam métodos e anticorpos diversos, além de diferentes

critérios de positividade da reação, o que culmina em resultados também distintos. Porém deve-se ressaltar a contribuição positiva destes estudos, demonstrando relevantes tendências e conclusões sobre esta neoplasia (Rosen, 1996).

Em grande número de trabalhos, a expressão do p53 é mais freqüente nos tumores ER negativos, histologicamente pouco- diferenciados. Sua expressão é menor em tumores do tipo túbulo- papilífero, lobular puro ou ductal com áreas de lobular, e mais freqüente em tumores do tipo medular.

A maioria dos trabalhos não consegue ainda estabelecer correlação significativa entre tamanho do tumor, estágio e expressão do p53. Em relação ao prognóstico, também parece não haver uma associação significativa bem estabelecida. Barnes et al.(1993) demonstraram associação significativa entre a proporção de células p53 positivas e o grau histológico nos carcinomas do tipo ductal e lobular. Em relação ao prognóstico, os casos com maior índice de positividade mostraram pior evolução em termos de intervalo livre de doença, sobrevida total e sobrevida após recidiva, exceto nos casos com grau histológico III. Cattoretti et al.(1988) observaram uma tendência dos tumores p53 positivos de serem ER negativos e de evolução mais agressiva. Houve correlação do p53 com o grau histológico, mas não com o status linfonodal. Ainda em relação ao status linfonodal, segundo Pietiläinen et al.(1995), o acúmulo da proteína p53 não mostrou valor prognóstico independente em casos com metástase axilar, enquanto que nos casos sem metástases a positividade do p53 significou uma evolução favorável, provavelmente relacionada a uma maior sensibilidade destes tumores à terapia adjuvante . Estes achados contrastam com o que tem sido concluído em outros estudos, que associam a positividade para o p53 com um prognóstico desfavorável. Haerslev & Jacobsen (1995) também não observaram valor prognóstico significativo do p53, no entanto a positividade para este marcador associa-se a tumores pouco- diferenciados, ER negativos .

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Barbareschi, M.	1996	- O valor prognóstico e preditivo do p53 parece menor do que o esperado, e é prematuro considerá-lo como parâmetro decisivo na escolha da terapêutica.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Barnes, D. M. et al.	1993	- A expressão p53 mostrou associação com pior prognóstico e foi o segundo parâmetro mais significativo em relação à sobrevida total, perdendo apenas para o status axilar.
• Humphrey, P. A. et al.	1994	- Expressão do p53 detectada em casos de Ca. "in situ", sobretudo nos casos com componente do tipo comedocarcinoma.
• Cattoretti, G. et al.	1988	- A expressão do p53 é associada a tumores ER negativos, EGF +, de alto grau e é um parâmetro promissor para avaliar o prognóstico.
• Pietiläinen, L. et al.	1995	- A expressão da proteína p53 é um fator prognóstico isolado de valor pequeno no carcinoma mamário.
• Poller, D. N. et al.	1993	- A expressão do p53 no Ca "in situ" mostrou associação com elevado grau histológico e com presença de necrose, e tendência de associação significativa com negatividade para ER.
• Poller, D. N. et al.	1992	- O p53 não mostrou valor prognóstico independente, apesar de sua expressão mostrar tendência de associação com pior prognóstico.
• Barbareschi, M. et al.	1992	- Relação da expressão do p53 com comportamento clínico mais agressivo.
• Haerslev, T. & Jacobsen, G. K.	1995	- Não observaram valor prognóstico do p53, que não mostrou relação com sobrevida total nem com intervalo livre de doença.

2.1.5- ONCOPROTEÍNA C-erbB-2 (NEU ou HER 2)

O C-erbB-2 é um proto-oncogene que codifica uma proteína de membrana celular, pertencente à família dos proto-oncogenes erbB (tipo I dos receptores tirosina-kinase), mesma família do EGF-R (fator de crescimento epidérmico). Atua através da fosforilação da tirosina. Sua amplificação tem sido associada aos adenocarcinomas, sobretudo na mama, e sua expressão pode ser avaliada por métodos moleculares e imuno-histoquímicos. Na avaliação da positividade imuno-histoquímica, é considerada a coloração da membrana citoplasmática, que a nível ultraestrutural localiza-se em organelas específicas. Nos carcinomas mamários o acúmulo verifica-se nos pseudópodes, estruturas relacionadas à disseminação celular, locomoção, motilidade e fagocitose, indicando que o C-erbB2 está envolvido nestas funções celulares (De Potter & Schelfhout, 1995).

A frequência de positividade dos carcinomas mamários descrita na literatura para este marcador varia em média entre 20 e 30%.

Quanto ao tipo histológico, é observada uma associação importante entre este marcador e o carcinoma do tipo comedo. Nos carcinomas ductais invasores, o C-erbB2 é mais frequentemente observado quando há um componente *in situ* significativo. Dawkins et al.(1993) destacaram a associação da positividade a lesões de alto grau histológico (tipo comedo ou grandes células), citando ainda que os tipos “especiais” de carcinoma (tubular, mucinoso, papilífero, medular e cribriforme), considerados de melhor prognóstico, raramente demonstram positividade para o C-erbB2.

Quanto ao seu valor prognóstico, segundo De Potter & Schelfhout (1995), a expressão do C-erbB2 mostrou valor prognóstico secundário aos clássicos indicadores como metástase axilar, tamanho e diferenciação do tumor e receptores hormonais. A expressão do C-erbB2 parece ser mais significativa nos primeiros anos após o diagnóstico, com redução drástica do seu valor a partir do 5º ano de evolução. Lovekin et al.(1991), estudando 667 casos, encontraram uma associação significativa entre a expressão do C-erbB2 e a sobrevida, porém também a consideraram menos significativa do que outros fatores prognósticos existentes. Os autores acreditam que o marcador seleciona um subgrupo de pior prognóstico, mas consideram que sua aplicação

clínica seja mais efetiva quando utilizado em combinação com outros marcadores. Wright et al.(1989), em um grupo de 185 casos, concluíram que o C-erbB2 tem valor preditivo de pior prognóstico em casos com ou sem metástases axilares, ressaltando que em grupos considerados de melhor prognóstico, o C-erbB2 selecionaria aqueles que teriam maiores benefícios com uma terapêutica mais agressiva já num estágio inicial .

A importância da expressão do C- erbB2 estende-se ainda ao tratamento, pois há estudos recentes mostrando que casos de carcinoma mamário que expressam este marcador se beneficiariam da administração de um medicamento chamado trastuzumab (herceptina), constituído por anticorpos para o C-erbB2. As primeiras experiências indicam que a herceptina possui atividade anti-tumoral potente, exercendo seu efeito terapêutico através de alguns mecanismos como antagonismo da função do sistema HER2 e inibição direta do crescimento das células tumorais. No estudo de Shak (1999), o anticorpo monoclonal anti- HER2 trastuzumab (herceptina) foi testado para verificação de sua eficácia e segurança em pacientes com carcinoma mamário como nova opção terapêutica para os casos de carcinoma metastático que expressam o C-erbB2. Foram incluídas neste estudo 1000 mulheres, e os dados indicaram que a herceptina pode ser uma importante opção de tratamento, sozinho ou em combinação com outras drogas. Baselga et al. (1999) também utilizaram a herceptina em casos de carcinoma mamário metastático com expressão do C-erbB2 determinada através do método imuno- histoquímico, e concluíram que esta droga, sozinha ou em combinação com quimioterapia, é uma grande aliada no tratamento destes casos.

Ravdin (1999), no entanto, ressaltou que ainda não há justificativas para a investigação de rotina deste marcador em tumores primários no momento do diagnóstico, uma vez que a importância de sua verificação tem sido observada apenas em casos de doença avançada, com metástases. Segundo o autor, a melhor estratégia seria guardar material do tumor primário, utilizando-o para a verificação da expressão do C-erbB2 em caso de recorrência da doença.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Wright, C. et al.	1989	- A expressão do C-erbB-2 pareceu ser um importante indicador prognóstico independente.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• De Potter & Schelfhout.	1994	- A expressão do C-erbB-2 relaciona-se com diminuição da sobrevida total e do intervalo livre de doença, podendo ser um marcador preditivo de recorrência.
• Molina, R. et al.	1996	- A expressão do marcador C-erbB-2 é útil no diagnóstico precoce de recorrência.
• Gusterson, B. A. et al.	1992	- A expressão do C-erbB-2 traz informações prognósticas adicionais e pode ser útil como preditivo de resposta à quimioterapia.
• Tandon, A. K. et al.	1989	- C-erbB-2 é um marcador significativo independente com valor preditivo para sobrevida geral e intervalo livre de doença nos casos com metástase axilar.
• Toikkanen, S. et al.	1992	- O C-erbB-2 tem significado prognóstico com expressão associada a menor sobrevida, com valor independente nos casos com metástase axilar.
• Lovekin, C. et al.		- A expressão do C-erbB-2 é um indicador prognóstico importante, relacionado com pior prognóstico.

2.1.6- PROTEÍNA BCL-2

O bcl-2 é um oncogene pertencente à categoria dos reguladores da morte celular programada (apoptose), ampliando a vida média celular e aumentando assim as chances da célula adquirir defeitos genéticos de crescimento e proliferação e/ou supressão (Korsmeyer, 1992)

Inicialmente detectado em casos de linfoma não-Hodgkin, tem sido também observado em tecidos não-linfóides fetais e adultos, e em algumas neoplasias hematológicas e epiteliais, sobretudo aquelas em tecidos sob

controle hormonal, como a mama (Sierra et al., 1995). Nathan et al.(1994), comparando tecido mamário fetal e infantil, observaram que no primeiro, a positividade para o Bcl-2 era maior nas células basais, enquanto que no último a positividade maior passava a ser nas células epiteliais luminiais, indicando que a perda progressiva de expressão do Bcl-2 em células basais reflete a diminuição da capacidade proliferativa do tecido e sua diferenciação, sugerindo um papel ativo deste gene na morfogênese mamária. Em reações imuno-histoquímicas, a positividade para o Bcl-2 é citoplasmática, sobretudo na região perinuclear.

Sobre o valor prognóstico deste marcador, Hurlimann et al.(1995), em 190 casos de carcinoma ductal invasor, observaram uma correlação inversa entre Bcl-2 e p53, e uma tendência de melhor prognóstico nos casos Bcl-2 positivos. Este valor prognóstico foi significativo no que se refere à recorrência em 5 anos, sobretudo em pacientes com idade acima dos 54 anos. Nos casos positivos para Bcl-2 e p53, parece que o Bcl-2 confere boa resposta à terapêutica hormonal, o que sugere que a avaliação simultânea destes marcadores pode ser útil na identificação de um subgrupo de melhor evolução. No entanto Sierra et al.(1995), em um grupo de 124 casos de carcinoma ductal invasor em estágio T1, verificaram uma tendência a metástases linfonodais 3,6 vezes maior no grupo Bcl-2 positivo em relação aos casos Bcl-2 negativos. Constataram ainda que esta tendência aumentava proporcionalmente ao percentual de células positivas, o que indicava uma associação bastante significativa. Os autores confirmaram a correlação do Bcl-2 com o ER e evidenciaram que a positividade do Bcl-2 foi mais freqüente em tumores com progressão metastática inicial do que nos casos sem metástase axilar, o que podia significar uma vantagem dos casos Bcl-2 positivos na progressão tumoral .

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Sierra, A. et al.	1995	- Valor prognóstico do Bcl-2, associado ao grau histológico e status do PR.
• Hurlimann, J. et al.	1995	- A expressão do Bcl-2 associou-se a melhor prognóstico.

Autor	Ano Publ.	Conclusões
• Berardo, M. D. et al.	1998	- Em casos com metástase axilar, a expressão do Bcl-2 é associada com vários indicadores de bom prognóstico, e está isoladamente associada a melhor prognóstico.
• Silvestrini, R. et al.	1996	- A negatividade para o marcador Bcl-2 é indicativa de comportamento biológico agressivo.
• Barbareschi, M. et al.	1996	- A positividade do Bcl-2 esteve associada a melhor prognóstico nos casos sem metástases axilares.

3. JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO -

A busca contínua por métodos que forneçam dados cada vez mais detalhados acerca de neoplasias de alta incidência, como o carcinoma mamário, visa possibilitar a distinção de tumores que embora histologicamente semelhantes, podem se comportar de maneira diferente. Estas informações prognósticas mais precisas permitiriam a instituição da terapêutica mais adequada a cada caso, traduzindo um aumento real das chances de cura destas pacientes.

Neste sentido, o desenvolvimento das técnicas de imuno-histoquímica e a utilização de marcadores cada vez mais específicos e sensíveis, vem contribuindo significativamente na elucidação de grande número de casos de difícil diagnóstico, bem como tem acrescentado importantes informações quanto à origem e evolução das neoplasias mamárias, permitindo que cada caso seja individualizado quanto à sua natureza, e portanto conduzido como tal.

O levantamento de publicações referentes ao uso de marcadores imuno-histoquímicos de possível valor prognóstico nos carcinomas mamários colocamos em contato com um infindável e riquíssimo material, que reflete o interesse que este assunto tem gerado ao longo de décadas. A grande quantidade de hipóteses e conclusões, muitas vezes conflitantes, pode ser parcialmente explicada pela variedade dos métodos utilizados, ou ainda pelas diferenças epidemiológicas entre os vários grupos populacionais estudados. Estes resultados podem ser ainda explicados por fatores de ordem técnica, como artefatos de fixação tecidual, comprometendo a qualidade das reações.

Embora poucas sejam as afirmações que reúnam um grau considerável de concordância, fica clara a evolução dos conhecimentos sobre o carcinoma mamário e os reflexos desta evolução no que diz respeito à terapêutica atualmente disponível. Fica também evidente a imperiosa necessidade de continuar os estudos nesta área, utilizando os conhecimentos já adquiridos e tentando ampliá-los. Neste sentido, a realização de estudos retrospectivos em casos com longo período de seguimento surge como opção ideal de material a ser utilizado, e talvez a melhor maneira de aproveitá-lo seja a pesquisa simultânea de vários marcadores, confrontando os resultados obtidos para cada um deles com os outros, e também comparando estes resultados com a

evolução clínica observada. Visto que nenhum dos marcadores até hoje estudados conseguiu firmar-se como marcador de valor prognóstico absoluto isoladamente, poderia ser bastante produtiva a tentativa de estabelecer um painel imuno-histoquímico que atendesse às necessidades de informações prognósticas utilizando marcadores já bem conhecidos, que juntos poderiam fornecer dados de tanta credibilidade quanto os parâmetros clinicamente utilizados.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

O presente estudo, em um grupo de 40 pacientes portadoras de carcinoma mamário, visa:

- Comparar os resultados obtidos através dos marcadores imuno-histoquímicos utilizados - ER, CEA , vimentina, p53, CerbB2 e Bcl-2 - com a evolução clínica apresentada por cada um dos casos estudados, verificando se há relação entre a expressão destes marcadores e o comportamento clínico, para tentar estabelecer o valor prognóstico de cada um dos marcadores testados.
- Comparar os resultados obtidos em cada marcador com os outros anticorpos utilizados e com parâmetros clínicos e patológicos, visando estabelecer uma possível relação entre suas expressões.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1 -CASUÍSTICA -

O grupo objeto do presente estudo consta de 148 pacientes com carcinoma mamário nos estádios clínicos I, II e III, tratadas com cirurgia conservadora (tumorectomia ou quadrantectomia), seguida de radioterapia adjuvante, atendidas no Centro de Oncologia Campinas (COC), no período de novembro de 1981 a janeiro de 1987.

Como critérios de inclusão, havia necessidade de que os blocos de parafina contendo os tumores estivessem disponíveis para a realização dos estudos imuno-histoquímicos. Além disto, informações sobre idade, estágio, resposta à terapêutica, morbidade e mortalidade também deveriam estar completas. Portanto, este grupo inicial foi reduzido para apenas 40 casos, os únicos dos quais foi possível obter os blocos de parafina dos cortes do tumor, por motivos diversos. Nestes, a idade das pacientes variou entre 30 e 80 anos, com média de 54,8 anos, mediana de 59,5 anos e desvio-padrão igual a 13,5 anos. Além disso, observou-se que 20,0% delas tinha idade entre 30 e 40 anos, 20,0% entre 41 e 50 anos, 15,0% entre 51 e 60 anos, e 45,0% tinha idade superior a 60 anos.

Foram realizados cortes corados pela técnica de rotina (hematoxilina & eosina), para classificação histológica das neoplasias. Em seguida foram processadas as reações imuno-histoquímicas para receptor de estrogênio (ER), antígeno carcinoembrionário (CEA), vimentina, p53, C-erbB-2 e Bcl-2. Estes estudos foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental - CAISM - UNICAMP.

A gradação histológica e nuclear foi feita segundo a modificação de Nottingham do sistema Bloom- Richardson.

Nos casos estudados, o tipo histológico ductal invasor foi o mais freqüente (90%), seguido pelos tipos colóide (5%), intraductal papilífero (2,5%) e carcinoma medular (2,5%). Em relação ao grau histológico, 5,4% tinham grau histológico I, 48,7% grau histológico II, e 45,9 % eram de grau histológico III. Quanto ao grau nuclear, 13,5% eram de grau nuclear 1, 78,4% apresentaram grau nuclear 2, e 8,1% apresentam grau nuclear 3. Metástases axilares ao diagnóstico foram constatadas em 55,0% dos casos. Quanto ao

estadiamento clínico, 15,0% encontravam-se no estágio I, 60,0% no estágio II, e 25,0% no estágio III.

O tempo de seguimento clínico médio dos casos estudados foi de 83,9 meses, tendo variado de 2 a 167 meses.

Quanto à evolução clínica apresentada, 60,0% dos casos evoluiu sem novas evidências da doença, 10,0% apresentou recidiva local, 12,5% apresentou metástases à distância, e 17,5% foi a óbito pela doença.

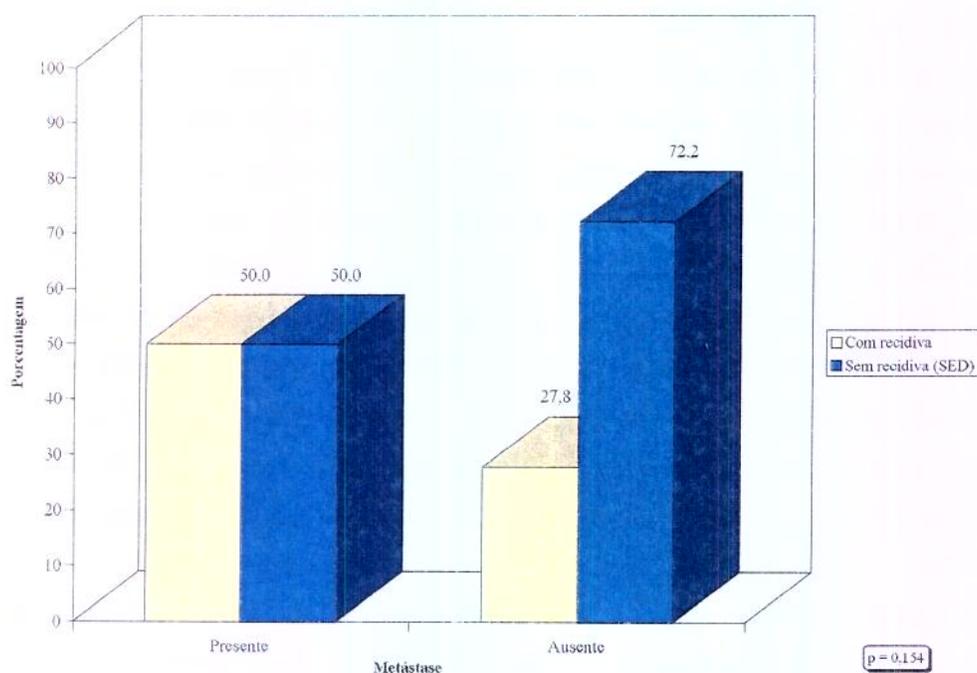


GRÁFICO 01 - Caracterização das pacientes quanto à evolução da doença, considerando-se a presença de metástase ao diagnóstico.

