

RAQUEL MARY RODRIGUES PERES

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *erbB-2* E DOS RECEPTORES
DE ESTERÓIDES NA TRANSIÇÃO DAS FRAÇÕES *IN SITU*
E INVASORA DE NEOPLASIAS DE MAMA**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO SARIAN

**Unicamp
2009**

RAQUEL MARY RODRIGUES PERES

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *erbB-2* E DOS RECEPTORES
DE ESTERÓIDES NA TRANSIÇÃO DAS FRAÇÕES *IN SITU*
E INVASORA DE NEOPLASIAS DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO SARIAN

**Unicamp
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P415e	Peres, Raquel Mary Rodrigues Expressão da proteína erbB-2 e dos receptores de esteróides na transição das frações in situ e invasora de neoplasias de mama / Raquel Mary Rodrigues Peres. Campinas, SP : [s.n.], 2009. Orientador : Luís Otávio Sarian Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Mamas - câncer. 2. Imuno-histoquímica. I. Sarian, Luís Otávio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês : erbB-2 expression and hormone receptor status in the transition áreas from in situ to invasive ductal carcinoma of the breast

Keywords: • Breast cancer
 • Immunohistochemistry

Titulação: Mestre em Tocoginecologia
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luís Otávio Zanatta Sarian
Profa. Dra. Suzana Guimarães Moraes
Prof. Dr. Aarão Mendes Pinto-Neto

Data da defesa: 18-06-2009

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: RAQUEL MARY RODRIGUES PERES

Orientador: Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO ZANATTA SARIAN

Membros:

1.

2.

3.

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 18/06/2009

*A Daniel Pares Filho
por todos os momentos que contribuíam
para que eu passasse por esta fase da minha vida
por acreditar que tudo isso vale a pena
e por deixar meus dias mais felizes e felizes.*

Dedico este trabalho...

*A Daniel Peres Filho
por todas as formas com que contribuiu
para que eu passasse por essa fase de minha vida
por acreditar que tudo isso vale a pena
e por deixar meus dias mais fáceis e felizes.*

Agradecimentos

A Deus, por seus propósitos surpreendentes em cada obra que faz em nossas vidas, capazes de nos conduzir à sabedoria para lidar com as dificuldades, à perseverança para suportar os desafios, ao perdão para restaurar nossas vidas e à Sua graça para nos permitir chegar até onde devemos ir.

Ao meu querido marido, por estar sempre presente em minha vida, principalmente durante este trabalho, nos sorrisos, nas lágrimas (que não foram poucas!), nas distâncias, nas conquistas, fazendo com que as dificuldades, que pareciam ser bem maiores do que eu, fossem reduzidas ao tamanho em que pudessem ser enfrentadas.

À minha família, que muito me encorajou para que eu nunca desistisse e pudesse chegar até aqui.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Luís Otávio Sarian e Dra. Juliana Heinrich, pela paciência, empenho, pelo compartilhar de conhecimentos, mas, sobretudo, pela convivência e amizade. Com certeza ainda tenho muito a aprender com vocês!

À Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, à Dra. Kátia Pítton Serra e à aluna de iniciação científica Jung Hyun Yoon, pela colaboração com a seleção das amostras, análise da técnica de imuno-histoquímica e colaboração para a elaboração desta dissertação.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM e do Laboratório de Patologia Molecular do CIPED, em especial à Dra. Glauce Aparecida Pinto, ao Prof. Dr. José Vassalo, ao Prof. Dr. Marcelo Alvarenga e ao

biólogo Paulo Latuf Filho, pela imensa colaboração com a análise e realização da técnica de imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, do Centro de Pesquisas do Hospital do Câncer – AC Camargo (SP), pela realização da técnica de TMA.

Aos funcionários e alunos do LCE: Lúcia, Lucilene, Mara, Alex, Amilton, Alexandre, Fernando, Isabella e Renata, sempre dispostos a ajudar entre tantos papéis, estufas, temperaturas, reagentes, além das conversas, momentos de descontração e trocas de experiências, essenciais para que eu pudesse concluir este trabalho.

À Cássia, pelas risadas, pelos desabafos, pela disposição em ajudar, enfim, pela amizade e por sempre colocar minhas lâminas para “dormir”!

À Profa. Dra. Suzana Guimarães Moraes (PUC-SP e Faculdade de Medicina de Jundiaí/SP), Profa. Dra. Ana Elisabete Silva (UNESP – São José do Rio Preto/SP), Prof. Dr. Aarão Mendes Pinto Neto (CAISM/UNICAMP), Profa. Dra. Maria Salete Costa Gurgel (CAISM/UNICAMP), Prof. Dr. Renato Zocchio Torresan (CAISM/UNICAMP) por terem aceitado participar da banca de qualificação e da banca examinadora deste trabalho, e contribuído com observações tão relevantes para o seu aprimoramento.

À secretária da Pós-Graduação do Departamento de Tocoginecologia – FCM/Unicamp, Margarete, e às secretárias do Departamento de Oncologia, Neusa e Débora, pela eficiência e disponibilidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP, pelo financiamento deste projeto.

**“Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos,
mas parece que não os há.
O nosso ir faz o caminho.” C.S.Lewis**

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Summary	xiii
1. Introdução	15
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Publicação.....	23
4. Conclusões.....	47
5. Referências Bibliográficas.....	48
6. Anexos	51
6.1. Anexo 1 – Cartas de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/Unicamp.....	51
6.2. Anexo 2 – Complementação técnica.....	55

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CAISM – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher

CDI – Carcinoma Ductal Invasivo

CDIS – Carcinoma Ductal *In Situ*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DCIS – Ductal Carcinoma *In Situ*

ER – *Estrogen receptors*

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

HC – Hospital das Clínicas

HR – *Hormone receptors*

IDC – *Invasive Ductal Carcinoma*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

PR – *Progesterone receptors*

RE – Receptores de estrógeno

RH – Receptores hormonais

RP – Receptores de progesterona

OMS – Organização Mundial da Saúde

TMA – *Tissue Microarray*

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Introdução: Há evidências indicando que a transição de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) para carcinoma ductal invasivo (CDI) é regulada por um número restrito de genes. Ainda permanece obscuro se a expressão do receptor erbB-2 e dos receptores hormonais predizem o potencial invasivo dos CDIS. **Objetivos:** Avaliar a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona (RE/RP) e da proteína erbB-2 em áreas específicas em tumores que apresentem componentes de CDIS e CDI concomitantemente, indicando uma possível transição. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados 85 casos de carcinomas da mama apresentando regiões contíguas de CDIS e CDI e obtidas amostras histológicas separadas, uma da região CDIS e outra da região CDI, do bloco de parafina original do diagnóstico, para montagem de um TMA (*tissue microarray*). A expressão das proteínas erbB-2, RE e RP foram verificadas através da técnica convencional de imuno-histoquímica. Os dados clínicos das pacientes foram coletados por consulta ao prontuário. **Resultados:** Aproximadamente 35% das áreas invasivas foram classificadas como 2+ ou 3+ para o erbB-2, em contraste a 47% no componente invasivo correspondente. A expressão de erbB-2 não se mostrou diferente nos componentes *in situ* e invasivo ($p=0,12$). A expressão de RP não

