

JOSÉ FERNANDO DE SOUZA SALES JÚNIOR

**ACHADOS NÃO-PROLIFERATIVOS E EXPRESSÕES DO
MARCADOR Ki-67 E DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO
EM MAMA CONTRALATERAL DE MULHERES TRATADAS
DE CÂNCER DE MAMA, EM USO DE TAMOXIFENO**

Dissertação de Mestrado

**ORIENTADOR: Prof. Dr. CÉSAR CABELLO DOS SANTOS
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA**

**Unicamp
2003**

JOSÉ FERNANDO DE SOUZA SALES JÚNIOR

**ACHADOS NÃO-PROLIFERATIVOS E EXPRESSÕES DO
MARCADOR Ki-67 E DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO
EM MAMA CONTRALATERAL DE MULHERES TRATADAS
DE CÂNCER DE MAMA, EM USO DE TAMOXIFENO**

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

**ORIENTADOR: Prof. Dr. CÉSAR CABELLO DOS SANTOS
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA**

**Unicamp
2003**

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

Sa32a	<p>Sales Júnior, José Fernando de Souza Achados não-proliferativos e expressões do marcador ki-67 e dos receptores de estrógeno em mama contralateral de mulheres tratadas de câncer de mama, em uso de tamoxifeno / José Fernando de Souza Sales Júnior. Campinas, SP : [s.n.], 2003.</p> <p>Orientadores : César Cabello dos Santos, Marcelo Alvarenga Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Proliferação celular. 2. Biópsia por agulhas. 3. Mama – Câncer. I. César Cabello dos Santos. II. Marcelo Alvarenga. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	---

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: JOSÉ FERNANDO DE SOUZA SALES JÚNIOR

Orientador: Prof. Dr. CÉSAR CABELLO DOS SANTOS

Co-Orientador: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA

Membros:

1.

2.

3.

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

Data: 28/08/2003

Dedico este trabalho...

*À minha esposa Rita,
pelo seu amor incondicional,
fazendo da minha felicidade, a sua.*

*Ao meu filho Fernando,
que deu um sentido nobre à minha existência.*

*Aos meus pais, José Fernando e Maria Rosemira,
que em sempre me apoiaram em tudo na vida.*

Agradecimentos

À minha irmã Taciana e meu cunhado Francisco, pelo carinho e colaboração que sempre me deram.

À minha irmã Fabiana e minha cunhada Hellen, que são também minhas secretárias, pela tolerância para comigo nos momentos mais duros.

Ao meu orientador e amigo César Cabello, que esteve ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu co-orientador Dr. Marcelo Alvarenga, pela dedicação e apoio.

Às professoras Sophie e Salete, pela enorme contribuição dada em minha aula de qualificação.

À Rose e Marisa, do Laboratório de Patologia Experimental pelo enorme apoio.

À Margareth, secretária da pós-graduação, pelas inúmeras vezes que fez muito mais do que era a sua obrigação para me ajudar.

Ao pessoal da ASTEC, em especial à Sueli e à Fernanda, pela colaboração e carinho.

Aos amigos Antônio Celso Moraes e José Eduardo Anfe, pelo apoio e incentivo neste trajeto.

Às pacientes amigas ou amigas pacientes do Grupo de Apoio no Combate ao Câncer RENASCER, que não mediram esforços em me ajudar.

Aos colegas Cíntia Aleixo e Hairton Falavigna, pela ajuda e suporte técnico.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	vii
Resumo	viii
Summary	x
1. Introdução	12
2. Objetivos	34
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. Sujeitos e Métodos.....	36
3.1. Desenho do estudo	36
3.2. Tamanho da amostra	36
3.3. Seleção de sujeitos	37
3.3.1. Critérios de inclusão.....	37
3.3.2. Critérios de exclusão.....	37
3.4. Variáveis.....	38
3.5. Técnicas e testes.....	42
3.5.1. Técnica de biópsia por agulha grossa	42
3.5.2. Avaliação anatomopatológica	43
3.5.3. Técnica de imunistoquímica para expressão dos receptores de estrógeno e do marcador Ki-67.....	44
3.6. Instrumentos para coleta de dados	49
3.7. Coleta de dados	49
3.8. Processamento e análise dos dados	50
3.8.1. Processamento	50
3.8.2. Análise.....	50
3.9. Aspectos éticos	51
3.10. Consentimento livre e esclarecido	52
3.10.1. Esclarecimento verbal	52
3.10.2. Preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	53
4. Resultados	54
5. Discussão	63
6. Conclusões	71
7. Referências Bibliográficas.....	72
8. Bibliografia de Normatizações	83
9. Anexos	84
9.1. Anexo 1 - Ficha de Avaliação.....	84
9.2. Anexo 2 - Avaliação Anatomopatológica	86
9.3. Anexo 3 - Consentimento Livre e Esclarecido	87
9.4. Anexo 4 - Fórmulas estatísticas utilizadas no cálculo do tamanho amostral.....	89
9.5. Anexo 5 - TABELA 16	90
9.6. Anexo 6 - TABELA 17	91
9.7. Anexo 7 - TABELA 18	92
9.8. Anexo 8 - TABELA 19	93
9.9. Anexo 9 - TABELA 20	94

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTG	Departamento de Tocoginecologia
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
H.C.	Registro geral das pacientes no CAISM
HC	Hospital das Clínicas
mg	Miligrama(s)
ml	Mililitro(s)
OMS	Organização Mundial da Saúde
RE	Receptor de estrógeno
RNA	Ácido ribonucléico
RP	Receptor de progesterona
TGF	Fator de crescimento tumoral
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
®	Marca Registrada
μ	Micra(s)
%	Porcentagem

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de achados não-proliferativos, a expressão do marcador Ki-67 e dos receptores de estrógeno avaliados pelo método de imunistoquímica em mama contralateral de pacientes em tratamento de câncer de mama, usuárias de 20mg/dia de tamoxifeno por um ano ou mais. As mulheres foram recrutadas no Ambulatório de Patologia Mamária do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas e no Ambulatório de Oncologia Ginecológica da Prefeitura de São João da Boa Vista. Para isso, foi realizado um estudo descritivo que avaliou pacientes de abril a junho de 2003. Foram excluídas as pacientes com câncer de mama bilateral, as que estavam em uso de qualquer medicação que tenha ação como hormônio sexual, as pacientes com dificuldade de comunicação que interferisse na coleta de dados, as que haviam parado de usar o tamoxifeno há mais de 24 horas, as que estivessem em uso de medicações anticoagulantes, se o material para análise histológica fosse insuficiente ou se fosse encontrada alguma lesão maligna (nenhuma lesão atípica foi encontrada). Para o cálculo do tamanho amostral foi realizado um estudo-piloto com 13 pacientes. Foram então recrutadas

44 pacientes, submetidas à biópsia em mama contralateral com agulha grossa (dispositivo “biopsy-cut” com agulha gauge 14). A análise dos dados, quando necessária, foi feita pelo teste exato de Fisher com nível de significância estabelecido de 5%. Observamos que globalmente 82% das pacientes apresentaram achados não-proliferativos e 100% das pacientes apresentaram expressão leve do marcador Ki-67. Cerca de 70% das pacientes foram receptor de estrógeno negativo na mama contralateral. O tempo de uso do tamoxifeno não se associou aos achados não-proliferativos, nem à expressão do marcador Ki-67 e do receptor de estrógeno. O índice de massa corpórea não se associou aos achados não-proliferativos, à expressão do marcador Ki-67 e nem do receptor de estrógeno. A presença de achados não-proliferativos não esteve associada ao padrão de densidade mamográfica pelo método de Wolfe. Concluímos que o uso de tamoxifeno por mais de um ano associou-se a uma taxa de cerca de 80% de achados não-proliferativos e a uma baixa taxa de proliferação celular avaliada pelo marcador Ki-67. Com relação ao receptor de estrógeno, apenas 30% das pacientes apresentaram expressão positiva na mama contralateral de pacientes tratadas por câncer de mama.

Summary

The issue of this study was evaluate the frequency of no-proliferate findings, the immunoreactions of the monoclonal Ki-67 antibody and estrogen receptor in contra lateral breast of patients treated of breast cancer and in use of 20mg tamoxifen daily for one year or more They were selected in Breast Pathology Unit in State University of Campinas and in Gynecology-Oncology Unit of Prefeitura Municipal de São João da Boa Vista. A descriptive study had been done, evaluating patients from April to June 2003. Patients with bilateral cancer, in use of any sexual hormones at least one year, difficult of communication to collect information, if tamoxifen had been interrupted up to 24 hours, in use of any anticoagulant agents, if the tissue hadn't been proper to histological evaluation and if we had found any malignant lesion, in any of this cases, the patients were excluded. A pilot trial with 13 patients was carried out. Biopsy-cut with gauge 14 needle has done in contra lateral breast of 44 patients. Some data were analyzed with the help of Fisher's exact test, and others variables were merely descriptive. The significance level was defined at 5%. We observed that around 82% of the patients have had no-proliferate findings and 100% of the

patients have had mild immunoreaction of monoclonal Ki-67 antibody. Around 70% of the patients have had a negative expression of estrogen receptor. The length of time of use of tamoxifen did not associate to no-proliferate findings, immunoreactions of monoclonal Ki-67 antibody or estrogen receptor. The body mass index (BMI) didn't associate to no-proliferate findings, immunoreactions of monoclonal Ki-67 antibody or estrogen receptor. The no-proliferate findings did not associate to Wolfe's parenchyma pattern in mammograms. We have concluded that the use of tamoxifen at least 1 year has shown around of 80% no-proliferate findings in opposite breast of breast cancer patients. In concern of expression of estrogen receptor, just 30% of patients have had positive expression.

1. Introdução

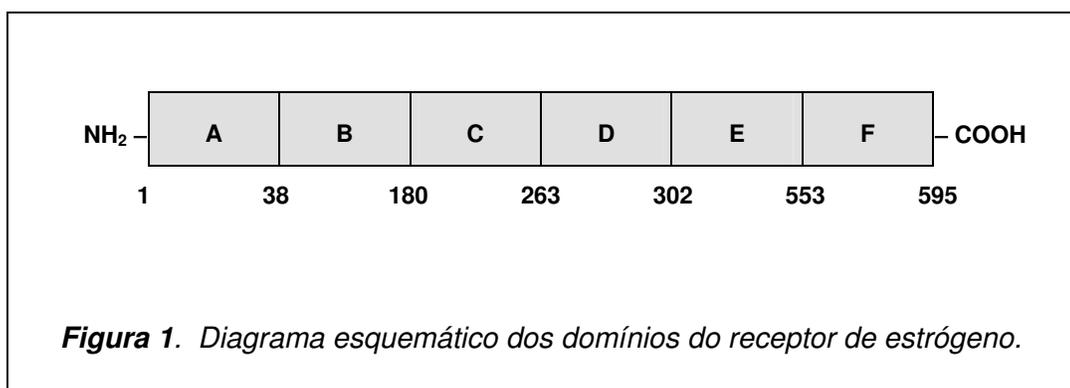
A relação entre a glândula mamária e os hormônios já se inicia intra-útero, na fase de desenvolvimento embrionário. Estrógeno, progesterona e certos tipos de glicocorticóides influenciam a diferenciação dos componentes parenquimatosos e mesenquimatosos, de mecanismo ainda não totalmente esclarecido. Também participando deste processo, e exercendo uma ação de bloqueio, aparecem os andrógenos. De maneira indireta complementando o ciclo de desenvolvimento da glândula, vêm a prolactina, a insulina, a tiroxina e o hormônio de crescimento, provocando uma progressão ordenada das células da mama em repouso para um estado funcional e estrutural diferenciado (KLEINEBERG et al., 1985; RUSSO e RUSSO, 1998).

A maior influência no crescimento mamário durante a puberdade é, sem dúvida alguma, do estrógeno. Na adolescência, com os níveis crescentes de estrógenos, a primeira resposta vem como aumento do tamanho e pigmentação da aréola. O tecido mamário liga-se aos estrógenos como os demais órgãos do aparelho reprodutor, mediado pelos receptores hormonais nas células mamárias.

O efeito primário dos estrógenos em mamíferos é estimular o crescimento da porção ductal do sistema glandular. Já a progesterona aparece influenciando o crescimento da porção alveolar do lóbulo. O desenvolvimento de receptores de estrógeno na mama não ocorre na ausência de prolactina; portanto, um hormônio somente não é capaz de completar todo o processo (KLEINEBERG et al., 1985; RUSSO e RUSSO, 1998).

Quando se observa que os estrógenos têm papel preponderante no desenvolvimento, diferenciação e proliferação da glândula mamária, e que os receptores hormonais estão intrinsecamente ligados a esse processo, pode-se entender a real importância destes receptores na cadeia de eventos. Vêm daí o enorme esforço e progresso que têm sido feitos nos últimos anos para entender a estrutura e o mecanismo de ação destas moléculas. Quando JENSEN e JACOBSON (1962) conseguiram realizar a identificação e quantificação dos receptores de estrógeno, iniciou-se uma corrida rumo ao entendimento destas proteínas. Os receptores de estrógeno e de progesterona pertencem a uma superfamília de receptores nucleares de hormônio, que incluem os receptores de hormônio de tireóide, da vitamina D, do ácido retinóico, além de outros. O clássico receptor de estrógeno, agora denominado alfa ($RE\alpha$), possui 595 aminoácidos que formam uma estrutura funcional que é dividida em domínios nomeados de A a F. Na extremidade do domínio A encontra-se um radical amina (NH_2) enquanto na extremidade oposta do domínio F encontra-se um radical carboxi (COO^-). *In vitro*, ensaios de mutageneses, estudos de mutação e deleção demonstraram cinco funções maiores nos domínios destas proteínas, assim descritas: A/B, relacionados

com função reguladora, tal como pela RNA-polimerase DNA-dependente, ou seja, a transcrição do receptor de estrógeno não dependente do hormônio; C, associação de dedos ligados de zinco com elemento de resposta a hormônio do DNA; D, região de dobradiça; E, associação de alta afinidade com ligante esteróide e finalmente o domínio F, que é importante para a modulação da atividade do receptor (Figura 1) (ELLEGE e FUQUA, 2000; KATZENELLENBOGEN et al., 2000).



