

**ORLANDO JOSÉ DE ALMEIDA**

---

---

**HIPÓTESES SOBRE A EVOLUÇÃO DO CARCINOMA  
DUCTAL *IN SITU* DA MAMA COM BASE NAS  
EXPRESSÕES DAS PROTEÍNAS BCL-2, C-ERBB-2,  
P53 E NOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO**

---

---

**Tese de Doutorado**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO**

**UNICAMP  
2003**

**ORLANDO JOSÉ DE ALMEIDA**

---

---

**HIPÓTESES SOBRE A EVOLUÇÃO DO CARCINOMA  
DUCTAL *IN SITU* DA MAMA COM BASE NAS  
EXPRESSÕES DAS PROTEÍNAS BCL-2, C-ERBB-2,  
P53 E NOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO**

---

---

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

**ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO**

**UNICAMP  
2003**

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

A164h Almeida, Orlando José de  
Hipóteses sobre a evolução do carcinoma  
ductal *in situ* da mama com base nas expressões  
das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53 e nos  
receptores de estrógeno. / Orlando José de  
Almeida. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador :Luiz Carlos Zeferino  
Tese ( Doutorado) Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mama - câncer. 2. \*Receptores  
estrogênicos. I. Luiz Carlos Zeferino. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas. III. Título.

## **BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluno: ORLANDO JOSÉ DE ALMEIDA**

---

**Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO**

---

### **Membros:**

1.

2.

3.

4.

5.

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

**Data: 25/07/2003**

## *Dedico este trabalho...*

*...à minha amada esposa Cristiane,  
pelo seu amor e incentivo,  
e à nossa filhinha Laura.*

*... aos meus pais, Umberto e Dóris, e a toda a família,  
que são uma benção em minha vida.*

*... ao nosso DEUS  
para quem entrego a minha vida e da minha família,  
e a quem tanto devo.*

# Agradecimentos

---

*Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino pela sua amizade e orientação. Minha gratidão pelo enorme incentivo e disposição em todos os momentos.*

*Ao Prof. Dr. Marcelo Alvarenga pelo seu apoio pessoal e profissional.*

*Ao Prof. Dr. Gustavo de Souza pelo seu auxílio e estímulo.*

*À Gláucia, à Marisa, ao Cris e a todo o pessoal do Laboratório de Patologia Experimental.*

*Aos estatísticos Edson e Gislaine.*

*Aos amigos da ASTEC.*

*À secretária Márcia e à acadêmica Ana Letícia.*

*Aos membros da banca examinadora.*

**... mas os que confiam no Deus Eterno  
recebem sempre novas forças. Voam nas  
alturas como águias, correm e não perdem  
as forças, andam e não se cansam.**

Isaías 40:31

**... porém eu e minha família  
serviremos ao Deus Eterno.**

Josué 24:15

# Sumário

---

Símbolos, Siglas e Abreviaturas .....	viii
Lista de Tabelas .....	ix
Resumo.....	xi
Summary.....	xiii
1. Introdução .....	15
2. Objetivos.....	30
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
3. Sujeitos e Métodos .....	32
3.1. Desenho do estudo .....	32
3.2. Tamanho amostral .....	32
3.3. Seleção de sujeitos .....	33
3.3.1. Critérios de inclusão.....	33
3.3.2. Critérios de exclusão.....	33
3.4. Variáveis e conceitos .....	34
3.4.1. Variáveis.....	34
3.4.2. Conceitos .....	34
3.5. Técnicas, testes e exames.....	38
3.6. Coleta de dados .....	43
3.7. Análise dos dados .....	43
3.8. Aspectos Éticos.....	44
4. Resultados .....	45
5. Discussão.....	61
6. Conclusões .....	74
7. Referências Bibliográficas.....	76
8. Bibliografia de Normatizações .....	90
9. Anexos.....	91
9.1. Anexo 1 .....	91
9.2. Anexo 2 .....	92
9.3. Anexo 3 .....	93
9.4. Anexo 4 .....	94
9.5. Anexo 5 .....	95

# Símbolos, Siglas e Abreviaturas

---

<b>Bcl-2</b>	Gene <i>B-cell lymphoma/leukemia-2</i>
<b>bcl-2</b>	Proteína do gene Bcl-2
<b>C°</b>	Graus Celsius
<b>c-erbB-2</b>	Proteína do gene HER-2
<b>CAISM</b>	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<b>CDIS</b>	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
<b>cm</b>	Centímetro(s)
<b>FCM</b>	Faculdade de Ciências Médicas
<b>GD</b>	Grau de diferenciação
<b>GN</b>	Grau nuclear
<b>HER-2</b>	Gene <i>human epidermal growth factor receptor-2</i>
<b>IC 95%</b>	Intervalo de confiança de 95%
<b>IPC</b>	Instituto de Patologia Campinas
<b>μl</b>	Microlitro(s)
<b>ml</b>	Mililitro(s)
<b>N</b>	Número
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>%</b>	Porcentagem
<b>P53</b>	Gene que codifica fosfoproteína de 53kDa
<b>p53</b>	Proteína do gene P53
<b>RE</b>	Receptores de estrógeno
<b>Unicamp</b>	Universidade Estadual de Campinas

# Lista de Tabelas

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Distribuição do estado de menopausa, dos RE e do GN segundo o tipo de carcinoma.....	46
<b>Tabela 2.</b> Associação entre o tipo de carcinoma e a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53.....	47
<b>Tabela 3.</b> Associação entre bcl-2 e c-erbB-2 segundo o tipo de carcinoma.....	48
<b>Tabela 4.</b> Associação entre RE e c-erbB-2 segundo o tipo de carcinoma.....	49
<b>Tabela 5.</b> Associação entre a expressão da proteína bcl-2 nos tipos de carcinoma e RE, estado de menopausa e aspectos morfológicos (GD e GN).....	50
<b>Tabela 6.</b> Associação entre a expressão da proteína c-erbB-2 nos tipos de carcinoma e RE, estado de menopausa e aspectos morfológicos (GD e GN).....	51
<b>Tabela 7.</b> Associação entre a expressão da proteína p53 nos tipos de carcinoma e RE, estado de menopausa e aspectos morfológicos (GD e GN).....	52
<b>Tabela 8.</b> Concordância entre a expressão da proteína bcl-2 no CDIS misto e carcinoma invasivo misto.....	53
<b>Tabela 9.</b> Concordância entre a expressão da proteína c-erbB-2 no CDIS misto e carcinoma invasivo misto.....	53
<b>Tabela 10.</b> Concordância entre a expressão da proteína p53 no CDIS misto e carcinoma invasivo misto.....	53

<b>Tabela 11.</b> Concordância entre a expressão dos RE no CDIS misto e carcinoma invasivo misto.....	54
<b>Tabela 12.</b> Concordância entre GN no CDIS misto e carcinoma invasivo misto.....	54
<b>Tabela 13.</b> Análise da associação entre as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2 p53 e RE no CDIS puro e carcinoma invasivo puro.....	55
<b>Tabela 14.</b> Associação entre as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53, dos RE, do estado de menopausa, do GN e do tipo comedocarcinoma nos CDIS misto e puro.....	56
<b>Tabela 15.</b> Associação entre a expressão das proteínas bcl-2 e c-erbB-2 no CDIS puro.....	57
<b>Tabela 16.</b> Associação entre estado dos RE e a expressão da proteína c-erbB-2 no CDIS puro...	58
<b>Tabela 17.</b> Associação entre as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53, dos RE, do estado de menopausa, do GN e do GD nos carcinomas invasivos puro e misto..	58
<b>Tabela 18.</b> Distribuição das expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, dos RE e do estado de menopausa no tipo comedocarcinoma.....	59
<b>Tabela 19.</b> Associação entre o GN dos tipos de carcinoma com as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, dos RE e do estado de menopausa.....	60

# Resumo

---

O objetivo deste estudo foi analisar o potencial evolutivo do carcinoma ductal *in situ* da mama para carcinoma invasivo em função da expressão das proteínas dos genes Bcl-2, C-erbB-2 e P53, da presença de receptores de estrógeno, de características morfológicas e do estado de menopausa. Para tanto realizou-se estudo do tipo descritivo analítico com 109 mulheres, baseando-se em erro tipo I de 0,05 e de tipo II de 0,20. Formaram-se dois grupos de mulheres selecionadas consecutivamente, um com 53 carcinomas ductais *in situ* e outro com 56 carcinomas invasivos estágio I. Para avaliar as associações entre as expressões das proteínas e dessas com os receptores de estrógeno, grau nuclear, grau de diferenciação, tipo comedocarcinoma e estado de menopausa utilizou-se o *odds ratio*. No grupo de carcinoma ductal *in situ* houve associação da expressão da proteína bcl-2 com positividade para receptores de estrógeno, graus nucleares 1 e 2 e tipos não-comedocarcinomas. Nesse mesmo grupo observou-se associação entre a expressão da proteína c-erbB-2 com negatividade para receptores de estrógeno, grau nuclear 3 e tipo comedocarcinoma. No grupo de carcinoma invasivo a expressão da proteína bcl-2 associou-se com receptores de estrógeno positivo,

graus nucleares 1 e 2 e graus de diferenciação I e II. Nesse grupo a expressão da c-erbB-2 associou-se a RE negativo, ao grau nuclear 3 e ao grau de diferenciação III. Somente houve associação entre a expressão da proteína p53 e grau nuclear 3 e grau de diferenciação III no grupo de carcinoma invasivo. Além disso, 38 dos carcinomas invasivos possuíam componente *in situ* associado. O componente *in situ* desses casos foi mais bcl-2 positivo e dos tipos não-comedocarcinomas do que os carcinomas ductais *in situ* puros. O componente invasivo foi mais c-erbB-2 positivo do que os carcinomas invasivos puros. Observou-se, ainda, concordância quase perfeita ou perfeita entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, dos receptores de estrógeno e do grau nuclear nos dois componentes do mesmo tumor. Esses resultados indicam que os carcinomas ductais *in situ* com maior potencial para invasão seriam os receptores de estrógeno e bcl-2 positivos e do tipo não-comedocarcinoma.

# Summary

---

The aim of this study was to evaluate the progression on invasiveness from breast ductal carcinoma in situ (DCIS) to invasive carcinoma based on the expression of some cell biological factors [bcl-2, c-erbB-2 and p53 proteins, estrogen receptors (RE)], histopathological features (nuclear grade, histological grade and comedocarcinoma type) and menopausal status. Association within cell biological factors, between cell biological factors and histopathological parameters and menopausal status were done using odds ratio and logistic regression. We investigated two groups of women; the first with 53 DCIS and the second with 56 invasive carcinomas stage I ( $\leq 2,0$  centimeters). The group of DCIS showed associations between overexpression of bcl-2 and ER positivity, nuclear grade 1 and 2 and non-comedocarcinoma. In this group there were associations between expression of c-erbB-2 and ER negativity, nuclear grade 3 and comedocarcinoma. The group of invasive carcinoma showed that the expression of bcl-2 was positively associated with ER positive, nuclear grade 1 and 2 and with histological grade I and II. This group also showed associations between overexpression of c-erbB-2 and ER negativity, nuclear grade 3 and histological grade III. The

expression of p53 was only associated with nuclear grade 3 and histological grade III in the invasive carcinoma group. In the invasive carcinoma group there were 38 cases that contained both elements, in situ and invasive ones. Expression of bcl-2 protein and non-comedocarcinoma were more frequently seen in the in situ element than in the pure DCIS. Expression of c-erbB-2 was more frequent in the invasive element than in pure invasive carcinoma. There was high concordance in the expressions of bcl-2, c-erbB-2, p53 proteins, RE and nuclear grade between in situ and invasive elements of the same tumor. Our results suggested that a group of DCIS patients with a high probability of progression to invasiveness are those whose tumors overexpress bcl-2 and ER positive, with non-comedocarcinoma types.

# 1. Introdução

---

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais freqüente entre as mulheres brasileiras e a que provoca mais óbitos. Estimativas para o ano de 2003, no Brasil, são de cerca de quarenta e um mil casos novos e de nove mil e cem óbitos pela doença (BRASIL, 2003).

Neste país existe ainda predomínio de casos de câncer mamário diagnosticados em estádios mais avançados, porém com a maior oferta de mamografias e com a sua introdução como método de rastreamento tem ocorrido aumento no diagnóstico de casos iniciais. Grande parte dos carcinomas *in situ* da mama não era diagnosticada, no passado, pela falta de um teste com capacidade de descobri-los precocemente. Com o advento da mamografia, um porcentual maior de casos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) tem sido descoberto na forma assintomática, apenas com alterações no exame radiológico.

Cerca de 20% dos casos de câncer mamário em países desenvolvidos, que têm programas de rastreamento populacional, são *in situ* e, na próxima década,

poderão ocorrer em até 1/3 do total (CADY et al., 1996; ENG-HEN et al., 1998; SCHWARTZ, 2000).

Os casos de CDIS, no passado, eram pouco diagnosticados e quase que somente na sua forma sintomática, manifestando-se como um nódulo mamário, descarga papilar ou doença de Paget do mamilo (HUGHES et al., 1996). Esses casos eram, provavelmente, aqueles que tinham se desenvolvido por um longo tempo como tumores não invasivos de baixa agressividade, tornando-se sintomáticos após um certo tempo.

Os carcinomas não-invasivos, ou *in situ*, são a forma de neoplasia maligna mais precoce, cujo tratamento adequado resulta em excelente sobrevida global e livre de doença. Na mama são, geralmente, carcinomas que podem surgir de duas formas diversas, segundo suas características histológicas: ductal e lobular. O carcinoma lobular *in situ* é diagnosticado acidentalmente, já que não possui uma forma de apresentação clínica característica, e é considerado marcador de risco para câncer invasivo, não necessitando de terapêutica específica.

O CDIS pode ser classificado em comedocarcinoma e não-comedocarcinoma (cribiforme, micropapilífero, sólido e intracístico), de acordo com a sua morfologia na avaliação histológica. O comedocarcinoma tem características anatomoclínicas próprias, diferindo dos demais CDIS, geralmente apresentando-se com maior extensão e com porcentual de recidiva local mais elevado. Os não-comedocarcinomas em geral têm menor dimensão e recidivam com menos frequência (CARVALHO, 1995; PAGE e LAGIOS, 1995; SOUZA e ALVARENGA, 2002).

A história natural do carcinoma da mama ainda é pouco conhecida, diferente de outras neoplasias, especialmente no que se refere à progressão da doença *in situ* para a invasiva. Assim, seria possível distinguir três formas distintas de apresentação dos carcinomas mamários: os CDIS puros, os carcinomas invasivos associados ao CDIS e os invasivos puros. O diferente comportamento biológico do carcinoma da mama ocorre, muito provavelmente, devido a diferentes alterações genéticas existentes nos clones das células neoplásicas (GUPTA et al., 1997).

Apenas uma parte dos casos de CDIS evolui para carcinoma invasivo, outros talvez se estabilizem nessa forma ou regredam. PAGE et al. (1982), e EUSEBI et al. (1994), mostraram que 20% a 28% do total de casos de CDIS submetidos somente à biópsia cirúrgica, sem nenhum tipo de tratamento complementar, recidivam como carcinoma invasivo após 17 anos. LAGIOS et al. (1989), encontraram taxa de recidiva local de 19%, após ressecção cirúrgica com margens negativas, para o CDIS do tipo comedocarcinoma, e também que o grau nuclear parece estar associado com a frequência da recidiva local. O risco relativo para um carcinoma invasor após um CDIS é de 4,5 (IC 95%= 3,7-5,5) (WÄRNBERG et al., 2000). Deve-se compreender que o CDIS é uma entidade complexa representada por um grupo heterogêneo de lesões, com diversos potenciais de malignidade (PAGE e JAPAZE, 1994; SKINER e SILVERSTEIN, 2001).

Em teoria, o processo de transformação neoplásica inicia-se a partir do epitélio glandular normal que se transforma em hiperplásico. Parte ou todo o epitélio hiperplásico pode evoluir para carcinoma *in situ* e parte pode permanecer como tal ou até regredir. Se evoluir para carcinoma *in situ*, é possível que assim

permaneça ou que em algum local desse epitélio haja invasão. Para que um epitélio que já possui várias características citomorfológicas de neoplasia maligna adquira a competência para transpor a membrana basal, provavelmente passará por modificações genéticas estruturais e funcionais.

A população celular de determinado tecido, normal ou neoplásico, depende do balanço dinâmico entre a proliferação e a apoptose. O processo de proliferação celular depende da replicação do DNA e da divisão da célula. O ciclo celular é composto pelas seguintes fases: G1 (*gap* 1 ou primeiro intervalo), S (síntese), G2 (*gap* 2 ou segundo intervalo) e M (mitose). Na fase G1, que dura cerca de oito horas, ocorre acúmulo de substratos no citoplasma, necessários para a síntese de DNA. Durante essa fase, as células podem progredir no ciclo celular ou entrar em estado de repouso (G0), que pode acontecer na privação de fatores de crescimento. Na fase S ocorre a replicação do DNA, em intervalo de oito horas. Na fase G2, com cerca de quatro horas, há armazenamento de substratos necessários para a mitose. Na mitose dá-se a condensação dos cromossomos que se distribuem de forma a garantir a separação das cromátides irmãs, duplicadas durante a fase S, igualmente entre as células filhas (REHEN, 2001).