2 - MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO -

* A pesquisa dos antígenos receptor estrogênico (clone 1D5), antígeno carcinoembrionário (policlonal), vimentina (clone V9), p53, C-erbB2 (policlonal) e Bcl-2 (clone) foi realizada de acordo com os procedimentos de rotina em imuno-histoquímica, técnica da estreptavidina - biotina - peroxidase, descritos por Hsu et al. (1981), com modificações do laboratório. Esta reação possibilita a identificação dos antígenos celulares através da enzima peroxidase, que se liga a um anticorpo específico. Em seguida, utiliza-se uma substância geradora de cor (diaminobenzidina- DAB), que reage com a

enzima e se precipita no local onde está presente o antígeno. A reação produzida é proporcional ao teor de antígeno, e a estrutura celular é em seguida contra - corada com hematoxilina de Mayer. Foram utilizados neste trabalho 6 anticorpos específicos, conforme descrito na Tabela 1. Utiliza-se ainda um anticorpo secundário capaz de ligar- se ao primário, conjugado à biotina , e o complexo de peroxidase conjugado à estreptavidina e biotina. A estreptavidina apresenta 4 sítios para a ligação da biotina, um deles é ocupado por biotina ligada ao anticorpo secundário, e os outros 3 se unirão ao complexo biotina- peroxidase da solução.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA
Primários		
-Anti- ER 1D5 (G. Delsol, França)	1:2000	Microondas, 3X 7 min., com tampão citrato, 10mM, pH 6,0. Variante: Substituição do tampão citrato por uréia 5% nos casos negativos com citrato.
-Anti-CEA A115- DAKO (policlonal)	1:1000	Não realizada
-Anti-vimentina (V9) M725	1:20	Não realizada
-Anti- proteína p53 M7001- DAKO	1:100	Microondas, 3X 7 min., com tampão citrato pH 6,0.
-Anti-C-erb-B2 A485-DAKO	1:300	Microondas, 3X 7 min., com tampão citrato pH 6,0.
-Anti-bcl-2 M887-DAKO	1:40	Autoclave com água destilada- 5 min.
Multi-link (biotinilado) E453-DAKO	1:100	-
Complexo estreptavidina- biotina-peroxidase K377-DAKO	1:100	-

Tabela 1 – Reagentes imuno-histoquímicos utilizados.

O procedimento foi realizado do seguinte modo :

A) Cortes histológicos de 5 micrômetros de espessura foram colocados em lâminas lavadas e tratadas com solução de organossilano a 2% em acetona (3- Aminopropil- trietoxi- silano, A3648 Sigma). Os cortes foram mantidos à temperatura ambiente até a realização da técnica imuno-histoquímica.

B) Desparafinação, com um banho de xilol a 60°C (15 min.) e dois banhos de xilol à temperatura ambiente (10 min. cada) para retirar o excesso de parafina.

C) Hidratação em gradiente decrescente de álcoois (3 banhos de álcool absoluto - 2 min. cada, 1 vez em álcool 80% por 2 minutos e 1 vez em álcool 50% por 2 min., todos à temperatura ambiente). Em seguida, lavagem em água corrente por 2 minutos e passagem em água destilada.

D) A seguir, procedeu-se à recuperação antigênica, visando desmascarar os antígenos afetados pela fixação dos tecidos em formalina.

As variações para esta técnica foram necessárias no momento da recuperação antigênica, uma vez que são necessários procedimentos para expor os antígenos afetados pela fixação do tecido com formalina. A recuperação antigênica pode ser realizada por digestão enzimática ou calor. A técnica específica utilizada para cada um dos marcadores está especificada na tabela 1 e consistiu de calor úmido (microondas ou autoclave), dependendo do anticorpo utilizado. Apenas para o CEA e vimentina não se utilizou o método de recuperação antigênica. Para o receptor estrogênico, nova tentativa foi feita nos casos não- reativos, substituindo-se o tampão citrato 10 mM, pH 6,0 utilizado habitualmente, por solução de uréia a 5%.

E) Inibição da peroxidase endógena, utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 15 minutos, à temperatura ambiente, seguindo-se lavagem em água corrente e água destilada, e incubação em tampão PBS (Phosphate buffer saline, pH 7,6).

F) Bloqueio de reações inespecíficas , visando eliminar a reação inespecífica de fundo, evitando que o anticorpo primário se una a outros antígenos

teciduais. Utilizou-se soro não-ímune de porco (o mesmo animal em que foi produzido o anticorpo secundário biotinilado), incubando os cortes durante 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, retirando-se o excesso em seguida com papel de filtro.

G) Incubação com o anticorpo primário durante 2 horas em câmara úmida, no caso dos anticorpos CEA e vimentina. Para o ER, p53, C-erb-B2 e Bcl-2 utilizou-se a incubação, por toda a noite a 4°C (cerca de 18 h.), continuando-se a reação na manhã seguinte. Retirado o excesso de anticorpo primário, seguiram-se 3 lavagens em PBS, cada uma de 5 minutos, à temperatura ambiente.

H) Reação com o anticorpo secundário biotinilado (anti-imunoglobulinas de coelho e camundongo, produzidas em suíno- Multilink, DAKO), incubado durante 30 min. em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, retirou-se o excesso e seguiram-se 3 lavagens de 5 minutos cada em PBS.

I) Incubação com complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (K377 Dako, diluição 1:100) durante 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, seguindo-se nova lavagem em PBS.

J) Coloração com DAB (3,3 tetra- hidrocloro- diamino- benzidina, D5637 Sigma), preparada como se segue: 100 ml. de PBS diluído 10 vezes, 60 mg. de DAB, 500 M de água oxigenada e 1000 M de DMSO.

K) Contra-coloração com hematoxilina de Mayer, durante 1 minuto em temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem em água corrente, com algumas gotas de amoníaco para obter melhor contraste da coloração, e posterior lavagem em água destilada.

L) Desidratação, com 3 banhos em álcool absoluto seguidos de passagem em 3 xilóis. Em seguida procedeu-se à montagem das lâminas em meio permanente (Entellan- Merck).

Após a realização das reações, a análise foi feita em microscópio óptico comum (os preparados são permanentes) e a classificação da

intensidade das reações foi feita de modo semi- quantitativo, enquadrando- as em uma das seguintes categorias:

0 = negativo em todas as células neoplásicas

+ = reação leve; até 20% das células neoplásicas coradas;

++ = reação moderada; 20 a 50% das células neoplásicas coradas;

+++ = reação intensa; mais que 50% das células neoplásicas coradas.

Para efeito de análise estatística, os casos foram agrupados de dois modos: 0 versus +/++/+++ , e 0/+ versus ++/+++.

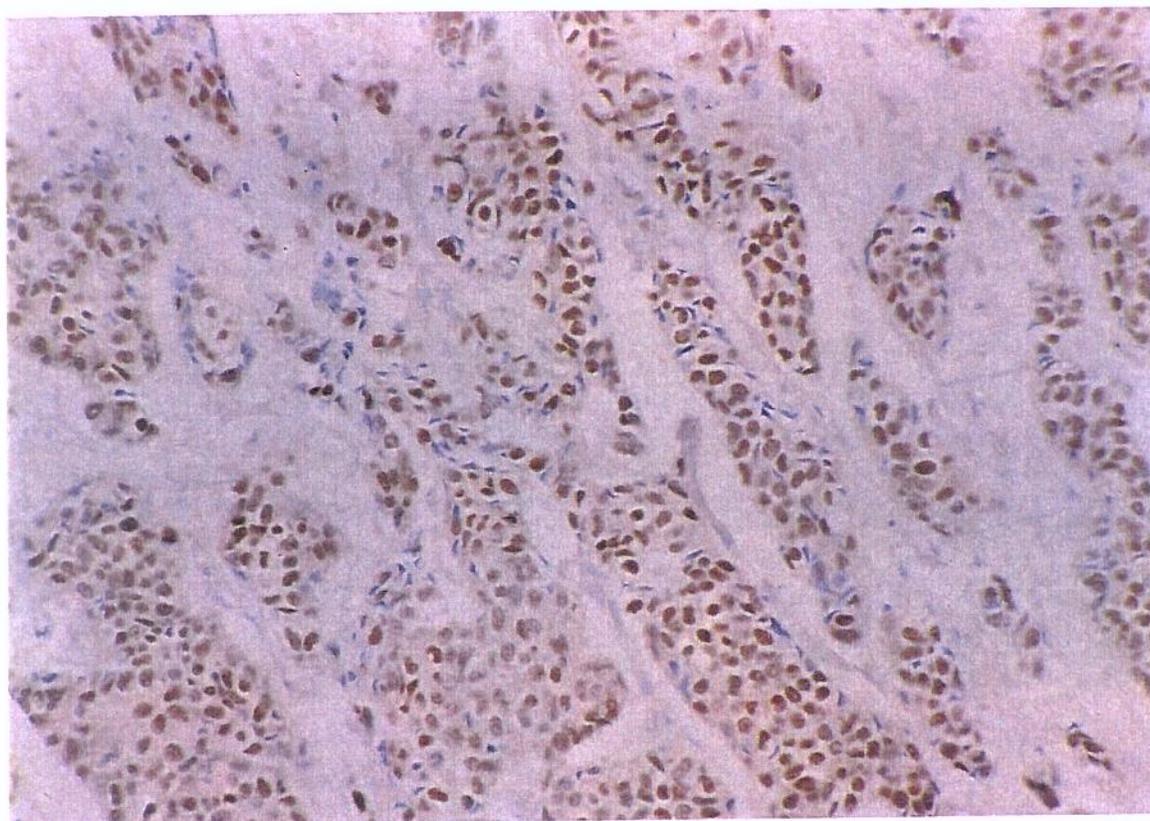


FIGURA 01 - Reação imuno-histoquímica positiva para ER (aumento de 200 x).

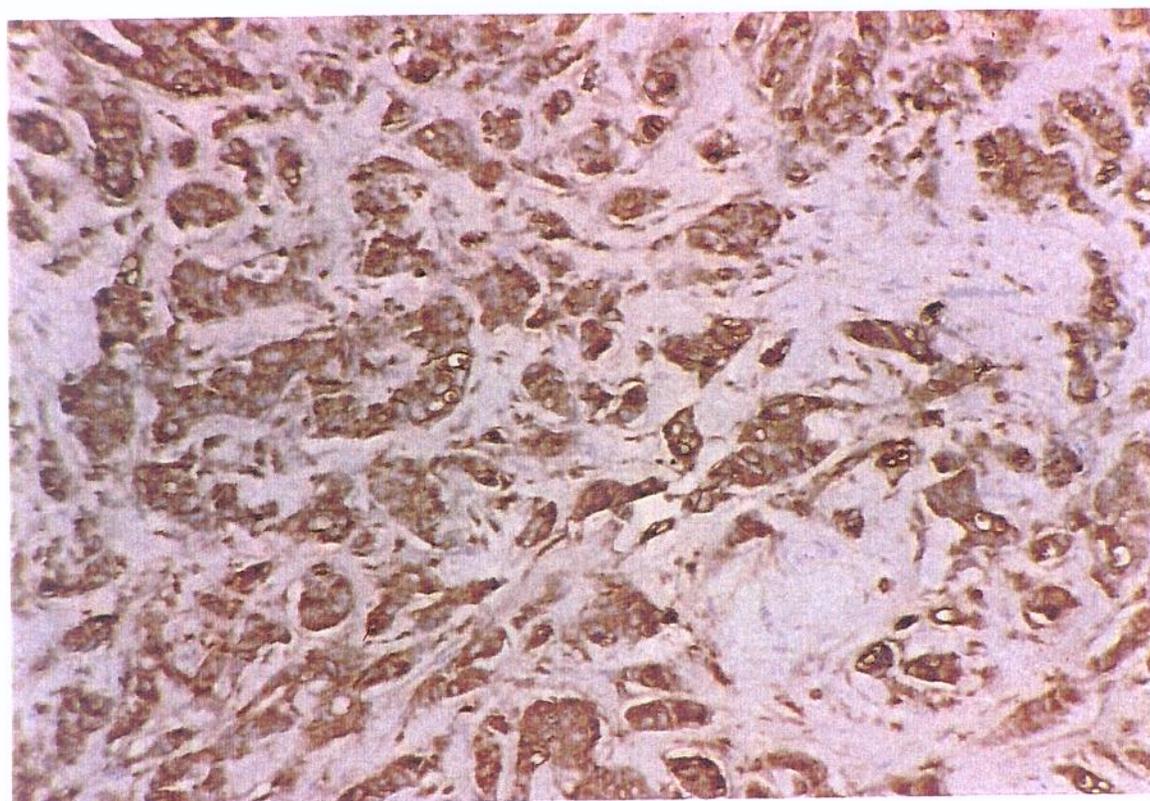


FIGURA 02 - Reação imuno-histoquímica positiva para CEA (aumento de 200 x).

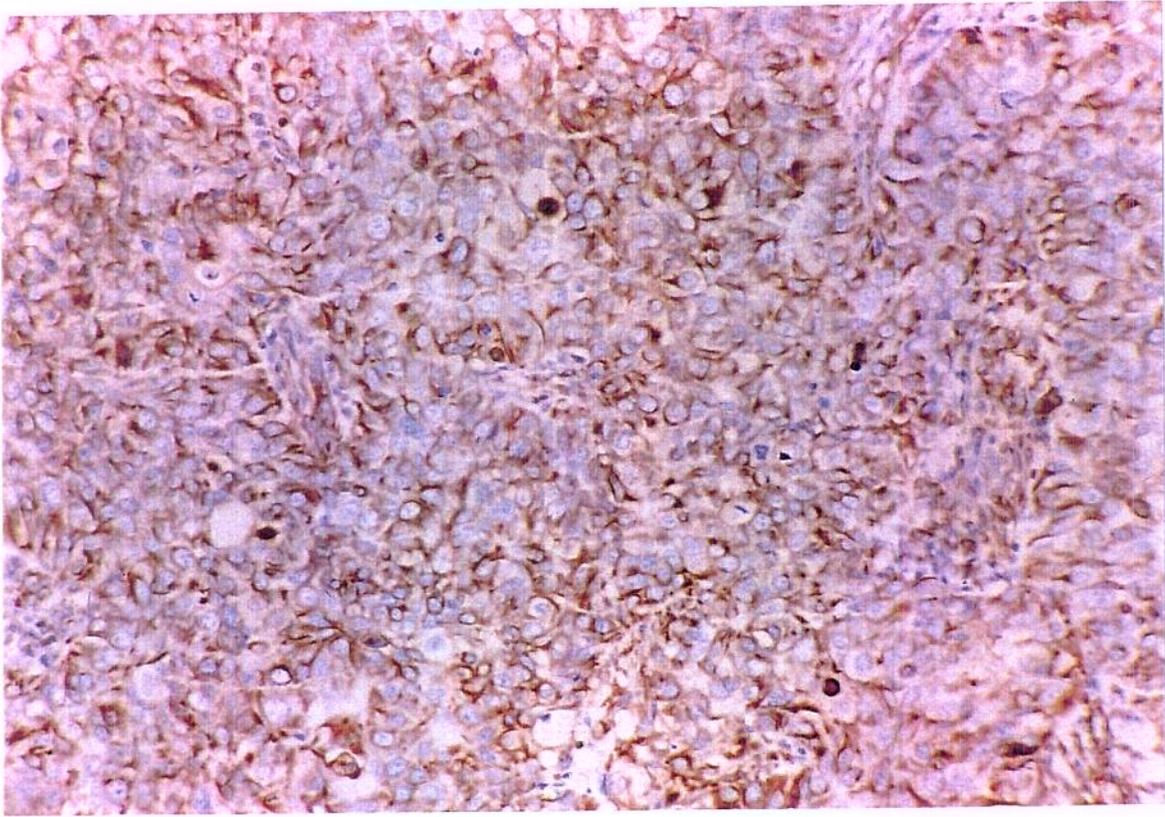


FIGURA 03 - Reação imuno-histoquímica positiva para Vimentina (aumento de 200 x).

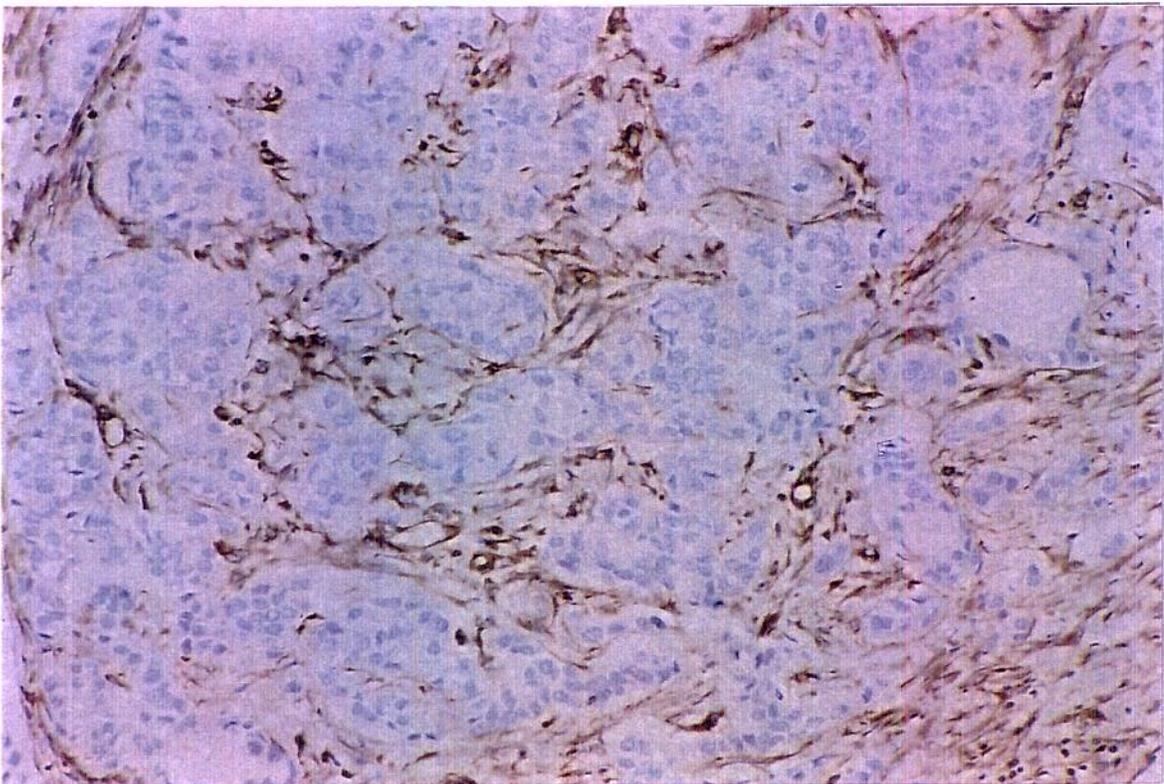


FIGURA 04 - Reação imuno-histoquímica para Vimentina - Controle interno positivo (aumento de 200 x).