A cascata de eventos que acontece no ambiente intracelular subsequente à ligação do hormônio com o receptor de estrógeno ainda não está totalmente esclarecida; porém, hipoteticamente e com base em algumas evidências, é possível traçar os rumos da reação. Os hormônios esteroideogênicos entram nas células-alvo por um processo de difusão passiva e combinam-se com proteínas receptoras específicas em uma reação com alto grau de afinidade e especificidade, reação esta que ocorre no domínio E do receptor hormonal específico (KATZENELLENBOGEN et al., 2000). A localização do receptor hormonal, de acordo com as evidências

de alguns trabalhos, é intranuclear na maior parte das vezes (WELSHONS et al., 1984; GUIOCHON-MANTEL et al., 1991). O complexo formado entre hormônio e receptor deve ser ativado, processo esse que envolve fosforilação e outras reações. O receptor de estrógeno encontra-se, enquanto inativado, ligado a certas moléculas chamadas de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) que se dissociam quando o hormônio liga-se ao receptor (ELLEDEGE e FUQUA, 2000; KATZENELLENBOGEN et al., 2000).

O complexo hormônio-receptor é então ativado, em um evento chamado de retenção, sofrendo um processo de dimerização, ligando-se à cromatina nuclear através da região da molécula do receptor chamada de domínio C, que é formada dentro de dois dedos fixadores de DNA com íons zinco (GREEN et al., 1988). A região do DNA em que o complexo hormônio-receptor se liga é chamada de elementos responsivos ao estrógeno (ERE). Atualmente são conhecidos três domínios de ativação do receptor de estrógeno – que vão estimular o DNA a sintetizar o RNA mensageiro – que são o domínio AF-1, tido como hormônio-independente, o AF-2, que se apresenta hormônio-dependente e o domínio AF-2 α , que possui tanto uma função ativadora transcricional quanto uma atividade estimuladora sobre o domínio AF-1 (ELLEDEGE e FUQUA, 2000; KATZENELLENBOGEN et al., 2000).

Recentes avanços no conhecimento a respeito da complexa cadeia de reações que envolvem este processo incorporaram ainda a participação de proteínas co-reguladoras, que funcionam como sinalizadores intermediários entre

os receptores de estrógenos e a mecânica transcricional, sendo a sua presença ou ausência determinante para que o receptor atue como repressor ou ativador transcricional. Fazem parte desta categoria de proteínas a CFP/p300, como co-ativadores, por exemplo, e como co-repressores a N-CoR e a SMRT, entre outras (ELLEGE e FUQUA, 2000; KATZENELLENBOGEN et al., 2000).

Em 1996, a identificação de um subtipo do receptor de estrógeno então batizado de receptor beta, enquanto o clássico foi chamado de alfa, trouxe mais luz sobre o funcionamento destas proteínas. Ele se localiza em um cromossomo diferente (cromossomo 14) do receptor alfa (cromossomo 6), além de apresentar diferenças estruturais, como conter 530 aminoácidos enquanto o receptor alfa apresenta 595. A sua localização também apresenta diferença, enquanto o alfa encontra-se preferencialmente na glândula mamária, o beta encontra-se em maior concentração, principalmente na próstata. O papel do receptor beta na mama ainda não está claramente definido (KUIPER et al., 1996; NILSSON e GUSTAFSSON, 2000).

É interessante avaliar a expressão dos receptores hormonais em mamas normais. A expressão dos receptores de estrógeno na mama na pós-menopausa gira em torno de 26%, enquanto o receptor de progesterona apresenta-se com a dosagem em torno de 2%. Estes dados mostram um contraste em relação à fase de menacme, quando a expressão dos receptores, em média, é de 6% de receptores de estrógeno e 29% de receptores de progesterona (JACQUEMIER et al., 1990). Outro dado relevante é que somente as células epiteliais apresentaram expressão de receptores hormonais, enquanto que, no útero, todas as células

estromais e endoteliais do endométrio e musculares lisas apresentaram expressividade dos receptores hormonais (LESSEY et al., 1988).

Sabe-se que existe variação dos receptores hormonais mamários na menacme, sendo que parece haver uma queda na expressão do receptor de estrógeno da primeira fase para a segunda fase do ciclo menstrual, enquanto o receptor de progesterona é discretamente afetado (DAHMOUSH et al., 1994). Por outro lado, NAZARIO et al. (1994) mostraram que na fase lútea (segunda fase) ocorre uma taxa de proliferação epitelial maior do que na primeira fase do ciclo. Desta forma, a expressão do receptor de estrógeno é inversamente proporcional à taxa de proliferação celular, ocorrendo na segunda fase do ciclo uma menor expressão destes receptores. A teoria que tenta explicar esta relação é de que as células que expressam o receptor de estrógeno, quando estão sob estímulo estrogênico, podem induzir a proliferação de outras células ao seu redor, que não apresentam estes receptores, através de mecanismos parácrinos (ANDERSON, 2002).

Diante de evidências que mostram a associação entre os estrógenos e o desenvolvimento e proliferação mamária, questiona-se a participação dos estrógenos na carcinogênese mamária.

Duas evidências no processo de atuação e metabolismo dos estrógenos na mama levam a crer que eles desempenham, sim, papel preponderante neste processo, sendo a primeira é que à medida que os estrógenos determinam um aumento da taxa de multiplicação celular, ao mesmo tempo diminuem o tempo

de reparação do DNA, aumentando, então, a chance de que um defeito no DNA produza uma célula neoplásica. Este seria um fator para os tumores estrógeno-dependentes. A segunda evidência, que explicaria o papel dos estrógenos na carcinogênese dos tumores receptores hormonais independentes, é a de que os estrógenos geram metabólitos que são genotóxicos e participariam de forma isolada ou sinérgica à primeira evidência na formação dos tumores (MORETÃO et al., 2001).

A observação de que o estrógeno participa como fator que faz a promoção e progressão do câncer de mama não é recente. Em 1889, ALBERT SCHINZINGER¹ de Freiburg na Alemanha, sugeriu que a remoção dos ovários nas mulheres na menacme provocaria um envelhecimento precoce com subsequente atrofia da mama e encapsulamento do tumor, basendo-se no princípio de que o tumor de mama era de pior prognóstico nas pacientes jovens.

Em 1896, *sir* George Thomas Beatson após observar que as vacas que eram fecundadas cerca de três meses após o parto prolongavam a lactação, relatou o caso de uma mulher de 33 anos, e ainda na menacme, com câncer de mama avançado atingindo a parede do tórax e que havia sido submetida à mastectomia. Foi submetida à ooforectomia bilateral e após oito meses a doença havia regredido de forma notável, vindo a paciente a morrer dois anos após a cirurgia (BEATSON, 1896).

¹ SHINZINGER A., 1889 apud SHETH S.P.; ALLEGRA J.C. Terapia endócrina do câncer de mama. In: BLAND K.I.; COPELAND E.M. A Mama: tratamento compreensivo das doenças benignas e malignas. São Paulo, Manole, 1994. p.1059-71.

Nos anos seguintes essa forma de tratamento foi sendo difundida, mostrando a regressão da doença metastática em somente 1/3 das pacientes. Esse grupo apresentava melhor prognóstico, com sobrevida duas a três vezes maior, quando comparado ao das pacientes cuja doença não regredia (HORSLEY, 1947; 1962; HENDERSON e CANELLOS, 1980; DEES e DAVIDSON, 2001).

A proposta de castração não cirúrgica foi feita pela primeira vez por DECOURMELLES (1922), utilizando a radioterapia para a ablação ovariana e sendo então seguido por outros autores, mostrando dados semelhantes à castração cirúrgica. O inconveniente da radioterapia em relação à cirurgia foi a demora de oito a dez semanas para se obter uma redução significativa na concentração sérica dos estrógenos (THAYSEN, 1948).

Com esses resultados, a proposta de castração profilática como forma de prevenir a recidiva e melhorar a sobrevida global veio à tona, resultando em vários anos de dados contrapostos, sendo que a maioria desses estudos teve um número pequeno de pacientes não dispostos em estudos aleatorizados e com controle (HORSLEY, 1947; 1962). Sob a luz dos dados atuais, a ooforectomia bilateral profilática ainda tem seu papel no tratamento adjuvante e na doença avançada das pacientes com receptores hormonais positivos (DEES e DAVIDSON, 2001).

Se havia falha da ablação ovariana em cerca de 2/3 dos casos para regressão da doença, uma possível explicação seria a produção de estrógenos mantida pela glândula adrenal. Os primeiros a colocar essa idéia em prática foram HUGGINS e BERGENSTAL 1951, que relataram seis casos de adrenalectomia

total, sendo que duas mulheres apresentaram regressão total, uma parcial e duas sem resposta. Esse procedimento só tornou-se exequível graças à descoberta da cortisona sintética no começo da década de 50, que deveria ser administrada nas pacientes submetidas à adrenalectomia. Nos anos que se seguiram, esse procedimento ganhou grande aceitação na terapia da neoplasia de mama avançada, produzindo um índice de remissão objetiva em torno de 34% (HENDERSON e CANELLOS, 1980). Porém, o índice de mortalidade no período de pós-operatório imediato e tardio variou entre 4% e 10% (HARRIS e SPRATT, 1969). Com o aparecimento de medicações que tornaram possível a adrenalectomia clínica, acompanhado do alto índice de morbimortalidade e da não reversibilidade do procedimento, levaram a adrenalectomia cirúrgica ao desaparecimento. Da mesma maneira, a realização concomitante da adrenalectomia com ooforectomia foi executada poucas vezes e não mostrou melhora da sobrevida global (NELSEN e DRAGSTEDT, 1961).

Se a ablação cirúrgica dos ovários podia apresentar resultados positivos na remissão tumoral, provavelmente a remoção das gonadotrofinas hipofisárias que regulam a secreção dos hormônios ovarianos também surtiria efeito. Com essa idéia, LUFT e OLIVECRONA (1955) foram os primeiros a relatar a hipofisectomia como forma de tratamento do câncer mamário metastático. Dos 36 pacientes tratados com essa técnica, nove morreram de complicações da cirurgia e 13 mostraram melhora subjetiva ou objetiva da doença por períodos que duraram de três a 28 meses. Estudos posteriores mostraram um índice de resposta em torno de 67% nas pacientes com receptor hormonal positivo e um índice de

morbimortalidade menor. MANNI et al. (1979), realizaram 212 hipofisectomias, com 11 óbitos relacionados à cirurgia.

As complicações clínicas como diabetes *insipidus*, hipotireoidismo e insuficiência adrenal, acompanhadas do aparecimento de novas drogas para tratamento clínico, com resposta semelhante e menor morbidade para a paciente, levaram também ao declínio desse tipo de cirurgia.

Com relação ao tratamento clínico, as primeiras tentativas de hormonioterapia no câncer de mama surgiram na década de 40 com o uso de estrógenos, e, desde então, numerosos trabalhos foram publicados relatando que 30% a 35% das pacientes na pós-menopausa apresentavam resposta objetiva positiva quando não selecionadas quanto ao receptor de estrógeno, e, se selecionadas, até 50% apresentavam melhora no período que variou de 12 a 14 meses. O estrógeno mais utilizado foi o dietilestilbestrol, que era usado em dose de 15mg via oral, diariamente. Se fossem usados os estrógenos conjugados, a dose seria de 30mg via oral, por dia (NATHANSON, 1952). Foi relatada uma série de efeitos colaterais como anorexia, vômito, enjôo, retenção hídrica, aumento da libido e incontinência urinária de esforço. O mecanismo de ação do estrógeno como antitumor não está completamente esclarecido, sendo que a hipótese aceita é que em altas doses o estrógeno exerce um efeito inibidor, enquanto que em baixas doses um efeito estimulante, visto em modelos animais (LIPPMAN et al., 1976).

Os andrógenos foram também utilizados em alguns trabalhos, com índice de resposta discretamente inferior ao dos estrógenos, tendo um desempenho

um pouco melhor quando na presença de metástases ósseas (KENNEDY, 1974). As drogas utilizadas foram o propionato de testosterona na dose de 100mg intramuscular, três vezes por semana, e a fluoximesterona com 10mg via oral, duas vezes por dia. Os efeitos colaterais, entretanto, eram bastante incômodos como virilização, retenção hídrica, enjôo, vômitos, libido aumentada, hepatotoxicidade e hipercalcemia (SHETH e ALLEGRA, 1994), sendo que por essa razão e devido ao aparecimento de fármacos com eficácia superior, também os estrógenos e andrógenos tiveram seu uso abandonado no tratamento do câncer de mama.

ESCHER e WHITE (1951), demonstraram que também a terapia com derivados da progesterona mostrou-se efetiva no tratamento do câncer de mama. Estudos realizados mostraram respostas entre 20% a 40% com duração entre três e 19 meses. A droga mais utilizada foi o acetato de megestrol na dose de 160mg via oral, diariamente, provocando efeitos colaterais discretos como ganho de peso, retenção hídrica e raros casos de trombose venosa profunda (ANSFIELD et al., 1976).

ROSS et al. (1982), prescreveram o acetato de megestrol para pacientes que não responderam ao tratamento com o citrato de tamoxifeno, obtendo 31% de remissão parcial e 33% de pacientes com doença estável. As evidências de que o tamoxifeno aumenta a expressão do receptor de progesterona servem como base para explicar a boa resposta do megestrol após a falha do tamoxifeno. Os estrógenos em baixas doses estimulam e em altas doses inibem, exercendo uma ação provavelmente de depleção dos receptores. Essa ação paradoxal é chamada de infra-regulação (*down-regulation*), pois tendo o tamoxifeno uma

ação estrogênica, estimularia a formação de receptores de progesterona (LIMA e GEBRIN, 1995).

Outra opção é o bloqueio do GnRH produzido no hipotálamo e que estimula a hipófise a sintetizar LH e FSH, que vão estimular os ovários a produzir seus hormônios. Têm eficácia semelhante à da ooforectomia cirúrgica em pacientes na pré-menopausa (HARVEY et al., 1985; ELLIS et al., 2000).