O ciclo celular pode ser desencadeado quando fatores de crescimento ligam-se a receptores da membrana, que são produzidos por protooncogenes, que controlam a proliferação celular. Entre os receptores de fatores de crescimento, a família *epidermal growth factor* (EGF) tem grande destaque, da qual faz parte o receptor codificado pelo protooncogene ERB-B2. A progressão do ciclo celular é regulada pela expressão coordenada e pela interação entre as ciclinas (proteínas

ativadoras) e as quinases dependentes da ciclina (CDK), que são proteínas reguladoras. Após a ligação do fator de crescimento ao receptor de membrana, acontece a ativação da tirosina-quinase citoplasmática, com fosforilação em cascata até o seu objetivo final, que é a ativação de fatores nucleares que controlam a transcrição do DNA e a divisão celular (COMOGLIO e BOCACCIO, 1997).

No decorrer do ciclo celular podem haver paradas em todas as fases, os chamados pontos de verificação ou de checagem. Nos pontos de verificação o ciclo pode ser atrasado ou interrompido, até que se estabeleçam as condições necessárias para a progressão. A interrupção do ciclo celular pode ocorrer devido à falta de sinais apropriados para a sua progressão, como mudanças no ambiente celular (diminuição dos nutrientes, sinalização por mitógenos, contato célula-célula) ou sinais intrínsecos (dano ao DNA). Uma das proteínas mais importantes nesse processo é a produzida pelo gene P53, que aumenta seus níveis intracelulares quando ocorrem lesões no DNA, provocando a interrupção do ciclo em G1, com tempo extra para o seu reparo (KERR et al., 1994; SODDU e SACCHI, 1997; REHEN, 2001).

Outro processo importante no controle da população celular, que possui papel oposto ao da mitose, é a apoptose, que é a morte celular programada. Esta pode ser induzida por diversos fatores como radiação, drogas, agentes oxidantes, vírus, hipóxia, choque térmico e outros. A apoptose resulta de inúmeros eventos que desencadeiam alterações celulares estruturais. Entre os mecanismos de apoptose, aquele mediado pelos genes da família BCL-2 é fundamental, principalmente os genes Bcl-2 e Bax. Esses são regulados por citoquinas e por outras substâncias que participam dos mecanismos de sobrevivência e de morte celular, como a proteína

p53, que induz a apoptose modulando esses genes, diminuindo a expressão do Bcl-2 e induzindo a expressão do Bax. A proporção entre as proteínas dos genes Bcl-2 e Bax dita a sensibilidade ou resistência das células a diversos estímulos apoptóticos. Os genes da família BCL-2 controlam a liberação de fatores pró-apoptóticos pelas mitocôndrias, como o citocromo-c. Esse age ativando a apaf-1, um cofator protéico, e formando complexos com as pré-caspases, com ativação das caspases, em especial da via caspase-9. As caspases fazem parte de um grupo de proteases homólogas que participam na execução da apoptose, provocando fragmentação e alteração na estrutura de certas proteínas-alvo. Esse processo origina mudanças nas funções dessas proteínas, podendo causar, entre outras, fragmentação do DNA e ruptura do núcleo (REED, 1998; HENGARTNER, 2000).

Quanto ao aspecto morfológico, o processo de morte celular programada segue os seguintes passos: contração da célula e perda do contato com células vizinhas, concentração da cromatina, ruptura do núcleo, alteração na membrana plasmática, formação do corpo apoptótico e fagocitose por macrófagos ou por outras células vizinhas. Quanto ao aspecto bioquímico, o principal evento na apoptose é a ruptura do DNA em múltiplos fragmentos, com cerca de 180 cópias de bases (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 1993; FRATI e MODESTI, 1997; KRAJEWSKI et al., 1997; MELLO et al., 2001).

O crescimento neoplásico, ou ilimitado, deve-se a dois eventos biológicos anormais: a célula transformada independe de fatores mitogênicos para proliferar e também não responde a sinais inibidores da proliferação. Nessas condições o ciclo celular está acelerado e o núcleo divide-se antes que o citoplasma esteja

adequadamente constituído, deixando uma quantidade inadequada de citoplasma para as células filhas, provocando o aumento da relação núcleo-citoplasma (DEMAY, 1996).

As células tumorais adquirem mutações em dois tipos de genes: os oncogenes e genes oncosuppressores. Os primeiros codificam proteínas que regulam o crescimento celular e, os outros, proteínas que geram sinais antiproliferativos. No processo de transformação neoplásica podem ocorrer ativação de oncogenes e inativação de genes oncosuppressores. Os protooncogenes são genes expressos em células normais que codificam moléculas participantes do processo de diferenciação, além de receptores para essas moléculas e fatores de transcrição. Eles podem transformar-se em oncogenes por meio de vários mecanismos genéticos, como: mutações que alteram a seqüência da proteína e a sua atividade ou expressão, amplificação gênica (aumento no número de cópias do oncogene), translocações cromossômicas (SODDU e SACCHI, 1997). O oncogene é uma seqüência de DNA mutado e produz oncoproteínas que induzem a proliferação anormal das células dos tecidos. Os genes supressores de tumores codificam determinadas proteínas que atuam de várias formas na proliferação e na diferenciação celular. Quando, por algum motivo, ocorrem mutações genéticas em determinadas células, a expressão das proteínas codificadas a partir desses genes poderá estar alterada, podendo causar um desequilíbrio nesses mecanismos, originando uma situação ideal para o desenvolvimento de uma população tumoral.

A análise molecular de vários tipos de tumores malignos, inclusive os de mama, pode identificar certas alterações genéticas, como as mutações e as

amplificações gênicas, que interferem na sua função reguladora, promovendo a perpetuação de clones celulares (NAGAI, 1995). Os genes Bcl-2, HER-2 e P53 têm sido estudados e parecem ter participação significativa nesses processos.

A família de genes BCL-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2 gene*) possui 16 homólogos que produzem proteínas com diferentes funções que podem ser divididas em grupos: bcl-2 e homólogos (inibem a apoptose), bax (dependendo da concentração, podem inibir ou induzir a apoptose) e bim (induzem a apoptose). Essas proteínas agem pelos seguintes mecanismos: modulação da qualidade e da quantidade dos poros na membrana interna das mitocôndrias (controlando a passagem de pequenas moléculas e algumas proteínas, como o citocromo-c), dimerização entre as proteínas dos genes da família e interação com outras proteínas da mitocôndria, regulação direta das caspases (ADAMS e CORY, 1998; HENGARTNER, 2000). A dimerização é importante processo na regulação da função apoptótica, em especial no balanço entre as concentrações das proteínas bcl-2 e bax. Quando ocorre excesso de homodímeros bax-bax predomina a apoptose, mas quando há formação de heterodímeros bcl-2–bax e a sua concentração é alta, a apoptose é inibida (CORY et al., 1999; VAKKALA et al., 1999).

O Bcl-2, inicialmente descrito no linfoma folicular de células B, é um protooncogene que foi isolado no ponto de ruptura na translocação entre os cromossomos 14 e 18. Esse gene codifica duas proteínas: a bcl-2  $\alpha$  e a bcl-2  $\beta$ . As proteínas têm distribuição difusa no interior da célula, particularmente no retículo endoplasmático e nas membranas do núcleo e mitocôndrias (COMOGLIO e BOCACCIO, 1997). A sua expressão parece ser controlada pelo estrógeno e

sua função principal é inibir a apoptose, favorecendo a diferenciação e sobrevivência celular, além de também participar do controle da taxa de proliferação celular (VAN SLOOTEN et al., 1998).

A expressão da proteína bcl-2 ocorre tanto em células normais e lesões proliferativas benignas (especialmente no epitélio de tecidos glandulares hormônio dependentes como o da mama e o da próstata), quanto em células de vários tumores malignos (mama, pulmão, etc). A sua expressão, nos tumores invasivos da mama, associa-se a fatores de bom prognóstico, como baixo grau histológico e positividade para receptores de estrógeno (RE) (BINDER et al., 1995; SIZIOPIKOU et al., 1996; GANDHI et al., 1998; QUINN et al., 1998).

A proteína bcl-2 é capaz de inibir os estímulos apoptóticos devido à radiação, hipertermia, glicocorticóides ou fatores de crescimento. É descrito, ainda, um papel no bloqueio do processo apoptótico de células tumorais expostas a certos quimioterápicos, podendo ser considerado um gene de resistência tumoral a drogas. A expressão do gene Bcl-2 em tumores invasivos pode relacionar-se à resposta à hormonioterapia ou à quimioterapia (ELLIS et al., 1998; FURTH et al., 1999).

O protooncogene *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2/*neu*) está presente no cromossomo 17q12 e codifica uma glicoproteína receptora de membrana, a p185, chamada de proteína ou receptor do HER-2 ou c-erbB-2. Ele faz parte de uma família de genes, juntamente com HER-1, HER-3 e HER-4, que produzem receptores de membrana, o que nos HER-2/*neu* tem papel-chave na proliferação, adesão, diferenciação e mobilidade celular (ALLRED, 1998; HAYES e THOR, 2002). As proteínas produzidas pelos membros dessa família têm, em

comum, uma estrutura composta de: receptor de ligação extracelular, seguimento lipofílico transmembranar e área intracelular com atividade tirosina-quinase. A proteína do gene HER-2 necessita de um ligante para ser ativada, mas não possui um ligante específico; por isso, utiliza aqueles dos outros membros da família (HER-1, HER-3 ou HER-4). A formação do complexo para ativação da proteína c-erbB-2 ocorre pela sua união com um fator de crescimento, por meio de um ligante, quando é desencadeada a sua função tirosina-quinase e a autofosforilação da tirosina. Isso desencadeia uma série de eventos em cascata, resultado da transmissão de sinais através da membrana celular e do citoplasma até o núcleo, onde ocorre ativação gênica e estimulação da mitose (YARDEN, 2001).

A célula epitelial normal possui duas cópias do gene HER-2 e expressa baixos níveis da sua proteína na membrana citoplasmática, o que equivale a algumas dezenas de milhares de receptores por célula (DOWSETT et al., 2000). A expressão desse protogene é regulada por fatores de crescimento e a sua transformação até oncogene ocorre geralmente por amplificação gênica (ocorrência de 10 cópias ou mais do gene por célula), o que origina a superexpressão de sua proteína. Essa proteína, quando superexpressa, tem níveis 10 a 100 vezes maiores do que no epitélio mamário normal, porém com a mesma estrutura (BACCHI, 2001; YARDEN, 2001).

O HER-2 está amplificado em vários adenocarcinomas humanos como mama, ovário, rim, pulmão, estômago e glândula salivar. Esse gene desempenha papel importante já na fase inicial do processo neoplásico no câncer mamário. A sua amplificação é maior no CDIS, podendo chegar a 60% a 70%, do que nos

carcinomas invasivos, entre 10% e 40% (RÉVILLION et al., 1998; BACCHI, 2001). Pode ser que o gene HER-2 contribua para o desenvolvimento da fase *in situ* da doença, diminuindo a sua ação quando ocorre a invasão (HOQUE et al., 2002).

Geralmente os carcinomas com expressão positiva para a proteína c-erbB-2 têm alto grau histológico e nuclear, aneuploidia, alta taxa de proliferação, baixa expressão para a proteína bcl-2 e para os receptores de estrógeno (POLLER et al., 1993; RÉVILLION et al., 1998). O aumento na expressão dessa proteína relaciona-se a maior agressividade dos carcinomas, tanto nos casos iniciais quanto nos mais avançados, podendo ser um indicador de prognóstico para recidiva da doença e para sobrevida global (QUERZOLI et al., 1998; TSUDA et al., 1998). Mulheres com tumores positivos para receptores de estrógeno e elevada expressão do c-erbB-2 apresentam maior resistência ao tamoxifeno do que aquelas com c-erbB-2 pouco expresso (DAHIYA e DENG, 1998). Dependendo da sua concentração, a proteína c-erbB-2 pode provocar resistência à quimioterapia, em especial quando são usados agentes alquilantes (MERIC et al., 2002).

O gene P53 localiza-se no cromossomo 17p e produz uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa com vida média de 20 a 30 minutos. A sua forma selvagem é ativada nas células normais quando ocorre dano ao DNA. Sua ativação pode provocar parada do ciclo celular na fase G1 ou na G2, permitindo a atuação dos mecanismos de reparação dos danos causados ao DNA (como os provocados por agentes citotóxicos ou por estresse oxidativo) ou a ativação da apoptose (SCHMITT, 1999). Se em uma célula, após sofrer dano em seu DNA, não

atuarem esses mecanismos que levam à sua reparação, esse dano acumulado poderá gerar células filhas com alterações genéticas permanentes.

Esse gene pode sofrer vários tipos de mutações diferentes, que participam do processo de instabilidade no genoma celular, necessária para o acúmulo de mutações de outros genes durante a progressão neoplásica. A proteína produzida pelo gene P53 mutado, ou proteína p53 “mutada”, pode ser menos ativa ou inativa, se comparada com a sua forma selvagem. A proteína p53 mutada pode ser mais estável e ter vida média mais prolongada, permanecendo no núcleo da célula, e por isso pode ser mais facilmente detectada. Quando isso acontece, ela pode perder a sua função de supressão tumoral, provocando aumento do número de mutações celulares, com conseqüente perpetuação de clones celulares anormais (MOLL et al., 1995; DONE et al., 1998). A ausência da amplificação da proteína p53 mutada nas lesões mamárias benignas e o aumento nas lesões *in situ* e nas invasivas exemplificam o papel que essa proteína tem nos eventos neoplásicos precoces, possivelmente auxiliando na identificação de CDIS com maior chance de invasão (RAJAN et al., 1997).

As mutações do gene P53 estão associadas a prognóstico desfavorável em várias neoplasias humanas, como carcinomas do pulmão, da mama, do cólon e do reto, próstata, estômago, e de vários tumores cerebrais e hematológicos. No carcinoma invasor da mama pode ser considerado um fator de mau prognóstico para sobrevida livre de doença e global, especialmente em casos com axila negativa (GASPARINI et al., 1998). A expressão elevada da proteína p53 mutada relaciona-se a tumores com negatividade para RE (ISOLA et al., 1992; PILLAI et al.,

1998). Essa proteína parece, ainda, estar relacionada à resistência à radioterapia (HALDAR et al., 1994; SILES et al., 1996 ).

O estrógeno, assim como outros hormônios, participa do processo carcinogênico na fase de promoção, quando ocorre expansão de clones celulares mutados. Esse hormônio estimula a produção de vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento transformante alfa (TGF  $\alpha$ ), os fatores de crescimento insulina-símile (IGF I e II ) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF). Os receptores de estrógeno (RE) são proteínas que fazem parte da família de receptores esteróidicos. Existem mais do que dois tipos de receptores de estrógeno, porém os principais são o tipo  $\alpha$  e o  $\beta$ , esse último descrito há pouco tempo. O mais conhecido e estudado é o tipo  $\alpha$ , que predomina nas células do carcinoma mamário (ABREU e KOIFMAN, 2002). O estrógeno atravessa a membrana das células-alvo por difusão passiva e liga-se ao seu receptor no núcleo celular, provocando a sua ativação. O complexo hormônio-receptor, que tem maior afinidade com o DNA, passa a controlar a velocidade de transcrição dos genes- alvo. Com essa interação ocorrem mudanças na síntese do RNA mensageiro e de proteínas envolvidas na regulação da diferenciação e proliferação celular (LIMA e GEBRIM, 1995).

O percentual de carcinomas positivos para RE varia entre 50% e 70%, tanto nos casos invasivos como *in situ* (CHAUDHURI et al., 1993; KARAYIANNAKIS et al.,1996). Dentro do mesmo tumor, parece existir grande correlação entre o comportamento dos receptores nos componentes invasivo e não invasivo (BUR et al., 1992). A sua ocorrência nos carcinomas relaciona-se a tumores bem

diferenciados. A positividade para RE confere melhor sobrevida livre de doença e global do que os tumores negativos; além disso, auxilia na indicação de hormonioterapia adjuvante com antiestrógenos (BUR et al., 1992; POLLER et al., 1993; YAGHAN et al., 1998).

Os graus histológico e nuclear, avaliados pelo exame anatomopatológico, fornecem outros dados importantes sobre o comportamento do tumor. A avaliação do grau nuclear, importante na graduação do CDIS, baseia-se na análise microscópica de características nucleares das células tumorais, como: morfismo, tamanho, aspecto da cromatina e dos nucléolos, presença de mitoses (SCHWARTZ et al., 1997). Tumores de baixo grau nuclear, ou seja 1 e 2, parecem ser menos agressivos do que aqueles com grau nuclear 3 (CARVALHO, 1995).

O método de graduação histológica de BLOOM e RICHARDSON (1957), modificado por ELSTON e ELLIS (1991), quantifica por meio de três características morfológicas: o percentual de formação de arranjo tubular, o grau de pleomorfismo nuclear e a contagem do número de mitoses (FITZGIBBONS et al., 2000). Os tumores bem diferenciados (graus I e II) podem relacionar-se ao maior intervalo livre de doença e a melhor sobrevida, do que aqueles pouco diferenciados (grau III).

Em resumo, nem todos casos de CDIS evoluem para invasivo e ainda se desconhecem os fatores determinantes desta transformação. Sabe-se que a carcinogênese é um processo de múltiplos estágios, resultante de inúmeras modificações genéticas. O estudo das lesões pré-invasivas e invasivas iniciais talvez possa identificar modificações genéticas que ocorreriam muito precocemente

durante a progressão de um carcinoma, e que poderiam estar associadas com a capacidade de uma lesão intra-epitelial tornar-se invasiva.

Do ponto de vista clínico interessaria identificar biomarcadores que permitissem diferenciar o CDIS em função do potencial de tornar-se invasor. Isso significa que estes marcadores poderiam ser usados como indicadores de risco de uma lesão intra-epitelial invadir o estroma.