foi estatisticamente diferente comparando-se regiões *in situ* e invasivas do tumor ($p=0,06$). Em contraste, houve uma discreta mudança na expressão de RE ($p=0,04$). O coeficiente de concordância intraclass (ICC) revelou forte concordância nas comparações entre as amostras de erbB-2 (ICC=0,61), RP (ICC=0,61) e RE (ICC=0,70), nos componentes *in situ* e invasivo. Conclusão: Os achados sugerem que a expressão de erbB-2, RE e RP não diferem entre os componentes *in situ* e invasivo do carcinoma da mama, especialmente nas regiões de transição de um componente a outro. Espera-se que as alterações moleculares ocorridas antes da mudança morfológica do tecido persistam na forma invasiva do tumor. A concomitância da atuação de fatores epigenéticos pode explicar porque alguns tumores *in situ* evoluem para invasivos, enquanto outros tumores *in situ* com características moleculares semelhantes não apresentam a mesma evolução, suportando a hipótese de uma base multifatorial para a progressão da doença.

Summary

Introduction: There is evidence indicating that the transition from ductal carcinoma *in situ* (DCIS) to invasive ductal carcinoma (IDC) is regulated by a restrict number of genes. It remains unknown whether erbB-2 and hormone receptor status predict the invasive potential of DCIS. Objectives: To evaluate estrogen/progesterone receptor (ER/PR) and protein erbB-2 status in the specific areas of breast tumors which share both components of DCIS and IDC, concomitantly, indicating a possible transition. Materials and methods: 85 cases of breast malignancies harboring contiguous regions of DCIS and IDC were selected. Separate histological samples, one from the DCIS and other from the neighboring IDC, from the original paraffin block used on diagnosis, were sampled using tissue microarrays (TMA). The erbB-2 and ER/PR status was assessed using conventional immunohistochemistry techniques. Clinicopathological data from the patients and from the disease were retrieved out of the patients' medical records. Results: Approximately 35% of the invasive areas were erbB-2 2+ or 3+, compared to 47% of their *in situ* counterparts. The expression of erbB-2 did not differ in the *in situ* and in the invasive components of the breast tumors ($p=0.12$). The PR status was not statistically different comparing the *in situ* and

invasive regions of the tumors ($p=0.06$). By contrast, there was a slight imbalance in ER status ($p=0.04$). The intraclass correlation coefficient (ICC) disclosed good agreement in sample-by-sample comparisons of erbB-2 (ICC = 0.61), PR (ICC= 0.61) and ER (ICC=0.70) expression in the *in situ* and invasive components. Conclusion: Our findings suggest that the expression of erbB-2 and ER/PR does not differ accross the *in situ* and invasive components of breast malignancies, especially in the transition region from one component to the other. It is expected that the molecular alterations which take place before the morphologic tissue changes persist in the invasive forms of breast tumors. The occurrence of concomitant epigenetic factors may explain why some *in situ* tumors develop to an invasive phenotype, while other *in situ* tumors with similar molecular characteristics do not have the same evolution, supporting the hypothesis for a multifactorial basis for disease progression.

1. Introdução

As neoplasias da mama, apontadas como o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres em todo o mundo, é também o que mais causa mortes entre mulheres no Brasil, no período pós-menopausa. Para 2009, no Brasil, foram estimados 49.400 novos casos, com um risco de 51 casos para cada 100 mil mulheres (1).

O carcinoma ductal da mama é o tipo histológico mais comum, embora determine um grupo bastante heterogêneo de tumores, o que impede que os fatores prognósticos e preditivos utilizados atualmente satisfaçam por completo a avaliação individual do risco e do tratamento dessas neoplasias. Por estas razões, são necessários padrões de prognóstico e terapêutica mais precisos. Não é raro encontrar, em um único espécime do tumor, extensas áreas de carcinoma ductal *in situ* associadas a áreas de carcinoma invasivo. Não obstante, outras características associadas à agressividade tumoral também podem variar em um mesmo exemplar cirúrgico, a exemplo da formação tubular, número de atipias por campo, entre várias outras (2).

Mais de 50% dos tumores ductais *in situ* evoluem para invasivo, apesar da grande variabilidade no tempo desta progressão. Entre 11% e 20% dos tumores ductais *in situ* têm associação com invasivo quando de sua completa excisão, e a recorrência em 1% a 32% desses tumores podem se apresentar na forma invasiva. Mulheres que se submetem à cirurgia conservadora da mama, em razão de tumores ductais *in situ*, têm chance de 7% a 9% de recidiva, mesmo após radioterapia adjuvante, e metade dessas recidivas se apresentará na forma de carcinomas ductais invasivos. A transição dos tumores ductais *in situ* para invasivos parece acontecer de maneira que os tumores *in situ* de baixo grau evoluam para invasivos de baixo grau, e os carcinomas *in situ* de alto grau determinem invasivos de alto grau. Ou seja, não parece haver um padrão linear de desenvolvimento, em que neoplasias *in situ* de baixo grau evoluam para alto grau e, na sequência, para invasivo. Além disso, as principais alterações nos padrões de expressão de genes ocorrem na transição de tecidos normais para carcinomas ductais *in situ* e não desse tipo de tumor para carcinomas ductais invasivos (3).

Para reduzir as limitações no entendimento dos processos biológicos que ocorrem nessas regiões de transição é necessário determinar o comportamento de marcadores biológicos, dos pouco conhecidos aos já classicamente estabelecidos como fatores prognósticos e preditivos para tumores de mama. A expressão transmembrana de receptores de hormônios esteróides (RH), ou seja, receptores de estrógeno e progesterona, e a expressão aumentada do gene *ERBB2* são exemplos de fatores preditivos já

consolidados para os tumores de mama. Embora exista farta literatura a respeito da expressão destes fatores em carcinomas ductais invasivos, pouco se sabe sobre o comportamento deles durante a progressão da fase *in situ* para a invasora. Tampouco existem informações sobre a expressão dos RH e do erbB-2 em tumores com diferentes graus de invasividade (4).

O gene *ERBB2* é um oncogene que, quando amplificado, proporciona ganho de função ou expressão aumentada dos produtos por ele codificados, levando à inibição da apoptose e a mecanismos de proliferação celular intensa e ininterrupta. Esse gene tem expressão aumentada em aproximadamente 30% dos tumores de mama invasivos e em mais de 60% dos tumores ductais *in situ*, transcrevendo para uma glicoproteína transmembrana – erbB-2- envolvida no controle de crescimento celular, e está incluída na família do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*).