Outra categoria de drogas, que compõem o arsenal terapêutico, são os inibidores da aromatase, que se propõem a fazer uma adrenalectomia clínica. A aromatase é um complexo enzimático contendo uma proteína, a p450, e uma flavoproteína, a NADPH citocromo p450redutase. Este complexo é responsivo a uma cadeia enzimática que, por sua vez, tem a capacidade de converter a androstenediona e a testosterona em estrona. É encontrada em diversos tecidos como ovário, placenta, hipotálamo, fígado, músculo e tecido adiposo (MORETÃO et al., 2001). Nas mulheres na pós-menopausa o principal local de formação de estrógenos fica em tecidos extra-ovarianos, como o tecido adiposo e a pele, sendo o principal substrato para a formação destes, a androstenediona. Cerca de 2% da androstenediona circulante são convertidas em estrona e posteriormente em estradiol nos tecidos periféricos. Isso promove um aumento significativo nos níveis séricos de estradiol (MORETÃO et al., 2001).

Os tecidos müllerianos são alvo da ação dos estrógenos. Os meios como os estrógenos chegam até a célula são três: os hormônios, que chegam através da circulação (endócrino); as células vizinhas (parácrino), geralmente adiposas

que produzem estrógenos; e a produção de estrógenos pela própria célula (autócrino) (MORETÃO et al., 2001). Os inibidores da aromatase promovem então uma inibição na produção dos estrógenos. A primeira droga a ser utilizada foi a aminoglutemida, ministrada na década de 50 como medicação anticonvulsivante. Porém, ao se utilizar essa droga observou-se que os pacientes apresentavam insuficiência adrenal, por inibir a síntese de todos os hormônios esteróides da supra-renal, bloqueando a clivagem da cadeia lateral do colesterol via inibição das enzimas 11-beta-hidroxilase e aromatase. Vários estudos foram então realizados, observando-se a ação dessa droga no tratamento do câncer de mama metastático de mulheres na pós-menopausa (HUGHES e BURLEY, 1970; SANTEN e WELLS, 1980). Os trabalhos mostraram uma efetividade que girava entre 20% a 40%, com duração de seis a 12 meses. O principal obstáculo era a toxicidade com grande quantidade de efeitos colaterais que incluíam *rush* cutâneo, sonolência e inibição da síntese do cortisol. Quando se diminui a dose da aminoglutemida com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais, a sua eficácia também diminui (HARRIS e DOWSET, 1983).

Uma segunda geração de inibidores da aromatase foi então desenvolvida: a 4-hidroxiandrostenediona faz ligação irreversível com a aromatase causando inibição permanente com alto grau de seletividade pela enzima, cujo retorno à atividade depende de neo-síntese. Esta droga é de uso parenteral, porém com efeitos colaterais poucos e suaves. Clinicamente a 4-hidroxiandrostenediona é muito efetiva, sendo observada uma resposta efetiva de 36% nos pacientes com

tumores avançados com receptores de estrógeno positivos e ainda integra o arsenal terapêutico utilizado no tratamento do câncer de mama (COOMBES et al., 1999).

E, finalmente, uma terceira geração de inibidores da aromatase foi desenvolvida, oferecendo diferentes fórmulas que são: o letrozol, o anastrozol e o vorozol, drogas não esteroidais e o examestane, um inativador da aromatase esteroidal. São fármacos muito efetivos e com efeitos colaterais toleráveis (MORETÃO et al., 2001; BAUM et al., 2002).

Apesar das outras possibilidades de hormonioterapia do câncer de mama, a categoria que se tornou mais importante nos dias atuais foi a dos bloqueadores dos receptores de estrógeno, os antiestrógenos. O principal representante dessa categoria é o citrato de tamoxifeno, sendo atualmente a droga mais utilizada no tratamento e prevenção do câncer de mama no mundo (STEARNS e GELMANN, 1998). Outros antiestrógenos foram estudados no tratamento da neoplasia mamária. O primeiro a ser testado foi o citrato de clomifeno (clomid®) que mostrou uma resposta global de cerca de 39%, quando usado por um período de um ano e com mínimos efeitos colaterais, sendo o principal a náusea. Não recebeu, porém, a aprovação para o tratamento do câncer de mama (HECKER et al., 1974). Outros medicamentos como o mesilato de trioxifen e a nofoxidina foram também estudados, porém como o citrato de tamoxifeno apresenta maior eficácia e menor toxicidade, o seu uso foi abandonado.

O citrato de tamoxifeno, de nome científico (Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamine, possui a propriedade de atuar nos

diferentes tecidos, exercendo o papel de antiestrógeno em alguns órgãos como a mama e como agonista do estrógeno em outros órgãos como o endométrio (FURR e JORDAN, 1984). HARPER e WALPOLE (1967) foram os primeiros a utilizar o tamoxifeno como contraceptivo pós-coito em ratas. COLE et al. (1971), realizaram o primeiro estudo no uso do tamoxifeno para tratamento de câncer de mama avançado.

O mecanismo de ação dos agonistas e antagonistas dos estrógenos levou ao conceito de moduladores específicos do receptor de estrógeno (SERM) (BURGER, 2000). A maneira específica como os SERM agem nos tecidos permanece ainda obscura, sendo que vários mecanismos têm sido estudados como: estrutura do ligante, subtipo do receptor de estrógeno envolvido, natureza da resposta hormonal do gene promotor e caráter e balanço entre co-ativadores e co-repressores que modulam a resposta celular ao complexo receptor de estrógeno-ligante (KATZENELLENBOGEN et al., 2000).

O mecanismo de ação do citrato de tamoxifeno ainda não está totalmente claro. Estudos indicam que sua principal atividade é realizar um bloqueio competitivo em nível de receptor de estrógeno no tecido mamário tumoral, inibindo, desta forma, a síntese mediada pelo RNA-mensageiro. Entretanto, existe diferença entre a estrutura e a função do receptor de estrógeno bloqueado pelo estradiol e pelo tamoxifeno. *In vitro*, o tamoxifeno inibe as células em fase G₁ precoce, não permitindo a passagem para fase G₁ terminal. Parece haver, nesse caso, um efeito inibidor do tamoxifeno sobre o fator de transformação e crescimento (TGF_n) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), sendo que ambos os fatores

promovem a proliferação das células normais e tumorais. Além disso, o tamoxifeno inibe a secreção do TGF_n e do EGF. O tamoxifeno é um potente inibidor da proteína C quinase e liga-se de forma inibitória à calmodulina, uma proteína que participa da síntese do DNA, ação esta fora do eixo central de bloqueio do receptor de estrógeno. Estas ações parecem provocar aumento na atividade do linfócito *natural killer* (NK), levando à destruição do tecido neoplásico (MICAELA et al., 1989; LIMA e GEBRIM, 1995)

As propriedades do tamoxifeno incluem a redução da circulação do “*insulin-like growth factor-1*”, inibição da angiogênese e indução da apoptose (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS, 1998), já muito bem estudados em mamas com tumores. A ação principal do tamoxifeno sobre as células tumorais é preponderantemente tumoristática, muito mais do que tumoricida (GOTTARDIS et al., 1988).

O citrato de tamoxifeno é administrado via oral e utilizado na dosagem de 20mg/dia, dividida em duas doses. A meia-vida inicial é de sete a 14 horas, atingindo níveis plasmáticos máximos em quatro a sete horas e a meia-vida de eliminação pode exceder a sete dias. Sofre biotransformação hepática dando vários metabólitos, sendo o principal o N-desmetil-tamoxifeno. A excreção do tamoxifeno faz-se principalmente pelas fezes, sendo somente pequena fração detectada na urina. A maior parte da dose é eliminada na forma conjugada e menos de 30% são excretadas na forma hidroxilada ou inalterada. As contra-indicações são hipersensibilidade ao tamoxifeno, gravidez e lactação (FURR e JORDAN, 1984; MICAELA et al., 1989; NEVEN e VERNAEVE, 2000).

Os principais efeitos colaterais relatados do tamoxifeno são ondas de calor em cerca de 15% das pacientes, náusea em cerca de 10%, trombocitopenia e leucopenia em cerca de 5%. Outros efeitos menos comuns incluem sangramento vaginal, corrimento vaginal, irregularidade menstrual, erupção cutânea, alterações do sistema nervoso central como letargia, depressão e tontura, acometimento ocular, como retinopatia, e fenômenos tromboembólicos. O tamoxifeno tem efeito estrogênico no útero e um dos temidos efeitos colaterais é a estimulação endometrial, com o conseqüente aparecimento de hiperplasias e de tumores endometriais, aumentando o risco relativo para câncer de endométrio para 2,5 (NEVEN e VERNAEVE, 2000). As precauções no uso do tamoxifeno incluem realizar hemograma e dosagem do cálcio sérico periodicamente; uso de métodos contraceptivos eficazes, pois o tamoxifeno é um indutor de ovulação, e avaliação periódica do endométrio por ultra-sonografia; avaliar o risco-benefício quando existem as seguintes situações como leucopenia, catarata, sensibilidade ao fármaco, trombocitopenia, catarata ou distúrbio da visão. O tamoxifeno pode interagir com drogas como anticoagulantes orais; antiácidos (ranitidina, cimetidina ou famotidina); estrógenos. A resposta objetiva do tratamento ocorre dentro de quatro a dez semanas. (FURR e JORDAN, 1984; MICAELA et al., 1989; NEVEN e VERNAEVE, 2000).

Foram realizados estudos clínicos dos tumores de mama avançados com o tamoxifeno, obtendo-se uma resposta de cerca de 30% quando não selecionadas as pacientes quanto ao estado do receptor hormonal, 50% quando o receptor de estrógeno é positivo e de 60% a 75% quando os receptores de estrógeno e de

progesterona são positivos (WARD, 1973). Quanto à atuação do tamoxifeno no tratamento adjuvante, estudos importantes mostraram a grande melhora no tempo livre de doença e na sobrevida global (FISHER et al., 1989; FISHER et al., 1996).

As mulheres com antecedente pessoal de câncer de mama têm alto risco para desenvolver um novo tumor na mama contralateral saudável. Esse risco é estimado em pouco menos de 1% ao ano de sobrevida, a partir do tratamento inicial. Durante o uso do tamoxifeno como tratamento adjuvante para o câncer de mama, notou-se uma redução na incidência de tumores primários na mama contralateral (FISHER et al., 1989). Esta redução lançou as bases para os estudos de quimioprevenção em mulheres com alto risco para esta doença. São reconhecidos quatro grandes ensaios clínicos aleatorizados e duplo-cegos que estudaram este assunto:

FISHER et al. (1998) realizaram o estudo P-1 do NSABP, que se iniciou em 1992 e foi finalizado em 1997, a respeito da quimioprevenção do câncer de mama com o uso de 20 mg/dia de tamoxifeno comparado ao uso de placebo. Foram admitidas 13.388 mulheres saudáveis e com risco aumentado para câncer de mama. Observou-se uma redução de 45% na incidência de câncer de mama nas mulheres em uso do tamoxifeno.

Outro estudo foi o IBIS I, onde foram recrutadas 7.152 mulheres com alto risco para câncer de mama e seguidas por cinco anos, estando em uso de tamoxifeno 20mg/dia ou placebo. Obteve-se uma redução de 32% no risco relativo para tumores invasivos e não invasivos (CUZICK et al., 2002).

Ao contrário dos anteriores, POWLES et al. (1998), em estudo que recrutou 2.94 mulheres com alto risco para câncer de mama e que fizeram uso de 20mg/dia de tamoxifeno comparado ao de placebo por oito anos, não conseguiram demonstrar sua ação como agente efetivo de quimioprevenção.

Da mesma forma, no estudo italiano realizado por VERONESI et al. (1998), foram envolvidas 5.408 mulheres histerectomizadas, aleatorizadas entre o uso de 20mg/dia de tamoxifeno e o uso de placebo. Cerca de 48% das mulheres haviam sido submetidas à ooforectomia bilateral na pré-menopausa, sendo isso um fator de redução de risco. Este estudo também não mostrou eficácia do tamoxifeno como agente de prevenção primária do câncer de mama.

Finalmente, uma metanálise realizada por KINSINGER et al. (2002), incluindo esses trabalhos, dentre outros, mostrou ser o tamoxifeno efetivo na prevenção de câncer de mama receptor hormonal positivo.

Alguns estudos foram realizados avaliando o impacto do uso do tamoxifeno na densidade mamográfica de mama oposta normal de mulheres tratadas de câncer de mama. BRISSON et al., (2000) em um ensaio clínico duplo-cego aleatorizado com 69 mulheres e um tempo médio de uso do tamoxifeno de 3,4 anos, mostrou uma mudança de 44%, em média, para menor densidade do parênquima mamário avaliado pelo padrão mamográfico de Wolfe contra 15% do grupo placebo (WOLFE, 1976). CHOW et al. (2000), em um ensaio clínico com 28 pacientes com mamas de alto risco e que usaram tamoxifeno por até dois anos, observaram redução média de 4% ao ano do padrão fibroglandular

da mama avaliado na mamografia, por digitalização da imagem. Esta observação é uma evidência indireta de que o tamoxifeno leve o tecido mamário a uma provável atrofia do epitélio glandular.

TAN-CHIU et al. (2003), analisando 13.293 mulheres com mamas de alto risco para câncer e que participaram do NSABP *Breast Cancer Prevention Trial*, um grande ensaio clínico duplo-cego aleatorizado sobre o uso do tamoxifeno *versus* placebo, observaram que houve redução de 28% no grupo que usou tamoxifeno em relação a biópsias por lesões proliferativas benignas, mostrando um risco relativo de 0,72. Esta é uma evidência clínica de que o tamoxifeno pode levar a uma diminuição no aparecimento de achados proliferativos na mama.

A associação de risco entre as alterações proliferativas mamárias e o câncer de mama já foi estabelecida (DUPONT e PAGE, 1985). O padrão de atrofia mamária é o retrato da involução da porção fibroglandular, de onde potencialmente surgem os tumores epiteliais malignos da mama. A ação do tamoxifeno poderia ser por um bloqueio da proliferação mamária, induzindo a atrofia desta glândula.