Para tanto, optou-se por realizar o presente estudo para testar a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53 e dos RE como biomarcadores. Foram escolhidas essas proteínas e os receptores de estrógeno pelo conhecimento do papel distinto de cada um no balanço dinâmico entre a proliferação e apoptose celular. A utilização da técnica de imunoistoquímica deveu-se ao fato de ser procedimento já bastante difundido e acessível, o que é importante considerar quando se procuram marcadores para uso na prática clínica. Interessa ainda testar as associações entre as expressões dessas proteínas e dos RE, e também com certas características morfológicas.

Este estudo procurou oferecer alguma contribuição para o conhecimento do padrão de expressão das proteínas de genes e de receptores que estão associados à carcinogênese mamária. Se alguma dessas proteínas tiver valor como fator preditivo da evolução de uma lesão intra-epitelial da mama, poderá ser adotada como biomarcador e oferecer mais segurança no planejamento terapêutico do carcinoma ductal *in situ*. Na prática, interessa agregar conhecimento que permita orientar a escolha do tratamento para cada caso, como condutas cirúrgicas mais ou menos conservadoras ou, ainda, terapêutica adjuvante.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

Analisar o potencial do carcinoma ductal *in situ* em evoluir para carcinoma invasivo por meio da expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, de receptores de estrógeno, das características morfológicas da neoplasia e do estado de menopausa.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Determinar as prevalências da expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 no CDIS e no carcinoma invasivo da mama até 2,0cm de diâmetro.
2. Verificar se há associação entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 com RE, grau nuclear e tipo comedocarcinoma no CDIS.
3. Verificar se há associação entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 com RE, grau nuclear e grau de diferenciação no carcinoma invasivo da mama até 2,0 cm de diâmetro.

4. Verificar se há associação entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, dos RE, de características morfológicas e do estado de menopausa no CDIS, puro ou associado a carcinoma invasivo.
5. Verificar se há associação entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, dos RE, de características morfológicas e do estado de menopausa no carcinoma invasivo, puro ou associado a CDIS.
6. Analisar a concordância da expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53, RE e grau nuclear entre o CDIS e o carcinoma invasivo, quando presentes na mesma mama.

## 3. Sujeitos e Métodos

---

### 3.1. Desenho do estudo

O estudo foi do tipo descritivo analítico, com análise da expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 no carcinoma ductal *in situ* (estádio 0) ou invasivo até 2,0cm de diâmetro com axila negativa (estádio I), além do estudo de receptores de estrógeno, de fatores morfológicos e clínicos.

### 3.2. Tamanho amostral

Baseando-se em um erro tipo I de 0,05 e erro tipo II de 0,20, foram utilizados os resultados obtidos neste mesmo estudo para avaliação da expressão da proteína do gene C-erbB-2, na proporção de um caso de CDIS para um caso de carcinoma invasivo, usando um porcentual de positividade de 68% para o primeiro grupo e de 39% para o segundo. O tamanho amostral foi de 104 mulheres, sendo dois grupos de 52 casos. Para isso foi utilizado o cálculo para tamanho de amostras desiguais (FLEISS, 1981). O levantamento dos casos terminou quando foram selecionados 109, sendo um grupo de 53 CDIS e outro de 56 carcinomas invasivos.

### **3.3. Seleção de sujeitos**

Foram selecionadas mulheres, de modo consecutivo, com o diagnóstico de carcinoma da mama estádios 0 e I, pela classificação TNM (UICC, 2003). Avaliaram-se casos de carcinoma *in situ* (Tis), que no presente estudo foram somente os do tipo ductal, além de casos de carcinoma invasivo com diâmetro tumoral máximo de 2,0 cm (T1), todos sem metástases axilares (N0).

Para isso foram revistos os registros hospitalares de mulheres atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), a partir de 1994. Foram analisados os respectivos blocos de parafina com material de tumores de mama biopsiados no Serviço entre 1994 e 1999. Além disso, foram analisados alguns casos operados na Maternidade de Campinas, também entre 1994 e 1999, cujos respectivos blocos foram provenientes do Instituto de Patologia Campinas.

#### **3.3.1. Critérios de inclusão**

- Mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma ductal *in situ* ou carcinoma invasivo no estágio I.

#### **3.3.2. Critérios de exclusão**

- Casos que não continham todos os dados clínicos e morfológicos no prontuário médico ou cujo material não apresentou condições para a avaliação histológica e reações de imunohistoquímica para avaliação das proteínas do estudo.

### 3.4. Variáveis e conceitos

#### 3.4.1. Variáveis

- 1) Expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53.
- 2) Tipo de carcinoma: carcinoma ductal *in situ* (CDIS) ou carcinoma invasivo.
- 3) Tipo de CDIS: CDIS puro ou CDIS misto.
- 4) Tipo de carcinoma invasivo: carcinoma invasivo puro ou carcinoma invasivo misto.
- 5) Dosagem de receptores de estrógeno (RE).
- 6) Grau nuclear: 1,2 ou 3.
- 7) Grau de diferenciação: I, II ou III.
- 8) Tipo comedocarcinoma para os CDIS: comedocarcinoma ou não-comedocarcinoma.
- 9) Menopausa (estado de menopausa): pré (pré-menopausa) ou pós (pós-menopausa).

#### 3.4.2. Conceitos

- **Resultados da análise das expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53 e dos RE**

Foram considerados positivos os casos com lâminas cuja contagem de células positivas foi igual ou superior a 10% em 10 campos na periferia dos tumores, com aumento de 40 vezes (microscópio *Nikkon Labphot*).

### – **Classificação dos grupos e subgrupos nos tipos de carcinoma**

O grupo de CDIS foi subdividido em: CDIS puro (somente carcinoma ductal *in situ*) e CDIS misto (carcinoma ductal *in situ* presente na periferia do carcinoma invasivo). O grupo de carcinoma invasivo foi subdividido em carcinoma invasivo puro (somente carcinoma invasivo) ou carcinoma invasivo misto (quando o carcinoma invasivo estava associado com carcinoma ductal *in situ*).

### – **Classificação do grau nuclear**

O grau nuclear foi classificado nas seguintes categorias: 1 (células com núcleos monótonos, com tamanhos de 1,5 a 2 vezes o do núcleo de uma célula epitelial normal, cromatina finamente dispersa, raros nucléolos e figuras de mitose, geralmente com polarização dos componentes celulares), 2 (células com núcleos de forma e tamanho moderadamente irregulares, cromatina grosseiramente agrupada ou aspecto nuclear vacuolado) ou 3 (núcleos com intenso pleomorfismo, de tamanho acima de 2,5 vezes o núcleo de uma célula epitelial normal, distribuição irregular da cromatina, nucléolos proeminentes, mitoses freqüentes).

### – **Classificação do grau de diferenciação**

O grau histológico, ou grau de diferenciação (GD) como foi chamado no estudo, foi classificado com pontuação para cada uma das seguintes características (ELSTON e ELLIS, 1991):

- 1) Formação tubular: 1 (> de 75%, ocorrendo na maior parte do tumor),  
2 (10 a 75%, ocorrendo em quantidade moderada) ou 3 (<10%,  
pouca ou nenhuma formação).

**2) Pleomorfismo nuclear:** 1 (pouco, com células uniformes e regulares), 2 (aumento moderado do tamanho e variedade) ou 3 (grande variedade).

**3) Número de mitoses** (por 10 campos de aumento, na periferia do tumor): 1 (0 a 9), 2 (10 a 19) ou 3 (> 20).

Após a somatória dos valores dados para cada uma das características acima citadas, os carcinomas invasivos foram classificados em três graus:

- Grau I (bem diferenciados) = 3 a 5 pontos.
- Grau II (moderadamente diferenciados) = 6 ou 7 pontos.
- Grau III (pouco diferenciados) = 8 ou 9 pontos.

Os carcinomas foram agrupados, para cálculo nas tabelas do estudo, em bem diferenciados (graus nucleares 1 e 2 e graus histológicos I e II) ou pouco diferenciados (grau nuclear 3 e grau histológico III).

#### – **Classificação do tipo comedocarcinoma no CDIS**

Os CDIS foram classificados em: comedocarcinomas e não-comedocarcinomas. Os comedocarcinomas caracterizaram-se microscopicamente por ductos preenchidos por células epiteliais com atipia nuclear, núcleos grandes e graus variados de necrose. Os não-comedocarcinomas foram dos tipos cribiforme, sólido, micropapilífero ou intracístico. O cribiforme constituiu-se de pontes de células epiteliais com tamanho e forma semelhantes, atipia nuclear leve ou moderada, formando espaços regulares dentro dos ductos. O sólido caracterizou-se por obliteração total da luz ductal por células uniformes, com atipia nuclear leve ou

moderada. O micropapilífero tinha estrutura papilífera recoberta por várias camadas de células epiteliais uniformes com projeções para o interior dos ductos, com atipia leve ou moderada. O intracístico era constituído por cisto preenchido parcial ou totalmente por células epiteliais anaplásicas (SOUZA e ALVARENGA, 2002). Os CDIS com mais de dois componentes diferentes (tipos mistos) foram agrupados juntamente aos comedocarcinomas quando possuíam, em uma parte do tumor, esse tipo de CDIS.

#### – **Características clínicas**

O estado de menopausa foi agrupado em pré-menopausa ou pós-menopausa, esse último quando foi relatada ausência de ciclos menstruais há mais de um ano, quando da primeira consulta. Não foi possível identificar o estado de menopausa de duas mulheres do estudo, pois essa informação não estava disponível nos prontuários (os dois casos foram de carcinoma invasivo). O estado de menopausa foi a única característica clínica utilizada como variável.

A idade das pacientes foi aquela referida pelas mulheres, em anos completos, e anotada no prontuário por ocasião da primeira consulta. O peso utilizado foi aquele descrito nos prontuários, medido em quilogramas quando da primeira consulta.

A média de idade das mulheres variou entre 23 e 77 anos no grupo de CDIS e entre 32 e 89 anos no grupo de carcinoma invasivo, com média de 53,3 anos no primeiro e de 58,8 anos no segundo. A variação do peso corpóreo foi de 42,0 a 93,0 quilogramas, com média de 64,2 no grupo de CDIS e de 63,7 no outro, porém estas informações não foram analisadas como variáveis (Anexo 1).

### **3.5. Técnicas, testes e exames**

Os blocos de parafina contendo material do tecido mamário foram previamente fixados em formol a 10%, recortados e confeccionaram-se lâminas coradas pela HE. Essas lâminas foram avaliadas por médico patologista que identificou as áreas com carcinoma invasivo e com CDIS, para que fossem preparados os cortes do estudo imunoistoquímico. O mesmo profissional fez a avaliação microscópica dos carcinomas, classificando os graus nucleares e de diferenciação, além do tipo comedocarcinoma.

Na análise imunoistoquímica foram usados os anticorpos primários bcl-2, p53 e c-erbB-2, além do anticorpo secundário, que se liga ao primário e conjuga-se à biotina, além do complexo da peroxidase conjugado à estreptavidina e à biotina. A estreptavidina contém quatro sítios para ligação da biotina, sendo um ocupado pela biotina junto ao anticorpo secundário e os outros acoplados ao complexo biotina-peroxidase. Foram feitos cortes de 4 $\mu$ m de espessura nos blocos de parafina e colocados em lâminas previamente tratadas com solução de organoselano a 4% em acetona (3 aminopropil-trietoxiselano- Sigma código A 3648). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa a 110°C durante uma hora, para fixá-los nas lâminas. Em seguida foram retiradas e mantidas em temperatura ambiente por mais uma hora.

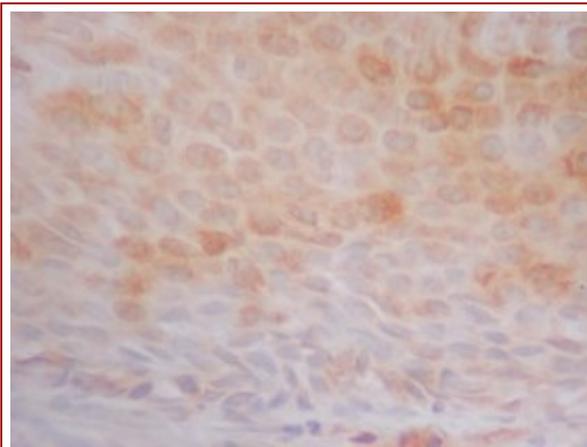
– **Técnica das reações de imunohistoquímica para os anticorpos bcl-2, c-erbB-2, p53 e RE**

Foram utilizados anticorpos monoclonais e policlonais específicos para bcl-2 (MxH, clone 124, DAKO, código M0887-1, diluição 1:40), c-erbB-2 (RxH, DAKO, código A0485-1, diluição 1:300), p53 (MxH, clone D07, DAKO, código M7001-1, diluição 1:100) e RE (MxH, clone 1D5 ascite, Delsol, diluição 1:2000).

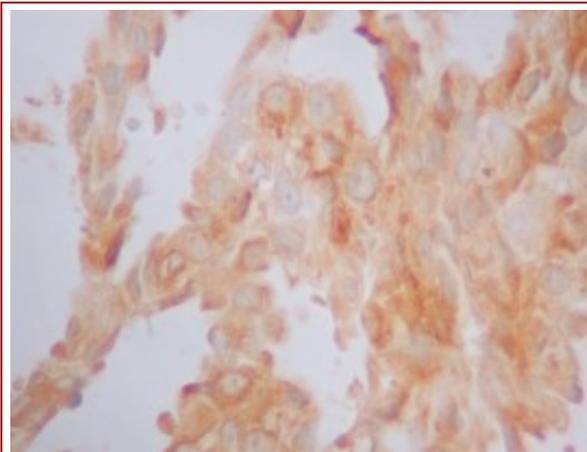
As secções foram desparafinizadas em banho de xilol 110<sup>0</sup> C por 30 minutos e, a seguir, dois banhos de xilol subseqüentes, em temperatura ambiente. Depois as lâminas foram hidratadas em álcool etílico em concentrações decrescentes (100, 80, 50%) em temperatura ambiente, e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos, de três minutos cada um, em água oxigenada a 10 volumes, seguidos de lavagem em água corrente e destilada. A recuperação antigênica foi feita em panela a vapor tipo *T-fall* para desmascaramento dos antígenos. As lâminas foram imersas em tampão (citrato de sódio ph 6,0 para o p-53, c-erbB-2 e RE; TRIS EDTA ph 9,0 para o bcl-2) por 30 minutos a 95<sup>0</sup>C. A seguir, resfriadas em temperatura ambiente durante 20 minutos e posteriormente lavadas em água corrente e destilada.

Na próxima etapa, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico a 4<sup>0</sup>C, durante a noite. Após a incubação, as lâminas passaram por três lavagens, no agitador, em PBS (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 a 7,6). Depois disso, secas e incubadas com o *Envision Labeled Polymer Component* (DAKO, código K1491) a 37<sup>0</sup>C durante uma hora e, a seguir, feitas três lavagens em PBS com agitação. A revelação foi feita com

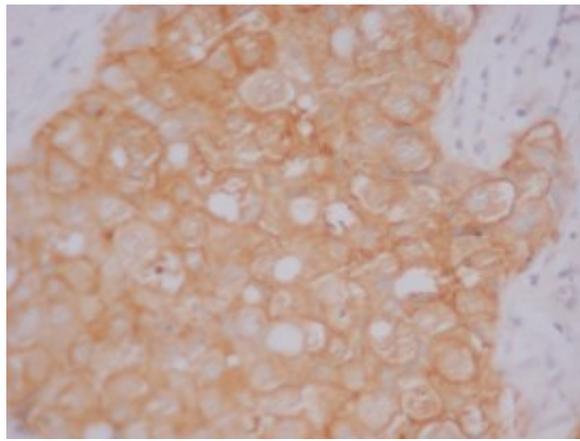
o substrato cromógeno DAB (3-3'-diaminobenzidine, SIGMA, código D5637) na proporção de 0,06g para cada 100ml em PBS, 500µl de água oxigenada a 30 volumes e 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C, durante cinco minutos. Depois as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Mayer por 30 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizadas em três banhos de xilol, e em seguida montadas em Entellan (*Merck*). Todas as reações imunoistoquímicas foram realizadas utilizando-se controles externos positivos: fragmento de linfonodo com linfoma de células do manto para o bcl-2, carcinoma ductal invasivo para o c-erbB-2 e RE, tumor de ovário *borderline* para o p53.



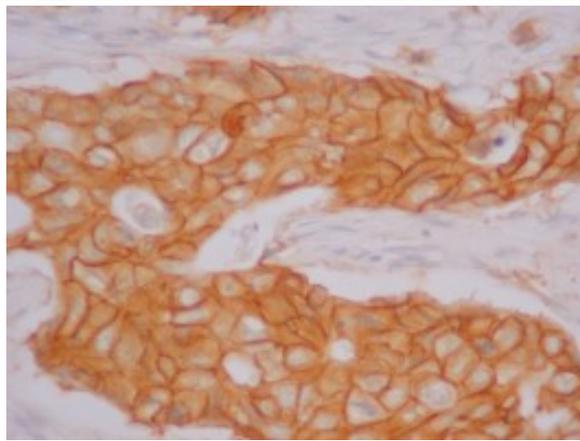
**Figura 1.** *CDIS com expressão positiva para proteína bcl-2.*



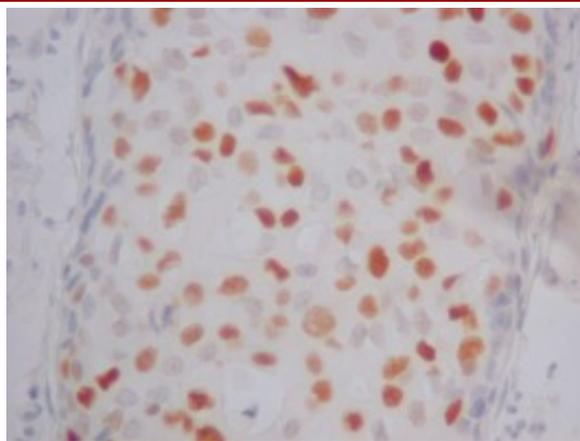
**Figura 2.** *Carcinoma ductal invasivo com expressão positiva para a proteína bcl-2.*



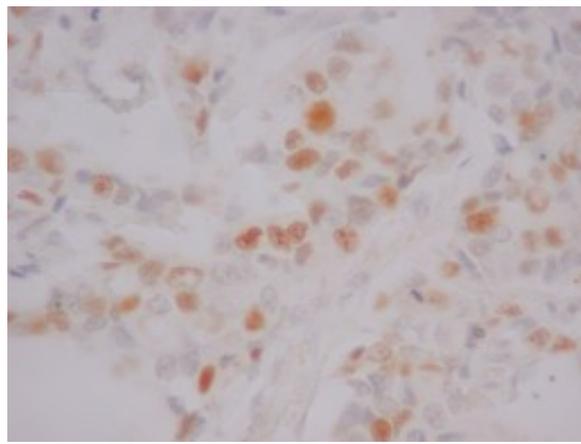
**Figura 3.** CDIS com expressão positiva para a proteína c-erbB-2.