- 3- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o objetivo de avaliar a relação entre a presença de metástases e evolução da doença utilizou-se o teste Qui-quadrado, que tem como objetivo comparar grupos de indivíduos quanto à proporção de ocorrência do evento. Neste caso, comparar o grupo de mulheres com metástases com aquelas sem metástases quanto à ocorrência de recidiva.

Para as curvas de sobrevida com dados categorizados, utilizou-se o método de Kaplan- Meyer. Os grupos categorizados foram comparados através do teste de Cox- Mantel. Para comparar os dados contínuos em relação à sobrevida, utilizou-se a regressão Cox.

Além disso, no caso de tabelas 2x2, quando é observada diferença significativa, avalia-se a razão das chances (O.R.), medida esta que quantifica o grau de associação entre duas variáveis.

Todos os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), tendo portanto, 95% de confiança de que os resultados estejam corretos.

RESULTADOS

RESULTADOS

Os marcadores imuno-histoquímicos ER, CEA e vimentina foram utilizados nos 40 casos que compõem o grupo objeto do nosso estudo. O marcador p53 foi utilizado em apenas 39 casos, o C-erb-B2 foi avaliado em 34 casos e o bcl-2 em 37 casos.

Quanto à presença de metástases, 22 (55%) dos casos apresentavam metástases ao diagnóstico, o que não ocorreu em 18 (45%) dos casos. Entre os casos com metástases, 11(50%) evoluíram sem novas evidências da doença, enquanto 4 (27,8%) apresentaram recidiva, porém esta diferença não mostrou-se significativa no nosso grupo.

As análises estatísticas dos resultados foram feitas agrupando-se os casos de duas maneiras: 0 x +/+/+/+, e 0/+ x +/+/+.

Vimentina e p53 foram os marcadores com maior índice de negatividade em nosso grupo, enquanto ER, CEA e c-erbB2 mostraram os maiores índices de positividade.

Não foi possível avaliar a influência do estadiamento da doença na positividade dos marcadores devido ao número reduzido de casos que compõem o objeto de estudo. Pôde-se no entanto fazer um estudo descritivo.

Veremos a seguir os resultados obtidos com cada um dos marcadores imuno-histoquímicos utilizados.

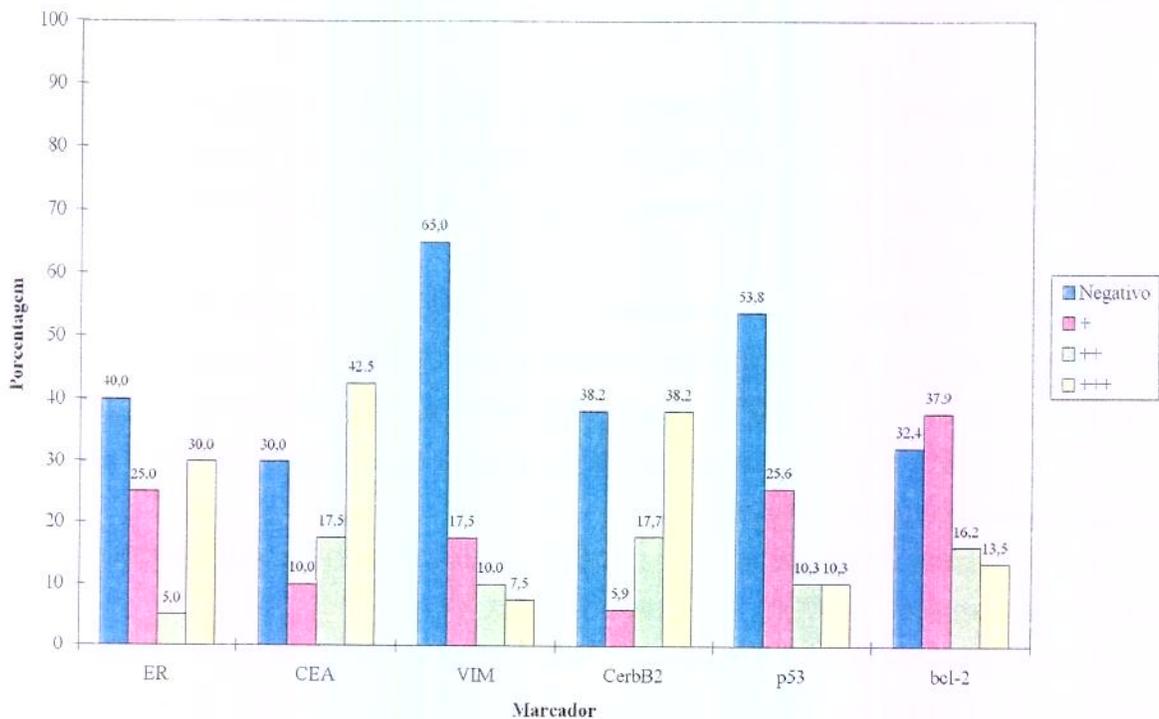


GRÁFICO 02 - Caracterização das pacientes quanto à resposta de cada marcador.

1) ER (1D5)

Os resultados obtidos com este marcador apresentaram a seguinte distribuição:

- 0 - 16 casos (40,0%)
- + - 10 casos (25,0%)
- ++ - 2 casos (5,0%)
- +++ - 12 casos (30,0%)

Não houve relação estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com este marcador e a idade das pacientes.

No que se refere aos graus histológico e nuclear, o marcador ER não mostrou correlação estatisticamente significativa com nenhum destes dois critérios, independente da maneira de agrupar os casos.

Quanto ao estadiamento, a positividade para o ER nos casos em estágio I foi de 33,3%, 41,7% no estágio II e 20,0% no estágio III.

Não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos com este marcador e os casos com e sem recidiva da doença, no

entanto observou-se uma maior positividade entre as mulheres sem novas evidências da doença.

A avaliação da influência da presença de metástases quanto à positividade dos marcadores também não mostrou-se estatisticamente significativa para nenhum dos marcadores estudados, porém no caso do ER observou-se maior índice de positividade no grupo de mulheres sem metástases ao diagnóstico.

2) VIMENTINA

A reação com a vimentina apresentou seus resultados distribuídos da seguinte forma :

- 0- 26 casos (65%)
- + 7 casos (17,5%)
- ++ 4 casos (10,0%)
- +++ 3 casos (7,5%)

Não houve relação estatística significativa entre a idade das pacientes e os resultados obtidos com este marcador.

Em relação ao grau histológico, houve evidência de associação estatisticamente significativa quando os casos eram agrupados como 0 x +/++/+++ e em relação ao grau nuclear, a evidência de associação significativa manteve-se nos 2 modos de agrupar os casos.

Quanto ao estadiamento, a positividade para a vimentina foi de 16,7% no estágio I, 12,5% no estágio II e 20,0% no estágio III.

Apesar de não haver diferenças significativas, a positividade para este marcador foi maior entre as pacientes sem novas evidências da doença durante o seguimento clínico.

A presença de metástases também não mostrou relação significativa com este marcador, porém observou-se maior índice de positividade entre os casos sem metástases.

3) CEA

As reações feitas com o CEA ficaram assim distribuídas:

0- 12 casos (30,0%)

+ - 4 casos (10,0%)

++- 7 casos (17,5%)

+++ - 17 casos (42,5%)

O CEA não apresentou relação estatisticamente significativa com a idade das pacientes.

Em relação ao grau histológico não houve associação significativa com este marcador em nenhuma das formas de agrupar os casos. Com o grau nuclear, houve evidência de associação estatisticamente significativa apenas quando os casos foram agrupados como 0/+ x ++/+++.

A positividade para o CEA atingiu 50,0% nos casos em estágio I, 70,8% no estágio II e 50,0% no estágio III.

No que se refere à evolução da doença em relação à positividade dos marcadores, não houve associação significativa com o CEA, no entanto o índice de positividade foi maior entre os casos sem evidências da doença.

Em relação à presença ou não de metástases ao diagnóstico, não houve associação significativa com este marcador, no entanto há indícios de uma relação entre a presença de metástases e a resposta ao CEA, com maior número de casos positivos no grupo sem metástases ($p= 0,071$).

4) P53

A relação com este marcador apresentou seus resultados distribuídos da seguinte maneira:

0- 21 casos (53,8%)

+ - 10 casos (25,6%)

++- 4 casos (10,3%)

+++ - 4 casos (10,3%)

A idade das pacientes não mostrou associação estatisticamente significativa com este marcador.

Também não houve relação significativa deste marcador com os graus histológico e nuclear em nenhuma das 2 formas de agrupar os casos.

Quanto ao estadiamento, o marcador p53 apresentou 16,7% de positividade no estágio I, 25,0% nos casos em estágio II e 20,0% naqueles em estágio III.

A evolução da doença não teve influência significativa nos resultados obtidos com o marcador p53, no entanto, seu índice de positividade foi maior nos casos onde houve recidiva da doença.

A presença de metástases ao diagnóstico não mostrou associação significativa com este marcador, mas há um índice de positividade maior no grupo com metástases linfonodais.

5) C-erb-B2

As reações com o c-erb-B2 apresentaram a seguinte distribuição:

0- 13 casos (38,2%)

+ 2 casos (5,9%)

++ 6 casos (17,7%)

+++ 13 casos (38,2%)

Não há relação estatisticamente significativa entre este marcador e a idade das pacientes que compõem o nosso grupo de estudo.

Quanto ao grau histológico, houve evidência de associação significativa com o c-erb-B2 quando os casos são agrupados como 0/+ x ++/+++. O grau nuclear não mostrou associação estatisticamente significativa em nenhuma das 2 formas de agrupar os casos.

Em relação ao estadiamento, observou-se um aumento do índice de positividade deste marcador à medida que aumenta o estadiamento da doença, com 20,0% de positividade entre os casos no estágio I, 54,6% nos casos em estágio II, e 85,7% de positividade no grupo em estágio III.

Em relação à evolução clínica, observou-se uma tendência de associação com a expressão deste marcador, com maior índice de positividade entre os casos onde não houve novas evidências da doença ($p=0,09$).

A presença de metástases ao diagnóstico também não influenciou significativamente os resultados obtidos com o c-erb-B2, mas o índice de positividade é maior nos casos com metástases.

6) Bcl-2

Os resultados obtidos com este marcador distribuíram-se da seguinte forma:

0- 12 casos (32,4%)

+ 14 casos (37,9%)

++ 6 casos (16,2%)

+++ 5 casos (13,5%)

A idade das pacientes estudadas não mostrou associação significativa com os resultados obtidos com este marcador.

Não houve também relação deste marcador com os graus histológico e nuclear em nenhuma das 2 formas de agrupar os casos.

Em relação ao estadiamento, houve 33,3% de positividade para o bcl-2 nos casos em estágio I, 37,5% no grupo com estágio II, e não houve positividade em nenhum caso em estágio III.

A evolução clínica não teve relação significativa com este marcador, porém houve maior número de casos positivos entre o grupo de pacientes com recidiva da doença.

A presença de metástases ganglionares ao diagnóstico também não influenciou os resultados deste marcador, porém sua positividade é maior nos casos sem metástases.

Quando os marcadores imuno-histoquímicos foram relacionados entre si, primeiramente levando-se em conta os casos negativos versus +/++/+++ (tabela 3), e a seguir os casos negativos/+ versus ++/+++ (tabela 4), encontramos apenas relação inversa entre os marcadores ER (1D5) e vimentina como significativa (vide tabela 4,*), quando ambos são moderada ou fortemente positivos.

Quando os marcadores imuno-histoquímicos foram relacionados com parâmetros morfológicos (graus histológico e nuclear), status dos linfonodos (negativo ou positivo) e idade da paciente (menores de 50 ou com 50 anos ou mais) [tabelas 5 e 6], obtivemos alguns dados significantes, porém mantiveram-se em ambas as análises apenas:

-Uma relação entre o grau nuclear 1 e a positividade para vimentina, enquanto o grau nuclear 2 foi mais frequentemente negativo para este marcador;

-Uma relação entre a positividade para CEA e ausência de metástases linfonodais, enquanto que casos CEA negativos apresentaram mais freqüentemente linfonodos positivos ao diagnóstico.

As curvas de sobrevida podem ser apreciadas nas figuras 1 a 11. Embora não tenhamos obtido grupos estatisticamente significantes, algumas curvas foram nitidamente distintas (ver gráficos da página 94 à 97):

-Figura 2- grupo menor e igual ou maior que 50 anos;

-Figura 4- graus histológicos 2 e 3;

-Figura 5- linfonodo acometido ou não;

-Figura 6- a avaliação do receptor de estrógeno negativo versus qualquer grau de positividade (6b) parece discriminar mais grupos de sobrevida que menor ou maior que 20% de positividade (6a);

-Para p53, c-erb-B2 e bcl-2, grupos com menos que 20% de positividade se destacam em relação aos com mais que 20% de positividade, o que não ocorre com os grupos negativo x positivo(figuras 9 a 11);

-Figura 9- casos com mais que 20% de positividade para p53 destacam-se dos demais, no sentido de pior sobrevida;

-Figura 10- casos com mais que 20% de positividade para c-erb-B2 destacam-se dos demais, no sentido de melhor sobrevida;

-Figura 11- casos com mais que 20% de positividade para bcl-2 destacam-se dos demais, no sentido de pior sobrevida.

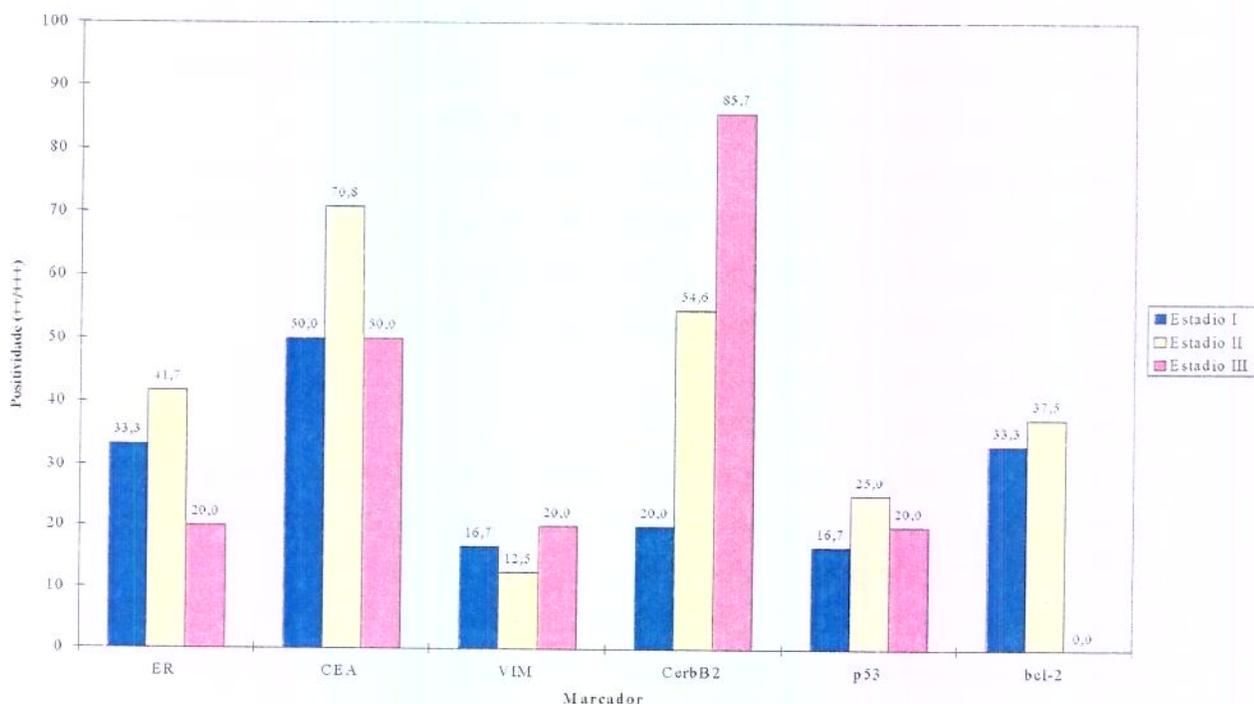


GRÁFICO 03 - Caracterização das pacientes quanto à positividade para os marcadores (++) considerando-se o estadiamento da doença.

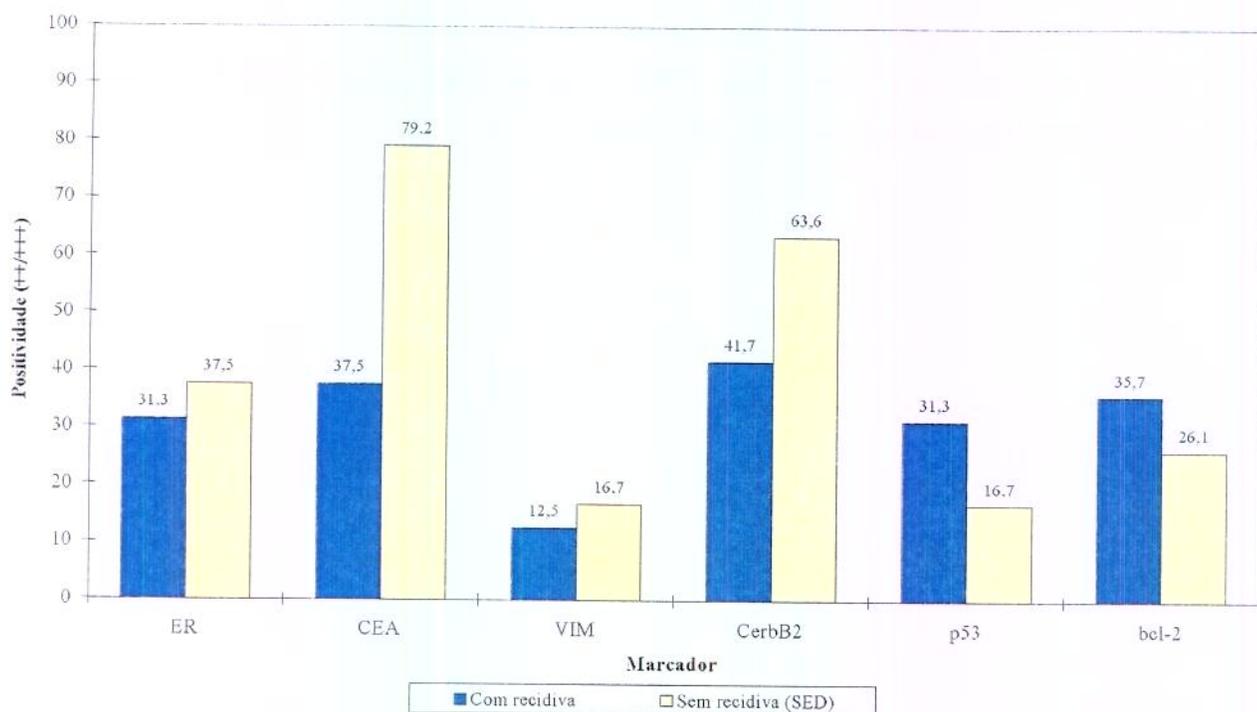


GRÁFICO 04 - Caracterização das pacientes quanto à positividade para os marcadores (++) considerando-se a evolução da doença.