A observação de que o uso do tamoxifeno leva a uma redução na incidência do câncer de mama de achados proliferativos benignos e da densidade mamográfica do padrão fibroglandular, aguça a curiosidade sobre o que acontece no tecido mamário sob a influência deste fármaco. WALKER et al., (1991) analisaram 17 biópsias de tecido “normal”, ou seja, próximos a lesões benignas ou em tecido de mastectomias por câncer de mama em mulheres que fizeram uso de 40mg/dia de tamoxifeno, por um período que variou de quatro dias a três

meses, com relação ao marcador Ki-67, receptor de estrógeno e progesterona e ao fator de crescimento epidérmico (EGFR), não encontrando diferença entre o tecido sobre influência do tamoxifeno e 50 biópsias de tecido mamário de mulheres que não utilizaram o fármaco. Já BERNARDES et al. (1999), realizaram um estudo duplo-cego aleatorizado com mulheres na pré-menopausa que iriam se submeter à biópsia mamária por lesões benignas. Administraram 10mg ou 20mg/dia de tamoxifeno, por 22 dias, para dois grupos *versus* placebo, e encontraram uma redução significativa da proliferação mamária avaliada pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). FACINA et al., (1997) e TANAKA et al., (1997) estudaram mulheres na pré-menopausa que seriam submetidas à exérese de lesões benignas, sendo então administrado tamoxifeno na segunda fase do ciclo e avaliado o tecido mamário próximo ao local da lesão com relação à quantificação de lisossomas. Esta quantificação é uma avaliação indireta da ação dos estrógenos na célula mamária. Os resultados desses estudos mostraram-se discordantes.

Esses estudos avaliaram a ação do tamoxifeno por um curto período de tempo e em mulheres que não apresentavam alto risco para câncer de mama. Para estudar mamas de alto risco e sob influência do tamoxifeno por longo período, desenhou-se isso um estudo para avaliar, no tecido mamário, o que se observou em termos de proliferação glandular. Para isso alguns instrumentos de avaliação da proliferação foram usados como o marcador Ki-67. O marcador Ki-67 é um anticorpo monoclonal específico para um antígeno nuclear, expresso apenas em células em proliferação (fase G₁ tardia, S, M e G₂ do ciclo celular). Esse anticorpo pode ser utilizado em fragmento fresco ou congelado e detectado

então por ensaio imunoistoquímico. Quanto maior a expressão do marcador Ki-67, maior a quantidade de células em proliferação. Sua expressão é dada pela porcentagem de células epiteliais coradas. A sua interpretação é feita como leve (até 10% de células coradas), moderada (11% a 20% de células) e intensa (acima de 20% de células) (GERDES, 1984; CLARK, 2000).

Outro instrumento de avaliação da proliferação utilizado foi a análise histomorfológica. Para tanto, foi preparado o material em blocos de parafina, que foi cortado no micrótomo, fixado em lâmina, desparafinado e corado com hematoxilina-eosina. Foi analisado em microscópio ótico com objetiva de 40 vezes. A avaliação levou em consideração uma série de parâmetros como a relação da gordura com o tecido epitelial, o número de camadas e tipos de células que revestem os ductos e, por fim, o número de unidades ducto-lóbulo terminais. A unidade ducto-lóbulo terminal é a unidade básica morfofuncional da mama, sendo composta pelo lóbulo e pela parte terminal do ducto. É de grande importância na carcinogênese mamária, pois existem evidências de que a maioria dos tumores epitelial da mama nasce a partir das células-tronco que se encontram na transição entre o ducto terminal e o lóbulo (RUDLAND, 1993).

O presente trabalho tem, portanto, os objetivos de descrever a frequência de lesões não-proliferativas em mama contralateral de mulheres tratadas de câncer de mama e que estão em uso de 20 mg/dia de tamoxifeno há 12 meses ou mais, avaliada pela histomorfologia e pela expressão do marcador Ki-67, e do receptor estrógeno pelo método imunoistoquímico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a frequência dos achados não-proliferativos, da expressão do marcador Ki-67 e dos receptores de estrógeno em mama contralateral de pacientes em tratamento de câncer de mama e usuárias de 20 mg/dia de tamoxifeno há pelo menos 12 meses, segundo tempo de uso, índice de massa corpórea, idade e tempo de menopausa.

2.2. Objetivos específicos

Em mama contralateral de pacientes tratadas de câncer de mama e usuárias de 20mg/dia de tamoxifeno por pelo menos 12 meses, avaliar:

1. A frequência de achados não-proliferativos pela análise histomorfológica e sua associação com o tempo de uso do tamoxifeno, índice de massa corpórea e idade.

2. A associação entre a frequência de achados não-proliferativos e o padrão mamográfico avaliado pelo método de Wolfe (WOLFE, 1976).
3. A frequência da expressão dos receptores de estrógeno realizado pela análise imunistoquímica e sua associação com o tempo de uso do tamoxifeno, índice de massa corpórea e idade.
4. A frequência da expressão do marcador Ki-67 realizada pela análise imunistoquímica.

3. Sujeitos e Métodos

3.1. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo clínico descritivo.

3.2. Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado através de um estudo-piloto com usuárias de 20mg/dia de citrato de tamoxifeno, por pelo menos 12 meses, cujo resultado mostrou um grau de atrofia do tecido mamário de 86,7%.

Adotando-se um nível de significância de 5,0% e um erro da amostra de 10,0%, obteve-se o n de 44 pacientes, com um intervalo de confiança da prevalência que vai de 76,7% a 96,7% (Anexo 3).

Foram então biopsiadas 48 pacientes, mas quatro apresentaram problemas técnicos com o material retirado no processamento anatomopatológico, sendo então desprezados, totalizando 44 casos.

3.3. Seleção de sujeitos

Foram selecionadas pacientes portadoras de câncer de mama que estavam em uso de 20mg/dia de citrato de tamoxifeno, acompanhadas no Ambulatório de Patologia Mamária do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e no Ambulatório de Oncologia Ginecológica da Prefeitura de São João da Boa Vista, no período de abril a junho de 2003, e selecionadas a partir da ordem de chegada.

3.3.1. Critérios de inclusão

- Pacientes em tratamento de carcinoma invasivo da mama em uso de 20mg/dia de citrato de tamoxifeno por pelo menos 12 meses.
- Pacientes com exame clínico normal e sem alterações suspeitas na mamografia da mama contralateral.

3.3.2. Critérios de exclusão

- Carcinoma de mama bilateral.
- Uso de medicações, excetuando-se o citrato de tamoxifeno, que tenham ação direta ou indireta, como hormônios sexuais no último ano.
- Parada da utilização do tamoxifeno 24 horas ou mais da realização da biópsia.

- Qualquer dificuldade de comunicação com a paciente que possa influenciar a coleta dos dados.
- Uso de substâncias que possam causar sangramento (ácido acetil salicílico, heparinas, dicumarínicos, e outros).
- Quantidade de material insuficiente para análise na biópsia realizada na mama contralateral.
- Diagnóstico de lesão maligna, *in situ* ou invasora da mama, na biópsia realizada nesta pesquisa.

3.4. Variáveis

- **Receptor de estrógeno:** Expressão dos receptores de estrógeno realizada pela técnica de imunistoquímica do tecido mamário, coletado por biópsia de agulha grossa e processado com o conjunto de imunistoquímica do laboratório DAKO®, categorizado como: negativo (0%); leve (de 0%-9%), moderado (de 10% a 49%) e intenso (maior que 50%).
- **Proliferação:** A avaliação do tecido mamário coletado por agulha grossa previamente inserido em parafina, desparafinado e corado por hematoxilina-eosina, foi realizada pelo patologista que utilizou um

microscópio ótico com aumento de 400 vezes, segundo os critérios anatomopatológicos, categorizado em: proliferativo e não-proliferativo.

- **Ki-67:** Dosagem realizada pela técnica de imunistoquímica do marcador Ki-67 presente no tecido mamário, coletado por biópsia de agulha grossa e processado pelo *kit* de imunistoquímica do laboratório DAKO®, categorizado como: leve (menor que 10%), moderada (de 11% a 20%), intensa (acima de 21%).
- **Idade:** Idade em anos completos, referida pela paciente no dia da entrevista.
- **Tempo de menopausa:** número de anos completos entre a menopausa e o dia da consulta, referido pela paciente como (JASZMAN, 1973): até quatro anos, cinco anos ou mais.
- **Tempo de uso do tamoxifeno:** tempo, em anos, de uso do tamoxifeno, categorizado como: menos que dois anos, e dois anos ou mais.
- **Padrão mamográfico:** padrão mamográfico observado na última mamografia realizada na paciente, com no máximo seis meses de intervalo, segundo os critérios de Wolfe (WOLFE, 1976):
 - N1: parênquima composto predominantemente por tecido gorduroso, com no máximo pequenas ilhas de "displasia". Ductos não visíveis.

- P1: parênquima composto na sua maioria por gordura, com ductos proeminentes na porção anterior até 1/4 da mama. Também pode ser uma fina faixa de ductos estendendo-se dentro de um quadrante.
- P2: Severo envolvimento com padrão ductal, ocupando mais de 1/4 do volume da mama.
- Dy: Severo envolvimento com "displasia". Com frequência confunde-se com padrão ductal proeminente.

Foi categorizada como: denso (agrupando o padrão N1 e P1) e não-denso (agrupando o padrão P2 e Dy).

- **IMC:** índice de massa corpórea é a relação entre peso (em quilogramas) e a altura multiplicada ao quadrado (em centímetros), sendo categorizado como: até 24, de 25 a 29 e 30 ou mais (KEYS et al., 1972).
- **RE do tumor:** Avaliação da dosagem dos receptores de estrógeno do tumor primário da paciente, categorizado como negativo ou positivo.
- **Estádio:** Estádio pós-operatório dos tumores de mamas das pacientes do estudo (AJCC, 1997).
- **Cor:** Cor de pele da paciente, avaliada pelo pesquisador e categorizada como: branca e não-branca.

- **Menarca:** Idade, em anos completos, em que a paciente teve a sua primeira menstruação.
- **Tipo histológico:** Tipo histológico do tumor primário, categorizado como ductal e não-ductal.
- **RP do tumor:** Avaliação da dosagem dos receptores de progesterona do tumor primário da paciente, categorizado como negativo ou positivo.
- **Cirurgia:** Tipo de cirurgia a que foi submetida a paciente para o tratamento do câncer de mama, categorizada como:
 - Conservadora: qualquer cirurgia que conserve a mama como a quadrantectomia, a tumorectomia e a setorectomia.
 - Radical: qualquer tipo de cirurgia que extirpe a mama, como a mastectomia à Pattey, à Madden, à Halsted ou simples.
- **Radioterapia:** Tratamento radioterápico a que a paciente foi submetida devido ao câncer de mama, categorizado como: sim ou não.
- **Quimioterapia:** Tratamento quimioterápico a que paciente foi submetida pelo câncer, categorizado como: sim ou não.

3.5. Técnicas e testes

3.5.1. Técnica de biópsia por agulha grossa

A biópsia por agulha grossa foi realizada em região que, segundo o exame mamográfico, correspondeu à área de maior densidade fibroglandular. Como a mamografia tinha o propósito de guiar o médico até a área de maior densidade glandular, se tivesse sido realizada há mais de seis meses era solicitada novamente. Com a paciente em decúbito dorsal foi feita a anti-sepsia, com solução de povidine tópico, na mama a ser biopsiada. Colocou-se um campo fenestrado estéril. Efetuou-se a colocação da agulha grossa no dispositivo que iria disparar o mandril da agulha, preparando-o para a biópsia. O bloqueio anestésico foi feito com solução de lidocaína a 2% quando se injetou cerca de 3ml com uma agulha calibre 25/7 a 1cm da borda da aréola no quadrante súpero-externo. Uma incisão com 2mm ou 3mm foi feita com uma lâmina de bisturi número 15, para a introdução da agulha grossa com 14 gauge de diâmetro que foi conectada a um dispositivo que realiza o avanço e recuo do mandril da agulha para a biópsia. A agulha foi introduzida cerca de 2cm a 3cm, sendo então realizado o disparo do dispositivo e retirada a agulha com o fragmento, que foi recolhido. Foi então armado novamente o dispositivo para se coletar novo fragmento.

Foram retirados em média cinco fragmentos de cada paciente. Após o término da biópsia, comprimiu-se o local com gaze estéril, por três a cinco minutos, fazendo então um curativo. Os fragmentos foram imediatamente imersos

em solução de formol a 10%. As pacientes foram reavaliadas após uma ou duas semanas do procedimento. Foram orientadas a procurar os pesquisadores em caso de qualquer destes sintomas; dor, febre, sangramento ou hematoma. Foi prescrito o uso de dipirona sódica (Lisador[®]) no caso de dor.

3.5.2. Avaliação anatomopatológica

Os fragmentos da biópsia mamária foram enviados ao Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp e imersos em solução de formol a 10%. Em seguida, estes fragmentos foram submetidos ao processamento para inclusão em parafina, e posteriormente sofreram cortes em micrótomo com 6 μ a 8 μ de espessura, para ser colocados em lâminas e corados por hematoxilina-eosina.

Foi avaliada uma lâmina de cada biópsia por um patologista do Departamento de Anatomia Patológica da FCM–Unicamp. A avaliação seguiu alguns critérios que foram: o número de unidades ductais terminais-lobulares por campo de aumento maior em microscópio Zeiss[®] com objetiva de 40 vezes, relação tecido epitelial-gordura-fibrose, tipos de células epiteliais que revestem os ductos (colunares ou cúbicas) e também o número de camada de células epiteliais.

Quando as células cúbicas foram encontradas, interpretou-se como atrofia epitelial e quando as células apresentavam aspecto colunar interpretou-se como não havendo atrofia (Figuras 2 e 3). Foi também relatada qualquer lesão epitelial proliferativa que eventualmente foi encontrada, e considerou-se

proliferação epitelial quando a unidade ducto-terminal lobular apresentava acima de quatro camadas celulares segundo os critérios de DUPONT e PAGE (1985) (Figuras 4 e 5).

3.5.3. Técnica de imunistoquímica para expressão dos receptores de estrógeno e do marcador Ki-67

A análise foi realizada por técnica de imunistoquímica em bloco de parafina. O bloco de parafina, no qual os fragmentos da biópsia da mama estavam inclusos, foi submetido a cortes, que distam entre si de 3mm a 4mm e com espessura de 6 μ a 8 μ . Estes cortes foram colocados em lâminas com cola especial (Silano®) e submetidos à desparafinização, que consistiu de várias etapas, sendo a primeira a colocação da lâmina em xilol I na estufa a 110°C por cerca de 30min, em seguida foram realizadas várias lavagens. Na segunda etapa colocou-se em xilol II e III em temperatura ambiente; também sendo feitas várias lavagens. Na terceira etapa a lâmina foi colocada em álcool absoluto I, II e III em temperatura ambiente, em seguida realizaram-se várias lavagens. Na quarta etapa, as lâminas foram colocadas em álcool 80% e 50%, realizando-se novamente várias lavagens. Na quinta etapa foi feita a lavagem em água corrente e destilada. Na sexta etapa efetuou-se o bloqueio da peroxidase endógena com três trocas de 3min cada em água destilada a 10%. A recuperação antigênica foi obtida através de calor úmido (panela a vapor) durante 30 min a 95°C, com tampão Tris-EDTA pH 8,9, deixando esfriar por 15min. Lavou-se então em água destilada e colocou-se em PBS.