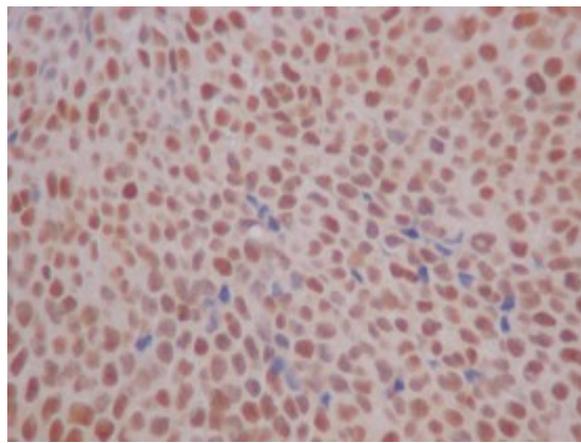
**Figura 4.** Carcinoma ductal invasivo com expressão positiva para a proteína c-erbB-2.



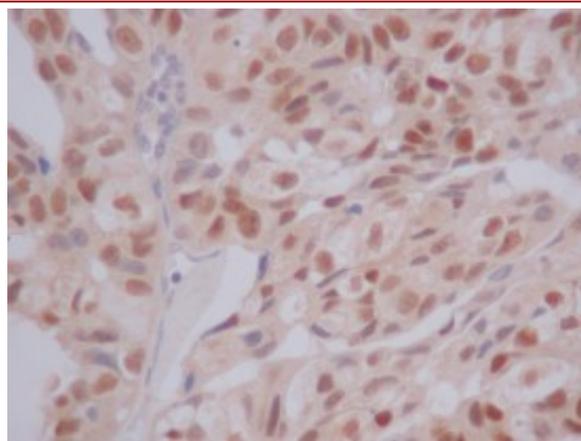
**Figura 5.** CDIS com expressão positiva para a proteína p53.



**Figura 6.** Carcinoma ductal invasivo com expressão positiva para a proteína p53.



**Figura 7.** CDIS com expressão positiva para RE.



**Figura 8.** Carcinoma ductal invasivo com expressão positiva para RE.

### **3.6. Coleta de dados**

Foi elaborada uma ficha que continha os seguintes dados: informações clínicas das mulheres (idade, peso e estado de menopausa), resultados da avaliação histológica (graus nuclear e de diferenciação) e dos resultados das expressões das proteínas dos genes e dos RE. As fichas não continham o nome ou o número de registro das mulheres (Anexo 2).

A coleta de dados iniciou-se após aprovação do projeto de tese pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, datada de 27 de julho de 1999.

### **3.7. Análise dos dados**

Após a revisão das fichas, as variáveis contínuas (peso e idade) foram descritas conforme médias e desvios-padrão. As outras variáveis (bcl-2, c-erbB-2, p53, RE, tipo de carcinoma, estado de menopausa, tipo comedocarcinoma, grau nuclear, grau de diferenciação), sendo categóricas, foram descritas em tabelas de freqüências.

A concordância entre as expressões das proteínas nos dois componentes do mesmo tumor foi feita através do coeficiente kappa (FISHER e VAN BELLE, 1993), interpretado de acordo com os critérios de LANDIS e KOCH, classificado

em pobre (<0,00), pequeno (0,00-0,20), regular (0,21-0,40), moderado (0,41-0,60), substancial (0,61-0,80) e quase perfeito (0,81-1,00) (LANDIS e KOCH, 1997).

Para estimar a magnitude das associações entre as variáveis nos grupos de CDIS e carcinoma invasivo utilizou-se o *odds ratio* (OR), com seu respectivo intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Considerou-se significativo o *odds ratio* cujo intervalo de confiança não incluiu o valor 1,0, podendo ser um dos limites. Foram usados modelos de regressão logística para estimar o *odds ratio* ajustado (LEMESHOW e HOSMER, 2000). A análise estatística acima descrita foi realizada com o auxílio do programa de computador SAS 8.2 (ASA/STAT, 1989).

### **3.8. Aspectos Éticos**

Os dados foram coletados nos prontuários e o material para a pesquisa foi obtido junto ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp e ao Instituto de Patologia Campinas, de modo que não houve contato com as pacientes. As mulheres foram identificadas por números, preservando-se as suas identidades. O projeto de pesquisa foi aprovado em 17/11/1999 sob Parecer n<sup>o</sup> 114/99, atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

## 4. Resultados

---

Avaliaram-se 109 mulheres, sendo 49% (53) com carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e 51% (56) com carcinoma invasivo. Entre os CDIS, 64% (34) foram do tipo comedocarcinoma puro ou com componente comedocarcinoma associado e os demais dos tipos não-comedocarcinoma. No grupo de carcinomas invasivos, 68% (38) foram do tipo misto.

No grupo de carcinomas invasivos, oito de 56 casos não foram do tipo ductal. Desses, seis foram tubulares, todos GN 1, bem diferenciados e RE positivos; cinco eram bcl-2 positivos e todos os seis p53 e c-erbB-2 negativos. Os outros dois foram: um túbulo-lobular e outro papilífero; o primeiro deles bem diferenciado (bcl-2 e RE positivos, c-erbB-2 e p53 negativos, com GN 1) e o outro moderadamente diferenciado (bcl-2, c-erbB-2, p53 e RE negativos, com GN 3).

Quanto ao estado de menopausa, 66% (71) das mulheres encontravam-se na pós-menopausa. Não houve associação entre o tipo de carcinoma, CDIS ou invasivo, e o estado de menopausa nos dois grupos (Tabela 1). Em dois casos de carcinoma invasivo não havia informação sobre o estado de menopausa.

Na avaliação do grau nuclear, 9% (10) foram grau 1, 35% (38) grau 2 e 56% (61) grau 3. Não foi observada associação entre o grau nuclear e o tipo de carcinoma. A prevalência de carcinomas invasivos com expressão positiva para os RE (RE positivos) foi cerca de duas vezes maior do que a dos CDIS, diferença estatisticamente significativa (Tabela 1).

**TABELA 1**  
**Distribuição do estado de menopausa, dos RE**  
**e do GN segundo o tipo de carcinoma**

	Tipo de Carcinoma				OR bruto	IC 95%
	Invasivo		CDIS			
	n	%	n	%		
<b>Menopausa</b>						
pré	15	(28)	21	(40)	ref.	
pós	39	(72)	32	(60)	<b>1,7</b>	(0,7 – 3,8)
<b>RE</b>						
negativo	19	(34)	34	(64)	ref.	(1,5 – 7,7)
positivo	37	(66)	19	(36)	<b>3,5</b>	
<b>GN</b>						
1	7	(13)	3	(6)	ref.	
2	22	(39)	16	(30)	<b>0,6</b>	(0,1 – 2,6)
3	27	(48)	34	(64)	<b>0,3</b>	(0,08 – 1,4)
<b>TOTAL</b>	<b>56</b>	<b>(100)</b>	<b>53</b>	<b>(100)</b>		

Foi observada associação entre a expressão positiva para a proteína bcl-2 (bcl-2 positiva) e o carcinoma invasivo, com base no *odds ratio* bruto (OR= 2,6; IC 95%= 1,2-5,6), mas essa associação não foi observada no *odds ratio* ajustado pela expressão das outras proteínas (OR= 1,7; IC 95%= 0,7-4,1) (Tabela 2). Entre os CDIS observou-se que cerca de metade foram bcl-2 positivos e no grupo de invasivos, cerca de 2/3.

A prevalência de casos com expressão positiva para a proteína c-erbB-2 (c-erbB-2 positiva) no grupo de CDIS foi de 68%, quase o dobro da prevalência observada no grupo de carcinoma invasivo (39%), com significância estatística nos *odds ratios* bruto e ajustado (Tabela 2).

A expressão positiva para a proteína p53 (p53 positiva) foi somente de 15% (16) do total de casos e não mostrou associação com os tipos de carcinoma (TABELA 2).

**TABELA 2**  
**Associação entre o tipo de carcinoma e a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53**

	Tipo de Carcinoma				<i>OR</i> <i>bruto</i>	IC 95%	<i>OR</i> <i>ajustado</i>	IC 95%
	Invasivo		CDIS					
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<b>bcl-2</b>								
negativo	17	(30)	28	(53)	Ref.		Ref.	
positivo	39	(70)	25	(47)	<b>2,6</b>	(1,2-5,6)	<b>1,7</b>	(0,7-4,1)
<b>c-erbB-2</b>								
negativo	34	(61)	17	(32)	Ref.		Ref.	
positivo	22	(39)	36	(68)	<b>0,3</b>	(0,1-0,7)	<b>0,4</b>	(0,1-0,9)
<b>p53</b>								
negativo	49	(88)	44	(83)	Ref.		Ref.	
positivo	7	(12)	9	(17)	<b>0,7</b>	(0,2-2,0)	<b>1,3</b>	(0,4-4,1)
<b>TOTAL</b>	<b>56</b>	<b>(100)</b>	<b>53</b>	<b>(100)</b>				

Analisou-se a interação entre as expressões das proteínas bcl-2 e c-erbB-2, porque mostraram significância estatística na tabela anterior (Tabela 2). Entre os CDIS bcl-2 negativos, 96% (27) dos 28 casos foram c-erbB-2 positivos (OR= 0,04;

IC 95%= <0,01-0,38), o que não ocorreu no grupo de carcinoma invasivo. Não foi observado o mesmo tipo de associação entre casos bcl-2 positivos e c-erbB-2 negativos, em nenhum dos dois grupos (Tabela 3).

Substituindo-se a expressão da proteína bcl-2 pelo estado dos RE foi observada associação semelhante, ou seja, entre os CDIS RE negativos 91% (31) dos 34 casos foram c-erbB-2 positivos, com *odds ratio* de 0,13 (IC 95%= 0,03-0,59). Não foi observado o mesmo tipo de associação entre casos RE positivos e c-erbB-2 negativos, em nenhum dos dois grupos (Tabela 4).

Assim, quase todos os casos de CDIS bcl-2 ou RE negativos foram c-erbB-2 positivos. Cerca de metade dos carcinomas invasivos bcl-2 e RE negativos foram c-erbB-2 positivo e metade negativo. Na situação em que o bcl-2 e os RE foram positivos notou-se uma proporção de cerca de um caso c-erbB-2 positivo para dois negativos, nos dois grupos (Tabelas 3 e 4).

**TABELA 3**  
**Associação entre bcl-2 e c-erbB-2 segundo o tipo de carcinoma**

bcl-2	c-erbB-2	Tipo de Carcinoma				OR Bruto	IC 95%
		Invasivo		CDIS			
		n	%	n	%		
negativo	positivo	9	(53)	27	(96)	<b>0,04</b>	(<0,01 – 0,38)
	negativo	8	(47)	1	(4)	ref.	
positivo	positivo	13	(33)	9	(36)	<b>0,89</b>	(0,31 – 2,55)
	negativo	26	(67)	16	(64)	ref.	
<b>TOTAL</b>		<b>56</b>	<b>(100)</b>	<b>53</b>	<b>(100)</b>		

**TABELA 4**  
**Associação entre RE e c-erbB-2 segundo o tipo de carcinoma**

bcl-2	c-erbB-2	Tipo de Carcinoma				OR Bruto	IC 95%
		Invasivo		CDIS			
		n	%	n	%		
negativo	positivo	11	(58)	31	(91)	<b>0,13</b> ref.	(0,03 – 0,59)
	negativo	8	(42)	3	(9)		
positivo	positivo	11	(30)	5	(26)	<b>1,18</b> ref.	(0,34 – 4,10)
	negativo	26	(70)	14	(74)		
<b>TOTAL</b>		<b>56</b>	<b>(100)</b>	<b>53</b>	<b>(100)</b>		

A magnitude da associação entre a expressão positiva para a proteína bcl-2 e para os RE foi maior para o grupo de CDIS (OR= 27,6; IC 95%= 5,2-146,0) do que no grupo de carcinomas invasivos (OR= 11,0; IC 95%= 2,9-41,3). Não foi observada diferença na expressão da bcl-2 entre mulheres na pré ou pós-menopausa, em nenhum dos dois grupos. Os CDIS bcl-2 positivos foram freqüentemente graus nucleares 1 e 2, com maior magnitude de associação do que entre os carcinomas invasivos. Os carcinomas invasivos bcl-2 positivos foram freqüentemente graus de diferenciação I e II (Tabela 5).

**TABELA 5**

**Associação entre a expressão da proteína bcl-2 nos tipos de carcinoma e RE, estado de menopausa e aspectos morfológicos (GD e GN)**

	Tipo de Carcinoma								OR	(IC95%)		
	CDIS				Invasivo							
	bcl-2		bcl-2		bcl-2		bcl-2					
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo				
n	%	n	%	n	%	n	%					
<b>RE</b>												
negativo	8	(32)	26	(93)	ref.		7	(18)	12	(71)	ref.	
positivo	17	(68)	2	(7)	<b>27,6</b>	(5,2-146)	32	(82)	5	(29)	<b>11,0</b>	(2,9-41,3)
<b>Menopausa</b>												
pré	9	(36)	12	(43)	ref.		10	(26)	5	(33)	ref.	
pós	16	(64)	16	(57)	<b>1,3</b>	(0,4-4,0)	29	(74)	10	(67)	<b>1,5</b>	(0,3-5,3)
<b>GN</b>												
1	3	(12)	0	(0)	ref.		6	(15)	1	(6)	ref.	
2	14	(56)	2	(7)	ref.		19	(49)	3	(18)	ref.	
3	8	(32)	26	(93)	<b>0,04</b>	(0,01-0,19)	14	(36)	13	(76)	<b>0,2</b>	(0,04-0,6)
<b>GD</b>												
I							12	(31)	1	(6)	ref.	
II							20	(51)	6	(35)	ref.	
III							7	(18)	10	(59)	<b>0,1</b>	(0,04-0,5)
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>(100)</b>	<b>28</b>	<b>(100)</b>			<b>39</b>	<b>(100)</b>	<b>17</b>	<b>(100)</b>		

Notou-se associação inversa entre a expressão da proteína c-erbB-2 e o estado dos RE nos dois grupos, sendo que a magnitude da associação foi maior para o grupo de CDIS (OR = 0,03, IC 95%= <0,01-0,2). Os carcinomas invasivos c-erbB-2 negativos foram mais freqüentes entre as mulheres na pós-menopausa, sendo que esta associação foi estatisticamente limítrofe (OR= 0,3; IC 95%= 0,08-1,0), o que não aconteceu no grupo de CDIS. Nos dois grupos ocorreu associação entre a expressão positiva da proteína c-erbB-2 e o grau nuclear 3, sendo que a

magnitude da associação foi maior para o grupo de CDIS. Os carcinomas invasivos c-erbB-2 positivos associaram-se com grau de diferenciação III (OR= 18,1; IC 95%= 4,1-79,0) (Tabela 6).

**TABELA 6**  
**Associação entre a expressão da proteína c-erbB-2 nos tipos de carcinoma e RE, estado de menopausa e aspectos morfológicos (GD e GN)**

	Tipo de Carcinoma											
	CDIS				Invasivo							
	c-erbB-2				c-erbB-2							
	Positivo		Negativo		OR	(IC95%)	Positivo		Negativo		OR	(IC95%)
n	%	n	%	n			%	n	%			
<b>RE</b>												
negativo	31	(86)	3	(18)	ref.		11	(50)	8	(24)	ref.	
positivo	5	(14)	14	(82)	<b>0,03</b>	(<0,01–0,2)	11	(50)	26	(76)	<b>0,3</b>	(0,09–0,97)
<b>Menopausa</b>												
pré	17	(47)	4	(24)	ref.		9	(43)	6	(18)	ref.	
pós	19	(53)	13	(76)	<b>0,3</b>	(0,09–1,3)	12	(57)	27	(82)	<b>0,3</b>	(0,08–1,0)
<b>GN</b>												
1	0	(0)	3	(18)	ref.		0	(0)	7	(21)	ref.	
2	4	(11)	12	(71)	ref.		4	(18)	18	(53)	ref.	
3	32	(89)	2	(11)	<b>60</b>	(9,9–365)	18	(82)	9	(26)	<b>12,5</b>	(3,3–47)
<b>GD</b>												
I							1	(4)	12	(35)	ref.	
II							7	(32)	19	(56)	ref.	
III							14	(64)	3	(9)	<b>18,1</b>	(4,1–7,9)
<b>TOTAL</b>	<b>36</b>	<b>(100)</b>	<b>17</b>	<b>(100)</b>			<b>22</b>	<b>(100)</b>	<b>34</b>	<b>(100)</b>		

A expressão positiva da proteína p53 apresentou associação somente com o grau nuclear 3 e com grau de diferenciação III no grupo de carcinoma invasivo, o que não foi observado para o CDIS (Tabela 7).