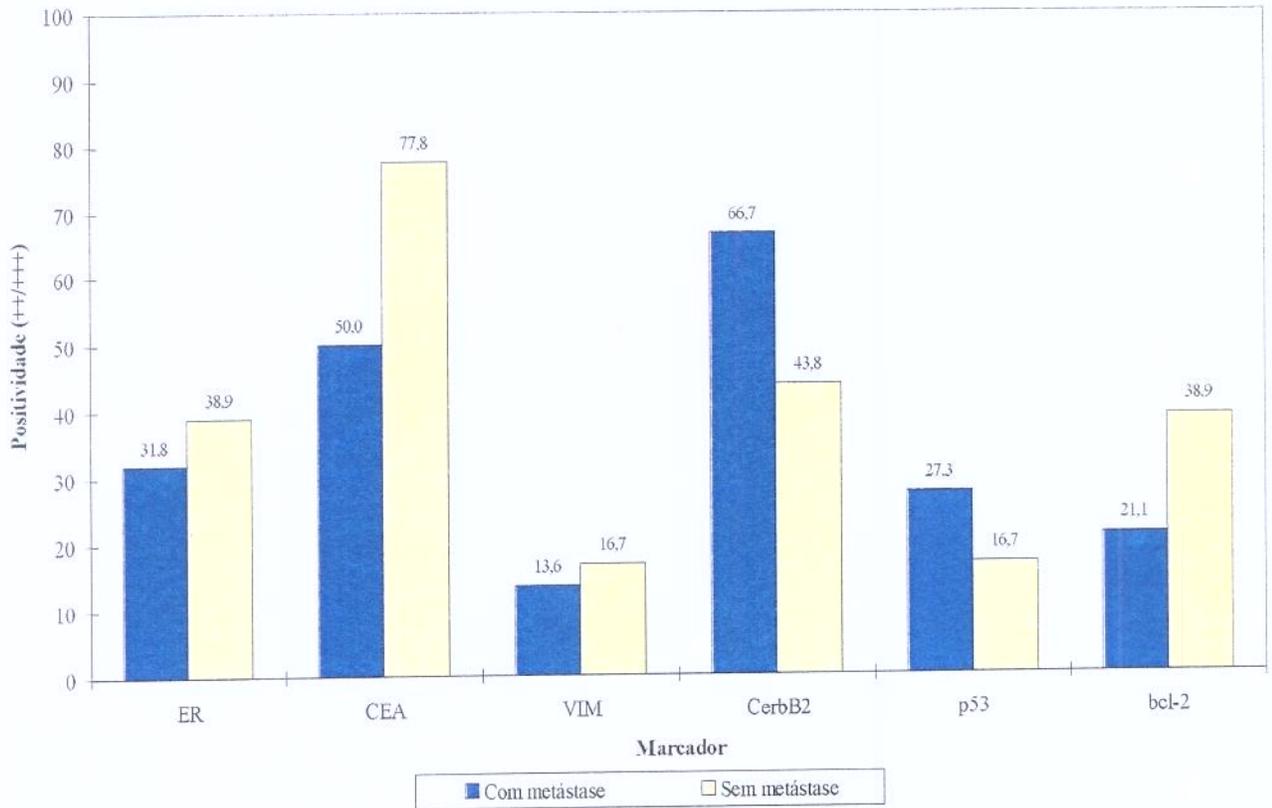


GRÁFICO 05 - Caracterização das pacientes quanto à positividade para os marcadores (+/+++) considerando-se a presença de metástase

DISCUSSÃO

- DISCUSSÃO -

Inúmeros autores têm se dedicado a avaliar o valor prognóstico de alguns marcadores imuno-histoquímicos no carcinoma mamário, visando estabelecer novos parâmetros tão eficazes quanto os critérios clínicos e patológicos já conhecidos.

A evolução dos métodos de imuno-histoquímica, com o surgimento constante de novas técnicas e anticorpos, tem se constituído uma ferramenta bastante valiosa neste sentido, permitindo o conhecimento de aspectos antes obscuros da carcinogênese e levantando novas hipóteses sobre o comportamento desta neoplasia. No entanto a análise dos resultados obtidos precisa ser feita de modo bastante crítico, para que não se atribuam conclusões que extrapolem as limitações do estudo realizado.

O presente trabalho tem como fator limitante preponderante o número de casos que compõe o grupo estudado. De um grupo inicial de 148 pacientes, foi reduzido para apenas 40 casos, os únicos dos quais foi possível obter os blocos de parafina para a realização do estudo imuno-histoquímico. A redução do número de casos limita sobremaneira a análise estatística dos resultados e conseqüentemente as conclusões que se pode obter a partir destes, porém avaliando os nossos resultados em relação aos de diversas publicações constatamos que eles são plenamente comparáveis e demonstram aspectos que merecem ser ressaltados.

Ainda sobre o grupo objeto do presente estudo deve-se salientar que foram todos tratados inicialmente com cirurgia conservadora e radioterapia adjuvante, o que torna o grupo uniforme do ponto de vista de avaliação do seguimento. Em 55% deles havia metástases em linfonodos axilares ao diagnóstico, enquanto 45% não apresentaram linfonodos metastáticos, o que permitiu uma boa avaliação deste importante parâmetro tanto em relação à evolução clínica observada quanto em relação aos marcadores estudados.

O tempo de seguimento clínico médio foi de 83 meses, o que também de acordo com a literatura, pode ser considerado satisfatório.

Podemos ainda ressaltar o fato de, em um mesmo grupo de casos, termos realizado estudos com 6 marcadores, alguns dos quais vêm sendo largamente avaliados em diversas publicações o que nos permite avaliá-los não apenas isoladamente em relação aos aspectos clínicos observados em cada

caso, mas também comparar os resultados entre estes marcadores verificando a hipótese de associações entre eles.

1) ER

No caso do marcador imuno-histoquímico para ER, existe grande aceitação na literatura quanto ao seu valor como indicador preditivo e como parâmetro para a escolha da terapêutica utilizada. Os métodos para sua detecção incluem desde o inicialmente utilizado método bioquímico Dextran coated charcoal (DCC), até o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, primeiro em cortes de tecido congelado (H222), e posteriormente utilizando cortes de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (1D5), o que permitiu uma grande ampliação das possibilidades de utilização deste anticorpo, incluindo os estudos retrospectivos em material de arquivo.

A positividade para ER mostra boa correlação com os parâmetros clínicos classicamente estabelecidos e com critérios histológicos como tipo do tumor, grau de diferenciação celular, presença de elastose, ausência de infiltração linfocitária e ausência de necrose, indicando que os casos ER + teriam melhores resultados com a instituição da terapêutica hormonal (De Lucca et al., 1993).

O tipo de anticorpo utilizado para a detecção deste marcador, assim como a técnica empregada também parecem ter influência nos resultados obtidos. Goulding et al. (1994) compararam resultados obtidos com o anticorpo utilizado em cortes congelados (H222) e com anticorpo para cortes fixados em formalina e incluídos em parafina (ER-1D5), observando que havia correlação dos resultados, porém a utilização do 1D5 acarretava intensidade e percentual de positividade maiores. Os autores defendem ainda a utilização do forno de microondas para recuperação antigênica como forma de associar facilidade e rapidez à reação, além de melhorar a coloração obtida devido à quebra de ligações protéicas cruzadas. Este procedimento foi utilizado em nosso trabalho, com obtenção de resultados bastante satisfatórios.

Ainda sobre a técnica utilizada para detecção do ER, Battifora et al. (1989) utilizaram 160 casos de carcinoma mamário para comparar os resultados entre o método bioquímico e o método imuno-histoquímico em tecido fixado em formalina e incluído em parafina e constataram que este último procedimento, quando adequadamente realizado, pode ser um padrão

ouro melhor do que o método bioquímico, substituído perfeitamente. Recomendam ainda o uso do marcador vimentina (clone V9) com controle da preservação antigênica tecidual, o que evitaria o risco de casos falso-negativos. Concluído o estudo, os autores ressaltaram que o método imunohistoquímico oferece vantagens ainda por ser menos complexo e de custo reduzido em relação ao bioquímico, além de permitir a visualização das células tumorais e poder ser aplicado a qualquer momento, mesmo em pequenos fragmentos de tecido.

Mascarel et al. (1995) não observaram valor prognóstico independente deste marcador. Steblings et al. (1989) concluíram que os níveis de ER tendem a diminuir com a progressão da doença, e que os casos com altos níveis ER respondem melhor à terapêutica endócrina. Robertson et al. (1994) no entanto, estudando 60 casos de tumor localmente avançado (> 5cm de diâmetro) observaram que o ER nos estádios I e II perde seu valor prognóstico isolado quando comparado ao grau histológico, porém no estágio III os fatores têm valor isoladamente. Mc Guire et al. (1982) constataram que os casos ER + têm risco menor de recorrência, e que uma avaliação quantitativa da positividade aumenta a chance de selecionar adequadamente os casos que se beneficiariam da terapêutica endócrina, pois quanto maior o índice de positividade da reação, melhores resultados obtidos. Gaskell et al. (1989) corroboraram com esta opinião em seu trabalho. Chevallier et al. (1988) não observaram valor prognóstico do ER nas pacientes pré-menopausa, enquanto que nas pós-menopausa o seu valor parece ser maior. Howat et al. (1983) não constataram nenhum valor do ER no que se refere ao prognóstico. Veronese et al. (1995), utilizando um anticorpo monoclonal para ER (1D5) em 257 casos, observaram o valor prognóstico deste marcador apenas nos casos tratados com Tamoxifen, concluindo que sua utilização tem valor preditivo para selecionar pacientes que se beneficiaram da terapêutica hormonal. Rich et al. (1978) observaram que as mulheres pré-menopausa apresentavam melhor percentual de positividade para o ER, porém a resposta à terapêutica hormonal apresentava índices semelhantes aos do grupo pós-menopausa. O percentual de casos ER positivo é idêntico nos casos com ou sem metástases axilares; a positividade para o ER indicou maior intervalo livre da doença, independente do status linfonodal, e que os casos ER positivos responderam melhor ao tratamento hormonal.

Em nosso grupo-alvo, o índice de positividade para este marcador foi de 35,0%, sendo que em 30% a intensidade da positividade foi considerada alta (+++), o que segundo Goulding et al. (1994) pode ser atribuído em parte ao anticorpo (1D5) e à técnica utilizados. Em relação ao estadiamento, observamos o maior índice de positividade nos casos em estágio II (41,7%) e o menor nos casos em estágio III (20,0%). A presença ou não de metástases parece não ter relação com a resposta ao marcador, pois não houve diferença estatisticamente significativa em relação à positividade nos casos com e sem metástases ao diagnóstico, o que está em concordância com alguns dos dados colhidos na literatura (Rich et al., 1978), embora tenhamos observado maior número de casos positivos no grupo de pacientes sem metástases ao diagnóstico.

O valor prognóstico deste marcador não foi constatado em nosso trabalho, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade observada nos casos que apresentaram recidiva (31,3%) e aqueles que evoluíram sem novas evidências da doença (37,5%).

A princípio, este fato poderia ser atribuído ao pequeno número de casos que compõem o grupo estudado, no entanto ele é compatível com as conclusões de outros trabalhos publicados (Chevalier et al. 1989, Veronese et al. 1995, De Luca et al., 1993, Mascarel et al., 1995) que utilizaram séries iguais ou maiores de casos e chegaram a constatações semelhantes, o que nos leva a crer que sejam bastante razoáveis as conclusões de Veronese et al. (1995), de que o ER seria um importante marcador apenas de valor preditivo, que teria um importante papel no sentido de selecionar aqueles casos que se beneficiariam da terapêutica hormonal.

A heterogeneidade dos resultados descritos na literatura em relação ao valor prognóstico deste marcador tem sido constantemente explicada pela diversidade dos anticorpos e técnicas utilizados, porém há trabalhos comparando resultados obtidos através de métodos bioquímicos e imunohistoquímicos que apresentaram grande equivalência destes e mesmo assim não ratificaram o valor prognóstico do ER (Mascarel et al., 1995), indicando que independente do método utilizado, é de fato plausível que o ER não tenha realmente o valor prognóstico absoluto que lhe foi atribuído de início. É preciso ressaltar no entanto que não estamos deste modo contra-indicando a sua utilização, apenas refletindo sobre o valor de sua interpretação, que ao nosso ver tem um significado menos amplo do que se pensava, restringindo-se

a selecionar casos que apresentariam melhor resposta a um tipo específico de tratamento.

A avaliação do valor preditivo deste marcador em relação à terapêutica hormonal não está incluída nos objetivos deste estudo, no entanto esta parece ser a maior aplicação do ER nos casos de carcinoma mamário.

2) VIMENTINA

A vimentina, inicialmente reconhecida exclusivamente como um marcador para células mesenquimais, começou a ter sua positividade observada em células do carcinoma mamário em 1987, por Azumi & Battifora Gould et al.(1990), estudando a expressão da vimentina em tecido mamário normal, hiperplásico e neoplásico, observaram que a frequência da sua positividade era bem mais elevada no epitélio hiperplásico ou neoplásico do que no normal. Esta expressão pode estar associada a negatividade para o receptor de estrógeno, indicando uma possível associação da vimentina com um comportamento clínico agressivo. Cattoretti et al.(1988) constataram evidências de uma relação inversa entre marcadores como vimentina, ER e p53. Domagala et al.(1990) estudaram a reatividade para vimentina e o marcador de proliferação Ki-67 em 90 casos de carcinoma mamário, observando forte correlação inversa entre a positividade para este marcador e o grau histológico do tumor, com maior índice de positividade no grau histológico III. A positividade para vimentina predominava em casos ER negativos, com fração de crescimento elevada, sugerindo que sua expressão indique um favorecimento da replicação destas células tumorais, que relaciona-se a um pior prognóstico no carcinoma mamário. Raymond & Leong(1989) consideraram que a expressão da vimentina pelos carcinomas mamários pode indicar desdiferenciação ou regressão e perda da inibição pelo contato célula- célula, resultando em comportamento mais agressivo. Sugeriram ainda que este marcador pode ter valor prognóstico para o carcinoma ductal invasor, identificando casos de comportamento agressivo independente do status nodal e do grau histológico.

Em nossos casos, a positividade para vimentina foi observada em 17,5% dos casos. Observou-se ainda associação entre este marcador e o grau histológico, quando os casos são agrupados como 0 x +/++/+++, com maior índice de positividade nos casos com grau histológico 3. Observamos ainda a

sua associação com o grau nuclear nos 2 modos de agrupar os casos, com maior número de casos positivos entre aqueles com grau nuclear 2. Em relação ao estadiamento sua positividade variou entre 12,5% (estádio II) e 20,0% (estádio III).

Quanto à evolução clínica apresentada, observou-se que a positividade deste marcador foi maior entre os casos sem novas evidências da doença, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre a positividade para os casos com ou sem recidiva.

Em nosso estudo não houve relação significativa da expressão de vimentina com a presença de metástase axilar, embora tenhamos observado maior índice de positividade para este marcador entre os casos sem metástase axilar ao diagnóstico. Pudemos de fato observar, como descrito por Domagala et al.(1990) um maior índice de positividade nos casos pouco diferenciados (grau histológico III). Constatamos ainda uma forte correlação inversa entre vimentina e ER em nossos casos, com 83,3% dos casos positivos para vimentina apresentando negatividade para ER. No entanto, a correlação com mau prognóstico não foi observada, pois mesmo não havendo diferenças significativas, a positividade para vimentina foi maior nos casos sem novas evidências da doença.

Domagala et al.(1990) sugeriram que a expressão da vimentina pode marcar a passagem do tumor a hormônio-independente, ou seja, a positividade para vimentina surgiria à medida que desapareceria a positividade para o ER e questionaram a possibilidade das células positivas para este marcador pertencerem a clones de células tumorais com maior potencial de crescimento. Pode haver de fato alguma relação entre a expressão destes marcadores mas não é possível sugerir tal afirmativa em nosso grupo visto que a positividade foi vista em um pequeno percentual de casos, embora houvesse associação negativa com o ER. Esta correlação precisaria ser reproduzida em uma série maior de casos e investigada mais profundamente. O valor prognóstico deste marcador, alvo maior do nosso interesse, não foi constatado, assim como a correlação entre positividade para a vimentina e comportamento clínico mais agressivo.

3) CEA

Identificado a princípio como marcador de neoplasia de origem epitelial, o CEA foi posteriormente detectado também em tecidos normais, como no intestino delgado (Isaacson & Judd, 1978). Em casos de carcinoma mamário, sua positividade foi atribuída a maiores índices de sobrevivência (Shousha et al., 1979), e este fato teria uma relação inversamente proporcional à intensidade da reação observada.

Os altos índices de reatividade cruzada observados com a utilização deste marcador talvez expliquem em parte o pouco material disponível na literatura sobre a avaliação do seu valor prognóstico no carcinoma mamário. Segundo Nap et al. (1983), o índice de casos falso-positivos atingiria 40,0%. Kuhajda et al. (1983) também destacaram a grande variação de sua reatividade, no entanto consideraram sua utilidade na distinção entre proliferação epiteliais malignas e benignas. Segundo Isaacson & Judd (1978), o pré-tratamento do tecido com ácido periódico poderia abolir ou diminuir as reações cruzadas do CEA sem alterar a sua especificidade. O uso de antígenos puros e de bons controles negativos também podem contribuir para reações imuno-histoquímicas mais fiéis, mas não há modo de excluir totalmente o risco de reações cruzadas. Em nossos casos procedemos à inibição da peroxidase endógena utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol. Fizemos ainda o bloqueio de reações inespecíficas, tentando evitar que o anticorpo primário fosse unido a outros antígenos teciduais.