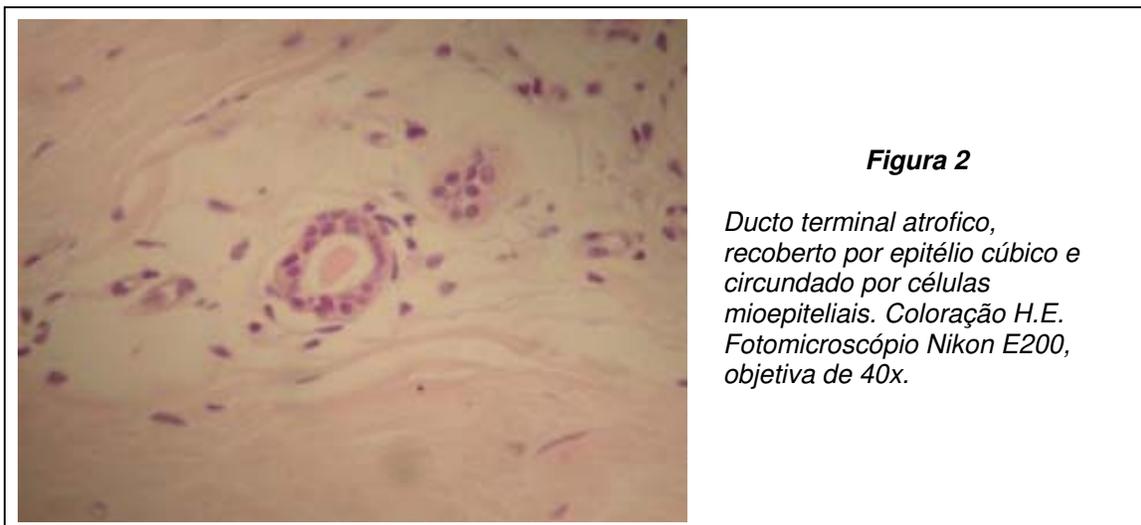
A coloração foi feita quando se colocou o anticorpo monoclonal. Incubou-se em câmara úmida durante 30min a 37° C, colocando-se em seguida na geladeira por cerca de 12 horas. Retiraram-se as lâminas da incubação com o anticorpo primário, lavando por três vezes no agitador, em PBS de cinco minutos, em temperatura ambiente. Secou-se com papel filtro e pingou-se o Sistema Envision Peroxidase Plus. Terminado o tempo, as lâminas foram colocadas no tampão PBS e preparado o DAB. Foi deixado o PBS pré-aquecido a 37°C. Dissolveu-se o DAB e acrescentou-se água oxigenada e DMSO. Misturou-se a solução e colocaram-se as lâminas para corar por cinco minutos a 37°C. Lavou-se em água corrente e destilada. Foi contracorado com hematoxilina de Mayer por 30min a 60min, de acordo com sua concentração, sendo novamente lavado. Passaram-se por alguns segundos em água amoniacal e, após, por água corrente e destilada. Finalmente foi desidratado e montado.

O método de detecção utilizado foi o *Label Streptavidin Biotin* (LSAB). O anticorpo utilizado foi o anticorpo monoclonal antiestrogênio, clone 1D5, com diluição 1/300 do laboratório DAKO® para o receptor de estrógeno e o anticorpo monoclonal anti Ki-67, clone MIB1 com diluição de 1/150 do laboratório DAKO® para avaliação do marcador Ki-67.

A leitura das lâminas foi feita em microscópio ótico com objetiva de 400 vezes. Para a avaliação do receptor de estrógeno foram contadas as células epiteliais com o núcleo corado e dada a medida da expressão por porcentagem. Quando não foram encontradas células coradas, a expressão foi tida como negativa (0%). A expressão foi interpretada como fraca se 1% a 9% das células

epiteliais foram coradas (Figura 6), moderada, de 10% a 49%, (Figura 7) e forte, se igual ou maior que 50%.

Para a avaliação do marcador Ki-67 foram contadas as células epiteliais com núcleo corado em todas as unidades ductais terminais-lobulares, sendo considerada como proliferação epitelial leve (até 10% das células coradas) (Figura 8), moderada (11% a 20%) ou intensa (maior ou igual a 21%).



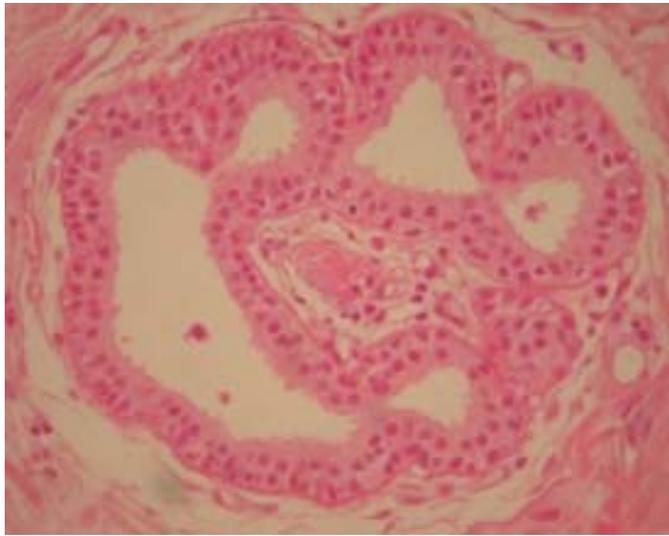


Figura 3

Unidade ductal terminal-lobular recoberta por epitélio colunar, sem sinais de atrofia epitelial. Coloração por H.E. Fotomicroscópio Nikon E200, objetiva de 40x.

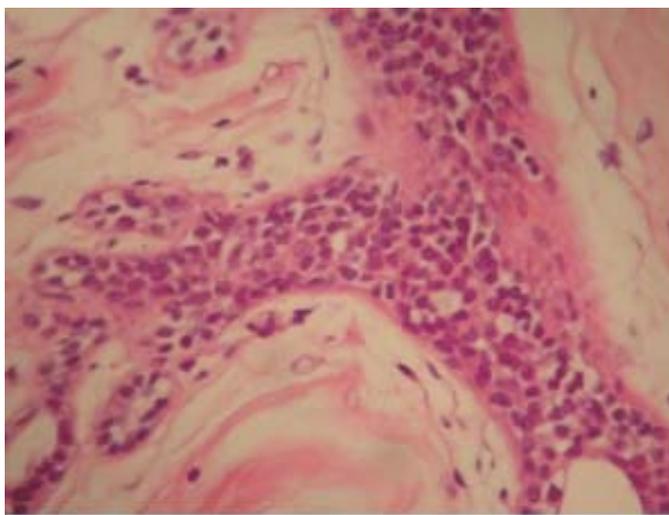


Figura 4

Unidade ductal terminal-lobular com proliferação de células epiteliais lobulares acima de quatro camadas (hiperplasia lobular típica). Coloração por H.E. Fotomicroscópio Nikon E200, objetiva de 40x.

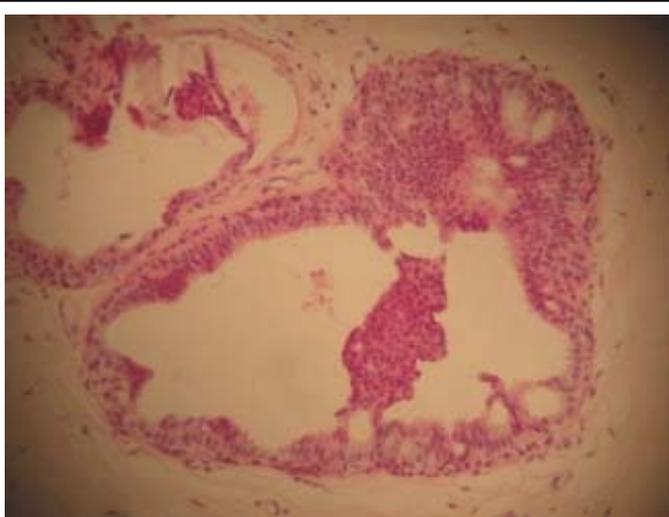


Figura 5

Hiperplasia ductal típica, moderada, caracterizada por formação de pontes e arcos recobertos por várias camadas de células epiteliais ductais. Coloração por H.E. Fotomicroscópio Nikon E200, objetiva de 2 x.

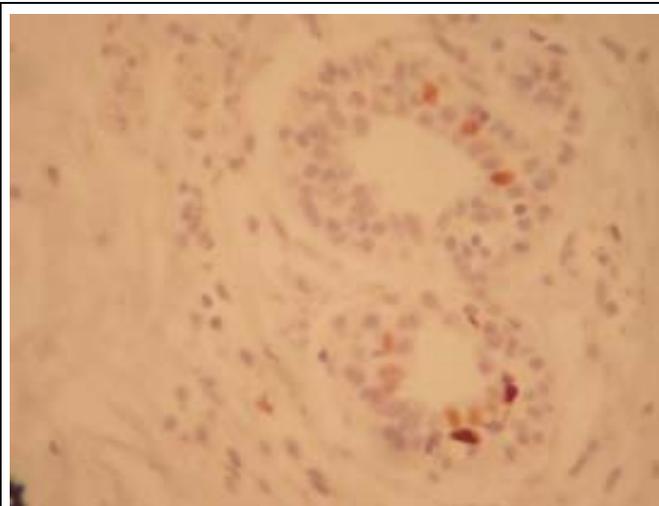


Figura 6

Coloração nuclear positiva para receptor de estrógeno em raras células epiteliais. Fotomicroscópio Nikon E200, objetiva 40x.

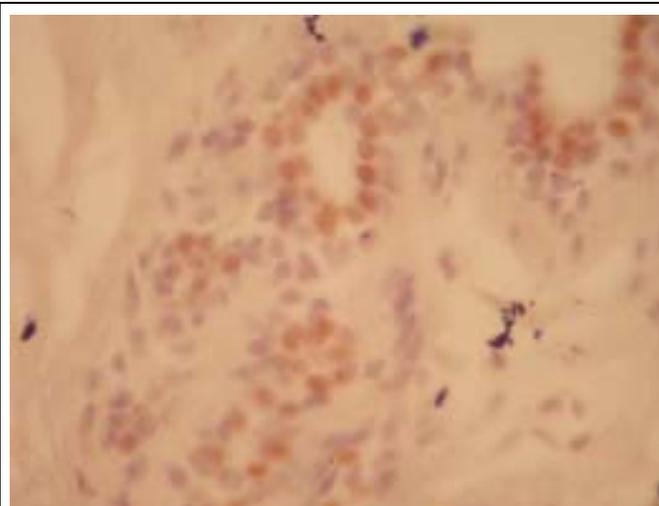


Figura 7

Exame imunoistoquímico com positividade nuclear das células epiteliais para receptor de estrógeno. Fotomicrosc. Nikon E200, 40x

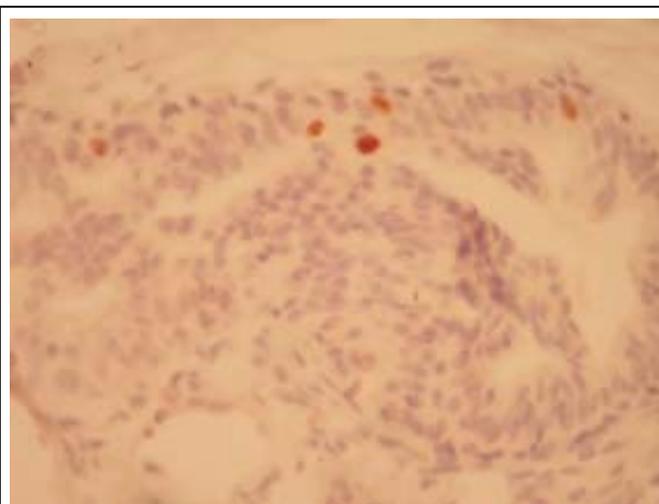


Figura 8

Hiperplasia ductal típica com raras células epiteliais positivas para Ki 67 (Mib 1). Fotomicroscópio Nikon E200, objetiva 40x.

3.6. Instrumentos para coleta de dados

- Ficha de avaliação: que foi preenchida pelo pesquisador, composta de dados pessoais e avaliação da doença, tendo sido feita a coleta de dados por entrevista com a paciente e por pesquisa no prontuário da mesma, e outra parte de avaliação do patologista, que foi preenchida com dados extraídos do laudo da biópsia realizada (Anexo 1).
- Biópsia da mama contralateral: foi realizada pelos pesquisadores nas pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão e após o consentimento pós-informado. Esta biópsia foi realizada no Ambulatório de Patologia Mamária do CAISM – Unicamp, no Centro Cirúrgico do CAISM – Unicamp ou no Ambulatório de Oncologia Ginecológica da Prefeitura de São João da Boa Vista.

3.7. Coleta de dados

Foram recrutadas as pacientes do Ambulatório, após prévia seleção e consentimento informado (Anexo 3) Foi realizada uma entrevista e, neste mesmo contato, coletados alguns dados do prontuário na ficha de avaliação (Anexo 2). Após, a paciente foi então submetida à biópsia da mama oposta, depois da avaliação da última mamografia, que deveria ter no máximo seis meses; caso contrário, seria realizada uma nova mamografia antes da biópsia.

Aproximadamente 30 trinta dias após a biópsia já estava disponível o resultado do exame do fragmento, que constou de uma avaliação histomorfológica e de uma avaliação por imunistoquímica dos receptores de estrógeno e do marcador Ki-67, estando estes dados em um laudo emitido pelo médico patologista.

Quando se terminou o preenchimento das fichas, onde cada uma teve um número atribuído pelo pesquisador, e qualquer dado que pudesse identificar a paciente, por exemplo, o nome ou o H.C., foi desprezado, restando apenas o número do caso no estudo. Ao final, as fichas foram agrupadas por numeração, sendo então os dados analisados.