TABELA 7

Associação entre a expressão da proteína p53 nos tipos de carcinoma e RE, estado de menopausa e aspectos morfológicos (GD e GN)

	Tipo de Carcinoma								OR	(IC95%)
	CDIS				Invasivo					
	p53				p53					
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo			
n	%	n	%	n	%	n	%			
<b>RE</b>										
negativo	8	(89)	26	(59)	ref.	4	(57)	15	(31)	ref.
positivo	1	(11)	18	(41)	<b>0,1</b> (0,02–1,6)	3	(43)	34	(69)	<b>0,3</b> (0,06–1,7)
<b>Menopausa</b>										
pré	4	(44)	17	(39)	ref.	3	(43)	12	(26)	ref.
pós	5	(56)	27	(61)	<b>0,7</b> (0,1–3,3)	4	(57)	35	(74)	<b>0,4</b> (0,09–2,3)
<b>GN</b>										
1	0	(0)	3	(7)	ref.	0	(0)	7	(14)	ref.
2	1	(11)	15	(34)	ref.	0	(0)	22	(45)	ref.
3	8	(89)	26	(59)	<b>5,5</b> (0,6–48)	7	(100)	20	(41)	<b>21,6</b> (1,1–400)
<b>GD</b>										
I						0	(0)	13	(27)	ref.
II						0	(0)	26	(53)	ref.
III						7	(100)	10	(20)	<b>56,4</b> (3,0->500)
<b>TOTAL</b>	<b>9</b>	<b>(100)</b>	<b>44</b>	<b>(100)</b>		<b>7</b>	<b>(100)</b>	<b>49</b>	<b>(100)</b>	

A concordância entre as expressões das proteínas nos componentes invasivo e *in situ* na mesma mama foi considerada quase perfeita para a bcl-2 (kappa= 0,88), para a c-erbB-2 (kappa=0,84) e para os RE (kappa=0,89). Para a proteína p53 foi perfeita, com kappa de 1,0 (Tabelas 8, 9, 10 e 11) (Anexo 3).

**TABELA 8**

**Concordância entre a expressão da proteína bcl-2  
no CDIS misto e carcinoma invasivo misto**

CDIS	Carcinoma invasivo bcl-2		Total
	Positivo	Negativo	
<b>bcl-2</b>			
Positivo	24	1	<b>25</b>
Negativo	1	12	<b>13</b>
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>13</b>	<b>38</b>

Coeficiente kappa (IC 95%): 0,88 (0,73-1,00)

**TABELA 9**

**Concordância entre a expressão da proteína c-erbB-2  
no CDIS misto e carcinoma invasivo misto**

CDIS	Carcinoma invasivo c-erbB-2		Total
	Positivo	Negativo	
<b>c-erbB-2</b>			
Positivo	18	3	<b>21</b>
Negativo	0	17	<b>17</b>
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>38</b>

Coeficiente kappa (IC 95%): 0,84 (0,67-1,00)

**TABELA 10**

**Concordância entre a expressão da proteína p53  
no CDIS misto e carcinoma invasivo misto**

CDIS	Carcinoma invasivo P53		Total
	Positivo	Negativo	
<b>p53</b>			
Positivo	5	0	<b>5</b>
Negativo	0	33	<b>33</b>
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>33</b>	<b>38</b>

Coeficiente kappa (IC 95%): 1,00

**TABELA 11**  
**Concordância entre a expressão dos RE no**  
**CDIS misto e carcinoma invasivo misto**

CDIS	Carcinoma invasivo RE		Total
	Positivo	Negativo	
RE			
Positivo	23	2	25
Negativo	0	13	13
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>15</b>	<b>38</b>

Coeficiente kappa (IC 95%): 0,89 (0,74-1,00)

Observou-se, ainda, concordância quase perfeita do grau nuclear nos componentes invasivo e *in situ* da mesma mama, com coeficiente kappa de 0,89 (Tabela 12).

**TABELA 12**  
**Concordância entre o GN no CDIS misto**  
**e carcinoma invasivo misto**

CDIS	Carcinoma invasivo GN		Total
	Positivo	Negativo	
GN			
1 / 2	18	1	19
3	1	18	19
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>38</b>

Coeficiente kappa (IC 95%): 0,89 (0,75-1,00)

Compararam-se as características dos CDIS puros (53 casos) com os carcinomas invasivos puros (18 casos). Os carcinomas invasivos puros foram

mais bcl-2 e RE positivos do que os CDIS puros (OR= 0,26; IC 95%= 0,06-0,99) (OR= 0,16; IC 95%= 0,04-0,63). Os CDIS puros foram mais c-erbB-2 positivos do que os carcinomas invasivos puros (OR= 7,41; IC 95%= 1,87-31,80). A expressão da proteína p53 não mostrou diferenças entre esses dois grupos (Tabela 13).

**TABELA 13**  
**Análise da associação entre as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53 e RE no CDIS puro e carcinoma invasivo puro**

	CDIS puro		Invasivo puro		OR	IC 95%
	n	%	n	%		
<b>bcl-2</b>						
Negativo	28	(53)	4	(22)	ref.	
Positivo	25	(47)	14	(78)	<b>0,26</b>	(0,06-0,99)
<b>c-erbB-2</b>						
Negativo	17	(32)	14	(78)	ref.	
Positivo	36	(68)	4	(22)	<b>7,41</b>	(1,87-31,80)
<b>p53</b>						
Negativo	46	(87)	16	(89)	ref.	
Positivo	9	(13)	2	(11)	<b>1,57</b>	(0,27-11,76)
<b>RE</b>						
Negativo	34	(64)	4	(22)	ref.	
Positivo	19	(36)	14	(78)	<b>0,16</b>	(0,04-0,63)
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>(100)</b>	<b>18</b>	<b>(100)</b>		

Realizou-se análise comparativa entre os CDIS mistos (38 casos) e os puros (53 casos). Os CDIS mistos foram mais bcl-2 positivos do que os CDIS puros, porém com associação próxima do limite de significância estatística (OR bruto= 2,1; IC 95%= 0,9-5,1). Os CDIS mistos foram mais freqüentemente RE positivos do que os CDIS puros, tanto na análise do *odds ratio* bruto (OR bruto= 3,4; IC 95%= 1,4-8,3)

quanto do ajustado (OR ajustado= 3,8; IC 95%= 1,0-14,0). Não ocorreu associação entre a expressão da c-erbB-2, da p53, do grau nuclear e do comedocarcinoma com o tipo de CDIS (Tabela 14) (Anexo 4).

**TABELA 14**  
**Associação entre as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53, dos RE, do estado de menopausa, do GN e do tipo comedocarcinoma nos CDIS misto e puro**

	CDIS				OR bruto	IC 95%	OR ajustado	IC 95%
	Misto		Puro					
	n	%	n	%				
<b>bcl-2</b>								
negativo	13	(34)	28	(53)	Ref.		ref.	
positivo	25	(66)	25	(47)	<b>2,1</b>	(0,9 – 5,1)	<b>1,5</b>	(0,4 – 5,5)
<b>c-erbB-2</b>								
negativo	17	(47)	17	(32)	Ref.		ref.	
positivo	21	(53)	36	(68)	<b>0,6</b>	(0,2 – 1,4)	<b>0,6</b>	(0,2 – 2,0)
<b>p53</b>								
negativo	33	(87)	44	(83)	Ref.		ref.	
positivo	5	(13)	9	(17)	<b>0,7</b>	(0,2 – 2,4)	<b>1,3</b>	(0,3 – 4,8)
<b>RE</b>								
negativo	13	(34)	34	(64)	Ref.		ref.	
positivo	25	(66)	19	(36)	<b>3,4</b>	(1,4-8,3)	<b>3,8</b>	(1,0-14,0)
<b>Menopausa</b>								
pré	12	(33)	21	(40)	Ref.		ref.	
pós	24	(67)	32	(60)	<b>1,3</b>	(0,5 – 3,2)	<b>1,1</b>	(0,4 – 2,9)
<b>GN</b>								
1	7	(18)	3	(6)	Ref.		ref.	
2	12	(32)	16	(30)	<b>0,3</b>	(0,1 – 1,5)	<b>0,5</b>	(0,1 – 2,8)
3	19	(50)	34	(64)	<b>0,2</b>	(0,1 – 1,0)	<b>1,1</b>	(0,2–12,8)
<b>Tipo comedocarcinoma</b>								
comedo	13	(34)	35	(66)	Ref.			
não-comedo	25	(66)	18	(34)	<b>3,7</b>	(1,5 – 9,0)		
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>(100)</b>	<b>53</b>	<b>(100)</b>				

Entre os CDIS puros, somente um de 53 casos foi bcl-2 e c-erbB-2 negativo, 43 de 53 casos foram bcl-2 ou c-erbB-2 positivos. A expressão para a proteína

bcl-2 ou para a proteína c-erbB-2 nos CDIS puros apresentou *odds ratio* de 0,02 (IC 95%= 0,00<-0,19) (Tabela 15). Apenas três casos de 53 foram c-erbB-2 e RE negativos, 45 de 53 foram c-erbB-2 ou RE positivos. A expressão para a proteína c-erbB-2 ou para o estado dos RE no CDIS puro apresentou *odds ratio* de 0,03 (IC 95%= 0,00<-0,20) (Tabela 16).

**TABELA 15**

**Associação entre a expressão das proteínas bcl-2 e c-erbB-2 no CDIS puro**

c-erbB-2	bcl-2		OR bruto	IC 95%
	Positivo	Negativo		
Positivo	9	27	<b>0,02</b>	(0,00<-0,19)
Negativo	16	1	ref.	
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>28</b>	<b>53</b>	

**TABELA 16**

**Associação entre o estado dos RE e a expressão da proteína c-erbB-2 no CDIS puro**

c-erbB-2	RE		OR bruto	IC 95%
	Positivo	Negativo		
Positivo	5	31	<b>0,03</b>	(0,00<-0,20)
Negativo	14	3	ref.	
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>34</b>	<b>53</b>	

Na análise comparativa entre os tipos de carcinoma invasivo, puro ou misto, os carcinomas invasivos mistos foram mais c-erbB-2 positivos, com *odds ratio* de 0,1 (IC 95%= 0,01-0,7), ajustado pelas outras proteínas e pelos RE, estado de

menopausa, grau nuclear e grau de diferenciação. Houve expressão da proteína c-erbB-2 em cerca de metade dos casos de carcinoma invasivo misto e em 1/5 dos casos de carcinoma invasivo puro (Tabela 17). Não foram observadas associações entre as proteínas bcl-2 e p53 com o tipo de carcinoma invasivo, quando analisados pelos *odds ratio* bruto ou ajustado (Anexo 5). O estado de menopausa, RE, grau de diferenciação e grau nuclear também não mostraram associação com o tipo de carcinoma invasivo (Tabela 17).

**TABELA 17**

**Associação entre as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, dos RE, do estado de menopausa, do GN e do GD nos carcinomas invasivos puro e misto**

	Carcinoma Invasivo				OR bruto	IC 95%	OR ajustado	IC 95%
	Puro		Misto					
	n	%	n	%				
<b>bcl-2</b>								
negativo	4	(22)	13	(34)	ref.		ref.	
positivo	14	(78)	25	(66)	<b>1,8</b>	(0,4 – 6,7)	<b>1,3</b>	(0,2 – 6,5)
<b>c-erbB-2</b>								
negativo	14	(78)	20	(53)	ref.		ref.	
positivo	4	(22)	18	(47)	<b>0,3</b>	(0,08-1,1)	<b>0,1</b>	(0,01-0,7)
<b>p53</b>								
negativo	16	(89)	33	(87)	ref.		ref.	
positivo	2	(11)	5	(13)	<b>0,8</b>	(0,1 – 4,7)	<b>2,8</b>	(0,2–27,8)
<b>RE</b>								
negativo	4	(22)	15	(39)	ref.		ref.	
positivo	14	(78)	23	(61)	<b>2,3</b>	(0,6–8,3)	<b>2,1</b>	(0,3–12,4)
<b>Menopausa</b>								
pré	3	(17)	12	(33)	ref.		ref.	
pós	15	(83)	24	(67)	<b>2,5</b>	(0,6–10,3)	<b>1,7</b>	(0,3 – 8,0)
<b>GN</b>								
1	0	(0)	7	(18)	ref.		ref.	
2	10	(56)	12	(32)	ref.		ref.	
3	8	(44)	19	(50)	<b>0,8</b>	(0,5-1,6)	<b>1,8</b>	(0,7 – 4,4)
<b>GD</b>								
I	2	(11)	11	(29)	ref.		ref.	
II	12	(67)	14	(37)	<b>4,7</b>	(0,8-25,6)		
III	4	(22)	13	(34)	<b>1,7</b>	(0,2-11,1)		
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>(100)</b>	<b>38</b>	<b>(100)</b>				

Quando se avaliou o tipo comedocarcinoma no CDIS puro ou misto não houve associação com a p53 em nenhum dos dois grupos. Os CDIS puros do tipo comedocarcinoma foram mais c-erbB-2 positivos (OR= 20,2; IC 95%= 4,6-87), o que não aconteceu no grupo de CDIS misto. Os não-comedocarcinomas foram mais bcl-2 e RE positivos nos dois grupos de CDIS. O estado de menopausa não se associou com o tipo comedocarcinoma (Tabela 18).

**TABELA 18**  
**Distribuição das expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, dos RE e do estado de menopausa no tipo comedocarcinoma**

	CDIS puro				CDIS misto							
	comedo		Não comedo		OR	(IC95%)	Comedo		Não comedo		OR	(IC95%)
	n	%	n	%			n	%	n	%		
<b>bcl-2</b>												
negativo	25	(71)	3	(17)	ref.		9	(69)	4	(16)	ref.	
positivo	10	(29)	15	(83)	<b>0,08</b>	(0,01-0,3)	4	(31)	21	(84)	<b>0,08</b>	(0,01-0,4)
<b>c-erbB-2</b>												
negativo	4	(11)	13	(72)	ref.		4	(31)	16	(64)	ref.	
positivo	31	(89)	5	(28)	<b>20,2</b>	(4,6 – 87)	9	(69)	9	(36)	<b>4,0</b>	(0,9–16,8)
<b>p53</b>												
negativo	28	(80)	16	(89)	ref.		10	(77)	23	(92)	ref.	
positivo	7	(20)	2	(11)	<b>2,0</b>	(0,3-10,8)	3	(23)	2	(8)	<b>3,4</b>	(0,4–23,9)
<b>RE</b>												
negativo	30	(86)	4	(22)	ref.		10	(77)	3	(12)	ref.	
positivo	5	(14)	14	(78)	<b>0,05</b>	(0,01–0,2)	3	(23)	22	(88)	<b>0,04</b>	(0,01-0,24)
<b>Menopausa</b>												
pré	15	(43)	6	(33)	ref.		5	(42)	7	(29)	ref.	
pós	20	(57)	12	(67)	<b>0,7</b>	(0,2 – 2,2)	7	(58)	17	(71)	<b>0,6</b>	(0,1–2,4)
<b>TOTAL</b>	<b>35</b>	<b>(100)</b>	<b>18</b>	<b>(100)</b>			<b>13</b>	<b>(100)</b>	<b>25</b>	<b>(100)</b>		

Na avaliação do grau nuclear dos tipos de carcinoma, os carcinomas invasivos grau nuclear 3 foram mais freqüentemente p53 positivos do que aqueles com graus

nucleares 1 e 2 (OR= 0,05, IC 95%= <0,01-0,8), o que não foi observado no grupo de CDIS. Tanto os CDIS quanto os carcinomas invasivos com grau nuclear 3 foram mais c-erbB-2 positivos, o que foi mais evidente no primeiro grupo. Os CDIS e os carcinomas invasivos com graus nucleares 1 e 2 foram mais bcl-2 positivos, com maior associação entre os CDIS (OR= 27,6, IC 95%= 5,2-146,1; OR= 5,8, IC 95%= 1,5-21,2). Os casos com graus 1 e 2 foram mais freqüentemente RE positivos, tanto no grupo de CDIS quanto dos invasivos, com maior associação do primeiro grupo (OR= 55,1, IC 95%= 10-304; OR= 5,2, IC 95%= 1,5-17,6). O estado de menopausa não mostrou associação com o grau nuclear dos tipos de carcinoma (Tabela 19).