Existem algumas evidências de que CEA e ER seriam marcadores tumorais opostos, e de que os casos CEA negativos teriam prognóstico melhor, independente da presença de metástases e do tipo histológico do tumor. Esteban et al. (1994) estudaram o comportamento de uma série de 202 casos de carcinoma mamário nos estádios I e II em relação aos marcadores CEA e ER, e observaram que a estratificação das pacientes baseada na expressão do CEA identifica 2 grupos de risco distintos. Os casos CEA e ER negativos têm um risco 3 vezes maior de recorrência do que aqueles ER positivos/CEA negativos, e risco de óbito cerca de 5,3 vezes maior. Dentre os casos ER negativos há um risco maior de óbito para aqueles cujo CEA também é negativo. Os autores concluíram seu estudo afirmando que a associação destes marcadores tem valor estatístico nos tumores em estágio I e II, identificando o subgrupo com maior risco de recidiva e óbito, e que a

associação de 2 ou mais parâmetros de valor preditivo pode ser de grande valor, complementando os parâmetros classicamente estabelecidos.

No presente estudo a positividade obtida para o CEA foi de 60,0%, com maior índice encontrado nos casos em estágio II (70,8%). Houve associação estatisticamente significativa deste marcador com o grau nuclear quando os casos foram agrupados como 0/+ x ++/+++, com maior número de casos positivos entre os casos de grau nuclear 2. Quando comparamos os resultados obtidos com este marcador com a evolução clínica apresentada, não observamos associação estatisticamente significativa, embora o índice de positividade tenha atingido 79,2% entre os casos sem novas evidências da doença, e 37,5% no grupo onde houve recorrência.

Observou-se ainda uma tendência de relação deste marcador com a presença ou não de metástases, verificando-se uma maior positividade no grupo de mulheres que não apresentavam metástases ao diagnóstico (77,8%)

Agrupando-se os casos de acordo com os resultados obtidos para CEA e ER, vemos que os casos ER-/CEA- representam 30,0% do total, sendo que 50% deles não apresentaram novas evidências da doença e 50,0% apresentaram recorrência. Portanto a associação dos resultados obtidos com estes dois marcadores em nosso estudo não adicionou nenhuma informação no sentido de identificar um subgrupo com maior risco de recidiva. O CEA não mostrou valor prognóstico isoladamente nem associado ao ER, no entanto seus maiores índices de positividade ocorrem nos grupos sem novas evidências da doença e sem metástases ao diagnóstico, o que pode ser considerado surpreendente, uma vez que no pequeno número de publicações que avaliam o CEA em relação ao comportamento do carcinoma mamário, sua expressão está geralmente associada a mau prognóstico.

4) p53

A expressão do p53 está mais frequentemente associada a tumores com pior evolução, histologicamente pouco diferenciados, geralmente ER negativos (Barnes et al., 1990; Cattoretti et al., 1988; Haerslev & Jacobsen, 1995). Barbareschi et al.(1992) observaram associação do p53 com alto índice mitótico e com aumento de tamanho do tumor, sugerindo que sua expressão associa-se a um comportamento mais agressivo. Poller et al.(1993), estudando casos de carcinoma in situ e casos de carcinoma ductal invasor, constataram a

associação da expressão do p53 com negatividade para ER e observaram que a positividade para o p53 em casos de carcinoma in situ parece estar restrita a casos do tipo comedocarcinoma. A expressão do p53 nos carcinomas in situ sugere a presença de mutações deste gene em fases iniciais da doença, que são mantidas ao longo da progressão tumoral, levando a uma expansão clonal do tumor in situ, que evoluiria para doença invasiva.

Em nosso estudo a positividade para o marcador p53 é observada em 20,6% dos casos, com o maior índice ocorrendo nos casos em estágio II (25,0%). Em relação ao seguimento clínico, não foram observadas diferenças significativas entre os casos com e sem recidiva, embora a positividade para o p53 tenha sido mais freqüente nos casos com recidiva (31,3%). A presença de metástases axilares também não teve influência significativa na expressão deste marcador, no entanto o índice de positividade foi maior nos casos com presença de metástases ao diagnóstico (27,3%).

A associação inversa entre p53 e ER não foi observada em nossos casos. Dos 26 tumores ER negativos, apenas 5 (19,2%) apresentaram positividade para o p53.

Em nosso estudo não foi possível demonstrar associação p53 com outros critérios como grau histológico, presença de metástases e negatividade para o ER. Também não foi observado valor prognóstico independente deste marcador, embora tenha se delineado uma tendência de correlação da expressão do p53 com pior prognóstico.

Nossos achados podem ser comparados aos de Barnes et al.(1990) em termos de prognóstico, com associação do p53 a uma evolução clínica desfavorável, e aos de Pietiläinen et al.(1995), para quem o estudo do p53 não forneceu informações adicionais aos fatores prognósticos já estabelecidos.

Barbareschi (1996), analisando os resultados obtidos em 37 trabalhos estudando o valor prognóstico do p53, concluiu que o valor prognóstico e preditivo da expressão p53 ainda não está bem estabelecido, e que é prematura a utilização deste marcador para definição do tipo de tratamento a ser instituído em casos individuais. O autor ponderou ainda que entre as diversas publicações há grande variação quanto ao número de casos estudados, tempo de seguimento e distribuição de casos com e sem metástases axilares, além do uso de diferentes técnicas imuno-histoquímicas.

Linden et al.(1994) observaram que os vários anticorpos utilizados para detecção do p53 diferem quanto ao epítipo detectado, o que acarreta variação

dos resultados obtidos, porém salientaram que o uso de um anticorpo isoladamente é mais indicado do que o uso de coquetéis, que a pré-digestão enzimática resolve o problema da imunorreatividade heterogênea e que o uso de microondas para recuperação antigênica melhora as reações.

A adição destas medidas técnicas recomendadas pela literatura nos faz considerar os resultados obtidos no presente estudo altamente confiáveis, embora não estejam em concordância com alguns autores que correlacionaram o p53 a diversos outros parâmetros, e estabeleceram o valor prognóstico deste marcador. A importância da utilização deste marcador não foi estatisticamente confirmada em nosso estudo, apesar da sua expressão ser mais frequentemente observada nos casos com evolução desfavorável.

5) C-erbB-2

A superexpressão do C-erbB-2 é observada em média em 25,0% dos carcinomas ductais invasivos e pode estar relacionada a um potencial metastático elevado, por estimulação do crescimento e da mortalidade celular (De Potter & Schelfhout, 1995). A associação entre a expressão deste marcador e um pior prognóstico foi constatada por alguns autores (Lovekin et al., 1991; Wright et al., 1989; Barbareschi et al., 1992), porém esta associação foi considerada de valor secundário quando comparada a indicadores clássicos de prognóstico (número de linfonodos com metástases, tamanho do tumor, grau histológico).

Wright et al. (1989) destacaram que o estudo do C-erb-B2 em um pequeno grupo de casos pode ter o valor prognóstico reduzido, mas que os casos positivos devem mostrar uma tendência a menores índices de sobrevida.

No presente estudo, a positividade observada para o C-erbB-2 atingiu 55,9%, índice bastante elevado se considerarmos a média de positividade de 25,0% observada em outras publicações. Houve associação significativa deste marcador com o grau histológico, quando os casos foram agrupados como 0/+ x ++/+++ , com maior número de casos positivos entre aqueles com grau histológico 2. Em relação ao estadiamento da doença observa-se um aumento da positividade à medida que aumenta o estadiamento, com 20,0% de positividade no estágio I e 85,7% de casos positivos no estágio III. Em relação à evolução clínica observada, embora não haja diferença significativa, observou-se uma tendência de associação, com 63,6% dos casos positivos

para o C-erb-B2 evoluindo sem recidiva, enquanto 41,7% deles apresentaram recorrência da doença ($p= 0,09$). A presença de metástases axilares não mostrou influência significativa na expressão deste marcador, porém a maioria dos casos positivos pertence ao grupo de mulheres com metástases (66,7%).

Os nossos resultados estão em concordância com De Potter & Schelfhout (1995), para quem a extensão da doença pareceu ser maior nos casos C-erbB-2 positivos, e com Lovekin et al.(1991), que observaram uma menor prevalência da positividade deste marcador nos casos sem metástases axilares. Estes autores, embora tenham confirmado o valor prognóstico do C-erbB-2, consideraram que este valor é limitado, e que talvez a sua aplicação clínica seja em combinação com outros marcadores. Wright et al.(1989) foram mais além e demonstraram que a expressão do C-erbB-2 mostrou valor preditivo de pior prognóstico, inclusive entre os casos ER positivos, ou seja, em um grupo considerado de prognóstico mais favorável, a positividade para o C-erbB-2 selecionaria casos de comportamento mais agressivo.

Procuramos em nosso casos ER positivos aqueles que apresentaram positividade também para o marcador C-erbB-2 e encontramos oito casos ER positivo/C-erbB-2 positivo. Comparando a evolução clínica apresentada por este grupo, verificamos que 7 deles (87,5%) evoluíram sem novas evidências da doença, enquanto apenas 1 (12,5%) apresentou recorrência da doença, indo posteriormente a óbito. Portanto em nossos casos a correlação entre C-erbB-2 e mau prognóstico não foi de nenhum modo estabelecida.

Barbareschi et al.(1992) referiram que a expressão do C-erbB-2 parecia estar relacionada a mau prognóstico, indicando redução da sobrevida total, mas sem relação com o intervalo livre da doença, o que pode justificar os nossos achados, uma vez que o evento valorizado em nossa evolução clínica é o surgimento da nova manifestação da doença (recidiva), não necessariamente levando ao óbito.

Dawkins et al.(1993), analisando o papel do estudo do C-erbB-2 no carcinoma mamário observaram que a avaliação deste marcador tem sido realizada sobretudo por métodos imuno-histoquímicos e que, em um total de 44 trabalhos, apenas 21 constataram associação significativa entre a sua expressão e o prognóstico. Concluíram que os resultados obtidos são ainda conflitantes e que seu valor prognóstico permanece controverso. Neste sentido, consideramos que nosso estudo não traz informações adicionais, visto que embora tenhamos observado uma tendência de associação da expressão

deste marcador com a evolução da doença, nossos dados não são estatisticamente significativos.

6) Bcl-2

Dos marcadores incluídos neste estudo o Bcl-2 é provavelmente o que reúne menor número de publicações sobre o seu papel no desenvolvimento do carcinoma mamário. Sabe-se que este oncogene pertence à categoria dos reguladores da morte celular programada (apoptose) e que sua expressão está relacionada à capacidade de proliferação e diferenciação (Nathan et al., 1994).

No que se refere à técnica para sua detecção imuno-histoquímica em material fixado em formalina e incluído em parafina, Umemura et al.(1995) concluíram que o melhor método para recuperação antigênica utiliza aquecimento em água deionizada. Em nossos casos, a recuperação antigênica foi realizada com aquecimento em autoclave com água destilada, durante um intervalo de 5 minutos.

O índice de positividade para o Bcl-2 atingiu 29,7% dos casos avaliados no presente estudo. Em relação ao estadiamento da doença, observamos que a positividade ocorreu em proporções semelhantes nos casos em estágio I e II (33,3% e 37,5% respectivamente), porém todos os casos em estágio III mostraram-se negativos para este marcador. Quando avaliamos a expressão deste marcador em relação à evolução clínica apresentada, não constatamos diferenças significativas, no entanto, a positividade é maior entre os casos com recidiva da doença (35,7%), do que naqueles onde não houve manifestações (26,1%). Também não houve diferença significativa quanto à presença de metástases axilares, sendo maior o índice de casos positivos entre o grupo de mulheres sem metástases ao diagnóstico (38,9%).

Sierra et al.(1995), estudando um população de 124 casos de carcinoma ductal invasor, observaram maior freqüência de positividade nos casos com metástase axilar, e que esta tendência à presença de metástases aumentava proporcionalmente ao percentual de células positivas para o Bcl-2, sugerindo uma associação bastante significativa, que parece indicar que o Bcl-2 aumenta a sobrevivência celular, favorecendo a progressão tumoral. Hurlimann et al.(1995) não observaram correlação entre a positividade para o Bcl-2 e a presença de metástases axilares. Também não houve diferença significativa em relação à sobrevivência. Foi observada uma correlação inversa entre a expressão de Bcl-2 e

p53. A positividade para Bcl-2 mostrou tendência a indicar bom prognóstico, o que para os autores foi considerado um resultado inesperado, uma vez que a expressão do Bcl-2 significa aumento da sobrevivência da célula tumoral, que deveria refletir pior prognóstico.

Em nossos casos não observamos nenhuma associação entre a expressão de p53 e Bcl-2.

Quanto ao significado da expressão do Bcl-2 em relação ao prognóstico do carcinoma mamário, parece não haver uma definição mais nítida sobre o seu papel na evolução da doença. Segundo Korsmeyer(1992), o oncogene Bcl-2 estaria mais associado ao bloqueio da morte celular do que propriamente à promoção da proliferação celular. Talvez a alteração relacionada a genes desta categoria seja um evento primário do desenvolvimento neoplásico, ou seja, o prolongamento da sobrevivência celular apenas permitiria maiores chances de adquirir defeitos adicionais em genes promotores de crescimento e proliferação (categoria II). Não haveria portanto uma influência direta do Bcl-2 sobre o prognóstico da doença.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES -

- Nenhum dos marcadores imuno-histoquímicos avaliados apresentou resultados estatisticamente significativos em relação ao prognóstico, exceto o C-erb-B2, que em nosso estudo mostrou uma tendência de associação entre sua positividade e um melhor prognóstico ($p= 0,009$).
- Não foi constatada nenhuma associação significativa entre a expressão dos marcadores estudados, no entanto, pudemos observar alguns aspectos curiosos, como a tendência de relação inversa entre a expressão de vimentina e ER ($p= 0,05$), porém sem reflexos no que se refere à evolução da doença, visto que o maior índice de positividade para vimentina ocorreu entre os casos sem novas evidências da doença.
- Embora não tenha sido estatisticamente demonstrado, a expressão do marcador p53 confirmou a tendência observada na literatura de associação com pior prognóstico.
- Com os casos agrupados como 0/+ versus ++/+++, observamos uma associação significativa entre a expressão da vimentina e o grau nuclear 1 ($p= 0,05$), entre a expressão do C-erbB-2 e os graus histológicos II e III ($p= 0,02$), e entre a expressão do CEA e a ausência de metástases ($p\sim 0,04$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXIEV, B.A.; VALKOV, J.N.; POPOV, A.A.; MARINOV, V.S. - Immunocytochemical detection of carcinoembryonic antigen in fine-needle aspirates from patients with diverse breast diseases. *Diagn. Cytopathol.*, 9(4) : 377-382, 1993
- ALEXIEVA - FIGUSCH, J.; VAN PUTTEN, W.L.J.; BLANKENSTEIN, M. A. et al. - The prognostic value and relationships of patient characteristics, estrogen and progesterin receptors, and site of relapse in primary breast cancer. *Cancer*, 61 : 758- 768, 1988.
- ANDERSEN, J. & POULSEN, H.S. - Immunohistochemical ER determination in paraffin embedded tissue. *Cancer*, 64 : 1901- 1908, 1989.
- ANDRY, G.; SUCIN, S.; PRATOLA, D. et al. - Relation between estrogen receptor concentration and clinical and histological factors : Their relative prognostic importance after radical mastectomy for primary breast cancer. *Eur. J. Clin. Oncol.*, 25 : 319- 329, 1989.
- AZUMI, N. & BATTIFORA, H. - The distribution of vimentin and keratin in epithelial and non- epithelial neoplasms. *J. Clin. Pathol.*, 88 : 286- 296, 1987.

- BASELGA, J.; TRIPATHY, D.; MENDELSON, J.; BAUGHMAN, S.; BENZ, C. C.; DANTIS, L.SKLARIN, N. T.; SEIDMAN, A. D.; HUDIS, C. A.; MOORE, J.; ROSEN, P. P.; TWADDELL, T.; HENDERSON, I. C. AND NORTON, L. - Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (herceptin) in patients with HER2/neu - overexpressing metastatic breast cancer.
Semin. Oncol. 26 (suppl. 12): 78- 83, 1999.
- BARBARESCHI, M. - Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas - A review of the literature involving over 9.000 patients.
Applied Immunohistochemistry, 4(2) : 106- 116, 1996.
- BARBARESCHI, M.; CAFFO, O.; VERONESE, S. LEEK, R. D.; FINA, P.; FOX, S.; BONZANINI, M.; GIRLANDO, S.; MORELLI, R.; ECCHER, C. PEZZELLA, F.; DOGLIONI, C.; DALLA PALMA, P. and HARRIS, A.- Bcl-2 and p53 expression in node- negative breast carcinoma: a study with long- term follow-up.
Hum. Pathol. 27: 1149- 1155, 1996
- BARBARESCHI, M.; LEONARDI, E.; MAURI, F.A.; SERIO, G. & DALLA PALMA, P. - P53 and CerbB-2 protein expression in breast carcinomas- An immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferation markers, and clinical stage in human breast cancer.
Am. J. Clin. Pathol., 98 : 408- 418, 1992.
- BARNES, R. & MASOOD, S. - Potential value of hormone receptor assay in carcinoma in situ of breast.
Am. J. Clin. Pathol., 94 : 533- 537, 1990

- BARNES, D.M.; DUBLIN, E.A.; FISHER, C.J., LEVISON, D.A. and MILLIS, R.R. - Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma :An important new independent indicator of prognosis ?
Human Pathology, 24 : 469- 476, 1993.
- BARRY, J. D.; KOCH, T. J.; COHEN, C. et al. - Correlation of immunohistochemical markers with patient prognosis in breast carcinoma : A quantitative study.
Am. J. Clin. Pathol., 82 : 582- 585, 1984.
- BATTIFORA, H. - Immunocytochemistry of hormone receptors in routinely processed tissues- The new gold standard.
Appl. Immunohistochem.,2 :143- 145,1994
- BATTIFORA, H.; MEHTA, P.; AHN, C. & ESTEBAN, J.M. - Estrogen receptor immunohistochemical assay in paraffin- embedded tissue- A better gold- standard ?
- BERARDO, M. D.; ELLEDGE, R. M.; DE MOOR, C.; CLARK, G. M.; OSBORNE, C. K.; ALLRED, D. C. - Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma.
Cancer, 82: 1296- 302, 1998.
- BLAMEY, R. - Does biological understanding influence surgical practice ?
Br. J. Cancer, 60 :271- 279, 1989.
- BLOOM, H.J.G. - Further studies on prognosis of breast carcinomas.
Br. J. Cancer, 4 : 347- 367,1950.

- BLOOM, H.J.G. & RICHARDSON, W.W. - Histological grading and prognosis in breast cancer.
Br. J. Cancer, 11 : 359 - 377, 1957.

- BUR, M.E.; ZIMAROWSKI, M.J.; SCHNITT,S.J. et al. - Estrogen receptor immunocytochemistry in carcinoma in situ of the breast.
Cancer, 69 : 1174- 1181, 1992.

- BUTLER,J.A.; BRETSKY,S.; MENENDEZ-BOTET,C. & KINNE,D.W. - Estrogen- receptor protein of breast cancer as a predictor of recurrence.
Cancer, 55 : 1178- 1181, 1985.

- CARTER, C. L.; ALLEN, C. & HENSON, D. E. - Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases.
Cancer, 63 : 181- 187, 1989.