3.8. Processamento e análise dos dados

3.8.1. Processamento

Os dados de cada paciente (identificado por um número) foram inseridos em um programa de computador EPI-INFO 6.04, com digitação dupla, para análise com auxílio do programa SAS, 2001.

3.8.2. Análise

Para algumas variáveis as análises foram apenas descritivas. Para outras, as análises foram feitas em tabelas de contingência testando associação com o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado preestabelecido foi de 5% ($\alpha=5\%$), sendo utilizados o programa de computador EPI-INFO versão 6.04 e o programa SAS, 2001.

3.9. Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa seguiu os princípios éticos presentes na Declaração de Helsinque (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 1996) e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Foi, também, avaliado e aprovado pela Comissão de Pesquisa do CAISM e pelo Comitê de Ética da FCM-Unicamp. Quatro observações devem ser feitas, uma vez que esta pesquisa envolveu seres humanos:

- As pacientes submetidas à biópsia por agulha grossa, por serem pacientes com antecedente pessoal de câncer de mama, têm um risco aumentado para câncer na mama saudável, incidência que gira em torno de 1% ao ano. Com esta biópsia teria sido possível, eventualmente, detectar algumas lesões neoplásicas ou pré-neoplásicas que não apresentavam expressão nos métodos de diagnóstico clínico ou de imagem.
- Com relação a riscos, a biópsia por agulha grossa é um procedimento que pode apresentar algumas complicações que eventualmente seriam: hematoma, sangramento e, muito raramente, pneumotórax. O desconforto que este procedimento traz é a dor, que foi minimizada com um botão anestésico no local da introdução da agulha grossa.
- As pacientes biopsiadas foram as mesmas que passaram por consulta no ambulatório, sendo as únicas alterações na rotina da paciente, um aumento de tempo, que foi em torno de 30min, e a biópsia que habitualmente não seria realizada.

- O sigilo com relação aos dados das pacientes foi mantido, pois estando as fichas completas, o nome e o registro foram destacados e desprezados, ficando somente um número atribuído a cada ficha.

3.10. Consentimento livre e esclarecido

O consentimento livre e esclarecido foi obtido pelo pesquisador principal no Ambulatório de Oncologia e Patologia Mamária do CAISM - Unicamp e no Ambulatório de Oncologia Ginecológica da Prefeitura de São João da Boa Vista e consistiu de duas etapas (BRASIL, 1996):

3.10.1. Esclarecimento verbal

É uma explanação verbal dada pelo pesquisador para a paciente, abrangendo os seguintes itens:

- Objetivo da pesquisa
- Justificativa e procedimentos a serem utilizados na pesquisa
- Riscos e possíveis benefícios que possam ocorrer
- Forma de acompanhamento e assistência dos sujeitos
- Garantia do sigilo quanto aos dados envolvidos na pesquisa
- Liberdade de se recusar a participar ou de se retirar em qualquer momento da pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo.

3.10.2. Preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3) foi mostrado à paciente pelo pesquisador, e, quando houve anuência desta, foi preenchido e assinado em duas vias, sendo uma entregue para a paciente e outra arquivada com o pesquisador.

4. Resultados

Observa-se na Tabela 1 que 68% da população das mulheres avaliadas, tinham mais de 50 anos. Em torno de 44% eram obesas, sendo que 82% eram de cor branca.

Por volta de 61% das mulheres estavam na pós-menopausa há cinco anos ou mais. Em relação ao padrão de densidade mamográfica, segundo Wolfe (WOLFE, 1976), 45% das mulheres apresentavam mama contralateral densa.

TABELA 1
Características clínico-epidemiológicas da população (n=44)

Características	N	(%)
Idade (anos)		
< 50	14	32
50 ≤	30	68
IMC		
< 25	11	25
25 a 29	13	29
30 ≤	20	45
Cor		
branca	36	82
não-branca	8	18
Tempo de menopausa (anos)		
< 5	17	39
5 ≤	27	61
Wolfe		
densa	20	45
não-densa	24	55
Total	44	100

A Tabela 2 mostra que cerca de 44% das mulheres apresentavam doença avançada, sendo a maioria de carcinoma ductal invasivo. Quatorze por cento das pacientes apresentaram tumores com expressão positiva para receptor de estrógeno, sendo que 15% expressaram receptor de progesterona positiva. Em torno de 75% das pacientes foram mastectomizadas.

A maioria das pacientes foi submetida a tratamento com quimioterapia ou radioterapia e usou tamoxifeno por até dois anos (Tabela 2).

TABELA 2
Distribuição dos aspectos dos cânceres de mama da população

Aspectos	N	(%)
estádio		
I	3	7
II	21	49
III	17	39
IV	2	5
desconhecido	1	
tipo histológico		
ductal	40	93
não-ductal	3	7
desconhecido	1	
RE tumor		
negativo	5	14
positivo	30	86
desconhecido	9	
RP tumor		
negativo	5	15
positivo	29	85
desconhecido	10	
cirurgia		
conservador	11	25
radical	33	75
radioterapia		
sim	36	82
não	7	18
desconhecido	1	
quimioterapia		
sim	29	67
não	14	33
desconhecido	1	
tempo de tamoxifeno		
até 2 anos	30	70
2 anos ou mais	13	30
desconhecido	1	

Por volta de 82% das pacientes apresentaram mamas com achados não-proliferativos, sendo que cerca de 78% deste grupo mostrou atrofia do epitélio mamário, segundo a avaliação histomorfológica (Tabela 3).

TABELA 3
Distribuição da população segundo a proliferação mamária (n=44)

Histomorfologia	N	(%)
achados		
não-proliferativos	36	82
<i>Atrófico</i>	28	78
<i>não-atrófico</i>	8	22
Proliferativos*	8	18
Total	44	100

(*) Não foi encontrada nenhuma lesão proliferativa atípica

(**) nenhuma lesão atípica foi encontrada

Não houve associação entre o tempo de uso do tamoxifeno e a proliferação mamária (Tabela 4).

TABELA 4
Distribuição da proliferação mamária segundo o tempo de tamoxifeno (n=43)

Proliferação	Tempo de tamoxifeno (anos)***				p valor*
	menos que 2		2 ou mais		
	n	(%)	n	(%)	
achados					0,42
não-proliferativos	24	86	11	73	
Proliferativos**	4	14	4	27	
Total	28	100	15	100	

(*) teste exato de Fisher

(**) nenhuma lesão atípica foi encontrada

(***) Uma paciente com tempo desconhecido de uso de tamoxifeno

Não houve associação entre a idade das pacientes e a proliferação mamária (Tabela 5).

TABELA 5
Distribuição da proliferação mamária segundo a idade (n=44)

Proliferação	Idade (anos)				p valor*
	< 50		≤ 50		
	n	(%)	n	(%)	
Achados					0,85
não-proliferativos	13	93	23	77	
Proliferativos**	1	7	7	23	
Total	14	100	30	100	

(*) teste exato de Fisher

(**) nenhuma lesão atípica foi encontrada

A associação entre o tempo de menopausa e a proliferação mamária não foi significativa (Tabela 6).

TABELA 6
Proliferação mamária segundo o tempo de menopausa (n=44)

Proliferação	Tempo de menopausa (anos)				p valor*
	< 50		≤ 50		
	n	(%)	n	(%)	
Achados					0,13
não-proliferativos	16	94	20	74	
Proliferativos**	1	6	7	26	
Total	17	100	27	100	

(*) teste exato de Fisher

(**) nenhuma lesão atípica foi encontrada

Não foi observada associação entre o índice de massa corpórea e a proliferação mamária (Tabela 7).

TABELA 7
Distribuição da proliferação mamária segundo o imc (n=44)

Proliferação	IMC						p valor*
	< 24		25 - 29		≤ 30		
	N	(%)	n	(%)	n	(%)	
achados							0,88
não-proliferativos	9	82	10	77	17	83	
Proliferativos**	2	18	3	23	3	17	
Total	11	100	13	100	20	100	

(*) teste exato de Fisher

(**) nenhuma lesão atípica foi encontrada

A maioria das pacientes, cerca de 74%, apresentou expressão do receptor de estrógeno negativa, sendo que nenhum caso apresentou mais de positividade forte (Tabela 8).

TABELA 8
Distribuição da população segundo o receptor de estrógeno (n=44)

Receptor de estrógeno	n	(%)
negativo (0%)	28	74
leve (1% a 9%)	7	18
moderado (10% a 49%)	3	8
forte (≤ 50%)	0	0
não avaliado	6	
Total	44	100

Em todos os casos em que o Ki-67 foi avaliado, a expressão foi apenas leve. Não houve nenhum caso com expressão acima de 1% (Tabela 9).

TABELA 9
Distribuição da população segundo o Ki-67 (n=44)

Ki-67	n	(%)
Leve	37	100
Moderado	0	
Intenso	0	
não avaliado	7	
Total	44	100

Não houve associação entre o tempo de uso do tamoxifeno e a expressão do receptor de estrógeno (Tabela 10).

TABELA 10
Expressão do receptor de estrógeno segundo o tempo de tamoxifeno (n=43)

Receptor de estrógeno	Tempo de tamoxifeno (anos)**				p valor*
	menos que 2		2 ou mais		
	n	(%)	N	(%)	
0	18	78	9	64	0,10
1% a 9%	2	9	5	36	
10% a 49%	3	13	0	0	
≤ 50%	0	0	0	0	
não avaliado	5		1		
Total	28	100	15	100	

(*) teste exato de Fisher

(**) exclui uma paciente com tempo desconhecido de uso de tamoxifeno

Não houve associação entre os níveis de dosagem dos receptores de estrógeno e a idade das pacientes (Tabela 11).

TABELA 11
Distribuição da expressão do receptor de estrógeno segundo a idade (n=44)

Receptor de estrógeno	Idade (anos)				p valor*
	< 50		≤ 50		
	n	(%)	n	(%)	
0	9	69	19	76	0,40
1% a 9%	3	23	4	16	
10% a 49%	1	8	2	8	
≤ 50%	0	0	0	0	
não avaliado	1		5		
Total	14	100	30	100	

(*) teste exato de Fisher

Não houve associação entre o tempo de menopausa e a expressão dos receptores de estrógeno (Tabela 12).

TABELA 12
Distribuição da expressão do receptor de estrógeno segundo o tempo de menopausa (n=44)

Receptor de estrógeno	Tempo de menopausa (anos)				p valor*
	< 5		≤ 5		
	N	(%)	n	(%)	
0	9	64	19	75,0	0,55
1% a 9%	3	22	4	17,9	
10% a 49%	2	14	1	7,1	
≤ 50%	0	0,0	0	0,0	
não avaliado	3		3		
Total	17	100	27	100	

(*) teste exato de Fisher

Não houve associação entre a expressão dos receptores de estrógeno e o índice de massa corpórea (Tabela 13).

TABELA 13
Distribuição da expressão do receptor de estrógeno segundo o IMC (n=44)

Receptor de estrógeno	IMC						p valor*
	< 24		25 - 29		≤ 30		
	N	(%)	n	(%)	n	(%)	
0	7	78	8	67	13	77	0,53
1% a 9%	1	11	2	16,5	4	23	
10% a 49%	1	11	2	16,5	0	0	
≤ 50%	0	0	0	0	0	0	
não avaliado	2		1		3		
Total	11	100	13	100	20	100	

(*) teste exato de Fisher

Não houve associação entre os achados não-proliferativos e a densidade mamográfica avaliada pelo padrão mamográfico de Wolfe (Tabela 14).

TABELA 14
Distribuição do padrão mamográfico de Wolfe segundo os achados não-proliferativos (n=44)

WOLFE	Proliferação				p valor*
	não-proliferativo		Proliferativo**		
	n	(%)	n	(%)	
Denso	16	44	4	50,0	1,0
Não-denso	20	56	4	50,0	
Total	36	100	8	100	

(*) teste exato de Fisher

(**) nenhuma lesão atípica foi encontrada

Não houve associação entre a expressão do receptor de estrógeno na mama contralateral e o padrão densidade mamográfica avaliada pelo padrão mamográfico de Wolfe (Tabela 15).

TABELA 15
Distribuição do padrão mamográfico de Wolfe segundo a expressão do receptor de estrógeno (n=38)

WOLFE	RE**								p valor*
	0%		1% a 9%		10% a 49%		≤ 50%		
	n	(%)	N	(%)	N	(%)	n	(%)	
Denso	11	39	2	29	3	100	0	0	0,24
não-denso	17	61	5	71	0	0	0	0	
Total	28	100	7	100	3	100	0	0	

(*) teste exato de Fisher

(**) excluí seis mulheres que não têm RE

5. Discussão

O estudo do tecido da mama contralateral de mulheres em tratamento de câncer de mama, usuárias de 20mg/dia de tamoxifeno, trouxe informações importantes em relação à proliferação glandular desta mama. Os resultados do presente estudo mostraram um predomínio de achados não-proliferativos nas pacientes biopsiadas que girou em torno 82%, sendo que deste grupo 78% apresentavam o epitélio atrófico. Apenas 18% das biópsias diagnosticaram achados proliferativos, sendo que nenhum caso mostrou lesão atípica.

Estes resultados são diferentes dos observados em mama contralateral de mulheres tratadas de câncer de mama e não usuárias de tamoxifeno. No trabalho realizado por ALVARENGA em Campinas em 1996, em que foram estudadas a mama contralateral de mulheres que foram submetidas à cirurgia para tratamento de câncer de mama, e que não estavam em uso de tamoxifeno, foram realizadas biópsias incisionais de quadrante súpero-externo e de região retroareolar da mama oposta. Esse estudo mostrou a freqüência de achados não-proliferativos em torno de 34% quando observamos o grupo com idade superior a 50 anos e

retiramos as lesões atípicas e neoplásicas (ALVARENGA, 1996) (Anexo 8). Essa comparação histórica de séries de casos estudados na Unicamp pode fortalecer o conceito da indução de não proliferação mamária desta droga.