Esse tipo de receptor tem função tirosina-quinase, e seu mecanismo de função consiste em um ligante, o fator de crescimento epidérmico (*EGF*) ou o transformador do fator de crescimento-alfa (*TGF- α*), atingir a porção extracelular da proteína, levando à dimerização desse receptor. A proteína erbB-2 não possui porção receptora conhecida, devendo dimerizar-se ao *EGFR* para que ocorra a transdução do sinal. A proteína erbB-2 desencadeia a via da MAP-quinase, envolvendo outras proteínas que agem fosforilando os fatores de transcrição para genes-alvo nas vias de transdução de sinal de fatores de crescimento e seus receptores (5,6). A amplificação do gene *ERBB2* está correlacionada com necrose do tipo comedo e com a acumulação de mutações

do gene p53. A expressão aumentada de erbB-2 em carcinomas *in situ* da mama está associada à aneuploidia e a índices aumentados de proliferação celular, e nos carcinomas *in situ* há maior taxa de expressão aumentada em casos com alto grau tumoral do que nos de baixo grau. A diferença de expressão nas porcentagens de erbB-2 nos carcinomas invasivo e *in situ*, indicam que há perda da expressão durante a progressão de um estado para o outro (3).

O estrógeno é um dos maiores estimuladores de crescimento e desenvolvimento celular no câncer de mama. Seu receptor pertence à família de receptores nucleares (NR). O mecanismo da ativação das vias de transdução para os receptores de estrógeno ocorre de formas diferentes, dependendo do tipo do receptor (alpha ou beta) e da mediação de outras moléculas, como Fos/Jun e SP-1. O receptor alpha tem sua expressão aumentada em mais da metade dos tumores da mama, e aproximadamente 70% destes tumores respondem ao tratamento com tamoxifeno. Resumidamente, quando um ligante, nesse caso um hormônio esteróide, como o estradiol, atravessa a membrana celular, possibilitado por suas características lipofílicas, pode ligar-se ao receptor de estrógeno. Os receptores encontram-se no citoplasma e no núcleo da célula, e ligam-se diretamente ao DNA para ativar fatores de transcrição após uma sequência de eventos desencadeados, como mudança de conformação em sua estrutura, e ativação de genes que participam ativamente do processo de síntese de proteínas (4,7,8).

O receptor de progesterona é um receptor intracelular e está presente em aproximadamente 54% a 59% dos carcinomas da mama, sendo induzido

pela presença de estrógeno. Esses receptores podem se apresentar nas isoformas A e B, e quando ativados, dimerizam e ligam-se diretamente ao DNA da célula, funcionando de maneira similar ao receptor de estrógeno. Essa ligação pode estimular cascatas de reações intracelulares e ativar a transcrição de genes-alvo, como o *CCND1*, que irão atuar nas vias da MAPK, e podem também agir como sensores que desencadearão múltiplas vias de sinalização kinase-dependentes (4,9).

Como descrito anteriormente, o *status* dos receptores hormonais e da proteína erbB-2, em associação com características morfológicas das neoplasias mamárias, formam um conjunto de dados capaz de definir um padrão prognóstico da evolução da doença e preditivo da resposta aos tratamentos adjuvantes. Contudo, múltiplos estudos demonstraram que estes potenciais preditivos e prognósticos são válidos principalmente para neoplasias invasoras. Em relação ao carcinoma *in situ*, os estudos convergem, com raras exceções, para mostrar que o estado dos receptores hormonais e da expressão da erbB-2 não guardam relação com o comportamento biológico das lesões (6,10,11), ou, pelo menos, não adicionam informações àquelas já propiciadas pelos critérios morfológicos usados na classificação do carcinoma ductal *in situ*. Apesar de vários estudos anteriores abordarem a situação dos marcadores moleculares envolvidos na progressão dos tumores da mama, é importante ressaltar, todavia, que ainda permanece uma lacuna no que toca ao comportamento, ou à associação da expressão, dos receptores hormonais e da proteína erbB-2 na fase de transição da doença pré-invasora para invasora, no mesmo indivíduo,

em componentes presentes na mesma peça cirúrgica. Este tipo de avaliação é tecnicamente difícil, porque a) só pode ser realizado através da avaliação de lesões *in situ* e invasivas de uma mesma mulher; b) estas lesões devem ser concomitantes e c) não podem estar distantes, mesmo que dentro da mesma mama, pois devem ser originadas de um mesmo clone neoplásico.

As dificuldades elencadas no parágrafo anterior justificam a atual escassez de estudos e, portanto, de informações concernentes ao comportamento dos marcadores biológicos na fase de transição de neoplasia *in situ* para invasora. Contudo, técnicas recentes de avaliação de marcadores biológicos em regiões precisas de espécimes histológicos, a exemplo dos *Tissue Microarrays* (TMA), inicialmente descrito por Kononen et al., em 1998 (12), podem possibilitar a determinação, em detalhe, do comportamento de diversas moléculas em áreas muito específicas das lesões. Esta técnica consiste na construção de blocos de parafina a partir de blocos originais de tumores, em que um “*arrayer*” faz cortes cilíndricos na área desejada do tumor, em tamanhos que variam de 0,6 mm a 1mm de diâmetro. Esses fragmentos cilíndricos são então rearranjados em um novo bloco de parafina, podendo conter até 1000 cilindros em um único array, dependendo do diâmetro utilizado, e seguindo uma ordem predeterminada. As vantagens dessa técnica são várias, como, por exemplo, avaliação de sensibilidade e especificidade a novos anticorpos para imuno-histoquímica, comparando diferentes clones; pesquisa de fatores prognósticos e preditivos dos tumores e uniformização de reações quando há disponibilidade de um grande número de amostras (13). Camp e cols. demonstraram que há concordância em

mais de 95% dos resultados na análise de cortes de dois cilindros de TMA em comparação a um corte histológico convencional, na análise da expressão de proteínas erbB2, receptores de estrógeno e de progesterona (14).

É necessário examinar se padrões de expressão protéica podem modificar-se em paralelo ao estágio de desenvolvimento e progressão neoplásica dos tumores, e se as características patológicas e do tumor encontram correspondência em nível molecular. A avaliação concomitante da expressão de proteínas e das características morfológicas de neoplasias ductais mamárias, em áreas de um mesmo tumor, porém com marcantes diferenças histológicas (*in situ versus* invasivo), proverá informações relevantes sobre as eventuais associações entre modificações moleculares específicas e alterações morfológicas e patológicas teciduais. Por estes motivos, decidiu-se pela condução do presente estudo. Nele, foram contornadas as dificuldades expostas acima a) abordando uma coorte de mulheres com neoplasias mamárias de componente *in situ* e invasor, b) presentes em um mesmo espécime cirúrgico e, c) através da precisão disponibilizada pelo TMA, avaliar a expressão dos receptores hormonais e da erbB-2 em áreas *in situ* e invasoras contíguas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Determinar a relação entre a expressão dos receptores hormonais e da proteína erbB-2 nas regiões contíguas *in situ* e invasora de neoplasias mamárias.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a expressão dos receptores hormonais e da proteína erbB-2 nas regiões contíguas *in situ* e invasora de neoplasias mamárias.
- Determinar a relação entre a expressão dos receptores hormonais e da proteína erbB-2 e as características morfológicas das regiões *in situ* e invasora.
- Determinar se a expressão dos receptores hormonais e da proteína erbB-2 nas regiões invasoras está associada com a expressão das mesmas nas áreas *in situ*.