- CATTORETTI, G.; ANDREOLA, S.; CLEMENTE, C. et al. - Vimentin and p53 expression on epidermal growth factor receptor - positive, oestrogen receptor- negative breast carcinomas.
Br. J. Cancer, 57 : 353- 357, 1988

- CATTORETTI, G.; RILKE, F.; ANDREOLA, S.; D'AMATO, L. & DELIA, D. - P53 expression in breast cancer.
Int. J. Cancer, 41: 178- 183, 1988.

- CHENG, L.; BINDER, S.W.; FU, Y.S. & LEWIN, K.J. - Methods in laboratory investigation - Demonstration of estrogen receptors by monoclonal antibody in formalin- fixed breast tumors.
Lab. Invest., 58 : 346- 353, 1988
- CHEVALLIER,B.; HEINTZMANN, F.; MOSSERI, V.; DANCE J. P.; BATIST, P.; GRAIC, Y.; BRUNELLE, P. BASWYAN, J. P. - Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in operable breast cancer - Results of a univariate and multivariate analysis.
Cancer, 62 : 2517- 2524, 1988.
- CLARK, G.M. - Do we really need prognostic factors for breast cancer ?
Breast Cancer Res. and Treat., 30 : 117- 126, 1994.
- COX, L.S. & LANE, D.P. - Tumour suppressors, kinases and clamps : How p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage.
BioEssays, 17(6): 501- 508, 1995.
- DAWKINS, H.J.S.; ROBBINS, P.D.; SMITH, K.L.; SARNA, M. et al. - What's new in breast cancer ? Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene C-erbB-2 in prognosis and disease.
Path. Res. Pract., 189 : 1233- 1252, 1993.
- DE LUCA, L. A.; SCHMITT, F. C.; TRAIMAN, P.; OLIVEIRA JR., B. et al. - Considerações sobre o câncer localmente avançado de mama (CLAM) acrescidas de identificação dos receptores de estrogênio usando anticorpos monoclonais.
Rev. Ass. Med. Brasil., 39(1) : 17- 32. 1993.

- DIXON, J. M.; Page, D. L.; ANDERSON, T. J. et al. - Long- term survivors after breast cancer.
Br. J. Surg., 72 : 445- 448, 1985
- DOMAGALA, W.; LASOTA, J.; BARTKOWIAK, J.; WEBER, K. and OSBORN, M. - Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction.
Am. J. Pathol.,136 : 219- 227, 1990.
- LE DOUSSAL,V.; TUBIANA- HULIN, M.; FRIEDMAN, S.; HACENE, K.; SPYRATOS, F. AND BRUNET, M.- Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff- Bloom- Richardson (SBR): An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas.
Cancer, 64: 1914- 1921, 1989.
- ELLIS, G.K. & GOWN, A.M. - New applications of monoclonal antibodies to the diagnosis and prognosis of breast cancer.
Pathol. Ann., 25 (Part2) : 193- 235, 1990
- ELLIS, J. O.; GALEA, M.; BROUGHTON, N. et al. - Pathological prognostic factors in breast cancer II - Histological type : relationship with survival in a large study with long- term follow-up.
Histopathology, 20 : 479- 489, 1992.
- ELSTON, C.W. & ELLIS, J. O. - Pathological prognostic factors in breast cancer I - The value of histological grade in breast cancer : Experience from a large study with long- term follow-up.

- ESTEBAN, J.M.; FELDER, B.; AHN, C.; SIMPSON, J. F.; BATTIFORA, H. and SHIVELY, J. E. - Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Cancer*, 74 : 1575- 1583, 1994.
- ESTEBAN, J.M.; AHN, C.; BATTIFORA, H. & FELDER, B. - Quantitative IMMUNOHISTOCHEMICAL assay for hormonal receptors : Technical aspects and biological significance. *J. Cell. Biochem.*, 19 (Sup.) : 138- 145, 1994.
- FARIA, S.L. & AMALFI, C. - Tratamento conservador do câncer da mama: Resultados de 148 pacientes com 88 meses de seguimento mediano. *J. Bras. Ginec.*, 103 : 63- 66, 1993.
- FARIA, S. L.; LEME, L. H. S. & OLIVEIRA FILHO, J. A. - Câncer da mama -Diagnóstico e tratamento. MEDSI- Ed. Médica e Científica Ltda., 1994.
- FECHNER, R.E. - One century of mammary carcinoma in situ - What have we learned ? *A.J.C.P.*, 100 (6) : 654- 661, 1993.
- FELDMAN, J.G.; PERTSCHUK, L.P.; CARTER, A.C. et al. - Histochemical estrogen binding - An independent predictor of recurrence and survival in stage II breast cancer. *Cancer*, 57 : 911- 916, 1986.

- FENOGLIO- PREISER, C. M.; LISTROM, M. B. & BLUME, P. - The use of immunohistochemistry : Present and future, in Fenoglio- Preiser, C.M.; Wolff, M. & Rilke, F. : Progress in surgical pathology. Field & Wood Med. Publishers, USA, 1992 (Vol. XII) - pp1- 30.
- FISHER, B.; BAUER, M.; WICKERHAM, L.; REDMOND, C.K. AND FISHER, E.R. - Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. Cancer, 52 : 1551- 1557, 1983.
- FISHER, B.; REDMOND, C.; FISHER, E.R.; CAPLAN, R. et al. - 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- 1087, 1988.
- FISHER, E.R.; SASS, R.; FISHER, B. et al. - Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 6) I - Intraductal carcinoma (DCIS). Cancer, 57 : 197- 208, 1986.
- FISHER, E.R.; REDMOND, C.; FISHER, B. et al. - Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP)- Prognostic discriminants for 8-years survival for node-negative invasive breast cancer patients. Cancer, 65 : 2121- 2128, 1990.

- GARNE, J.P.; ASPEGREN, K.; LINELL, F. et al. - Primary prognostic factors in invasive breast cancer with special reference to ductal carcinoma and histologic malignancy grade.
Cancer, 73(5) : 1438- 1448, 1994
- GASKELL, D.J.; SANGSTERL, K.; HAWKINS, R.A.; CHETTY, U. AND FORREST, A. P. M. - Relation between immunocytochemical estimation of oestrogen receptor in elderly patients with primary breast cancer and response to Tamoxifen.
The Lancet, May 13, 1989.
- GERDES, J.; PICKARTZ, H.; BROTHERTON, J. et al. - Growth factors and estrogen receptors in human breast cancers as determined in situ with monoclonal antibodies.
Am. J. Pathol., 129 : 486- 492, 1987.
- GIARDINA, C.; RICCO, R.; LETTINI, T. et al. - Relation between primary tumor shape and biological behavior in breast cancer.
Tumori, 75 : 117 - 122, 1989.
- GOLD, P. & FREEDMAN, S.O. - Demonstration of tumor- specific antigens in HUMAN colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques.
Tumor specific antigens,
- GOULD, V. E.; KOUKOULIS, G. K.; JANSSON, D. S.; NAGLE, R. B.; FRANKE, W. W. and MOLL, R.- Coexpression patterns of Vimentin and Glial filament protein with cytokeratins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast.
J. Pathol., 137 : 1143- 1155, 1990.

- GOULDING, H.; PINDER, S.; CANNON, P.; PEARSON, D. et al. - A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin- fixed tissue samples.
Hum. Pathol., 26(3) : 291- 294, 1994.

- GRAHAM, D.M.; LONG, J. & LLOYD, R.V. - Detection of estrogen receptor in paraffin - embedded sections of breast carcinoma by immunohistochemistry and in situ hibridization.
Am. J. Surg. Pathol., 15(5) : 475- 485, 1991.

- GUAZZI, A.; BOZZETTI, C.; RIVA, I. et al. - Relationship between estrogen receptor concentration and cytomorphometry in breast cancer.
Cancer, 56 : 1972- 1976, 1985.

- GUSTERSON, B. A.; GELBER, R. D.; GOLDHIRSCH, A.; PRICE, K. N.; SAVE-SODERBORGH, J.; ANBAZHAGAN, R.; STYLES, J.; RUDENSTAM, C-M.; GOLOUH, R.; REED, R.; MARTINEZ-TELLO, F.; TILTMAN, A.; TORHORST, J. GRIGOLATO, P.; BETTELHEIM, R.; NEVILLE, A.M.; BURKI, K.; CASTIGLIONE, M.; COLLINS, J.; LINDTNER, J. and SENN, H. J. - Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer.
J. Clin. Oncol., 10: 1049- 1056, 1992.

- HAAGENSEN; CUSHMAN; DAVIS et al. - Risk and detection of breast carcinoma.
Saunders Company, Philadelphia, 1981.

- HAERSLEV, T. & JACOBSEN, G. K. - An immunohistochemical study of p53 whit correlations to histopathological parameters, c-erbB-2, Proliferating Cell Nuclear Antigen, and prognosis.
Hum. Pathol 26 : 295-301, 1995
- HALDAR, S.; NEGRINI, M.; MONNE, M.; SABBIONI, S. & CROCE, C. M - DOWU - Regulation of Bcl-2 by p53 in breast cancer cels.
Cancer Research 54 : 2095-2097, 1994
- HAWKINS, R. A.; TESDALE, A. L.; KILLEN, M. R.; JACK, WJL, CHETTY, U.; DIXON, J. M.; HULME, M. J; PRESCOTT, R. J.; MCINTYRE, M. A. and MILLER. W. R.- Prospective evaluation of prognostic factors in operable breast cancer.
Br. J. of Cancer, 74: 1469- 1478, 1996.
- HAWKINS, R.A. - Receptors in the management of breast cancer.
Br. J. Hosp. Med., 9 : 160- 164, 1985.
- HELIN, H.J.; HELLE, M.J.; KALLIONIEMI, O.-P. & ISOLA, J.J. - Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinomas.
Cancer, 63 : 1761- 1767, 1989.
- HOWAT, J. M. T.; BARNES, D. M.; MARRIS, M. & SWINDELL, R. - Thes association of cytosol oestrogen and progesterone receptors with histological features of breast cancer and early recurrence of disease.
BR. J. Cancer 47: 629-640, 1983.
- HSU, S.M.; RAINE, L. & FANGER, H. - A comparative study of the peroxidase- antiperoxidase method and avidin- biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies.
Am. J. Clin. Pathol., 75 : 734- 738, 1981.

- HUMPHREY, P. A.; FRANQUEMONT, D. W.; GEARY, W. A.; KERNS, B-J. M.; IGLEHART, J. D. and MARKS, J. R. - Immunodetection of p53 protein in noninvasive epithelial proliferative breast disease. *Applied Immunohistochemistry*, 2(1): 22- 28, 1994

- HURLIMANN, J.; LARRINAGA, B. and VALA, D. L. M. - Bcl-2 protein in invasive ductal breast carcinomas. *Virchows Archives*, 426: 163- 168, 1995.

- ISAACSON, P. & JUDD, M. A. - Immunohistochemistry of carcinoembryonic antigen : Characterisation of cross- reactions with other glycoproteins. *Gut*, 18 : 779- 785, 1977.

- ISAACSON, P. & JUDD, M.A. - Immunohistochemistry of carcinoembryonic antigen in the small intestine. *Cancer*, 42 : 1554- 1559, 1978.

- JOHNSON JR., H.; MASSOD, S.; BELLUCO, C. et al. - Prognostic factors in node negative breast cancer. *Arch. Surg.*, 127 : 1386- 1391, 1992.

- JONAT, W.; MAASS, H. & STEGNER, H. E. - Immunohistochemical measurement of estrogen- receptors in breast cancer tissue samples. *Cancer Res.*, 46 : 4296- 4298,1986.

- KANDARAKI, C.; VENETI, S.; ATHANASSIADES, P. et al. - An immunohistochemical study of actin and CEA in the diagnosis of suspicious breast aspirations.
Acta Cytologica, 37 : 599, 1993.
- KNIGHT, W.A.; LIVINGSTON, R.B.; GREGORY, E.J. & MC GUIRE, W.L. - Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer.
Cancer Res., 37 : 4669- 4671, 1977.
- KORSMEYER, S.J. - Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death.
Blood, 80(4): 879-886, 1992.
- KUHAJDA, F.P.; OFFUT, L.E. AND MENDELSON, G. - The distribution of carcinoembryonic antigen in breast carcinoma- Diagnostic and prognostic implications.
Cancer, 52 : 1257- 1264, 1983.
- KURTZ, J.M.; JACQUEMIER, J.; AMALRIC, R. et al. - Risk factors for breast recurrence in premenopausal and postmenopausal patients with ductal cancers treated by conservation therapy.
Cancer, 65 : 1867- 1878, 1990.
- LEADER, M.; COLLINS, M.; PATEL, J. AND HENRY, K. - Vimentin : An evaluation of its role as a tumour marker.
Histopathology, 11 : 63- 72, 1987.

- LEE, A. K.; ROSEN, P. P.; DE LELLIS, R. A. et al. - Tumour marker expression in breast carcinomas and relationship to prognosis - A immunohistochemical study.
Am. J. Clin. Pathol., 84 : 687- 696, 1985.
- LEONG, A.S.Y. - The expression of Vimentin in epithelial neoplasms, in Fenoglio- Preiser,C.M.; Wolff,M. & Rilke,F. : Progress in surgical pathology.
Field & Wood Med. Publishers, USA, 1992 (Vol. XII), pp 31- 48.
- LINDEN, M.D.; NATHANSON, S.D. AND ZARBO, R.J. - Evaluation of anti- p53 antibody staining- Quality control and technical considerations.
Appl. Immunohist., 2(3): 218- 224, 1994.
- LOVEKIN, C.; ELLIS, J.O.; LOCKER, A.; ROBERTSON, J. F. R. BELL, J.; NICHOLSON, R. GULLICK, W. J.; ELSTON, C. W. and BLAMEY, R. W. - C-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer.
Br. J. Cancer,63: 439- 443, 1991.
- MANSOUR, E.G.; HASTERT, M.; PARK, C.H. et al. - Tissue and plasma carcinoembryonic antigen in early breast cancer - A prognostic factor.
Cancer, 51 : 1243- 1248, 1983.

- MASCAREL, I.; SOUBEYRAN, J.; MACGROGAN, G.; WAFFLART, J.; BONICHON, F.; DURAND, M.; AVRILA., MAURIAC, R.; TROJANI, M. and COINDRE, J. M. - Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in 938 breast carcinomas - Concordance with biochemical assay and prognostic significance.
Appl. Immunohist.,3(4): 222- 231, 1995.
- MAURI, F.A.; VERONESE, S.; TRIGO, B. et al. - ER1D5 and H222 (ER- ICA) antibodies to human estrogen receptor protein in breast carcinomas - Results of a multicentric comparative study.
Appl. Immunohistochem., 2 : 157- 163,1994.
- MCCANN, A.H.; DERVAN, P.A. et al. - Prognostic significance of C-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer.
Cancer Res., 51 : 3296- 3303, 1991.
- MCCARTY JR.K.S.; MILLER, L.S.; COX, E.B. et al. - Estrogen receptor analysis - Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies.
Arch. Pathol. Lab. Med., 109: 716- 721, 1985.
- MCGUIRE, W.L.; OSBORNE, C.K.; CLARK, G.M. AND KNIGHT, W.A. - Steroid hormone receptors and carcinoma of the breast.
Am. J. Physiol.,243(Endocrinol. Metabol. 6): E99- E102, 1982.
- MCGUIRE, W.L.; TANDOM, A.K.; ALLRED, D.C. et al. - Prognosis and treatment decisions in patients with breast cancer without axillary node involvement.
Cancer, 70 : 1775- 1781, 1992.

- MCGUIRE, W.L.; TANDOM, A.K.; ALLRED, O. et al. - How to use prognostic factors in axillary node- negative breast cancer patients. J.N.C.I., 82 (12) : 1006- 1015,1990.

- MOLINA, R.; JO, J.; ZANÓN, G.; FILELLA, X. FARRUS, B.; MUÑOZ, M.; LATRE, M. R.; PAHISA, J.; VELASCO, M.; FERNANDEZ, P.; ESTAPÉ, J. and BALLESTA, M. - Utility of C-erbB-2 in tissue and in serum in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients: comparison with carcinoembryonic antigen and CA 15.3. British Journal of Cancer,74: 1126- 1131, 1996.

- MONTORO, A. F. et al. - Alternativas diagnósticas e terapêuticas no câncer de mama. Edição Bradepal, Coedição CNPq, São Paulo, 1987.

- NAP, M.; KENNING, H.; BURTIN, P. et al. - CEA and NCA in benign and malignant breast tumors. Am. J. Clin. Pathol., 82 : 526- 534, 1984.

- NAP, M.;TEN HOOR, K.A. & FLEUREN, G.- J. - Cross reactivity with normal antigens in commercial anti- CEA sera, used for immunohistology- The need for tissue controls and absorptions. Am. J. Clin. Pathol., 79 : 25- 31, 1983.

- NATHAN, B.; ANBAZHAGAN, R.; CLARKSON, P.; BARTKOVA, J. & GUSTERSON,B. - Expression of Bcl-2 in the developing human fetal and infant breast. Histopathology,24: 73- 76, 1994.

- NOMURA, Y.; MIURA, S.; KOYAMA, H. et al. - Relative effects of steroid hormone receptors on the prognosis of patients with operable breast cancer.
Cancer, 69 : 153- 164, 1992.
- OHRI, A. K.; OHRI, S. K.; HERBERT, A. et al. - The relationship between clinical staging, oestrogen receptor status and silver- binding nucleolar organizer regions (AgNOR) in breast carcinoma.
Eur. J. Surg Oncol., 18 : 103- 107, 1992.
- PAGE, D.L. - Prognosis and breast cancer- Recognition of lethal and favorable prognostic types.
Am. J. Surg. Pathol., 15(4) : 334- 349, 1991.
- PAGE, D.L. & ANDERSON, T.J. - Diagnostic histopathology of the breast
3rd. Ed., Churchill Livingstone, New York, 1989.
- PIETILÄINEN, T.; LIPPONEN, P.; AALTOMAA, S.; ESKELINEN, M.; KOSWA, V. M. and SYRJÄNEN, K. - Expression of p53 protein has no independent prognostic value in breast cancer.
Journal of Pathology, 177: 225- 232, 1995.
- POLLER, D. N.; HUTCHINGS, C. E.; GALEA, M.; BELL, J. A.; NICHOLSON, R. A.; ELSTON, C.W.; BLAMEY, R. W. AND ELLIS, I. O. - P53 protein expression in human breast carcinoma: Relationship to expression of epidermal growth factor receptor, CerbB-2 protein overexpression, and oestrogen receptor.
Br. J. Cancer, 66: 583- 588, 1992.