**TABELA 19**  
**Associação entre o GN dos tipos de carcinoma com as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53, dos RE e do estado de menopausa**

	Tipo de Carcinoma								OR	(IC95%)		
	CDIS				Invasivo							
	GN 1/ 2		GN 3		GN 1/ 2		GN 3					
n	%	n	%	n	%	n	%					
<b>bcl-2</b>												
negativo	2	(11)	26	(76)	ref.	4	(14)	13	(48)	ref.		
positivo	17	(89)	8	(24)	<b>27,6</b>	(5,2-146,1)	25	(86)	14	(52)	<b>5,8</b>	(1,5-21,2)
<b>c-erbB-2</b>												
negativo	15	(79)	2	(6)	ref.	25	(86)	9	(33)	ref.		
positivo	4	(21)	32	(94)	<b>0,01</b>	(<0,01-0,1)	4	(14)	18	(67)	<b>0,1</b>	(0,02-0,3)
<b>p53</b>												
negativo	18	(95)	26	(76)	ref.	29	(100)	20	(74)	ref.		
positivo	1	(5)	8	(24)	0,1	(0,02-1,6)	0	(0)	7	(26)	<b>0,05</b>	(0,01-0,8)
<b>RE</b>												
negativo	3	(16)	31	(91)	ref.	5	(17)	14	(52)	ref.		
positivo	16	(84)	3	(9)	<b>55,1</b>	(10,0-304)	24	(83)	13	(48)	<b>5,2</b>	(1,5-17,6)
<b>Menopausa</b>												
pré	6	(32)	15	(44)	ref.	6	(21)	9	(35)	ref.		
pós	13	(68)	19	(56)	<b>1,7</b>	(0,5-5,6)	22	(79)	17	(65)	<b>1,9</b>	(0,5-6,5)
<b>TOTAL</b>	<b>19</b>	<b>(100)</b>	<b>34</b>	<b>(100)</b>			<b>29</b>	<b>(100)</b>	<b>27</b>	<b>(100)</b>		

## 5. Discussão

---

Com base nos resultados deste estudo, e em dados da literatura, para orientar a discussão formularam-se duas premissas sobre os diferentes caminhos na evolução do carcinoma ductal *in situ* (CDIS).

Premissa um: uma parte dos carcinomas ductais *in situ* poderia estabilizar-se nessa forma, ou até mesmo regredir, e outra evoluiria até a forma invasiva. Do ponto de vista clínico interessaria identificar os CDIS que progrediriam para carcinoma invasivo.

Premissa dois: os carcinomas invasivos mistos (associados ao carcinoma ductal *in situ* na mesma mama) podem corresponder aos casos em que ocorreu progressão até a forma invasora em algum ponto de um CDIS preexistente.

Há muitas evidências de que as características morfológicas do CDIS, em especial o grau nuclear, mantenham-se constantes durante o processo evolutivo da doença, da fase pré-invasiva até a invasiva. Sabe-se que a associação entre as características histológicas dos componentes *in situ* e invasivo no mesmo

tumor é bastante significativa (LAMPEJO et al., 1994; GOLDSTEIN e MURPHY, 1996), como também foi observado no presente estudo.

Os eventos genéticos que provocam a proliferação epitelial na forma *in situ* definem as características morfológicas do clone neoplásico, que se mantêm estáveis após a invasão do estroma (GUPTA et al., 1997). É possível admitir que a transformação da forma *in situ* para a invasiva dependa de eventos genéticos distintos daqueles responsáveis pelas características morfológicas do carcinoma.

De acordo com os resultados deste estudo, é possível afirmar que os carcinomas ductal *in situ* e invasivo, associados na mesma mama, apresentam expressão das proteínas e estado dos RE semelhantes. O índice de concordância, medido pelo coeficiente kappa, entre as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53 e dos RE foi considerado quase perfeito ou perfeito. Dos 38 casos analisados, ocorreu divergência entre os componentes *in situ* e invasivo em apenas dois casos para a proteína bcl-2 e para os RE, em três para a c-erbB-2 e em nenhum para a p53. Outros estudos também mostraram que, quando estes dois componentes estão associados, há elevada concordância nos perfis imunistoquímico e genético (BARNES et al., 1992; KAPUCUOGIU et al., 1997; BUERGER et al., 1999; MÉNARD et al., 2001; MOMMERS et al., 2001; WÄRNBERG et al., 2002).

Descritivamente, os resultados deste estudo mostraram que cerca de 2/3 dos componentes *in situ* e invasivo no mesmo tumor expressaram a proteína bcl-2 (bcl-2 positivos), e aproximadamente metade expressaram a proteína c-erbB-2 (c-erbB-2 positivos). WÄRNBERG et al. (2001), relataram que cerca de metade

dos casos foram bcl-2 positivos e metade c-erbB-2 positivos nos dois componentes. QUERZOLI et al. (1998), mostraram que 1/3 foi c-erbB-2 positivo nos dois componentes. As diferenças na positividade entre esses estudos podem ser atribuídas a fatores relacionados à técnica de imunistoquímica, como também à variabilidade no perfil desse carcinoma entre diferentes populações.

A comparação entre os CDIS puros e mistos mostrou que a expressão das proteínas c-erbB-2 e p53 foi semelhante nos dois grupos. Todavia, os casos de CDIS misto foram mais freqüentemente RE positivos do que os CDIS puros, tanto na avaliação pelo *odds ratio* bruto quanto pelo ajustado. A expressão da proteína bcl-2 também foi mais freqüente nas mulheres com CDIS misto, ainda que a significância poderia ser considerada limítrofe (OR= 2,1 com IC 95%= 0,9 - 5,1;  $p=0,08$ ). Valorizou-se este resultado pela elevada associação entre a expressão da proteína bcl-2 e do estado dos RE, de tal forma que o valor que mostrou significância limítrofe pode ser conseqüente a uma amostra de baixo poder estatístico para demonstrar diferenças reais na população, pois apenas 38 mulheres apresentaram CDIS misto.

Houve predomínio de não-comedocarcinomas no grupo de CDIS misto, diferente dos CDIS puros em que predominaram os comedocarcinomas. Uma importante característica dos comedocarcinomas é a abundância de células que preenchem os ductos que estão no lobo envolvido, com freqüentes áreas de necrose que podem calcificar e aparecer na mamografia como microcalcificações de características suspeitas, tornando esses tumores radiologicamente mais evidentes

do que os não-comedocarcinomas (HOLLAND e HENDRIKS, 1994; KOPANS, 1998; SOUZA e ALVARENGA, 2002).

Se os comedocarcinomas tivessem maior capacidade de evoluir para carcinoma invasivo do que os não-comedocarcinomas, deveria-se supor que a forma predominante de CDIS misto (associado ao invasivo) fosse do tipo comedocarcinoma, o que não ocorreu neste estudo. Talvez certos CDIS do tipo não-comedocarcinoma tenham maior potencial de invasão do que os comedocarcinomas.

No presente estudo, os CDIS puros raramente foram concomitantemente negativos para a expressão da proteína c-erbB-2 e bcl-2 ou para a expressão da proteína c-erbB-2 e para os RE. Somente um de 53 casos foi bcl-2 e c-erbB-2 negativo, enquanto 43 de 53 casos foram positivos para uma ou outra proteína, mostrando *odds ratio* de 0,02 (IC 95%= 0,00<-0,19). De modo semelhante, apenas três em 53 CDIS puros foram c-erbB-2 e RE negativos, 45 de 53 tumores eram c-erbB-2 ou RE positivos, com *odds ratio* de 0,03 (IC 95%= 0,00<-0,20). Portanto, nesse grupo observou-se forte associação inversa entre a expressão positiva da proteína bcl-2 e a positividade dos RE em relação à expressão da c-erbB-2, situação essa descrita em outros estudos (POLLER et al., 1993; PERIN et al., 1996; ALBONICO et al., 1998; QUINN et al., 1998; MOMMERS et al., 2001; RINGBERG et al., 2001).

Esses resultados sugerem que para o CDIS manifestar-se seria necessária a participação da proteína c-erbB-2 ou dos RE, o que indicaria que esta fase da carcinogênese seria dependente de fatores externos à célula. De fato, a proteína

c-erbB-2 é uma glicoproteína receptora de membrana que, uma vez ativada por um fator de crescimento que vem de fora da célula, transmite sinais através da membrana celular até o núcleo (YARDEN, 2001). Já os RE localizam-se no núcleo e são ativados pelo estrógeno, que atravessa a membrana celular por difusão passiva (LIMA e GEBRIM, 1995).

A partir desses dados podemos inferir que os CDIS que progrediriam para carcinomas invasivos por serem RE positivos seriam os não-comedocarcinomas, que originariam carcinomas invasivos RE positivos de melhor prognóstico. Por outro lado, os CDIS que progrediriam por apresentarem expressão positiva para a proteína c-erbB-2 seriam os comedocarcinomas, originando carcinomas invasivos c-erbB-2 positivos de prognóstico ruim.

Admitindo-se que o grupo de CDIS puros contém os casos que iriam progredir para carcinoma invasivo e os que não seguiriam esse caminho, com base na premissa um, formulada no início da discussão, é possível supor que uma parte daqueles CDIS com maior chance de progredir teria perfil semelhante aos CDIS mistos. Em hipótese, então, os carcinomas ductais *in situ* RE e bcl-2 positivos e dos tipos não-comedocarcinoma estariam entre aqueles com maior chance de progressão.

Alguns autores sugerem que, baseados em seus resultados, certos tipos de CDIS, como os comedocarcinomas, possuiriam mecanismos que favoreceriam preferencialmente o desenvolvimento da forma *in situ*, e não da invasiva (BARNES et al., 1992; QUERZOLI et al., 1998). Outros acham que alguns comedocarcinomas falhariam em progredir para a invasão talvez pela maior instabilidade no controle da

proliferação e da apoptose celular, com persistência no estágio *in situ* por mais tempo do que outros carcinomas (VIACAVA et al., 1999; HOQUE et al., 2002).

Sabe-se que a extensão da lesão e o acometimento das margens cirúrgicas são importantes fatores preditivos para a recidiva local no tratamento conservador do CDIS (FISHER et al., 1998; HETEKIDIS et al., 1999; CROMBIE et al., 2001). Isto ocorreria porque os CDIS pouco diferenciados, que correspondem àqueles com grau nuclear 3 e do tipo comedocarcinoma, crescem de modo contínuo no interior dos ductos e podem acometer grandes extensões dentro do sistema ductal, o que dificultaria a retirada de toda lesão quando do tratamento cirúrgico conservador (FAVERLY et al., 1994).

Talvez o pior prognóstico dos CDIS com grau nuclear 3 e do tipo comedocarcinoma, descrito por certos autores (SKINNER e SILVERSTEIN, 2001), esteja relacionado mais à dificuldade de retirada de toda a lesão, com a permanência de doença residual, do que à sua maior capacidade de invadir o estroma. É possível admitir que esses CDIS estendam-se amplamente pelos ductos por não possuir capacidade imediata de atravessar a membrana basal, podendo adquiri-la depois de um tempo mais longo do que alguns CDIS dos tipos não-comedocarcinomas.

Possivelmente as lesões *in situ* com expressão positiva da bcl-2 originam-se de pequenos ductos e lóbulos mamários com essa característica, que na transformação neoplásica manteriam o mesmo fenótipo (VIACAVA et al., 1999). O gene Bcl-2 parece contribuir, especialmente no início do processo de transformação neoplásica, para a sobrevivência celular. Ele agiria regulando a taxa de proliferação

das células, por meio dos seus efeitos antiapoptótico e antimitótico, possibilitando a diferenciação celular. Por isso observa-se a maior expressão dessa proteína em células neoplásicas mais diferenciadas. Com a progressão do tumor até a invasão parece que o efeito antimitótico diminui e persiste o antiapoptótico, resultando em menor latência tumoral (VAN SLOOTEN et al., 1998; FURTH et al., 1999).

Neste estudo observou-se forte associação entre a expressão da proteína bcl-2 e dos RE, especialmente no grupo de CDIS, com *odds ratio* de 27,6 (IC 95%= 5,2-146), mas também entre os carcinomas invasivos com *odds ratio* de 11,0 (IC 95%= 2,9-41,3). Essa elevada associação está de acordo com outros estudos (GANDHI et al., 1998; QUINN et al., 1998; RINGBERG et al., 2001). O estrógeno, que atravessa a membrana plasmática por difusão passiva, liga-se aos seus receptores no núcleo celular. Esse complexo hormônio-receptor atua modulando a expressão do gene Bcl-2, o que poderia explicar o comportamento tão semelhante entre a expressão da proteína desse gene e do estado dos RE.

O tamoxifeno, que é um antiestrógeno, inibe a evolução da hiperplasia atípica para carcinoma *in situ* e deste para invasivo, quando utilizado na dose de 20mg ao dia por cinco anos (FISHER et al., 1999). Assim, é possível que nos carcinomas RE positivos o estrógeno atue sobre fatores relacionados ao processo de invasão, como as metaloproteínas, as moléculas de adesão intercelular ou os fatores angiogênicos, entre outros. Essa dependência do estrógeno em células neoplásicas RE positivas parece diminuir quando elas são também c-erbB-2 positivas, o que provoca resistência ao uso do tamoxifeno. Talvez nas células RE e c-erbB-2 positivas o processo de invasão ocorra preferencialmente pela

via c-erbB-2, com aumento na atividade das metaloproteínas e na capacidade de invasão (HAYES e THOR, 2002; MERIC et al., 2002).

Um fato sobre o possível papel do gene HER-2 no carcinoma ductal *in situ* deve ser destacado. Os CDIS expressam mais freqüentemente a proteína c-erbB-2 do que os carcinomas invasivos, o que pode significar que esta proteína contribua mais para o desenvolvimento e progressão do CDIS, pois aumentaria a proliferação e motilidade celular (LEAL et al., 1995; ALBONICO et al., 1998; QUINN et al., 1998; RÉVILLION et al., 1998; HO et al., 2000; RINGBERG et al., 2001). Quando a lesão progride para a forma invasiva ocorreria diminuição da sua expressão e teriam importância outros mecanismos independentes desse gene.

O grupo de mulheres com carcinoma invasivo mostrou menor número de casos c-erbB-2 positivos (39%) e maior número de casos RE positivos (66%), se comparado com o grupo de CDIS. Não foi observada, entretanto, associação inversa entre o estado dos RE e da expressão da proteína bcl-2 com a expressão da proteína c-erbB-2, como foi observado no CDIS.

Entre os carcinomas invasivos, comparou-se o grupo de 18 casos puros a outro de 38 casos mistos. Observamos comportamento semelhante entre esses dois grupos, a não ser em relação à expressão da proteína c-erbB-2, que foi mais freqüente no carcinoma invasivo misto na avaliação do *odds ratio* ajustado pelas demais variáveis, se comparado com o grupo de carcinoma invasivo puro. Alguns autores também observaram esta diferença entre esses dois grupos (ANDRULIS et al., 1998; QUERZOLI et al., 1998).

Os carcinomas invasivos puros exibiram, ainda, características bastante distintas daquelas mostradas pelos CDIS puros. Os carcinomas invasivos puros foram mais freqüentemente bcl-2 e RE positivos e c-erbB-2 negativos, sendo as diferenças significativas se comparados com os carcinomas *in situ* puros. Isso nos leva a supor que o carcinoma invasivo puro não se origina dos CDIS puros. O carcinoma invasivo sem áreas associadas de CDIS possivelmente sofreu alterações genéticas muito precoces, talvez ainda na fase de hiperplasia, passando muito rapidamente pela fase *in situ* ou talvez evoluindo diretamente sem passar por essa fase, constituindo o grupo de carcinomas invasivos “*de novo*” (WÄRNBERG et al., 2001; WÄRNBERG et al., 2002). Na verdade seriam lesões que, desde o início, possuiriam a capacidade de atravessar a membrana basal dos ductos.

Esses resultados podem sugerir que a etapa da carcinogênese correspondente ao carcinoma invasivo até 2,0cm de diâmetro restrito à mama teria padrões mais variados do que a fase *in situ*, e estaria mais associada à positividade de RE e de bcl-2 e menos dependente da proteína c-erbB-2 (QUERZOLI et al., 1998; MOMMERS, et al. 2001).

Há estudos que mostraram menor positividade para bcl-2 no carcinoma invasivo do que no *in situ* (ZHANG et al., 1997; WU et al., 2000; CORADINI et al., 2002). Todavia, como no presente estudo, outros também encontraram maior positividade entre casos invasivos do que os *in situ* (KAPUCOUGIU et al., 1997; WÄRNBERG et al., 2001).

Neste estudo observou-se que 68% dos CDIS foram c-erbB-2 positivos, valor significativamente maior do que o observado no grupo de carcinoma invasivo. Uma metanálise com 97 estudos publicados entre 1978 e 1996, que usaram métodos diferentes para avaliar a expressão do HER-2/*neu* no carcinoma da mama como *southern*, *northern* e *western-blot*, *PCR* (*polymerase chain reaction*), imunohistoquímica, citometria de fluxo e *FISH* (*fluorescent in situ hybridization*) mostrou maior positividade no carcinoma ductal *in situ* do que no invasivo (RÉVILLION et al., 1998). Quanto aos casos de carcinoma invasivo avaliados no presente estudo, a positividade para a proteína c-erbB-2 foi de 39%, semelhante aos resultados de outros autores (ANDRULIS et al., 1998; TSUDA et al., 1998; MOMMERS et al., 2001; SOUEN e CARVALHO, 2002).

A positividade de expressão da proteína p53 foi baixa neste estudo e não houve associação entre a expressão da proteína p53 e o tipo de carcinoma, *in situ* ou invasivo, concordando com outros autores (RAJAN et al., 1997; ZHANG et al., 1997; TSUDA et al., 1998; ROSEN, 2001).

Na avaliação dos receptores de estrógeno, os casos de CDIS parecem ter alta positividade em vários estudos, o que discorda do presente estudo em que foi só de 36% (MALAFA et al., 1991; POLLER et al., 1993; CHAUDHURI et al., 1993; KARAYIANN-AKIS et al., 1996; PERIN et al., 1996; ALBONICO et al., 1998). Isso pode ter ocorrido, talvez, pelo elevado número de casos com grau nuclear 3 no grupo de CDIS, por diferenças técnicas na avaliação da sua expressão ou porque os casos deste estudo possuem mesmo esta particularidade. Alguns autores

encontraram maior positividade entre tumores invasivos, quando comparados com *in situ*, concordando com os nossos dados (WÄRNBERG et al., 2001).