3. Publicação

American Journal of Clinical Pathology

AJCP

erbB-2 expression and hormone receptor status in the
transition areas from in situ to invasive ductal carcinoma of
the breast

Journal: American Journal of Clinical Pathology

Manuscript ID: AJCP-2009-05-0240

mstype: Original Article

Date Submitted by the Author: 08-May-2009

Complete List of Authors: Rodrigues-Peres, Raquel; University of Campinas, CAISM-Women's Hospital - Clinical Laboratories; University of Campinas, CAISM-Women's Hospital - Clinical Laboratories

Derchain, Sophie; University of Campinas, Obstetrics and Gynecology

Heinrich, Juliana; University of Campinas, CAISM-Women's Hospital - Clinical Laboratories

Serra, Katia; University of Campinas, Obstetrics and Gynecology

Yoon, Jung; University of Campinas, Medical Sciences

Pinto, Glauce; University of Campinas, Pathology; University of Campinas, CAISM-Women's Hospital - Pathology Laboratory

Alvarenga, Marcelo; University of Campinas, Obstetrics and Gynecology

Soares, Fernando; Hospital do Câncer AC Camargo

Sarian, Luis; University of Campinas, Obstetrics and Gynecology

Keywords: AP Breast, Basic Science, Molecular Diagnostics

**erbB-2 expression and hormone receptor status in the transition areas from
in situ to invasive ductal carcinoma of the breast**

Raquel Mary Rodrigues Peres¹

Sophie F M Derchain²

Juliana K Heinrich¹

Kátia Piton Serra²

Jung Hyun Yoon³

Glauce Aparecida Pinto¹

Marcelo Alvarenga²

Fernando Augusto Soares⁴

Luís Otávio Zanatta Sarian² sarian@terra.com.br

1. CAISM – Women´s Hospital, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.
3. Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.
4. Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author:

Luís Otávio Zanatta Sarian

Área de Oncologia Ginecológica e Patologia Mamária

CAISM/FCM/UNICAMP

Rua Alexander Fleming, 101

13083-881 Campinas SP, Brasil

Telefone: +55-19-35219384, Fax: +55-19-

E-mail: sarian@terra.com.br

ABSTRACT

Background: It remains unknown whether erbB-2 and hormone receptor statuses predict the invasive potential of breast ductal carcinoma *in situ* (DCIS). Objectives: to examine the erbB-2 and estrogen/progesterone receptor (ER/PR) statuses in the precise areas where DCIS is turning into invasive ductal carcinoma (IDC). Subjects and methods: 85 cases of breast malignancies harboring contiguous regions of DCIS and IDC were selected. Separate histological samples, from the DCIS and the neighboring IDC were sampled using tissue microarrays (TMA). The erbB-2 and ER/PR statuses were assessed using immunohistochemistry. Results: The expression of ERBB-2 did not differ in the DCIS and IDC components of the breast tumors ($p=0.12$). There was a good agreement in sample-by-sample comparisons of erbB-2 (ICC=0.61), PR (ICC=0.61) and ER (ICC=0.70) expression in DCIS and IDC components. Conclusion: Our findings suggest that the expressions of erbB-2 and ER/PR do not differ in the transition region from DCIS to IDC.

INTRODUCTION

There is a growing body of evidence supporting the concept that the transition of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) to invasive ductal carcinoma (IDC) is regulated by a small number of genes [1]. More than 50% of DCIS evolve to IDC, despite the high variability in time for this progression. Between 11-20% of DCIS are associated with invasive carcinoma when entirely excised, and recurrence in 1-32% of these tumors may occur in invasive form. The main changes in gene expression patterns occur during the transition from normal tissues to DCIS, instead of at the stage when DCIS is progressing to IDC [2]. Pathological characteristics alone have been proven to be insufficient to predict the clinical behavior of DCIS, leaving room to biomolecular markers of tumor malignization potential [3]. However, the molecular mechanisms controlling the transition from DCIS to IDC are still poorly understood.

The major representatives of the molecular markers used to predict prognosis and to plan treatment strategies for DCIS and IDC are the estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors and the erbB-2 protein expression, which are in current clinical use in most cancer treatment centers. This gene is overexpressed in approximately 30% of invasive breast tumors and more than 60% of ductal *in situ* tumors and transcribes a transmembrane glycoprotein - erbB2 – involved in cell growth control. This protein is included in the *EGFR* family (epidermic growth factor receptor) and has tirosine-quinase function [4,5]. Estrogen is one of the most important factors for growth stimulation and cell development in breast cancer. Its receptor is included in the *NR* family (nuclear

receptors). The receptor alpha is overexpressed in more than half of all breast cancers, and almost 70% of them respond to tamoxifen treatment [6-8].

However, many studies have been carried out to address the question as to whether these markers are capable of predicting the invasive potential of DCIS, with disappointing results. For instance, with the exception of the study by Provenzano et al. (2003) [9], most reports concur in that hormone receptor status is not an important prognostic factor in DCIS. The same is true with regards to the expression of the erbB-2 protein, as most studies converge to the fact that it is not a prognostic factor in DCIS independent of standard pathologic parameters [10, 11].

Because of several methodological limitations, however, these studies are far from being conclusive as to how the hormone receptor and erbB-2 status behave within breast tumors that harbor both DCIS and IDC components. Firstly, although some studies suggest that IDC that develops surrounding erbB-2 positive DCIS may not feature a erbB-2 positive status - a finding that has led many investigators to suspect that *ERBB2* gene amplification may not be required for the progression of DCIS to IDC [12], none has examined the expression of these markers at the precise region where the transition from DCIS to IDC occur. Moreover, most of the previous studies analyze separate sets of women with DCIS and IDC, that is, they do not compare the expression of these molecules in DCIS and IDC in the same specimen.

The only study design capable of overcoming the aforementioned difficulties would be identifying DCIS and IDC lying in the same region of surgical breast specimens and determining the expression of the molecules of

interest in these transition areas. Such a study design requires precision techniques of histological sampling, because distant areas of DCIS and IDC, even if collected from the same women, may have emerged from different mutant cell lines. We therefore decided to conduct the present study, in which we sampled contiguous areas of DCIS and IDC. We then determined the expression of ER/PR and erbB-2 at the precise areas where DCIS is turning to IDC, in an attempt to rule out the confounding effects of examining lesions originated from different cell clones or even from women with discrepant epidemiological and genetic backgrounds.

Methods

Study design and selection of the cases

For this cross-sectional study, 107 cases of breast malignancies harboring contiguous regions of DCIS and IDC were selected. The patients had been treated with surgery at the breast cancer clinics of the State University of Campinas, São Paulo, Brazil, from 2004 to late 2006. Clinical and epidemiological characteristics were retrieved from the patients' medical records. We further excluded from the analysis 22 cases because of technical problems in assessing concomitantly the erbB-2 and ER/PR statuses, thereby resulting in a sample size of 85 cases. The study protocol has been fully approved by the institution's ethics review board (CEP #314/2008). Because of the retrospective nature of the study, the obligation to obtain a signed informed consent from the women has been waived.