- POLLER, D. N.; ROBERTS, E. C.; BELL, J. A.; ELSTON, C. W.; BLAMEY, R. W. and ELLIS, J. O. - P53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: Relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and C-erbB-2 protein.
Human Pathology,24: 463- 468, 1993.
- DE POTTER, C.R. & SCHELFHOUT, A.M. - The neu- protein and breast cancer.
Virchows Archiv.,426: 107- 11, 1995.
- POULSEN, H.S.; OZZELLO, L.; KING, W.J. & GREENE, G.L. - The use of monoclonal antibodies to estrogen receptors (ER) for immunoperoxidase detection of ER in paraffin sections of human breast cancer tissue.
J. Histochem. Citochem., 33 : 87- 92, 1985.
- PUJOL, P.; HILSENBECK, S.G.; CHAMNESSG.C. & ELLEDGE, R.M. - Rising level of estrogen receptor in breast cancer over two decades.
Cancer, 74 : 1611- 1616, 1994.
- QUERZOLI, P.; FERRETTI, S.; MARZOLA, A.; TASSINARI, D.; INDELL, M.; MARCHETTI, E.; FABRIS, G. AND NENCI, I. - Clinical usefulness of estrogen receptor immunocytochemistry in human breast cancer.
Tumori, 78 : 287- 290, 1992.
- RAVDIN, P. M. - Should HER2 status be routinely measured for all breast cancer patients ?
Semin. Oncol, 26 (suppl. 12): 117- 123, 1999.

- RAYMOND, W. A. & LEONG, A. S. Y. - Vimentin - A new prognostic parameter in breast carcinoma ?
J. Pathol., 158 : 107- 114, 1989.

- RAYMOND, W. A. & LEONG, A. S. - Y. - Co-expression of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in benign and neoplastic breast epithelium.
J. Pathol.,157 : 299- 306, 1989.

- RICH, M.A.; FURMANSKI, P.; AND BROOKS, S.C. & the Breast Cancer Prognostic Study Surgery and Pathology Associates. - Prognostic value of estrogen receptor determinations in patients with breast cancer.
Cancer Res.,38: 4296- 4298, 1978.

- ROBERTSON, J.F.R.; ELLIS, I.O.; PEARSON, D.; ELSTON, C. W.; NICHOLSON, R. I.; BLAMEY, R. W. - Biological factors of prognostic significance in locally advanced breast cancer.
Breast Cancer Res. Treat.,29 : 259- 264, 1994.

- ROSEN, P. P. - Rosen's Breast Pathology
Lippincott - Raven Publishers; Philadelphia, 1996

- RUBIN,E. & FARBER,J. - Pathology, 1ª Edição, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1988.

- RUDER, A.M.; LUBIN, F.; WAX, Y. et al. - Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients - Epidemiologic characteristics and survival differences.
Cancer, 64 : 196- 202, 1989.
- SCHMITT, F.C.L. & ANDRADE, L. - Spectrum of carcinoembryonic antigen immunoreactivity from isolated ductal hiperplasias to atypical hiperplasias associated with infiltrating ductal breast cancer.
J. Clin. Pathol., 47 : , 1994.
- SCHWARTZ, M.R. - Carcinoembryonic antigen and estrogen- receptor - A prognostic duo in breast cancer ?
Cancer, 74 : 1519- 1522, 1994.
- SHAK, S. - Overview of the trastuzumab (herceptin) anti HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2 - overexpressing metastatic breast cancer.
Semin. Oncol., 26 (suppl. 12): 71- 77, 1999.
- SHEAHAN, K.; O'BRIEN, M.J.; BURKE, B. et al. - Differential reactivities of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA related monoclonal and polyclonal antibodies in common epithelial malignancies.
Am. J. Clin. Pathol., 94 : 157- 164, 1990.

- SHI, S.R.; CHAIWUN, B.; YOUNG, L. et al. - Antigen retrieval using pH 3,5 glycine- HCl buffer or urea solution for immunohistochemical localization of Ki-67.
Biotechnic & Histochemistry, 69 : 213- 215, 1994.
- SHINTAKU, J. P. & SAIB, J. W. - Detection of ER monoclonal antibodies in routinely processed formalin- fixed paraffin sections of breast carcinomas.
AJCP, 87 : 161- 167, 1987.
- SHOUSHA, S.; LYSIOTIS, T.; GODFREY, V.M. & Schener, P.J. - Carcinoembryonic antigen in breast cancer tissue : A useful prognostic indicator.
Br. Med. J., 1 : 777- 779, 1979.
- SIERRA, A.; LLOVERAS, B.; CASTELLSAGUÉ, X.; MORENO, L. GARCIA-RAMIREZ, M. and FABRA, A. - Bcl-2 expression is associated with lymphonode metastasis in human ductal breast carcinoma.
Int. J. Cancer, 60: 54- 60, 1995.
- SILVESTRINI, R.; BENINI, E.; VENERONI, S.; DAIDONE, M. G.; TOMASIC, G.; SQUICCIARINI, P. and SALVADORI, B. - P53 and bcl- 2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients.
J. Clin. Oncol., 14: 1604- 1610, 1996.
- SKOOG, L.; HUMLA, S.; AXELSSON, M. et al. - Estrogen receptor levels and survival of breast cancer patients- A study on patients participating in randomized trials of adjuvant therapy.
Acta Oncologica, 26 : 95- 100, 1987.

- SNEAD, D.R.J.; BELL, J.A.; DIXON, A.R. et al. - Methodology of immunohistological detection of oestrogen receptor in human breast carcinoma in formalin- fixed, paraffin- embedded tissue : A comparison with frozen section methodology.
Histopathology, 23 : 233- 238, 1993.
- STAQUEL, M. J. - Cancer therapy : Prognostic factors and criteria of response.
Raven Press, N. York, 1975.
- STEBBINGS, W.S.L.; ANDERSON, E.; PUDDEFOOT, J.R.; VINSON, G.P. GILMORE, O. J. A. and PLOWMAN, P. N. - Variations in steroid receptor status with disease stage in breast cancer.
European Journal of Surgical Oncology,15: 322- 327, 1989.
- STYLIANODOU, A. & PAPADIMITRIOU, C.S. - Immunohistochemical demonstration of estrogen receptors on routine paraffin sections of breast carcinomas : A comparison with frozen sections and an enzyme immunoassay.
Oncology, 49 : 15- 21, 1992.
- SWANSON, G.M. - Changing pattern of breast cancer- Is it a reflection of changing etiology?
Cancer, 74 : 1523- 1524, 1994.

- TANDON, A. K.; CLARK, G. M.; CHAMNESS, G. C.; ULLRICH, A. AND MCGUIRE, W. R. - HER-2 / neu oncogene protein and prognosis in breast cancer.
J. Clin. Oncol.,7: 1120- 1128, 1989.
- TAVASSOLI, F.A. - Pathology of the breast
Ed. Appleton & Lange, Connecticut, 1992.
- TOIKKANEN, S. HELIN, H. ISOLA, J. and JOENSUU, H.- Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: A 30 year follow-up.
J. Clin. Oncol., 10: 1044- 1048, 1992.
- THORPE, S.M.; ROSE, C.; RASMUSSEN, B.B. et al. - Prognostic value of steroid hormone receptors : Multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer.
Cancer Res., 47 : 6126- 6133, 1987.
- TODD, J.H.; DOWLE, C.; WILLIAMS, M.R. et al. - Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer.
Br. J. Cancer, 56 : 489- 492, 1987.
- TORMEY, D.C.; WAALKES, T.P.; SNYDER, J.J. & SIMON, R.M. - Biological markers in breast carcinomas: III- Clinical correlations with carcinoembryonic antigen.
Cancer,39: 2397- 2404, 1977.
- TSANGARIS, T.N.; KNOW, S.M. & CHEEK, H. - Tumor hormone receptor status and recurrences in premenopausal patients with node-negative breast carcinoma.
Cancer, 69 : 984- 987, 1992.

- UMEMURA, S.; KAWAI, K.; OSAMURA, Y. & TSUTSUMI, Y. -
Antigen retrieval for Bcl-2 protein in formalin- fixed, paraffin-
embedded sections.
Pathology International,45: 103- 107, 1995.
- VAN AGTHOVEN, T.; TIMMERMANS, M.; FOLKENS, J.A. et al. -
Differential expression of estrogen, progesterone, and epidermal growth
factor receptors in normal, benign and malignant human breast tissues
using dual staining immunohistochemistry.
Am. J. Pathol., 144 : 1238- 1246, 1994.
- VAN BOGAERT, L. J. - The proliferative behavior of the human adult
mammary epithelium.
Acta Cytologica, 23 : 252- 257, 1979.
- VERONESE, S. M.; BARBARESCHI, M.; MORELLI, L.; ALDOVINI,
D.; MAURI; F. A.; CAFFO, O.; GAMBACORTA, M.; DALLA
PALMA, P. - Predictive value of ER1D5 antibody immunostaining in
breast cancer - A paraffin- based retrospective study of 257 cases.
Appl. Immunohistochem., 3(2) : 85- 90, 1995.
- VOLLENWEIDER- ZERARGUI, L.; BARRELET, L.; WONG,Y. et al. -
The predictive vallue of estrogen and progesterone receptors"
concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women-
Clinical correlation on 547 patients.
Cancer, 57 : 1171- 1180, 1986.
- WALKER, R. A. - Demonstration of carcinoembryonic antigen in human
breast carcinomas by the immunoperoxidase technique.
J. Clin. Pathol., 33 : 356- 360, 1980.

- WRIGHT, C.; ANGUS, B.; NICHOLSON, S.; SAINSBURY, J. R. C.; CAIRNS, J.; GULLICK, W. J.; KELLY, P.; HARRIS, A. R. and HORNE, C. H. W. - Expression of CerbB-2 oncoprotein: A prognostic indicator in human breast cancer.
Cancer Research,49: 2087- 2090, 1989.
- YOSHIMOTO, M.; SAKAMOTO, G. & OHASHI, Y. - Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer.
Cancer, 72 (10) : 2993- 3001, 1993.
- ZIMMERMANN, W.; WEBER, B.; ORTLIEB, B. et al. - Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors.
Cancer Res., 48 : 2550- 2554, 1988.

ANEXOS

ANEXOS

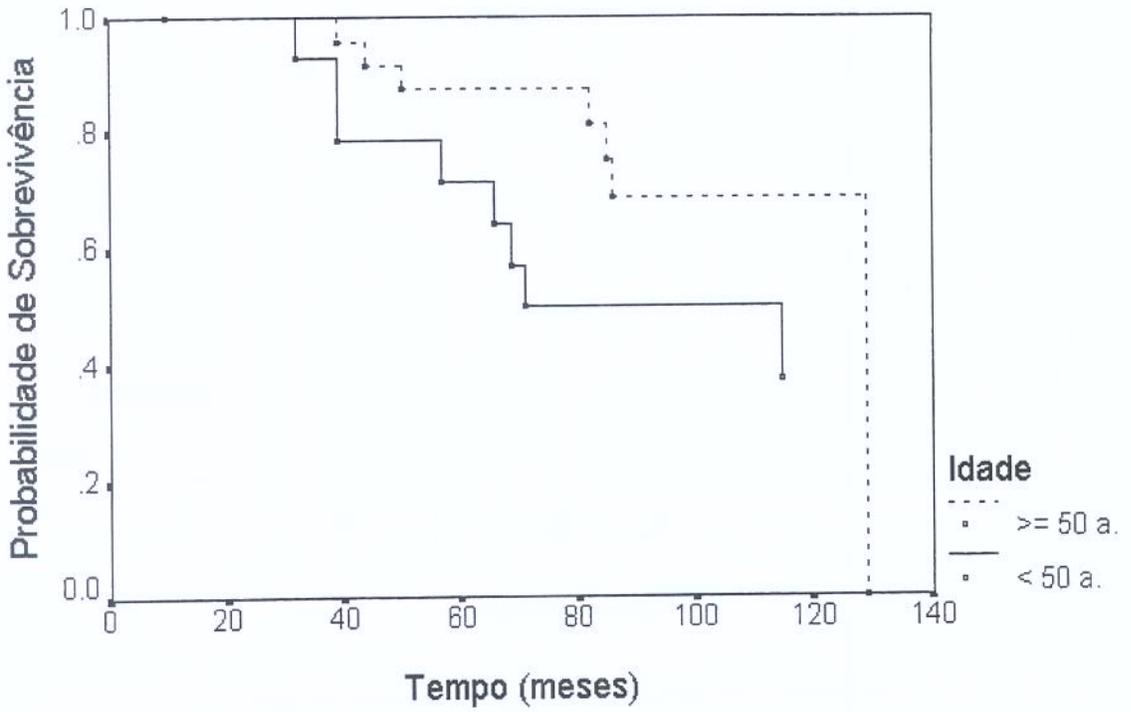


Figura 02: Curva de Sobrevida para Idade (p=0.2018)

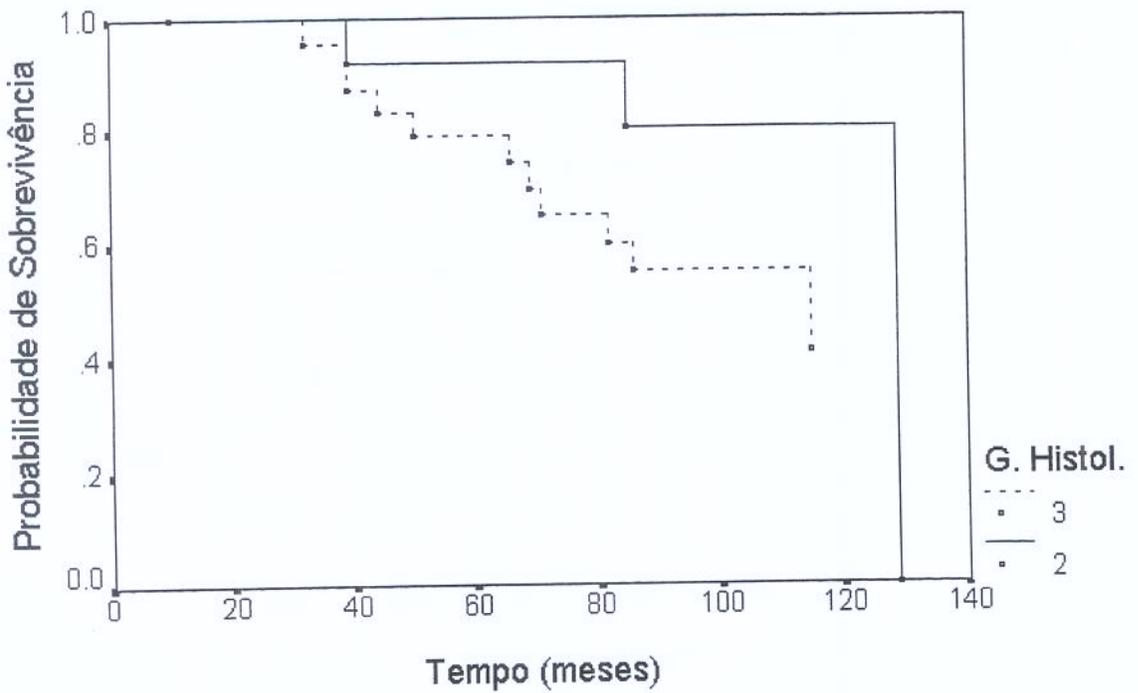


Figura 04: Curva de Sobrevida para Grau Histológico (p=0.1954)

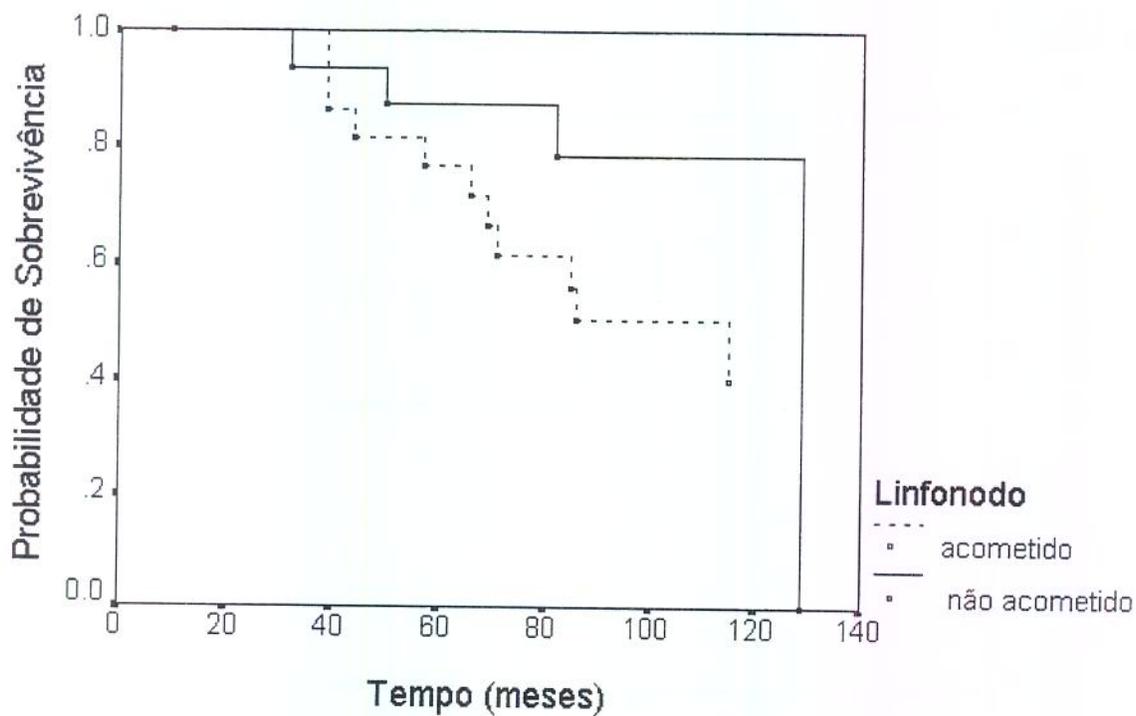


Figura 05: Curva de Sobrevida para Status do Linfonodo ao Diagnóstico (p=0.1782)

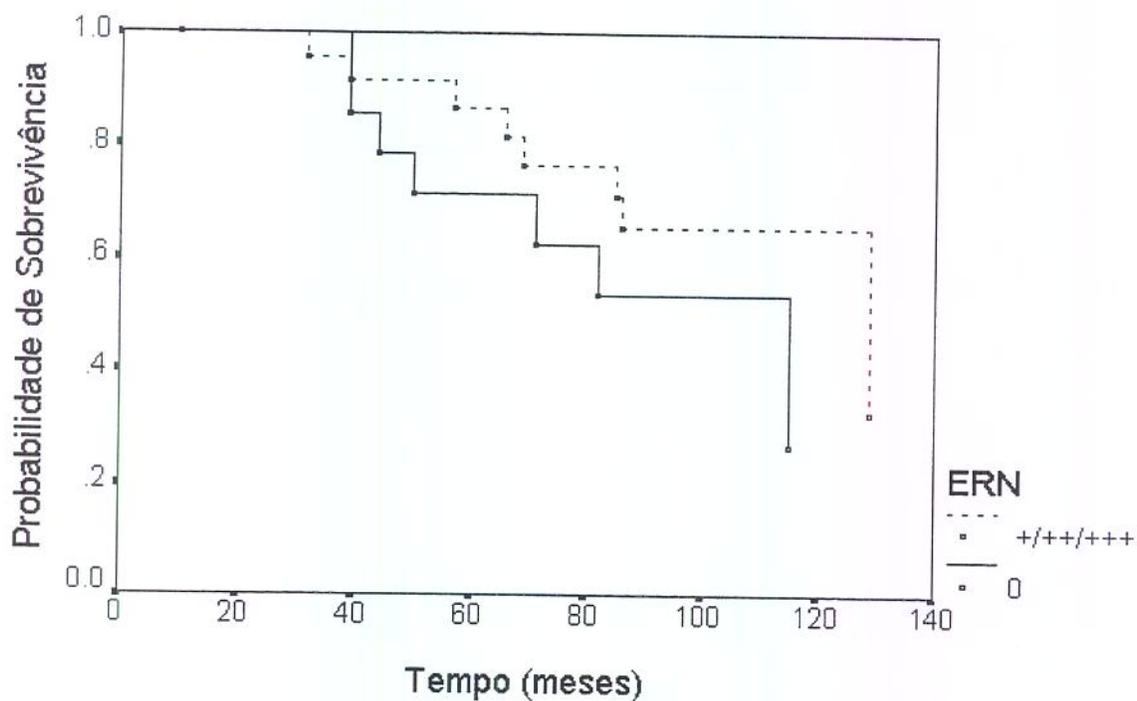


Figura 06: Curva de Sobrevida para ER ; 0 x 1,2 e 3+ (p=0.2473).