Os resultados deste estudo mostraram associação entre a expressão da bcl-2 com graus nucleares 1 e 2 e com graus de diferenciação I e II, concordando com diversos autores (SIZIOPIKOU et al., 1996; KRAJEWSKI et al., 1997; SIERRA et al., 1998; LÊ et al., 1999; BOTTINI et al., 2000; WU et al., 2000; HEMACHANDRAN et al., 2002). Houve associação entre a expressão das proteínas c-erbB-2 e p53 com o grau nuclear 3 e com o grau de diferenciação III, como descrito em outros estudos (BOBROW et al., 1994; SCHMITT, 1996; MACK et al., 1997; HO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001; HOQUE et al., 2002).

Os CDIS puros do tipo comedocarcinoma foram mais c-erbB-2 positivos do que os CDIS mistos, diferença essa já descrita por alguns (BARNES et al., 1992). Foi observada grande associação entre CDIS dos tipos não-comedocarcinomas e positividade para a expressão da proteína bcl-2 e dos RE, como descrito por outros (BUR et al., 1992; CHAUDHURI et al., 1993; POLLER et al., 1993; KARAYIANNAKIS et al., 1996; GANDHI et al., 1998).

Certas considerações devem ser feitas sobre a imunistoquímica para avaliar a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53 e dos RE. Algumas limitações dessa técnica, na avaliação do comportamento biológico de cada tumor e na comparação com a literatura, são: a variabilidade na utilização de diferentes técnicas (processamento do material, diferentes anticorpos primários), falta de consenso na interpretação dos resultados (diferentes sistemas de escores),

efeitos deletérios causados pela estocagem prolongada dos blocos de parafina que podem alterar a sensibilidade dessa técnica (em particular para a p53), entre outros (PRIOLEAU e SCHNITT, 1995; JACOBS et al., 1996; WERNER et al., 2000; BACHI, 2001). Entretanto, existem vantagens que tornam essa técnica disponível para a prática clínica, motivo pelo qual a utilizamos. Estas vantagens são: baixo custo, especificidade e rapidez, necessidade de poucos reagentes. Além disso, essa técnica pode ser feita com equipamentos encontrados em muitos laboratórios e têm, em algumas situações, estreita correlação com os resultados de outros métodos mais sofisticados e caros como o *FISH* (COUTURIER et al., 2000; DOWSET et al., 2000; BACHI, 2001; TSUDA et al., 2001).

Optou-se por definir como expressão positiva quando havia 10% ou mais de células coradas para as análises das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53 e RE. Ainda que não haja uma padronização sobre os critérios de interpretação, o corte em 10% parece ser bastante difundido (BOBROW et al., 1994; PILLAI et al., 1998; TSUDA et al., 1998; YAGAN et al., 1998; MEGHA et al., 2000; SOUEN e CARVALHO, 2002).

Como propostas para estudos futuros, seria importante avaliar esses CDIS que apresentarem recidiva local, para que sejam reanalisadas as expressões dessas proteínas tanto nas recidivas do tipo *in situ* quanto do tipo invasivo, além da expressão de outros genes e de receptores hormonais. Poder-se-ia, ainda, complementar a análise dos carcinomas invasivos mistos e CDIS mistos examinando as expressões de outros genes relacionados à carcinogênese mamária, além da angiogênese e da ploidia.

Podemos admitir, baseados neste estudo, que:

- 1) Para que o CDIS torne-se invasivo é necessária a participação de fatores externos, que alcançam as células pela via RE ou pela via c-erbB-2.
- 2) Os CDIS com maior potencial para invasão são os não-comedocarcinomas. Apesar do CDIS do tipo comedocarcinoma possuírem menor potencial invasor do que os não-comedocarcinomas, o fato dos comedocarcinomas ocuparem grandes extensões dentro dos ductos restringe tratamentos mais conservadores.
- 3) Os carcinomas invasivos puros não se originam dos CDIS diagnosticados rotineiramente e, talvez, evoluam diretamente a partir das hiperplasia atípicas.

## 6. Conclusões

---

- A expressão da proteína bcl-2 foi positiva em 47% dos CDIS e 70% dos carcinomas invasivos, da c-erbB-2 em 68% dos CDIS e 39% dos carcinomas invasivos, da p53 em 17% dos CDIS e 12% dos carcinomas invasivos. Ocorreram diferenças entre a expressão da proteína bcl-2, mais positiva entre os carcinomas invasivos, e da proteína c-erbB-2, mais positiva entre os CDIS.
  
- Nos CDIS houve associação:
  - entre a expressão da proteína bcl-2 e positividade para RE, graus nucleares 1 e 2 e tipos não-comedocarcinomas.
  - entre a expressão da proteína c-erbB-2 e negatividade para RE, grau nuclear 3 e tipo comedocarcinoma.
  
- Nos carcinomas invasivos até 2,0 cm houve associação:
  - entre a expressão da proteína bcl-2 e positividade para RE, graus nucleares 1 e 2 e graus de diferenciação I e II.

- entre a expressão da proteína c-erbB-2 e negatividade para RE, grau nuclear 3, grau de diferenciação III e pré-menopausa.
  - entre a expressão da proteína p53 e grau nuclear 3 e grau de diferenciação III.
- 
- Os CDIS mistos foram mais freqüentemente RE e bcl-2 positivos e do tipo não-comedocarcinoma, em relação aos CDIS puros.
  - Os carcinomas invasivos mistos foram mais freqüentemente c-erbB-2 positivos do que os carcinomas invasivos puros.
  - A concordância entre as expressões das proteínas bcl-2, c-erbB-2, p53, dos RE e do grau nuclear no CDIS e no carcinoma invasivo presentes na mesma mama foi quase perfeita ou perfeita.

## 7. Referências Bibliográficas

---

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Significância prognóstica dos receptores hormonais e do c-erbB-2 no câncer da mama feminina. **Rev Bras Mastol**, 12:33-40, 2002.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, 281:1322-6, 1998.

ALBONICO, G., QUERZOLI, P.; FERRETTI, S.; RINALDI, R.; NENCI, I. Biological profile of *in situ* breast cancer investigated by immunohistochemical technique. **Cancer Detec Prev**, 22:313-8, 1998.

ALLRED, D.G.; HARVEY, J.M.; BERERDO, M.; CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod Pathol**, 11:155-68, 1998.

ANDRULIS, I.R.; BULL, S.B.; BLACKSTEIN, M.E.; SUTHERLAND, D.; MAK, C.; SIDLOFSKY, S. et al. *Neu/erbB-2* amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. **J Clin Oncol**, 16:1340-9, 1998.

**ASA/STAT User's Guide**. SAS Institute, USA, 4<sup>a</sup> ed., 1989.

BACCHI, C.E. HER-2/*neu* (c-erbB-2) e câncer da mama. **Rev Bras Mastol**, 11(4): 143-50,2001.

BARNES, D.M.; BARTKOVA, J.; CAMPLEJOHN, R.S.; GULLICK, W.L.; SMITH, P.J.; MILLIS, R.R. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein: why does this occur more frequently in ductal carcinoma *in situ* than in invasive mammary carcinoma and is this of prognostic significance? ***Eur J Cancer***, 28:644-8, 1992.

BINDER, C.; MARX, D.; OVERHOFF, R.; BINDER, L.; SCHAUVER, A.; HIDDERMANN, W. bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathological variables. ***Ann Oncol***, 6:1005-10, 1995.

BLOOM, H.J.G.; RICHARDSON, W.W. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 has been followed for 15 years. ***Br J Cancer***, 11:359-77, 1957.

BOBROW, L.G.; HAPPERFIELD, L.C.; GREGORY, W.M.; SPRINGALL, R.D.; MILLIS, R.R. The classification of ductal carcinoma *in situ* and its association with biological markers. ***Sem Diag Pathol***, 11:199-207, 1994.

BOTTINI, A.; BERRUTI, A.; BERSIGA, A; BRIZZI, M.P.; BRUNELLI, A.; GORZEGNO, G. et al. p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients. ***Clin Cancer Res***, 6:2751-8, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2003**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>

BUERGER H.; OTTERBACH, O.; SIMON, R.; POREMBA, C.; DIALLO, R.; DECKER, T. et al. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma *in situ* of the breast - evidence of multiple genetic pathways. ***J Pathol***, 187:396-402, 1999.

BUR, M.E.; ZIMAROWSKI, M.J.; SCHNITT, S.J.; BAKER, S.; LEW, R. Estrogen receptor immunohistochemistry in carcinoma *in situ* of the breast. ***Cancer***, 69:1174-81, 1992.

CADY, B.; STONE, M.D.; SCHULER, J.G.; THAKER, R.; WANNER, M.A.; LAVIN, P.I. The new era in breast cancer – invasion, size and nodal involvement dramatically decreasing as a result of mammographic screening. **Arch Surg**, 131:301-8, 1996.

CARVALHO, F.M. Câncer da mama – anatomia patológica. In: FAUZER, S.A. **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo: Roca Ltda; 1995. p.587-602.

CHAUDHURI, B.; CRIST, K.A; MUCCI, S.; MALAFA, M.; CHAUDHURI, P.K. Distribution of estrogen receptors in ductal carcinoma *in situ* of the breast. **Surgery**, 113:134-7, 1993.

COMOGLIO, P.M.; BOCACCIO, C. I fattori di crescita controllano la proliferazione cellulare. In: COMOGLIO, P.M.; NICOLIN, A. **La cellula neoplastica: biologia, diagnose e terapia molecolare**. Milão – IT: UTET Periodici Scientifici; 1997. p.109-20.

CORADINI, D.; PELLIZZARO, C.; VENERONI, S.; VENTURA, L.; DAIDONE, M.G. Infiltrating ductal and lobular breast carcinomas are characterized by different interrelationships among markers related to angiogenesis and hormone dependence. **Br J Cancer**, 87:1105-11, 2002.

CORY, S.; VAUX, D.L.; STRASSER, A; HARRIS, A.W.; ADAMS, J.M. Insights from bcl-2 and myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. **Cancer Res**, 59 (suppl.):1685-92, 1999.

COUTURIER, J.; VINCENT-SALOMON, A.; NICOLAS, A.; BEUZEBOC, P.; MOURET, E.; ZAFRANI, B. et al. Strong correlation between results of fluorescent *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/ *neu*) gene status in breast carcinoma. **Mod Pathol**, 13:1238-43, 2000.

CROMBIE, N.; RAMPAUL, R.S.; PINDER, S.E.; ELSTON, C.W.; ROBERTSON, J.F.R.; ELLIS, I.O. Extent of ductal carcinoma *in situ* within and surrounding invasive primary breast carcinoma. **Br J Surg**, 88:1324-9, 2001.

DAHIYA, R.; DENG, G. Molecular prognostic markers in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 52:185-200, 1998.

DEMAY, R.M. The Pap smear. In: DeMAY, R.M. **The art & science of cytopathology**. Chicago-IL: ASCP Press; 1996. p.39-205.

DONE, S.J.; ARNESON, N.C.R.; ÖZÇELİK, H.; REDSTON, M.; ANDRULIS, I.L. *p53* mutations in mammary ductal carcinoma *in situ* but not in epithelial hyperplasias. **Cancer Res**, 58:785-9, 1998.

DOWSETT, M.; COOKE, T.; ELLIS, I.; GULLICK, W.J.; GUSTERSON, B.; MALLON, E. et al. Assessment of HER-2 status in breast cancer: why, when and how? **Eur J Cancer**, 36:170-6, 2000.

ELLIS, P.A.; SMITH, I.E.; DETRE, S.; BURTON, S.A.; SALTER, J.; A'HERN, R. et al. Reduced apoptosis and proliferation and increased bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**, 48:107-16, 1998.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.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. **Histopathology**, 19:403-10, 1991.

ENG-HEN, N.; FOOK-CHEONG, N.; TAN, P.; LOW, S.; CHIANG, G.; TAN, K. et al. Results of intermediate measures from a population-based, randomized trial of mammographic screening prevalence and detection of breast carcinoma among asian women – The Singapore Breast Screening Project. **Cancer**, 82:1521-8, 1998.

EUSEBI, V.; FEUDALE, E.; FOSCHINI, M.P.; MICHELI, A.; CONTI, A.; RIVA, C. et al. Long-term follow-up of *in situ* carcinoma of the breast. **Sem Diagn Pathol**, 11:223-35, 1994.

FAVERLY, D.R.G.; BURGERS, L.; BULT, P.; HOLLAND, R. Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma *in situ*: clinical implications. **Semin Diagn Pathol**, 11:193-8, 1994.

FISHER, B.; DIGNAM, J.; WOLMARK, N.; MAMOUNAS, E.; CONSTANTINO, J.; POLLER, W. et al. Lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. **J Clin Oncol**, 16:441-52, 1998.

FISHER, B.; DIGNAM, J.; WOLMARK, N.; WICKERHAM, L.; FISHER, E.R.; MAMOUNAS, E. et al. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. **Lancet**, 353:1993-2000, 1999.

FISHER, L.D.; VAN BELLE, G. **Biostatistics – a methodology for the health sciences**. New York, John Wiley & Sons; 1993.

FITZGIBBONS, P.L.; PAGE, D.L.; WEAVER, D.; THOR, A.D.; ALLRED, D.C.; CLARK, G.M., et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med**, 124:966-78, 2000.

FLEISS, J.C. Determining sample sizes needed to detect a difference between two populations. In: FLEISS, J.C. **Statistical methods for rates and proportion**. 2th ed. New York: John Wiley & Sons; 1981. p.33-49.

FRATI, L.; MODESTI, A. Apoptosi e malignità. In: COMIGLIO, P.M.; NICOLIN, A. **La cellula neoplastica: biologia, diagnose e terapia moleculare**. Milão – IT: UTET Periodici Scientifici; 1997. p.145-61.

FURTH, P.A.; BAR-PELED, U.; LI, M.; LEWIS, A.; LAUCERICA, R.; JAGER, R. et al. Loss of anti-mitotic effects of bcl-2 with retention of anti-apoptotic activity during tumor progression in a mouse model. **Oncogene**, 18:6589-96, 1999.

GANDHI, A.; HOLLAND, P.A.; KNOX, W.F.; POTTEN, C.S.; BUNDRED, N.J. Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma *in situ* of the breast. **Br J Cancer**, 78:788-94, 1998.

GASPARINI, G.; TOI, M.; VERDERIO, P.; RANIERI, G.; DANTE, S.; BONOLDI, E. et al. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. *Int J Oncol*, 12:1117-25, 1998.

GOLDSTEIN, N.S.; MURPHY, T. Intraductal carcinoma associated with invasive carcinoma of the breast – a comparison of the two lesions with implications for intraductal carcinoma classification systems. *Am J Clin Pathol*, 106:312-8, 1996.

GUPTA, S.K.; DOUGLAS-JONES, A.G.; FENN, N.; MORGAN, J.M.; MANSEL, R.E. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma *in situ*). *Cancer*, 80:1740-5, 1997.

HALDAR, S.; NEGRINI, M.; MONNE, M.; SABBIONI, S.; CROCE, C.M. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res*, 54: 2095-7, 1994.

HAYES, D.F.; THOR, A.D. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol*, 29:231-45, 2002.

HEMACHANDRAN, M.; NIJHAWAN, R.; JOSHI, K. Cytological grading, apoptosis, and bcl-2 protein expression in breast cancer. *Diagn Cytopathol*, 26:356-9, 2002.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770-6, 2000.

HETELEKIDIS, S.; COLLINS, L.; SILVER, B.; MANOLA, J.; GELMAN, R.; COOPER, A. et al. Predictors of local recurrence following excision alone for ductal carcinoma *in situ*. *Cancer*, 85: 427-31, 1999.

HO, G.H.; CALVANO, J.E.; BISOGNA, M.; BORGAN, P.I.; ROSEN, P.P.; TAN, L.K. et al. In microdissected ductal carcinoma *in situ*, HER-2/*neu* amplification, but not p53 mutation, is associated with high nuclear grade and comedo histology. *Cancer*, 89:2153-60, 2000.

HOLLAND, R.; HENDRIKS, J.H.C.L. Microcalcifications associated with ductal carcinoma *in situ*: mammographic-pathologic correlation. ***Semin Diagn Pathol***, 11:181-92, 1994.

HOQUE, A.; SNEIGE, N.; SAHIN, AA; MENTER, D.G.; BACUS, J.W.; HORTOBAGYI, G.N. et al. HER-2/*neu* gene amplification in ductal carcinoma *in situ* of the breast. ***Cancer Epidemiol Bio Prev*** 11:587-90, 2002.

HUGHES, K.S.; LEE, A.K.; ROLFS, A. Controvérsias no tratamento do carcinoma ductal *in situ*. In: LOPEZ, M.J. Problemas especiais no tratamento do câncer da mama ***Clín Cirurg Am Norte***. Rio de Janeiro: Interlivros; 1996. p.253-75. vol. 2

ISOLA, J.; VISAKORPI, T.; HOLLI, K.; KALLIONIEMI, O. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. ***J Natl Cancer Inst***, 84: 1109-14, 1992.

JACOBS, T.W.; PRIOLEAU, J.E.; STILLMAN, I.E.; SCHNITT, S.J. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. ***J Natl Cancer Inst***, 88:1054-9, 1996.

KAPUCUOGIU, N.; LOSI, L.; EUSEBI, V. Immunohistochemical localization of bcl-2 and bax proteins in *in situ* and invasive duct breast carcinomas. ***Virchows Arch***, 430:17-22, 1997.

KARAYIANNAKIS, A J.; BASTOUNIS, E.A; CHATZIGIANNI, E.B.; MAKR, G.G.; ALEXION, D.; KARAMANAKOS, P. Immunohistochemical detection of oestrogen receptors in ductal carcinoma *in situ* of the breast. ***Eur J Surg Oncol***, 22: 578-82, 1996.