Determination of the histological areas

The Tissue Microarray technique consisted of paraffin-blocks construction, hereinafter named as “TMA”, from original paraffinized blocks. An arrayer cut of cilindric tissue areas, producing a new block with capacity for up to 1000 tissue sections, can be made depending on the size of the chosen sections. For the present study, hematoxylin and eosin (H&E) slides were produced from the preselected original paraffin blocks with contiguous (transitional) areas of DCIS and IDC. An experienced pathologist used these slides to ascertain the best and most representative areas of DCIS and IDC for TMA analysis. One of the major concerns was that the selected areas must be contiguous. Based on the pathologist's directives, tissue cylinders with 1mm in diameter were acquired from the original tumor blocks and arrayed into a single recipient paraffin block at high density. Sections were obtained from this new block, and then, immunohistochemistry was performed in the new slide.

IHC processing

Sections were deparaffinized with xylol and dehydrated in alcohol series. Washes in hydrogen peroxide were performed, followed by distilled water washes. For antigen retrieval, steam was used and then the slide was immersed in citrate buffer pH 6.0 for 30 minutes. The slide was dried at room temperature and washed in distilled water. After that, the slide was incubated in a moist chamber, with the specific primary antibody at 4°C, overnight (erbB-2: clone

CB11/dilution 1:200, Novocastra; ER: clone 6F11/dilution 1:80, Novocastra; PR: clone PGR312/dilution 1:100, Novocastra). The slide was, then, washed in PBS pH 7.4 – 7.6. As detection system, the slide was incubated in Novolink Max Polymer (Novocastra) at 37°C for 1 hour, and washed in PBS. After, DAB chromogenic substrate (3'-diaminobenzidine, SIGMA, # D5637) was applied, at the proportion 0.06g to 100ml of PBS, 500µl hydrogen 3% peroxide and 1ml dimethylsulfoxide (DMSO) at 37°C for 5 minutes. Finally, the slide was washed in tap water and counterstained with Harris' hematoxylin. After being dehydrated, it was mounted in resin (Entellan®). Internal and external positive and negative controls were used in order to validate the reactions.

IHC analysis

The erbB-2 and ER/PR staining was assessed independently by a single observer, uninformed of the clinical and pathological features of the disease. Two TMA sets of each tumor component were used for each marker, i.e. each tumor area was assessed twice. In *post-hoc* analysis, if scores differed in the two analyses, the stronger staining was considered. Membranous staining was considered for erbB-2 and nuclear staining for ER/PR. erbB-2 staining was graded using a four-stain patterns score: 1) 0 (Negative): no staining or membrane staining in <10% of tumor cells; 2) 1+: faint membrane staining in >10% of tumor cells; 3) 2+: weak/moderate complete membrane staining in >10% of tumor cells and 4) 3+: strong complete membrane staining in >10% of tumor cells [13]. The ER/PR continuous percentage of stained nuclei was further

categorized three ways: 1) negative: less than 10% of stained nuclei; 2) 10% to 50% of stained nuclei and 3) >50% of stained nuclei.

Statistical analysis

All statistical calculations were performed with the R environment for statistical computing [14]. Confidence levels were set to 5% ($p=0.05$). Analysis of covariance (CANOVA) was used to assess the relation between clinical and pathological features of the disease and the erbB-2 and ER/PR scores. The paired t-test was used to compare the expression of erbB-2 and ER/PR in the *in situ* and invasive components of the breast lesions. Finally, intraclass correlation coefficients (ICC) were calculated to assess agreement in the cross tabulation of erbB-2 and ER/PR scores obtained in the *in situ* and invasive regions of the breast tumors.

RESULTS

Our sample consisted of women with mean age of 45 years, 12/85 women with familial history of breast cancer, 33/85 women with small (<2.0) tumors and only 3/85 women with stage IV disease at diagnosis. Most (76/85) tumors were high-grade, and 32/85 of the *in situ* areas were rendered as comedo. Concerning the *in situ* component, approximately 38% of the lesions were classified as “comedo” and 66% were rendered as high nuclear grade. The majority (90%) of the invasive components were assigned as poorly differentiated (histological grade = 3) (Table 1).

Approximately 35% of the invasive areas were 2+ or 3+ erbB-2, compared to 47% of their *in situ* counterparts. However, 25% of the invasive areas expressed 3+ erbB-2, compared to only 19% of the *in situ* samples. While approximately 53% of the invasive regions were negative for ER, only 42% of the *in situ* samples did not express the marker. The majority of the samples in both groups expressed PR in >50% of the cells. The expression of erbB-2 did not differ in the *in situ* and invasive components of the breast tumors ($p=0.12$). The PR status was not statistically different comparing the *in situ* and invasive regions of the tumors ($p=0.06$). By contrast, there was a slight imbalance in ER status ($p=0.04$). Samples with strong expression of ER were 26% in *in situ* areas compared to 22% in the invasive component (Table 2).

The intraclass correlation coefficients (ICC) disclosed good agreement in sample-by-sample comparisons of erbB-2 (ICC = 0.61), PR (ICC= 0.61) and ER

(ICC=0.70) expression in the *in situ* and invasive components. Complete agreement (exactly the same score) was more common at the extremities of the scoring scales, i.e in negative and 3+ samples for erbB-2 and negative and $\geq 50\%$ for hormone receptors. Complete disagreement, i.e. negative expression in one component contrasting to maximum expression in the other, in only 1/85 erbB-2 assessment and as few as 8/85 PR and 2/85 ER samples (Table 3).

DISCUSSION

Our findings suggest that the expression of erbB-2 and ER/PR does not differ across the *in situ* and invasive components of breast malignancies, especially in the transition region from one component to the other. To our knowledge, our study is the first attempt at examining the expression of these markers at the transition region from DCIS to IDC. With this approach, we tried to analyze the physically neighboring regions of the lesions, but with different morphological profiles. It is reasonable to infer that the transition to invasiveness is occurring at these locations, and that the molecular processes that lead to invasion are active there. Combined to the findings of a few previous and methodologically different studies, several implications and theoretical inferences may be derived.

The transmembrane expression of hormone receptors (estrogen and progesterone) and erbB-2 protein are examples of consolidated predictive factors in breast tumors. The role of the lesions' morphological characteristics has been explored to its full potential, and comprehensive classifications of the ductal *in situ* lesions, based upon morphology, are widely used and provide some useful information [6]. *ERBB2* gene amplification in breast cancer has been associated with increased cell proliferation, cell motility, tumor invasiveness, progressive regional and distant metastases, accelerated angiogenesis, and reduced apoptosis [15]. However, there is little information about their action in tumor progression from *in situ* to invasiveness. The

information about hormone receptor status and expression of erbB-2 protein as related to tumor invasiveness is also limited, justifying the present study [15].