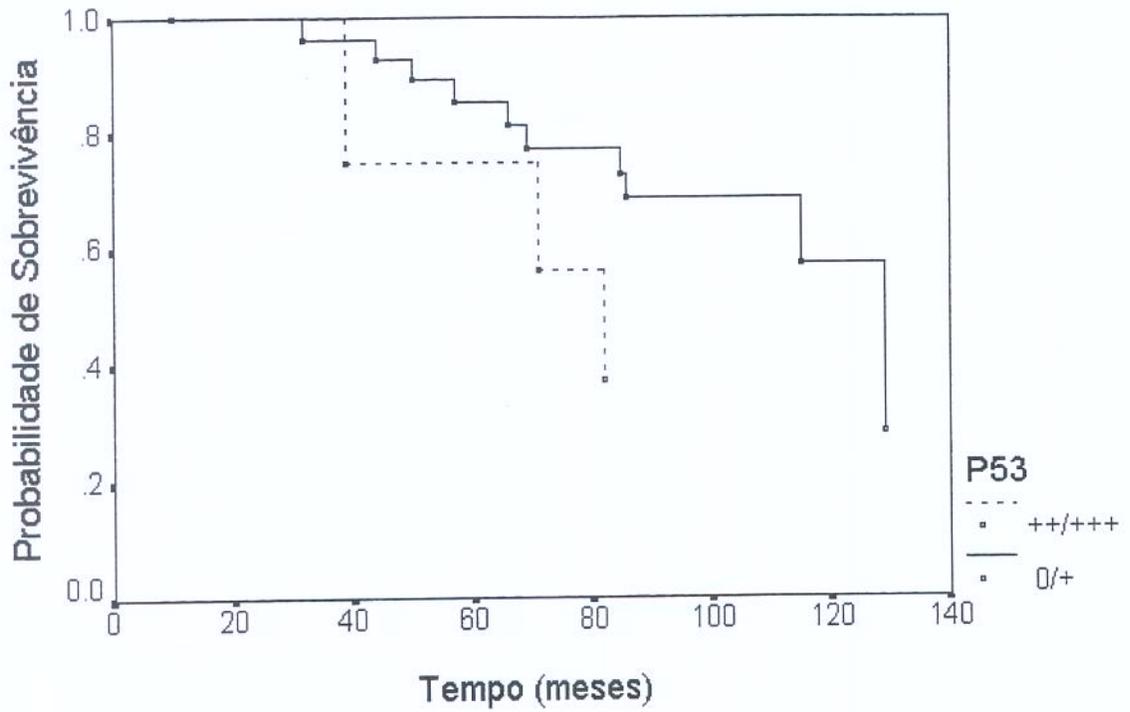


Figura 09: Curva de Sobrevida para P53; 0/+ x 2e3+ (p = 0.1728)

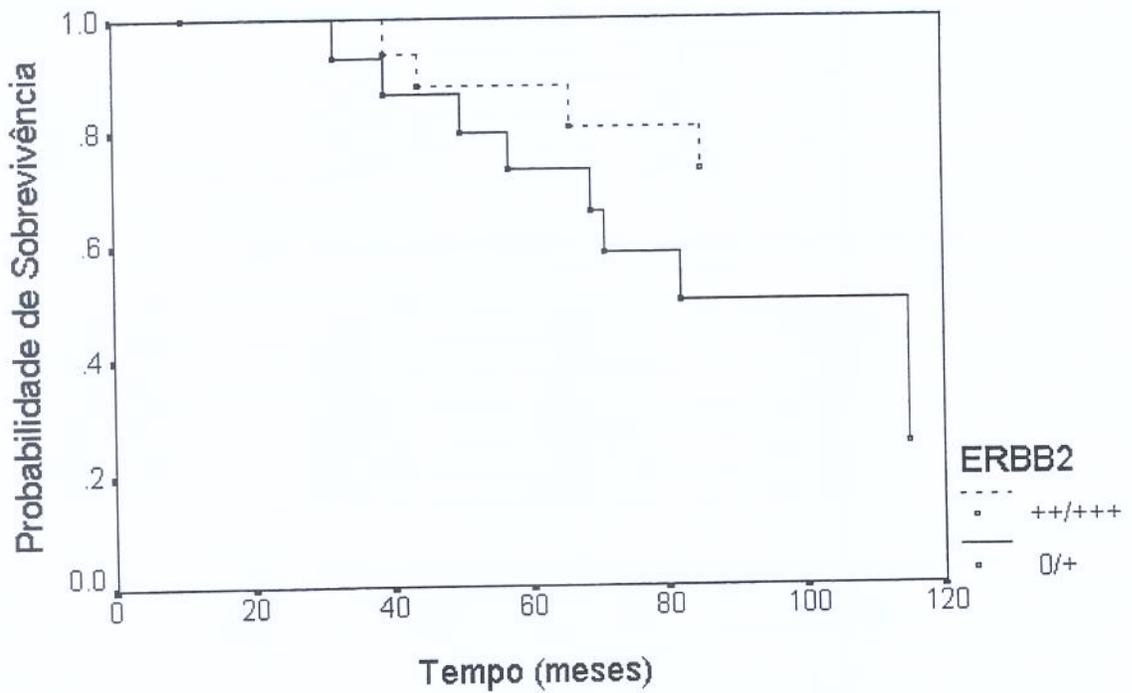


Figura 10: Curva de Sobrevida para ERBB2; 0/+ x 2 e 3+ (p = 0.0940)

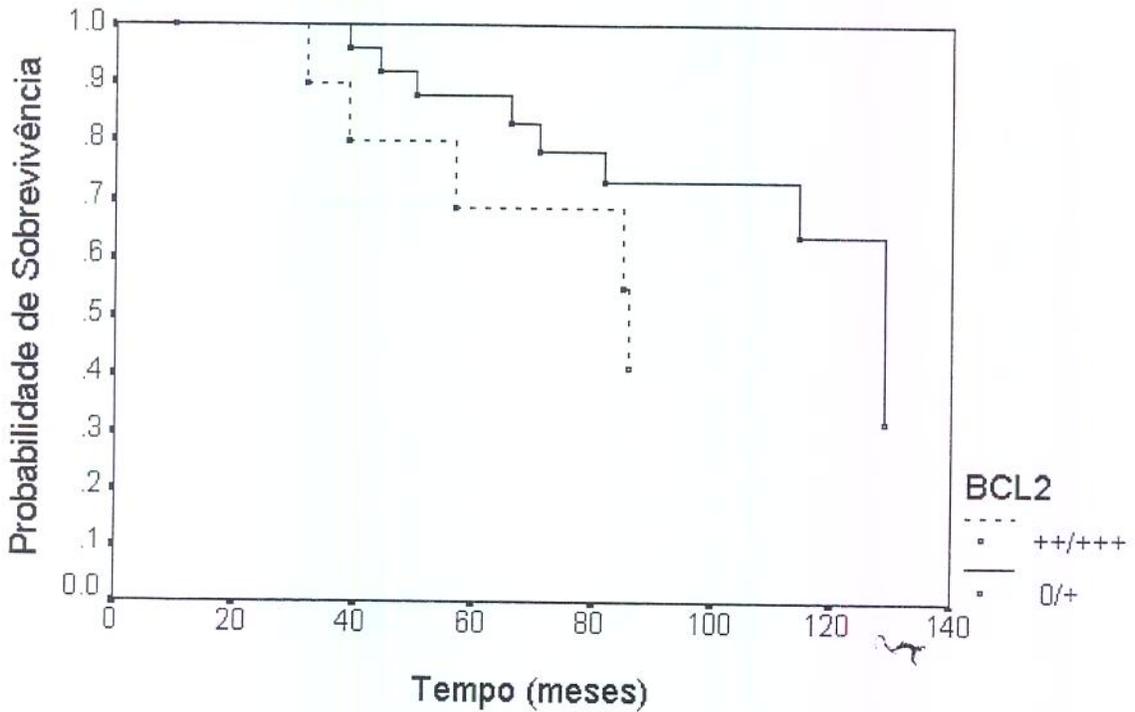


Figura 11: Curva de Sobrevida para BCL2; 0/+ x 2 e 3+ (p = 0.1443)

Tabela 1-Distribuição dos achados citológicos e estadiamento no diagnóstico das 40 pacientes.

	1	2	3
Grau histológico	2 (5%)	13 (32,5%)	25 (62,5%)
Grau nuclear	9 (22,5%)	30 (75%)	1 (2,5%)
Estádio	6 (15%)	24 (60%)	10 (25%)

Tabela 2- Frequência e graus de expressão dos marcadores imuno-histoquímicos.

	0	1+	2+	3+	Total +
ER (1D5) n=40	16 (40%)	10 (25%)	2 (5%)	12 (30%)	24 (60,0%)
CEA n=40	12 (30%)	4 (10%)	7 (17,5%)	17 (42,5%)	28 (70,0%)
Vim n=40	26 (65%)	7 (17,5%)	4 (10%)	3 (7,5%)	14 (35,0%)
P53 n=39	21 (53,8%)	10 (25,6%)	4 (10,3%)	4 (10,3%)	18 (46,2%)
c-erb-B2 n=34	13 (38,2%)	3 (8,8%)	6 (17,6%)	12 (35,3%)	21 (61,7%)
Bcl-2 n=37	12 (32,4%)	14 (37,8%)	6 (16,2%)	5 (13,5%)	25 (67,5%)

Tabela 3-Relação entre os marcadores imuno-histoquímicos (tomados 0 x +/+/+++) - valores de p.

	ER (1D5)	CEA	Vim	P53	c-erb-B2
ER (1D5)	-----	-----	-----	-----	-----
CEA	1.000	-----	-----	-----	-----
Vim	0,343	0,720	-----	-----	-----
P53	0,477	0,284	0,303	-----	-----
c-erb-B2	0,296	0,451	1.000	1.000	-----
Bcl-2	0,488	1.000	0,274	0,295	1.000

Tabela 4- Relação entre os marcadores imuno-histoquímicos (tomados 0/+ x ++/+++) - valores de p.

	ER (1D5)	CEA	Vim	P53	c-erb-B2
ER (1D5)	-----	-----	-----	-----	-----
CEA	0,279	-----	-----	-----	-----
Vim	0,05	0,407	-----	-----	-----
P53	0,220	1.000	1.000	-----	-----
c-erb- B2	1.000	0,291	1.000	1.000	-----
Bcl-2	0,268	0,713	0,646	1.000	0,448

Tabela 5-Relação entre graus histológico e nuclear da neoplasia, status do linfonodo e idade (abaixo ou acima de 50 anos) e marcadores imunohistoquímicos (0 x +/++/+++)- valores de p.

	ER (1D5)	CEA	Vim	P53	c-erb-B2	Bcl-2
Grau histológico	0,755	0,412	0,077**	0,643	0,255	0,868
Grau nuclear	0,180	0,367	0,044**	0,843	0,803	1.000
Linfonodo	0,897	0,096**	0,386	0,399	0,533	0,909
Idade	0,693	0,490	0,329	0,119	0,725	0,488

Grau nuclear 1/ vim + | relação
 Grau nuclear 2 / vim - | inversa

Grau hist. 1+ 2 vim - | relação
 Grau hist. 3 vim + | direta
 Linfonodo - / CEA +

Tabela 6- Idem tabela 5, sendo 0/+ x ++/+++ - valores de p.

	ER (1D5)	CEA	Vim	P53	c-erb-B2	Bcl-2
Grau histológico	0,874	1.000	0,584	1.000	0,023*	0,109
Grau nuclear	1.0	0,080*	0,052**	1.000	0,835	0,454
Linfonodo	0,641	0,038**	0,900	0,582	0,311	0,235
Idade	0,685	0,292	0,210	0,820	0,492	0,728

Grau histológico inverso grau + erb
 Grau histológico < ,CEA +++

Nº	Registro	Idade	Data diagn.	Tipo histológico/ Grau	Bloco nº	ER	CE A	VI M.	Evolução	Estadiamento	Cerb B2	P 5 3	Bc 1-2
01	840385	64	03/84	Ca. ductal inv. GHIII e GN1	34644	+++	+++	-	05/88-SED	III	NR	-	+
02	840235	37	02/84	Ca. ductal inv. GHIII e GN1	106107	-	+++	++ +	11/91-SED	I	-	-	-
03	840833	38	08/84	Ca. ductal inv. GHIII e GN2	111353	+++	+	-	04/87-rec. local 08/92-viva com tu.	I	-	-	++
04	830279	60	02/83	Ca. ductal inv. GHII e GN2	20000	+++	+++	-	06/87-alta a pedido;SED	II	NR	-	+
05	840795	45	08/84	Ca. ductal inv. GHII e GN2	110960	-	+++	-	08/92-SED	II	+++	+	-
06	830636	64	05/83	Ca. ductal inv. GHIII e GN2	98954	-	+++	++	12/91-SED	II	-	+	++
07	840874	66	09/84	Ca. ductal inv. GHII e GN2	26556	-	+++	-	08/92-SED	II	+++	-	+
08	820007	61	11/81	Ca. colóide	84458	+	-	-	08/92-rec. local	I	NR	-	-
09	831032	69	10/83	Ca. ductal inv. GH III e GN1	102934	-	+++	++ +	06/87-rec+meta 07/87-óbito	III	+++	+	+
10	831058	67	09/83	Ca. ductal inv. GHII e GN2	102239	+++	+++	-	05/88-SED	II	++	+	++ +
11	861034	44	09/86	Ca. ductal inv. GHI e GN3	1703/86	-	+++	-	11/86-alta a pedido;SED	II	+	-	++ +
12	861019	48	06/86	Ca. ductal inv. GHIII e GN 1	134090	-	+++	+	01/87-SED	II	++	-	-
13	861070	68	09/86	Ca. ductal inv. GHII e Gn2	132972	+	+++	-	11/86-SED 11/93-óbito;tu. dissem..	II	+++	+	++ +
14	830687	42	06/83	Ca. ductal inv. GHIII e GN3	99560	++	+++	-	01/92-SED	II	++	-	++ +
15	841119	35	11/84	Ca. ductal inv. GHI e GN2	114051	+++	-	-	08/89-rec. local 10/91-viva com tu.	II	-	-	++
16	861119	65	09/86	Ca. ductal inv. GHII e GN2	134151	+	-	-	11/96-SED	III	++	-	+
17	840570	68	06/84	Ca. ductal inv. GHII e GN2	25450	-	-	++ +	08/92-SED	II	++	-	+
18	830402	60	04/83	Ca. ductal papilífero GHII e GN2	98102	+	-	-	02/92-SED	I	-	+	++
19	820702	80	07/82	Ca. ductal inv. e GHII e GN 2	91428	+++	++	-	08/90-viva;SED	II	-	-	+
20	830909	45	09/83	Ca. colóide	102391	+	+++	-	04/93-SED	II	-	-	+
21	860955	71	08/86	Ca. ductal inv. GHIII e GN2	132422	-	++	-	10/90-óbito por ca. mama	I	-	-	+
22	820861	30	08/82	Ca. ductal inv. GHIII e GN2	91915	+++	+	-	09/84-rec. local= mastec.; 10/85-meta	II	_inv . +++	+	++

									óssea 11/85-óbito		in situ		
23	831014	66	09/83	Ca. ductal inv. GHII e GN2	102264	+++	++	-	02/89-SED	II	+++	-	+
24	860996	72	07/86	Ca. ductal inv. GHII e GN2	132764	+++	+++	+	10/92- óbito;SED	II	-	-	-
25	830535	66	05/83	Ca. ductal inv.com áreas in situ GHII e GN2	98175	+++	+++	+	08/93-viva;SED	I	+++	+	-
26	830873	59	06/83	Ca. ductal inv.GHII e GN2	100645	-	++	-	05/88-SED	II	+++	+	++
27	841114	40	05/84	Ca. ductal inv. GHII e GN2	114036	-	-	+	09/94-viva;SED	III	+++	-	-
28	860999	68	07/86	Ca. ductal inv. GHIII e GN2	130754	-	++	-	11/86-SED 11/89-óbito;ca. dissem.	III	NR	N R	N R
29	820919	36	09/82	Ca. ductal inv. GHII e GN2	92366	-	+++	-	02/86-meta óssea 11/90viva-	II	+++	+	-
30	861378	68	09/86	Ca. ductal inv. GHIII e GN2	153984	+++	-	+	11/86-SED 11/93-óbito,tu. dissem.	II	NR	+	++
31	861216	64	10/86	Ca. medular	134188	-	++	+	12/91- SED	II	-	+	+
32	810480	41	10/80	Ca. ductal inv. GHII e GN2	74346	++	++	-	09/94- viva e SED	II	+++	+	+
33	861135	54	08/86	Ca. ductal inv, GHIII e GN2	133346	+	+	++	04/94-SED	III	+++	+	-
34	851331	54	10/85	Ca. ductal inv. GHIII e GN3	123676	-	-	++	08/92-meta óssea 06/94- meta óssea dissem.	II	-	+	-
35	860372	39	04/86	Ca. ductal inv. GHII e GN2	127341	-	-	-	03/92-óbito por ca. mama	II	-	+	-
36	851165	44	10/85	Ca. ductal inv. GHIII e GN2	123144	+	-	-	07/91meta 08/94-viva com tu...	III	-	-	N R
37	870165	30	01/87	Ca. ductal inv. GHIII GN2	137135	+	-	+	06/92-meta óssea 12/94-meta dissem.	III	++	-	+
38	861241	64	10/86	Ca. ductal inv. GHII e GN1	134477	+++	+++	-	11/96- viva e SED	III	+++	+	-
39	860418	46	04/86	Ca. ductal inv. GHIII e GN2	128349	-	-	+	11/95-meta. óssea 11/96- viva, em químio	II	+	-	+
40	861236	55	10/86	Ca. ductal inv, GHIII e GN2	135846	-	+++	-	04/94 - SED a	III	NR	+	N R