Existem várias evidências clínicas de que possivelmente o tamoxifeno diminua a proliferação celular do tecido mamário. Uma delas é o conhecimento de que seu uso por cinco anos ou mais reduz a incidência de novos tumores na mama contralateral em cerca de 45% (FISHER et al., 1998; POWLES et al., 1998; KINSINGER et al., 2002). Também estudos com acompanhamento mamográfico de pacientes em uso de tamoxifeno corroboram esta teoria (BRISSEON et al., 2000; CHOW et al., 2000). TAN-CHIU et al. (2003) mostraram haver a redução em 29% do risco de biópsia por lesões proliferativas benignas em mamas contralaterais de mulheres tratadas de câncer de mama e em uso de tamoxifeno.

As lesões proliferativas típicas ou atípicas levam ao aumento do risco relativo para câncer de mama, já demonstrado em alguns estudos (DUPONT e PAGE, 1985) A observação desses dados leva a sugerir que a diminuição do aparecimento de lesões proliferativas possa ser um dos mecanismos pelo qual o tamoxifeno propicie a menor incidência de câncer mamário nessas mulheres.

Em um estudo recente, FACINA et al. (2003) através de um ensaio clínico duplo-cego aleatorizado, compararam três grupos de mulheres na menopausa que usaram tamoxifeno na dose de 5mg, 10mg e 20mg/dia, por 50 dias, com um grupo que usou placebo. Biopsiaram então as mamas destas mulheres durante cirurgia para retirada de fibroadenomas e observaram uma diferença

significativa na expressão do Ki-67 quando comparados os grupos que utilizaram o tamoxifeno com o grupo placebo. Não houve diferença significativa entre os grupos que utilizaram tamoxifeno em diferentes doses. A média de expressão do marcador Ki-67 no grupo placebo foi de 2,04% enquanto nos grupos que utilizaram tamoxifeno foi de 0,19%, 0,24% e 0,04% com 5mg,10mg e 20mg de tamoxifeno, respectivamente. Esse trabalho apresentou uma evidência clínica, através do marcador Ki-67, da ação do tamoxifeno em reduzir a proliferação epitelial.

No presente estudo observamos uma expressão fraca do marcador Ki-67, sendo que todos os casos apresentaram expressão igual ou menor que 1%. Encontramos na literatura que na pós-menopausa a expressão do marcador Ki-67 em tecido mamário normal encontra-se abaixo de 1% (HOFSETH, 1999). Como a expressão do marcador Ki-67 mostra-se muito fraca em mamas na pós-menopausa e a quantidade de tecido mamário obtido nas biópsias por agulha grossa era pequena, não conseguimos demonstrar através deste marcador uma redução da proliferação epitelial da mama.

Com relação à expressão dos receptores de estrógeno no tecido mamário da mama contralateral, foram encontrados 74% de expressividade zero e apenas 8% de expressão moderada, sendo que nenhum caso de expressão forte. Encontramos na literatura trabalhos mostrando a média de porcentagem de células positivas expressando receptor de estrógeno na pós-menopausa de mamas saudáveis sem ação do tamoxifeno, que giram entre 24% a 26% (JACQUEMIER et al., 1990; LAWSON et al., 2002). Entretanto, no presente trabalho observamos

uma prevalência abaixo da média da expressão do receptor de estrógeno em mulheres na pós-menopausa.

O tamoxifeno atua de modo a promover a redução da circulação do “*insulin-like growth factor 1*”, inibição da angiogênese e indução da apoptose (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS, 1998), já muito bem estudados em mamas com tumores, levando a uma ação tumoristática sobre as células tumorais e promovendo também uma redução na incidência de tumores na mama contralateral (GOTTARDIS et al., 1988; FISHER et al., 1984). Entretanto, o mecanismo mais importante é o bloqueio competitivo em nível de receptor de estrógeno com os estrógenos (MICAELA et al., 1989). Os estrógenos têm uma ação antiapoptótica, enquanto os antiestrógenos têm uma ação pró-apoptótica através do receptor de estrógeno, conforme demonstrado por SOMAI et al., (2003).

Questiona-se se um outro mecanismo de ação desta droga, ainda não citado, e que de acordo com as observações deste trabalho, seria a redução dos níveis de receptor de estrógeno no tecido mamário, levando assim a uma menor influência dos estrógenos na proliferação e, portanto, na carcinogênese da mama.

Vale aqui ressaltar que, ao contrário da dosagem de receptor de estrógenos através do método bioquímico, o método imunistoquímico não é influenciado por alterações no nível do estrógeno ou drogas que interfiram no receptor como o tamoxifeno (ELLEGE e FUQUA, 2000),

A imunistoquímica também apresenta a vantagem de poder ser feita com apenas pequenos fragmentos de tecido, além de medir o total de receptor de estrógeno, não apenas a fração livre. A desvantagem da imunistoquímica é ser um método semi-subjetivo, podendo variar quando se muda o observador. Os resultados podem variar dependendo da fixação do tecido, do tipo de anticorpo utilizado e do tratamento do antígeno. Dependendo do epítipo reconhecido, anticorpos diferentes podem detectar apenas certas formas do receptor, como a alfa ou beta, não reconhecendo uma isoforma ou variante específica (ELLEGE e FUQUA, 2000).

O tempo de uso do tamoxifeno não mostrou associação na expressividade do receptor de estrógeno; portanto, seu uso por longo período não levou à mudança da expressão do receptor de estrógeno. KHAN et al., (2002) demonstraram a consistência da expressão do receptor de estrógeno, avaliando em duas oportunidades diferentes com diferença mínima de seis meses, o tecido mamário das mesmas pacientes com relação ao receptor, mostrando não haver diferença entre a expressão. O que observamos com isto é que a redução da expressão do receptor de estrógeno induzida pelo tamoxifeno parece se manter, visto que o tempo de uso não levou ao aumento da expressão dos receptores. A expressão aumentada do receptor de estrógeno no tecido mamário tem sido considerada como um dos fatores que promoveriam a carcinogênese mamária (ANDERSON, 2002; LAWSON et al., 2002).

O índice de massa corpórea não influenciou os achados não-proliferativos nem tampouco os receptores de estrógeno. Sabe-se que a obesidade na pós-

menopausa associa-se a maior conversão periférica de androstenediona da glândula supra-renal em estrona, que posteriormente se converterá em estradiol (ABRÃO e MARQUES, 1995). O aumento de estradiol nessas mulheres poderia induzir o aumento de achados proliferativos mamários, não tendo sido observado no presente estudo este comportamento.

O tamoxifeno parece então exercer um efeito protetor sobre o epitélio mamário, bloqueando também a ação do estradiol produzido pela conversão periférica da androstenediona. A obesidade adquirida na pós-menopausa é fator de risco já conhecido para câncer de mama, estando relacionada ao aumento, em cerca de duas vezes, do nível de estradiol circulante (LeMARCHAND et al., 1988).

Neste estudo observou-se que mesmo as mamas consideradas densas pelo método de avaliação proposto por Wolfe, apresentaram maior predomínio de achados não-proliferativos. O padrão de mamas densas observado por Wolfe mostrava um risco aumentado de câncer em relação às mamas não-densas (WOLFE, 1976). Se no presente estudo foi encontrado maior número de achados não-proliferativos do que proliferativos no grupo denso, isto mostra que mesmo estas mamas encontram-se com baixa proliferação celular. Portanto, nesta população de mulheres usuárias de tamoxifeno, a correlação entre aumento de densidade mamária e proliferação celular não pode ser feita. Provavelmente a alta densidade da mama na mamografia corresponde a um processo de atrofia com fibrose do tecido mamário.

Este trabalho apresenta algumas limitações que gostaríamos de também discutir. Em primeiro lugar, não possui um grupo-controle. Como existe um grupo histórico de mulheres em tratamento de câncer de mama no Caism-Unicamp - e que não estavam em uso de tamoxifeno - que foram biopsiadas e avaliadas no trabalho de Alvarenga, optou-se por utilizar este conhecimento, ainda que não totalmente comparável, para a presente análise (ALVARENGA, 1996). Pesou nesta decisão a questão ética de se biopsiar desnecessariamente as pacientes, apesar da pequena morbidade.

Uma segunda limitação deste trabalho reside no fato de que avaliamos apenas uma porção da mama e não ela como um todo. É óbvio que não seria possível mastectomizar estas pacientes com o único objetivo de estudo do comportamento proliferativo do tecido. No entanto, biopsiamos a área de maior concentração de tecido fibroglandular, com base na mamografia.

Apesar das limitações, o estudo apresenta algumas contribuições. Não encontramos na literatura trabalho semelhante sobre a mama contralateral de mulheres tratadas de câncer de mama e em uso de tamoxifeno por mais de 12 meses com relação a achados não-proliferativos e receptor de estrógeno até o momento da conclusão desta tese. Alguns estudos avaliaram mamas com patologias benignas e utilizaram o tamoxifeno por curto período (WALKER et al., 1991; FACINA et al., 1997; TANAKA et al., 1997; BERNARDES, Jr. et al., 1999; FACINA et al., 2003).

O presente estudo traz também algumas contribuições, sob outra perspectiva, de como o tamoxifeno protege as mamas de alto risco (mama contralateral). Um dos mecanismos seria através da indução de achados histológicos não-proliferativos. Outro mecanismo seria a observação de que o uso do tamoxifeno reduziria a expressão do receptor de estrógeno, através do qual se induziria a redução da proliferação.

E uma outra contribuição seria a observação de que o padrão mamográfico de alta densidade não é um marcador de proliferação celular em mulheres usuárias de tamoxifeno.

Apesar das limitações, este trabalho abre as perspectivas para novos estudos sobre a ação do tamoxifeno em mamas de alto risco e um melhor entendimento sobre seu papel na prevenção primária do câncer de mama.

6. Conclusões

Em mamas contralaterais de pacientes tratadas de câncer de mama e usuárias de 20 mg/dia de tamoxifeno por pelo menos 12 meses, concluiu-se que:

1. A grande maioria das pacientes apresentou achados não-proliferativos, sendo que nestes casos, 78% apresentaram atrofia do epitélio mamário. Não houve associação entre proliferação mamária e o tempo de uso do tamoxifeno, índice de massa corpórea e idade.
2. Cerca de 70% das pacientes não apresentaram expressão do receptor de estrógeno, sendo que a frequência de expressão deste receptor não mostrou associação com o tempo de uso do tamoxifeno, índice de massa corpórea e idade.
3. Todas as pacientes apresentaram baixa proliferação tecidual segundo o marcador Ki-67.
4. A densidade mamográfica segundo Wolfe não se associou aos achados não-proliferativos (WOLFE, 1976).

7. Referências Bibliográficas

AJCC. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER– Breast. In: AJCC. **Cancer staging manual**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.171.

ABRÃO, M.S.; MARQUES, J.A. Câncer do endométrio. In: ABRÃO, F. S. **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo: Roca Editora; 1995. p.95-108.

ALVARENGA, M. **Carcinomas, alterações proliferativas e não proliferativas da mama contralateral em mulheres com as mesmas lesões simultâneas da mama ipsolateral**. Campinas, 1996 [Tese – Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas].

ANDERSON, E. The role of estrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. **Breast Cancer Res**, 4:197-201, 2002.

ANSFIELD, F.J.; DAVIS, H.L.; RAMIRE, G.; DAVIS, T.E.; BORDEN, E.C.; JOHNSON, R.O. et al. Further clinical studies with megestrol acetate in advanced breast cancer. **Cancer**, 38:53-5, 1976.

BEATSON, G.T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. **Lancet**, 2:104-7, 1896.

BERNARDES Jr., J.R.M.; NONOGAKI, S.; SEIXAS, M.T.; RODRIGUES de LIMA, G.; BARACAT, E.C.; GEBRIM, L.H. Effect of a half dose of tamoxifen in normal breast tissue. *Int J Gynecol Obstet*, 67:33-8, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. – Resolução nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Inf. Epidemiol. SUS, 1996.

BRISSON, J.; BRISSON, B.; COTE, G.; MAUNSELL, E.; BERUBE, S.; ROBERT, J. Tamoxifen and mammographic breast densities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9:911-5, 2000.

BURGER, G.K. Selective oestrogen receptor modulators. *Horm Res*, 53:25-9, 2000.

CHOW, C.K.; VENZON, D.; JONES, E.C.; PREMKUMAR, A.; O'SHAUGHNESSY, J.; ZUJEWSKI, J. Effect of tamoxifen on mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9:917-21, 2000.

CLARK, G.M. Prognostic Factors. In: HARRIS, J.R.; LIPPMAN, M.E.; MORROW, M.; OSBORNE, C.K. (eds.). **Diseases of the breast**. Massachusetts: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p587-620.

COLE, M.P.; JONES, C.T.A.; TODD, I.D.H. A new antiestrogenic agent in late breast cancer. An early appraisal of ICI 46-474. *Br J Cancer*, 25:270-5, 1971.

COOMBES, R.C.; HARPER-WINE, C.; DOWSET, M. Aromatase inhibitor and their use in the sequential setting. *Endocr Relat Cancer*, 6:259-63, 1999.

CUZICK, J.; FORBES, J.; EDWARDS, R.; BAUM, M.; CAWTHORN, S.; COATES, A. et al. First results from International Breast Cancer Interventional Study (IBIS I): a randomized prevention trial. *Lancet*, 360:817-24, 2002.

DAHMOUSHM, L.; PIKE, M.C.; PRESS, M.F. Hormones and breast-cell proliferation. In: LOBO, A.B. **Treatment of the postmenopausal women: basic and clinical aspects**. New York: Raven Press Ltd; 1994. p.327-37.

DeCOURMELLES, F.V. La radiotherapie indirecte ou dirigee par les correlation organiques. *Arch Elect Med*, 32:264-7, 1922.

DEES, E.C.; DAVIDSON, N.E. Ovarian ablation as adjuvant therapy for breast cancer. *Semin. Oncol*,28:322-31, 2001.

DUPONT, W.D.; PAGE, D.L. Risk Factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *New Engl J Med*, 312:146-51, 1985.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Tamoxifen for early breast cancer: an overview for the randomised trials. *Lancet*, 351:1451-67, 1998.

ELLEDGE, R.M.; FUQUA, S.A.W. Oestrogen and progesteron receptors. In: HARRIS, J.R.; LIPPMAN, M.E.; MORROW, M.; OSBORNE, C.K. (eds.) **Diseases of the breast**. Massachussets: Lippincott Willians & Willkins; 2000. p.565-86.