Castro and colleagues recently reported results that, in spite of several methodological differences, are in full agreement with our findings. After analyzing the gene expression signatures of epithelial cells isolated by laser capture microdissection, they found that cells derived from DCIS specimens associated with invasive cancer displayed very similar gene signatures compared to cells from the invasive component of the tumor. By contrast, cells isolated from pure DCIS had substantially different gene signatures compared to those isolated from tumors with an invasive component [16]. They proposed two possible explanations for their findings: 1) a small number of genes regulate the transition from DCIS to IDC and 2) the major molecular alterations associated with invasion precede the morphological changes observed through light microscopy. These are sensible explanations to our findings as well, although we may add that, if they are true, we shall expect that the molecular alterations which occur before the morphological invasion persist in the invasive form of the tumor. There are also current lines of evidence suggesting that the morphologic evidence of invasion, at light microscopy, is manifested only after major molecular alterations. These molecular alterations should compound with microenvironmental factors (possibly related to the biological behavior of myoepithelial cells and stromal cells) in order to DCIS evolve to IDC [16]. These microenvironmental factors may explain why some DCIS progress to IDC while other DCIS lesions with similar molecular profiles do not, which supports the hypothesis of a multifactorial background for the disease progression.

Importantly, neither Castro's nor our study answered the question as to whether erbB-2 is, in fact, involved in the acquisition of the invasiveness capacity by the epithelial lesions. Both studies just provide the information that DCIS and invasive components of a given breast lesion have similar molecular profiles. Another large study display results that are in alignment to ours. Park and cols. [12] after analyzing 50 cases of pure DCIS and 270 cases of IDC with intraductal and invasive components detected that the erbB-2 gene was amplified in 50% of DCIS and 30% of IDC with intraductal components, which is in agreement with previous studies [11; 17-19]. However, their most relevant finding was that the erbB-2 expression in the intraductal component of IDC was similar to that of the associated invasive component. They acknowledge that these results might be hampered by the small sample of pure DCIS compared to IDC.

The association of erbB-2 positive status with specific pathologic conditions of the breast has been studied to a large extent during the last decade. erbB-2 overexpression has been consistently associated with higher grades and extensive form of DCIS and DCIS displaying comedo-type necrosis [20-23]. The prevalence of erbB-2 positivity has ranged 24%-38%, slightly higher than that for invasive cancer. We detected the same trend, as 2+ and 3+ erbB-2 expression was 34% and 47% for IDC and DCIS, respectively, in our sample. It is important to mention that the higher proportion of erbB-2 positivity in our sample compared to that reported in other studies may be due to the clinical and epidemiological features of our sample, in which a large number of high-grade and advanced cases could be found. The large number of advanced cases is

probably a consequence of the inadequate efficacy of the Brazilian public health system screening strategy.

Some of the methodological aspects of our study must be discussed. The protein expression identification with immunohistochemistry technique can be safely applied in combination with the *Tissue Microarray* (TMA) technique, which was first described by Kononen et al, in 1998 [24]. High sensibility and specificity to new immunohistochemistry antibodies evaluation, comparing different clones; reaction uniformity when many samples are to be performed and economy in reagent and time are some of the advantages in using TMA technique [25]. Although some uncertainties have been raised about using TMA rather than conventional histological sections, studies have suggested that there is more than 95% concordance rate between the both techniques in expression of ERBB-2 protein and ER/PR receptors analysis. In our case, the TMA technique allowed precision sampling of the transition areas from DCIS to IDC.

In essence, our findings corroborate the assumption that neither erbB-2 status nor the ER/PR expressions play a relevant role in the progression from DCIS to IDC. The *in situ* and invasive components of breast tumors have been shown before to display similar molecular profiles. Our study, as the first attempt focusing its analysis on the transition from one component to the other, examines a tumor region where important steps of the carcinogenic process occur.

Acknowledgements: This study was partially funded by the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (Fapesp), grant 2008/08536-9.

REFERENCES

1. Schnitt SJ. The transition from ductal carcinoma *in situ* to invasive breast cancer: the other side of the coin. Breast Cancer Research 2009;11(1): Epub ahead of print.
2. Wiechmann L, Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. Cancer. 2008 May 15;112(10):2130-42. Review.
3. Skinner KA, Silverstein MJ. The management of ductal carcinoma in situ of the breast. Endocr Rel Cancer 2001;8:33-45.
4. Nibs & Mabs. Drogas de Alvo Molecular na Oncologia e Hematologia. [on-line] 2008 [acessado em 06/09/2008]. Disponível em: <http://www.nibsemabs.com.br/bases.asp?id=1>
5. Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of ERBB-2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. Mod Pathol. 2002 Dec;15(12):1318-25.
6. Hussein MR, Abd-Elwahed SR, Abdulwahed AR. Alterations of estrogen receptors, progesterone receptors and c-erbB2 oncogene protein expression in ductal carcinomas of the breast. Cell Biol Int. 2008 Jun;32(6):698-707. Epub 2008 Jan 25.
7. Nassif MC, Cimarosti HI, Zamin LL, Salbego CG. Estrógeno versus isquemia cerebral: hormônio feminino como agente neuroprotetor. Infarma. 2005;4 (17):57-60.

8. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007 Jul;87(3):905-31. Review.
9. Provenzano E, Hopper JL, Giles GG, Marr G, Venter DJ, Armes JE. Biological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur J Cancer.* 2003 Mar;39(5):622-30.
10. Wärnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg L. Tumour markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. *Br J Cancer.* 2001 Sep 14;85(6):869-74.
11. Cornfield DB, Palazzo JP, Schwartz GF, Goonewardene SA, Kovatich AJ, Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ et al. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and in situ breast cancer. *Int. J. Cancer* 1988; 42; 842-845.
12. Park K, Han S, Kim HJ, et al. ERBB-2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 2006;48:702-707.
13. Tokatli F, Altaner S, Uzal C, Ture M, Kocak Z, Uygun K, et al. Association of HER-2/neu overexpression with the number of involved axillary lymph nodes in hormone receptor positive breast cancer patients. *Exp Oncol* 2005;27(2):145-149.

14. R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, last access 20th April, 2009
15. Moasner MM. The oncogene ERBB-2. Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007;26:6469-6487.
16. Castro NP, Osorio CABT, Torres C, Bastos EP, Mourão-Neto M, Soares FA, Brentani HP, Carraro DM. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Research* 2008;10:R87.
17. Soomro S, Shousha S, Taylor P, Shepard HM, Feldmann M. c-erbB-2 expression in different histological types of invasive breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1991; 44; 211–214.
18. Sommerville JE, Clarke LA, Biggart JD. c-erbB-2 overexpression and histological type of in situ and invasive breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45; 16–20.
19. Iglehart JD, Kerns BJ, Huper G, Marks JR. Maintenance of DNA content and erbB-2 alterations in intraductal and invasive phase of mammary cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1995; 34;253–263. Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. *J Bras Patol Med Lab.* 2007 Fev; 43(1):55-60.

20. Bose S, Lesser ML, Norton L et al. Immunophenotype of intraductal carcinoma. Arch Pathol Lab Med 1996;120:81-85.
21. Moreno A, Lloveras B, Figueras A et al. Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histologic classifications and biologic markers. Mod Pathol 1997;10:1088-1092.
22. Mack L, Kerkvliet N, Doig G et al. Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma in situ of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erb B2, bcl-2, and ki-67. Hum Pathol 1997;28:974-979.
23. Meijnen P, Peterse JL, Antonini N et al. Immunohistochemical categorization of ductal carcinoma in situ of the breast. Br J Cancer 2008;98:137-142.
24. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med. 1998 Jul;4(7):844-7.
25. Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. J Bras Patol Med Lab. 2007 Fev; 43(1):55-60.