KERR, J.F.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. ***Cancer***, 73: 2013-26, 1994.

KOPANS, D.B. Pathologic, mammographic, and sonographic correlation. In: KOPANS, D.B. **Breast Imaging**. New York: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p. 511-615.

KRAJEWSKI, S.; THOR, A.D.; EDGERTON, S.M.; MOORE II, D.H.; KRAJEWSKA, M.; REED, J.C. Analysis of bax and bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. **Clin Cancer Res**, 3:199-208, 1997.

LAGIOS, M.D.; MARGOLIN, F.R.; WESTDAHL, P.R.; ROSE, M.R. Mammographically detected duct carcinoma *in situ* – frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on recurrence. **Cancer**, 63:618-24, 1989.

LAMPEJO, O.T.; BARNES, D.M.; SMITH, P.; MILLIS, R. Evaluation of infiltration ductal carcinomas with a DCIS component: correlation of the histologic type of the *in situ* component with grade of the infiltrating component. **Semin Diagn Pathol**, 11:215-22, 1994.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, 33:159-74, 1977.

LÊ, M.G.; MATHIEU, M.C.; DOUG-RASY, S.; LE BIHAN, M.L.; EL ALL, H.A.; SPIELMANN, M. et al. *c-myc*, *p53* and *bcl-2*, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and lower risk of metastasis and death in operable patients. **Int J Cancer**, 84: 562-7, 1999.

LEAL, C.B.; SCMITT, F.C.; BENTO, M.J.; MAIA, N.C.; LOPES, C.S. Ductal carcinoma *in situ* of the breast – Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and *c-erbB-2* protein. **Cancer**, 75:2123-31, 1995.

LEMESHOW, S.; HOSMER JR., D.W. **Applied Logistic Regression**. 2ed., New York: John Wiley; 2000. 392p.

LIMA, G.R.; GEBRIM, L.H. Hormonioterapia. In: Abrão, F.S. **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo: Roca; 1995. p. 109-16.

MACK, L.; KERKVLIT, N.; DOIG, G.; O'MALLEY, F.P. Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma *in situ* of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erbB-2, bcl-2, and ki-67. **Hum Pathol**, 28:974-9, 1997.

MALAFIA, M.; CHAUDHURI, B.; THOMFORD, N.R.; CHAUDHURI, P.K. Estrogen receptors in ductal carcinoma *in situ* of breast. **Am Surgeon**, 56:436-9, 1991.

MEGHA, T.; FERRARI, F.; ARCURI, F.; LALINGA, A.V.; LAZZI, S.; CARDONE, C. et al. Cellular kinetics and expression of bcl-2 and p53 in ductal carcinoma of the breast. **Oncol Rep**, 7:473-8, 2000.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.L.; ENGLER, S.S.M. Morte celular. In: CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.H. **A célula 2001**. São Paulo: Manole LTDA; 2001. p.275-81.

MÉNARD, S.; FORTIS, S.; CASTIGLIONI, F.; AGRETI, R.; BALSARI, A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. **Oncology**, 61(suppl 2):67-72, 2001.

MERIC, F.; HUNG, M.C.; HORTOBAGYI, G.N.; HUNT, K.K. HER/*neu* in the management of invasive breast cancer. **J Am Coll Surg**, 194:488-501, 2002.

MOLL, U.M.; OSTERMEYER, A.G.; AHOMADEGBE, J.C.; MATHIEU, M.C.; RIOU, G. p53 mediated tumor cell response to chemotherapeutic DNA damage: a preliminary study in matches pairs of breast cancer biopsies. **Hum Pathol**, 26: 1293-301, 1995.

MOMMERS, E.C.M.; LEONHART, AM.; FALIX, F.; MICHALIDES, R.; MEIJER, C.J.L.M.; BAAK, J.P.A et al. Similarity in expression of cell cycle proteins between *in situ* and invasive ductal breast lesions of same differentiation grade. **J Pathol**, 194:327-33, 2001.

NAGAI, M.A. Oncogênese. In: FAUZER, S.A. **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo: Roca Ltda; 1995. p.17-37.

PAGE, D.L.; DUPONT, W.D.; ROGERS, L.W.; LANDENBERGER, M. Intraductal carcinoma of the breast: follow-up after biopsy only. **Cancer**, 49:751-8, 1982.

PAGE, D.L.; LAGIOS, M.D. Pathologic analysis of the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) B-17 trial. **Cancer**, 75:1219-22, 1995.

PERIN, T; CANZONIERI, S.; MASSARUT, S.; BIDOLI, E.; ROSSI, C.; RONCADIN, M. et al. Immunohistochemical evaluation of multiple biological markers in ductal carcinoma *in situ* of the breast. **Eur J Cancer**, 32A:1148-55, 1996.

PILLAI, M.R.; KESARI, A.L.; CHELLAM, V.G.; MADHAVAN, J.; NAIR, P.; NAIR, M.K. Spontaneous programmed cell death in infiltrating duct carcinoma: association with p53, bcl-2, hormone receptors and tumor proliferation. **Pathol Res Pract**, 194:549-57, 1998.

POLLER, D.N.; SNEAD, D.R.J.; ROBERTS, E.C.; GALEA, M.; BELL, J.A.; GILMOUR, A. et al. Oestrogen receptor expression in ductal carcinoma *in situ* of the breast: relationship to flow cytometric analysis of DNA and expression of the c-erbB-2 oncoprotein. **Br J Cancer**, 68:156-61, 1993.

PRIOLEAU, J.; SCHNITT, S.J. p53 antigen loss in stored paraffin slides. **New Engl J Med**, 332:1521-2, 1995.

QUERZOLI, P.; ALBONICO, G.; FERRETI, S.; RINALDI, R.; BECCATI, D.; CORCIONE, S. et al. Modulation of biomarkers in minimal breast carcinoma: a model for human breast carcinoma progression. **Cancer**, 83:89-97, 1998.

QUINN, M.; OSTROWSKI, J.L.; HARKINS, L.; RICE, A.J.; LONEY, D.P. Loss of bcl-2 expression in ductal carcinoma *in situ* of the breast relates to poor histological differentiation and to expression of p53 and c-erbB-2 proteins. **Histopathology**, 33:531-6, 1998.

RAJAN, P.B.; SCOTT, D.J.; PERRY, R.H.; GRIFFITH, C.D.M. p53 protein expression in ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the breast. **Breast Cancer Res Treat**, 42:282-90, 1997.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, 17:3225-36, 1998.

REHEN, S.K. Ciclo celular. In: CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.H. **A célula 2001**. São Paulo: Manole LTDA;2001. p.235-47.

RÉVILLION, F.; BONNETERRE, J.; PEYRAT, J.P. ErbB-2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. **Eur J Cancer**, 34:791-808, 1998.

RINGBERG, A; ANAGNOSTAKI, L.; ANDERSON, H.; IDVALL, I.; FERNÖ, M. Cell biological factors in ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the breast - relationship to ipsilateral local recurrence and histopathological characteristics. **Eur J Cancer**, 37:1514-22, 2001.

RODRIGUES, J.R.P.; DE LUCA, L.A; BACCHI, C.E.; UEMURA, G.; PINAFFI, T.L.R.; VESPOLI, H.M.D.L. et al. Fatores prognósticos do câncer da mama em mulheres na pré e pós-menopausa. **Rev Bras Mastol**, 11:9-16, 2001.

ROSEN, P.P. Intraductal carcinoma. In: ROSEN, P.P. **Rosen's breast pathology**. 2<sup>a</sup> ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.257-323.

SCHMITT, F. Carcinoma ductal *in situ* da mama: graduação histológica, marcadores biológicos e papel do anátomo-patologista. **J Bras Patol**, 32:8-13, 1996.

SCHMITT, F. Marcadores prognósticos em carcinoma mamário. In: ALVES. V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.30-46.

SCHWARTZ, G.F.; LAGIOS, M.D.; CARTER, D.; CONNOLLY, J.; ELLIS, I.O.; EUSEBI, V. et al. Consensus Conference on the Classification of Ductal Carcinoma *In Situ*. **Cancer**, 80: 1798-802, 1997.

SCHWARTZ, G.F.; SOLIN, L.J.; OLIVOTTO, I.A.; ERNSTER, V.L.; PRESSMAN, P.I. The consensus conference on the treatment of *in situ* ductal carcinoma of the breast, april 22-25, 1999. **Breast J**, 6:4-13, 2000.

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **End Rev**, 14:133-51, 1993.

SIERRA, A; CASTELLSAGUÉ, X.; COLL, T.; MAÑAS, S.; ESCOBEDO, A.; MORENO, A. et al. Expression of death-related genes and their relationship to loss of apoptosis in T1 ductal breast carcinomas. **Int J Cancer**, 79:103-10, 1998.

SILES, E.; VILLALOBOS, M; VALENZUELA, M.T.; NÚÑEZ, M.I.; GORDON, A.; McMILLAN, T.J. et al. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumor cell lines. **Br J Cancer**, 73: 581-8, 1996.

SIZIOPIKOU, K.P.; PRIOLEAU, J.E.; HARRIS, J.R.; SCHNITT, S.J. *bcl-2* expression in the spectrum of preinvasive breast lesions. **Cancer**, 77:499-506, 1996.

SKINER, K.A.; SILVERSTEIN, M.J. The management of ductal carcinoma in situ of the breast. **Endocr Rel Cancer**, 8:33-45, 2001.

SODDU, S.; SACCHI, A. La proteina p-53 e la riparazione del danno al DNA. In: COMOGLIO, P.M.; NICOLIN, A. **La cellula neoplastica: biologia, diagnose e terapia molecolare**. Milano – IT: UTET Periodici Scientifici; 1997. p.21-33.

SOUEN, J.; CARVALHO, F.M. Relação entre a expressão imunoistoquímica da proteína HER-2 e os estádios de cânceres de mama e o status dos linfonodos. **Rev Bras Mastol**, 12:11-4, 2002.

SOUZA, G.A.; ALVARENGA, M. Carcinoma *in situ* de mama. In: PIATO, S. **Tratado de ginecologia**. São Paulo: Artes Médicas; 2002. p.1104-17.

TSUDA, H.; SAKAMAKI, C.; TSUGANE, S.; FUKUTOMI, T.; HIROHASHI, S. A prospective study of significance of gene and chromosome alterations as prognostic indicators of breast cancer patients with lymph node metastases. **Breast Cancer Res Treat**, 48:21-32, 1998.

TSUDA, H.; AKIYAMA, F.; TERASAKI, H.; HASEGAWA, T.; KUROSUMI, M.; SHIMADZU, M.; et al. Detection of HER-2/*neu* (c-erbB-2) DNA amplification in primary breast carcinoma – interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. **Cancer**, 92: 2965-74, 2001.

UICC. Union Internationale Contre le Cancer. **TNM**. Disponível em:  
<<http://www.uicc.org/>>

VAKKALA, M.; LÄHTEENMÄKI, K.; RAUNIO, H.; PÄÄKKÖ, P.; SOINI, Y. Apoptosis during breast carcinoma progression. **Clin Cancer Res**, 5:319-24, 1999.

VAN SLOOTEN, H.J.; VAN DE VIJVER, M.J.; VAN DE VELDE, C.J.H.; VAN DIERENDONCK, J.H. Loss of bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death, but also with increased proliferative activity. **Br J Cancer**, 77:789-96, 1998.

VIACAVA, P.; NACCARATO, AG; BEVILACQUA, G. Different proliferative patterns characterize different preinvasive breast lesions. **J Pathol**, 188:245-51, 1999.

WÄRNBERG, F.; NORDGREN, H.; BERGKVIST, L. HOLMBERG, L. Tumor markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. **Br J Cancer**, 85:869-74, 2001.

WÄRNBERG, F.; CASALINI, P.; NORDGREN, H.; BERGKVIST, L.; HOLMBERG, L.; MÉNARD, S. Ductal carcinoma *in situ* of the breast: a new phenotype classification system and its relation to prognosis. **Breast Cancer Res Treat**, 73:215-21, 2002.

WERNER, M.; CHOTT, A.; FABIANO, A.; BATTIFORA, H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. **Am J Surg Pathol**, 24:1016-9, 2000.

WU, J.; SHAO, Z.; SHEN, Z.; LU, J.; HAN, Q.; FONTANA, J.A. et al. Significance of apoptosis and apoptotic-related proteins, bcl-2, and bax in primary breast cancer. **Breast J**, 6: 44-52, 2000.

YAGHAN, R.; STANTON, P.D.; ROBERTSON, K.W.; GOING, J.J.; MURRAY, G.D.; McARDLE, C.S. Oestrogen receptor status predicts local recurrence following breast conservation surgery for early breast cancer. **Eur J Surg Oncol**, 24:424-6, 1998.

YARDEN, Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. **Oncology**, 61(suppl 2):1-13, 2001.

ZHANG, G.J.; KIIMIJIMA, I.; ABE, R.; KANNO, M.; KATAGATA, W.; HANA, K. et al. Correlation between the expression of apoptosis-related bcl-2 and p-53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. **Clin Cancer Res**, 3:2329-35, 1997.

## **8. Bibliografia de Normatizações**

---

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.  
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4<sup>a</sup> ed.,  
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade  
de Ciências Médicas, Unicamp. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98  
(alterada 2002).

## 9. Anexos

---

### 9.1. Anexo 1

#### Avaliação da idade e peso segundo o tipo de carcinoma

Tipo de carcinoma	<i>n</i>	Idade (anos)		Peso (quilogramas)	
		média	Desvio padrão	média	Desvio padrão
CDIS puro	53	53,3 (23-72)	11,82	64,2 (42,0-93,0)	11,85
Invasivo puro	18	59,8 (34-73)	10,50	64,2 (48,0-88,0)	10,16
Invasivo + CDIS	38	58,3 (32-89)	14,37	63,4 (42,8-85,0)	10,83
<b>TOTAL</b>	<b>109</b>				

---

## 9.2. Anexo 2

### Ficha do estudo

Nº <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		
<b>1. IDADE</b> <input type="text"/> <input type="text"/> * anos	<b>2. PESO</b> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> , <input type="text"/> <input type="text"/> * quilogramas	<b>3. ESTADO DE MENOPAUSA</b> <input type="checkbox"/> 1. pré-menopausa 2. pós-menopausa
<b>4. TIPO DE CARCINOMA</b> <input type="checkbox"/> 1. CDIS 2. invasivo	<b>5. GN</b> <input type="checkbox"/> 1. 1 2. 2 3. 3	<b>6. GD</b> <input type="checkbox"/> 1. I 2. II 3. III
<b>7. bcl-2</b> <input type="checkbox"/> 1. positivo 2. negativo	<b>8. p53</b> <input type="checkbox"/> 1. positivo 2. negativo	<b>9. c-erbB-2</b> <input type="checkbox"/> 1. positivo 2. negativo
<b>10. RE</b> <input type="checkbox"/> 1. positivo 2. negativo		

### 9.3. Anexo 3

#### Correlação entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 no CDIS misto e carcinoma invasivo misto

CDIS	Carcinoma Invasivo					
	bcl-2		c-erbB-2		p53	
	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	Negativo
<b>bcl-2</b>						
positivo	<b>24</b>	<b>1</b>	10	15	2	23
negativo	<b>1</b>	<b>12</b>	8	5	3	10
<b>c-erbB-2</b>						
positivo	11	10	<b>18</b>	<b>3</b>	5	16
negativo	14	3	<b>0</b>	<b>17</b>	0	17
<b>p53</b>						
positivo	1	4	5	0	<b>5</b>	<b>0</b>
negativo	24	9	13	20	<b>0</b>	<b>33</b>
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>33</b>

#### 9.4. Anexo 4

### Associação entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 nos CDIS misto e puro

	CDIS				<i>OR</i> <i>bruto</i>	IC 95%	<i>OR</i> <i>ajustado</i>	IC 95%
	Misto		Puro					
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<b>bcl-2</b>								
negativo	13	34	28	53	ref.		ref.	
positivo	25	66	25	47	<b>2,1</b>	(0,9 – 5,1)	<b>1,9</b>	(0,7 – 5,1)
<b>c-erbB-2</b>								
negativo	17	47	17	32	ref.		ref.	
positivo	21	53	36	68	<b>0,6</b>	(0,2 – 1,4)	<b>0,8</b>	(0,2 – 2,2)
<b>p53</b>								
negativo	33	87	44	83	ref.		ref.	
positivo	5	13	9	17	<b>0,7</b>	(0,2 – 2,4)	<b>0,9</b>	(0,2 – 3,2)
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>100</b>	<b>53</b>	<b>100</b>				

## 9.5. Anexo 5

### Associação entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 no carcinoma invasivo puro ou misto

	Carcinoma Invasivo				<i>OR</i> <i>bruto</i>	IC 95%	<i>OR</i> <i>ajustado</i>	IC 95%
	Puro		Misto					
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<b>bcl-2</b>								
negativo	4	(22)	13	(34)	ref.		ref.	
positivo	14	(78)	25	(66)	<b>1,8</b>	(0,4 – 6,7)	<b>1,7</b>	(0,4 – 6,5)
<b>c-erbB-2</b>								
negativo	14	(78)	20	(53)	ref.		ref.	
positivo	4	(22)	18	(47)	<b>0,3</b>	(0,08–1,1)	<b>0,2</b>	(0,04–1,2)
<b>p53</b>								
negativo	16	(89)	33	(87)	ref.		ref.	
positivo	2	(11)	5	(13)	<b>0,8</b>	(0,1 – 4,7)	<b>3,0</b>	(0,3–28,2)
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>(100)</b>	<b>38</b>	<b>(100)</b>				