Table 1 – Key clinical features of the women and pathological characteristics of the breast lesions

Characteristic	n	%
Age		
<54	46	54
≥54	39	46
Family history		
Yes	12	14
No	73	86
Status of the axilla		
Negative	36	42
1-2 LN	23	27
3+	26	16
Tumor size		
<2.0 cm	33	39
2.0 to 5.0 cm	33	39
>5.0 cm	19	22
Disease stage		
I	20	23
II	26	30
III	36	42
IV	3	4
<i>In situ component</i>		
Comedo		
No	53	62
Yes	32	38
Nuclear grade		
1	2	2
2	27	32
3	56	66
<i>Invasive component</i>		
Histological grade		
1	2	2
2	7	8
3	76	90

Table 2 – Expression of erbB-2 and hormone receptors in the *in situ* and invasive components of the breast lesions

	Component				p
	<i>In situ</i>		invasive		
	n	%	n	%	
ERBB-2					
Negative	20	24	28	33	0.12
1+	25	29	28	33	
2+	24	28	8	9	
3+	16	19	21	25	
Progesterone receptor					
Negative	28	33	20	24	0.06
<50%	11	13	14	16	
≥50%	46	54	51	60	
Estrogen receptor					
Negative	36	42	45	53	0.04
<50%	27	32	21	25	
≥50%	22	26	19	22	

Table 3 – Cross-tabulation of the expression of erbB-2 and ER/PR in the *in situ* and invasive components of the breast lesions

<i>In situ</i>	Invasive				
ERB B2	Negative	1+	2+	3+	ICC
Negative	13	5	1	1	0.61
1+	9	10	2	4	
2+	6	13	5	0	
3+	0	0	0	16	
PR	Negative	<50%	≥50%		
Negative	16	5	7		0.62
<50%	3	3	5		
≥50%	1	6	39		
ER	Negative	<50%	≥50%		
Negative	31	5	0		0.70
<50%	12	11	4		
≥50%	2	5	15		

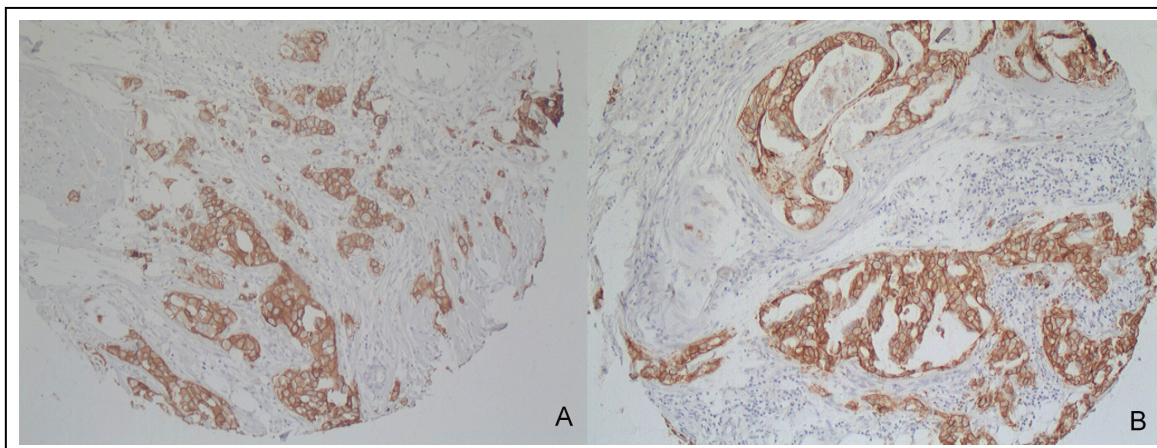


Figure 1 – Agreeing 3+ expression of erbB-2 in the in situ (A) and invasive (B) components of a breast tumor (X100)

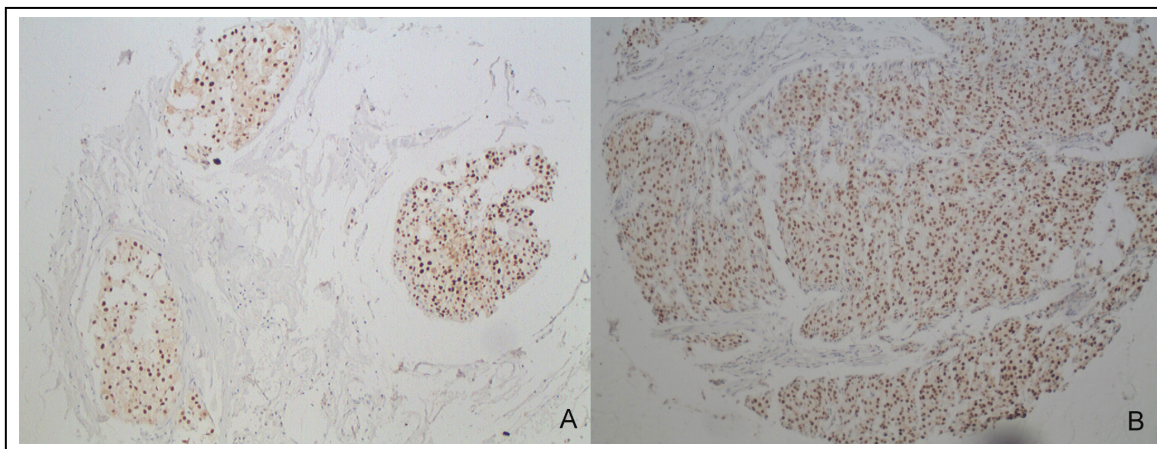


Figure 2 – Agreeing >50% expression of ER in the in situ (A) and invasive (B) components of a breast tumor (X100)

4. Conclusões

- A expressão 2+ ou 3+ da proteína erbB-2 foi de 46% e 34%, respectivamente, nas regiões *in situ* e invasiva.
- Dentre as características clinico-patológicas avaliadas, apenas a presença de três ou mais linfonodos axilares comprometidos esteve associada a maior expressão de erbB-2 na porção invasora do tumor.
- A expressão de erbB-2 e dos receptores hormonais foi semelhante nas porções *in situ* e invasora dos tumores de mama.

5. Referências Bibliográficas

1. Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa de incidência de câncer no Brasil para 2008. [on-line] 2008 [acessado em 02/09/2008]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.
2. Lee A, Park WC, Yim HW, Lee MA, Park G, Lee KY. Expression of c-erbB2, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. Jpn J Clin Oncol. 2007;37(9):708-14.
3. Wiechmann L, Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. Cancer. 2008;112(10):2130-42. Review.
4. Hussein MR, Abd-Elwahed SR, Abdulwahed AR. Alterations of estrogen receptors, progesterone receptors and c-erbB2 oncogene protein expression in ductal carcinomas of the breast. Cell Biol Int. 2008 Jun;32(6):698-707. Epub. 2008; Jan 25.

5. Nibs & Mabs. Drogas de Alvo Molecular na Oncologia e Hematologia. [online] 2008 [acessado em 06/09/2008]. Disponível em :
<http://www.nibsemabs.com.br/bases.asp?id=1>
6. Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of ERBB-2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol*. 2002;15(12):1318-25.
7. Nassif MC, Cimarosti HI, Zamin LL, Salbego CG. Estrógeno versus isquemia cerebral: hormônio feminino como agente neuroprotetor. *Infarma*. 2005;4(17):57-60.
8. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007;87(3):905-31. Review.
9. Yeh I, Mies C. Application of immunohistochemistry to breast lesions. *Arch Pathol Lab Med*. 2008; 132: 349-58.
10. Wärnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg L. Tumour markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. *Br J Cancer*. 2001. Sep 14;85(6):869-74.

11. Menezes MVM, Cestari ALO, Almeida O, Alvarenga M, Pinto GA, Gurgel MSC et al. Protein expression of c-erbB-2 and p53 in normal ducts, ductal carcinoma *in situ* and invasive carcinoma of the same breast. Sao Paulo Med J. 2006;124(3):121-4.
12. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med. 1998;4(7):844-7.
13. Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS et al. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43(1):55-60.
14. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. Lab Invest. 2000;80(12):1943-9.

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Cartas de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 21/11/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 705/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0503.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INSTABILIDADE GENÔMICA EM NEOPLASIAS MALIGNAS DA MAMA EM FUNÇÃO DA PRESENÇA DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO E DA CONCENTRAÇÃO DE ALUMÍNIO INTRACELULAR”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Mary Rodrigues

INSTITUIÇÃO: CAISM / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 02/10/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/10/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Determinar a instabilidade dos genes C-MYC e ERBB2 no tecido tumoral da mama e suas relações com o receptor de estrógeno e a presença de alumínio intracelular.

III - SUMÁRIO

Será um estudo de corte transversal, com tamanho amostral de 67 casos. O material será coletado de mulheres aguardando cirurgia para retirada de neoplasias malignas da mama, na enfermaria de Oncologia Ginecológica e Patologia Mamária do CAISM-UNICAMP. Após seu aceite em participar da pesquisa, o material extirpado será encaminhado para realização de exames de rotina e retirada de fragmento para a pesquisa de receptores de estrogênio por imunohistoquímica, determinação da presença e quantidade de alumínio intracelular por coloração específica e espectrometria de absorção atômica e da instabilidade genômica do C-MYC e ERBB2 pela técnica de FISH. A análise preliminar bivariada constará do cálculo de qui-quadrados para avaliar a associação de instabilidade genômica para cada um dos genes em estudo em relação à presença e quantidade de alumínio intracelular (nuclear, citoplasmático ou de membrana). A seguir, serão elaborados modelos de regressão logística, a fim de avaliar a associação da presença de alumínio com cada uma das instabilidades genômicas em estudo e levando-se em conta a participação das variáveis de controle. O nível de significância assumido será de 5% ($p \leq 0,05$ e intervalos de confiança de 95%).

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS/MS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2.007.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 26/11/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 087/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0063.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA COX-2 EM CARCINOMAS DE MAMA DUCTAIS INVASOR E IN SITU E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE HER2, MUTAÇÃO P53 E RECEPTORES DE ESTRÓGENO E DE PROGESTERONA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Kátia Pítton Serra / Sophie F. M. Derchain (orientadora).

INSTITUIÇÃO: CAISM / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 04/03/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/03/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a expressão da COX-2 em peças de mastectomia e quadrantectomia de mulheres com carcinoma ductal Invasor, associado a carcinoma ductal *in situ* de mama e sua relação com a expressão do HER2, da mutação p53 e dos receptores de estrógeno e progesterona.

III - SUMÁRIO

Serão incluídos os blocos de parafina de 96 mulheres com carcinoma ductal invasivo associado a carcinoma *in situ*. A avaliação da expressão da COX-2, p53, HER2 e receptores de estrogênio e progesterona será realizada por imunohistoquímica. Será aplicado modelo de regressão logística, ajustado para as categorias patológicas, para avaliar uma possível relação entre carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasor de mama e a expressão de COX-2. Um modelo linear generalizado, também ajustado para a avaliação patológica, será utilizado para determinar correlações possíveis entre a expressão de p53, HER2, RE e Rpg e a expressão da proteína COX-2.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um projeto de mestrado que aborda assunto de relevância dentro do tema escolhido. O projeto apresenta-se bem redigido, com metodologia atualizada, englobando publicações recentes em imunohistoquímica. Os critérios de inclusão, exclusão estão bem definidos; cálculo do tamanho amostral e análise estatística muito são pertinentes ao estudo. Os aspectos éticos estão abordados de forma clara, o estudo em questão não acarretará riscos e não implicarão em quaisquer modificações no tratamento da doença. O orçamento é detalhado e apresenta a mais nova aquisição de reveladores de alta sensibilidade em imunohistoquímica.



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de março de 2008.

Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

6.2. Anexo 2 – Complementação técnica

Nesta seção serão descritos os aspectos técnicos não contemplados no artigo original, facilitando seu entendimento.

Os casos incluídos neste trabalho foram selecionados de pacientes atendidas na área de Oncologia Ginecológica e Patologia Mamária do CAISM/UNICAMP, entre janeiro de 2004 a dezembro de 2006, em um total aproximado de 900 casos. Foram revistos todos os laudos dos casos de carcinoma da mama do período, que apresentaram concomitância de componente *in situ* e invasivo na mesma peça cirúrgica, confirmada pelo laudo anátomo-patológico, em um total de 165 casos. Destes, foram selecionados 107 casos em que os componentes de interesse estavam preservados e disponíveis no bloco histológico de arquivo e de onde seria possível retirar um fragmento para a montagem de um TMA do componente *in situ* e um TMA do componente invasivo.

Para a montagem do TMA, os fragmentos foram analisados, novamente, por um patologista que delimitou as áreas selecionadas de DCIS e IDC para serem dissecadas do bloco original e apostas no TMA. Por se tratar de uma técnica recente e ainda não disponível em todos os laboratórios de rotina, a montagem do TMA foi realizada no Centro de Pesquisa do Hospital do Câncer – AC Camargo, em São Paulo. O bloco do TMA, após preparado, foi submetido a cortes seriados e estes foram aplicados a lâminas adesivadas, para a preservação da integridade dos fragmentos apostos no bloco. As lâminas de

TMA foram submetidas às técnicas de imunohistoquímica convencional para as proteínas erbB-2, ER e PR, como descrito no artigo original. Dos 107 casos no TMA, 85 apresentaram coloração para as três proteínas de interesse, sendo, desta forma, incluídos no estudo, constituindo a amostra final.

Este estudo faz parte de um projeto de pesquisa que tem por objetivo avaliar outros marcadores moleculares dos tumores da mama, além dos já apresentados nesta dissertação, além da avaliação de genes envolvidos na progressão desses tumores nas regiões de transição *in situ* para invasivas. Por esse motivo, foram anexadas duas cartas de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, que dizem respeito ao projeto como um todo. Vale ressaltar que esta dissertação apenas contempla uma parte do projeto proposto, e outros estudos já estão sendo conduzidos completando as análises propostas pelo grupo, com financiamento recém aprovado pela FAPESP (processo 2008/08536-9).