ELLIS, M.J.; HAYES, D.F.; LIPPMAN, M.E. Treatment of metastatic breast cancer. In: HARRIS, J.R.; LIPPMAN, M.E.; MORROW, M.; OSBORNE, C.K. (eds.) **Diseases of the breast**. Massachussets: Lippincott Willians & Willkins; 2000. p565-86.

Epi Info: version 6.04b. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention, 1997.

ESCHER, G.C.; WHITE, A. Symposium on steroids in experimental and clinical practice. Philadelphia: P Blukiston & Son; 1951. p.402-48.

FACINA, G.; RODRIGUES de LIMA, G.;SIMÕES, M.J.; NOVO,N.F.;GEBRIM, L.H. Estrogenic activity of tamoxifen on normal mammary parenchyma in the luteal phase of the menstrual cycle. **Int J Gynecol Obstet**, 56:19-24, 1997.

FACINA, G.; BARACAT, E.C.; LIMA, G.R.; GEBRIM, L.H. Efeitos de diferentes doses de tamoxifeno sobre a proliferação celular do epitélio mamário. **RBGO**, 25:185-91, 2003.

FISHER, B.; CONSTANTINO, J.P.; REDMOND, C. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. **New Engl J Med**, 320:479-83, 1989.

FISHER, E.R.; FISHER, B.; SASS, R.; WICKERHAM, L. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol nº4).XI.Bilateral breast cancer. **Cancer**, 54:3002-11, 1984.

FISHER, B.; DIGNAN, J.; BRYANT, J.; DeCILLIS, A.; WUCHERHAM, D.L.; WOLMARK, N. Five *versus* more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. **J Natl Cancer Inst**,1529-42, 1996.

FISHER, B.; CONSTANTINO, J.P.; WICKERHAM, D.L.; REDMOND, C.K.; KAVANAH, M.; CRONIN, W.M. et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. **J Natl Cancer Inst**, 90:18:1371-88, 1998.

FURR, B.J.A.; JORDAN, V.C. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. **Pharm Ther**, 25:127-205, 1984.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol**, 133:1710-5, 1984.

GOTTARDIS, M.M.; ROBINSON, S.P.; JORDAN, V.C. Estradiol-stimulated growth of MCF-7 tumors implanted in athymic mice: a model to study the tumorigenic action of tamoxifen. ***Steroid Biochem***, 30:311-4, 1988.

GREEN, S.; KUMAR, V.; THEULAZ, I. WAHLI, W.; CHAMBOM, P. The N-terminal DNA-binding 'zinc-finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. ***EMBO J***, 7:3037-44, 1988.

GUIOCHON-MANTEL, A.; LESCOP, P.; CHGRISPIN-MAITRE, S.; LOSFELT, H.; PERROT-APLANAT, M.; MILGROM, E. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. ***EMBO J***, 10:3851-9, 1991.

HARPER, M.J.K; WALPOLE, A.L. A derivative of triphenylethylene: Effect on implantation and mode in rats. ***J Reprod Fert***, 13:101-19, 1967.

HARRIS, A.L.; DOWSET, M. Endocrine effects of low dose aminoglutethimide alone in advanced postmenopausal breast cancer. ***Br J Cancer***, 47:621-7, 1983.

HARRIS, H.S.; SPRATT, J.S. Bilateral adrenalectomy in metastatic mammary cancer. ***Cancer***, 23:145-51, 1969.

HARVEY, H.A.; LIPTON, A.; MAX, D.T.; PERLMAN, H.G.; DIAZ-PERCHES, R.; de la GARZA, J. Medical castration produced by the GnRH analogue leuprolide to treat metastatic breast cancer. ***J Clin Oncol***, 3:1068-72, 1985.

HECKER, E.; BEGH, I.; LEVY, C.M.; MAGNIN, C.A.; MARTINEZ, J.C.; LOUREIRO, J. et al. Clinical trial of clomiphene in advanced breast cancer. ***Eur J Cancer***, 10:747-9, 1974.

HENDERSON, I.C.; CANELLOS, G.P. Cancer of the breast, the past decade. ***New Engl J Med***, 302:1730-6, 1980.

HOFSETH, L.J.; RAAFAT, A.M.; OSUCH, J.R.; PATHAK, D.R.; SLOMSKY, C.A.; HASLAM, S.Z. Hormone replacement therapy with estrogen ou estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased with epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. ***J Clin Endocrinol Metab***, 84:4559-65, 1999.

HORSLEY, G.W. Treatment of the breast in premenopausal patients with radical amputation and bilateral ooforectomy. ***Ann Surg***, 125:703-17, 1947.

HORSLEY, J.S. III. Twenty years experience with prophylatic bilateral oophorectomy in the treatment of carcinoma of the breast. ***Ann Surg***, 155:935-8, 1962.

HUGGINS, C.B.; BERGENSTAL, D.M. Surgery of adrenals. ***JAMA***, 147:101-6, 1951.

HUGHES, S.W.M.; BURLEY, D.M. Aminoglutethimide a “side effect” turned to therapeutic advantage. ***Postgrad Med J***, 46:409-16, 1970.

JACQUEMIER, J.D.; HASSOUN, J.; TORRENTE, M.; MARTIN, P.M. Distribution of estrogen and progesterone receptors in healthy tissue adjacent to breast lesions at various stages – immunohistochemical study of 107 cases. ***Breast Cancer Res Treat***, 15:109-17, 1990.

JASZMAN, L. Epidemiology of climateric and post-climateric complaints. In: VAN KEEP, P.A.; LAURITZEN, C. (eds.). ***Ageing and estrogens***. Basel: Karger; 1973. p.22-34.

JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I. - Bais guide to the mechanism of estrogen action. ***Recent Prog Horm Res***, 18:387-91, 1962.

KATZENELLENBOGEN, B.S.; MONTANO, M.M.; EDIGER, T.R.; SUN, J.; EKENA, K.; LAZENNEC, G. et al. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. **Recent Prog Horm Res**, 55:163-93, 2000.

KENNEDY, B.J. Hormonal therapies in breast cancer. **Semin Oncol**, 1:119-30, 1974.

KEYS, A.; FIDANZA, F.; KARVONEN, M.J.; KIMURA, N.; TAYLOR, H.L. Indices of relative weight and obesity. **J Chron Dis**, 25:329-43, 1972.

KHAN, S.A.; YEE, K.A.; KAPLAN, C.; SIDDIQUI, J.F. – Estrogen receptor alpha expression in normal human breast epithelium is consistent over time. **Int J Cancer**, 102:334-7, 2002.

KINSINGER, L.S.; HARRIS, R.; WOOLF, S.H.; SOX, H.C.; LOHR, K.N. Chemoprevention of breast cancer: a summary of the evidences for the U.S. Preventive Services Task Force. **Ann Intern Med**, 137:59-69, 2002.

KLEINEBERG, D.L.; NIEMANN, W. FLAMM, E.; COOPER, P.; BABITSKY, G. Primate mammary development. **J Clin Invest**, 75:1943-7, 1985.

KUIPER, G.G.J.M.; ENMARK, E.; MARKKU, P.H.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci**, 93:5925-30, 1996.

LAWSON, J.S.; FIELD, A.S., TRAN, D.D., KILLEEN, J., MASKARENIC, G., ISHIKURA, H. et al. Breast cancer incidence and estrogen receptor alpha in normal mammary tissue-an epidemiologic study among Japanese women in Japan and Hawaii. **Int J Cancer**, 97:685-7, 2002.

LE MARCHAND, L.; KOLONEL, L.N.; EARLE, M.E.; MI, M.P. Body size at different periods of life and breast cancer risk. **Am J Epidemiol**, 128:137-52, 1988.

LESSEY, B.A.; KILLAM, A.P.; METZGER, D.A.; HANEY, A.F.; GREENE, G.L.; McCARTY Jr, K.S. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, 67:334-40, 1988.

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

LIPPMAN, M.; BOLAN, G.; HUFF, K.K. The effects of estrogen and anti-estrogens in hormone-responsive human breast cancer in long term tissue culture. **Cancer Res**, 36:4595-691, 1976.

LUFT, R.; OLIVECRONA, H. Hypophysectomy in man: experiences in metastatic cancer of breast. **Cancer**, 8:261-70, 1955.

MANNI, A.; PEARSON, O.H.; BORDKEY, J.; MARSHALL, J.S. – Transsphenoidal hipophysectomy in breast cancer. Evidence for an individual role of pituitary and gonadal hormones in support tumor growth. **Cancer**, 44(6):2330-37, 1979.

MEDRONHO, A.R.; CARVALHO, M.D.; BLOCH, V.K.; LUIZ, R.R.; WERNECK, L.G. – **Epidemiologia**, São Paulo: Atheneu; 2002. 493p.

MICAELA, M.; BUCKLEY, T.; GOA, L.K. Tamoxifen – A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties an therapeutic use. **Drugs**, 37:451-90, 1989.

MORETÃO, A.L.; ANGULSKI, C.; PIAZZA, M.J. Inibidores da aromatase e seu uso na prática clínica. **Femina**, 29:695-700, 2001.

NATHANSON, I.T. Clinical investigative experience with steroid hormones in breast cancer. **Cancer**, 5:754-62, 1952.

NAZARIO, A.C.; SIMOES, M.J.; DE LIMA, G.R. Morphological and ultrastructural aspects of the cyclical changes of human mammary gland during menstrual cycle. *Rev Paul Med*, 112:543-7, 1994.

NELSEN, T.S.; DRAGSTEDT, L.R. Adrenalectomy and oophorectomy for breast cancer. *JAMA*, 175:379-83, 1961.

NEVEN, P.; VERNAEVE, H. Guidelines for monitoring patients taking tamoxifen treatment. *Drug Safety*, 22:1-11, 2000.

NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A.; Estrogen receptor transcription and transactivation basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res*, 2:360-6, 2000.

POWLES, T.; EELES, R.; ASHLEY, S.; EASTON, D.; CHANG, J.; DOWSETT, M. et al. Interim analysis of the incidence of breast cancer in the Royal Marsden Hospital tamoxifen randomized chemoprevention trial. *Lancet*, 352:98-101, 1998.

ROSS, M.B.; BUZDAR, A.V.; BLUMENSCHIEN, G.R. Treatment of advanced breast cancer with megestrol acetate after therapy with tamoxifen. *Cancer*, 49:413-7, 1982.

RUDLAND, P.S. Epithelial stem cells end their possible role in the development of the normal and diseased breast. *Histol Histopathol*, 8:385-9, 1993.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Role of hormones in cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3:49-61, 1998.

SANTEN, R.; WELLS, S.A.Jr. The use of aminoglutethimide in treatment of patients with metastatic carcinoma of the breast. *Cancer*, 46:1066-74, 1980.

SAS Institute Inc. SAS/STAT software changes and enhancements through release 8.2. Cary, N.C.: SAS Institute, Inc. 1999-2001.

SHETH, S.P.; ALLEGRA, J.C. Terapia endócrina do câncer de mama. In: BLAND K.I.; COPELAND E.M. **A Mama: tratamento compreensivo das doenças benignas e malignas**. São Paulo: Manole; 1994. p.1059-71.

SOMAI, S.; CHAOUAT, M.; JACOB, D.; PERROT, J.Y.; ROSTENE, W.; FORGEZ, P. et al. Antiestrogens are pro-apoptotic in normal human breast epithelial cells. **Int J Cancer**, 105:607-12, 2003.

STEARNS, V.; GELMANN, E.P. Does tamoxifen cause cancer in humans?. **J Clin Oncol**, 16:779-92, 1998.

TANAKA, C.I.; GEBRIM, L.H.; LIMA, G.R.; SIMÕES, M.D. Study of the action of tamoxifen on the mammary gland epithelium of premenopausal patients by lysosome quantification. **Rev Paul Med**, 115:1390-4, 1997.

TAN-CHIU, E.; WANG, J.; CONSTANTINO, J.P.; SOONMYUNG, P. BUTCH, C.; WICKERHAM, D.L. et al. Effects of tamoxifen on benign breast disease in women at high risk for breast cancer, **J Nat Cancer Inst**, 95:302-7, 2003.

THAYSSSEN, V.F. The influence of castration by roentgen on carcinoma of the breast. **Acta Radiol**, 29:189-94, 1948

VERONESI, U.; MAISONNEUVE, P.; COSTA, A.; SACCHINI, V.; MALTONI, C.; ROBERTSON, R.N. et al. Prevention of breast cancer with tamoxifen: preliminary findings from the Italian randomized trial among hysterectomized women. **Lancet**, 362:93-7, 1998.

WALKER, K.J.; PRICE-THOMAS, J.M.; CANDLISH, W.; NICHOLSON, R.I.
Influence of the antioestrogen tamoxifen on normal breast tissue. *Br J Cancer*,
64:764-8, 1991.

WARD, H.W.C. Antioestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at
two dose levels. *Br Med J*, 1:113-4, 1973.

WELSHONS, W.V.; LIEBERMAN, M.E.; GPRSKI, J. Nuclear localization of
unoccupied oestrogen receptors. *Nature*, 307:747-9, 1984.

WOLFE, N.J. Breast patterns as na index of risk for developing breast cancer.
Am J Roentgenol,126:1130-9, 1976.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION, World Medical Association Declaration of
Helsinki: Recommendations guiding physicians in biomedical research involving
human subjects. Somerset West, Republic of South Africa, 1996.

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^a 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 - Ficha de Avaliação

ACHADOS NÃO-PROLIFERATIVOS E EXPRESSÕES DO MARCADOR Ki-67 E DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO EM MAMA CONTRALATERAL DE MULHERES TRATADAS DE CÂNCER DE MAMA, EM USO DE TAMOXIFENO

Caso n°.|_|_|_| Data: _/ _/ _

Dados Pessoais e Avaliação da doença

1. Idade: |_|_| anos
2. Peso: |_|_|_|, |_| Kg
3. Altura: |_|_|_|, |_| cm
4. IMC: |_|_|. |_|_| Kg/m²
5. Paridade: G|_|_| P|_|_| A|_|_|
6. Menarca: |_|_| anos
7. Menopausa: |_|_| anos
8. Estadiamento patológico: T|_|_| N|_|_| M|_|_| Ecp: |_|_|_|
9. Tipo histológico: _____
-
10. Receptor de estrógeno: positivo () negativo ()
11. Receptor de progesterona: positivo () negativo ()
12. Tratamento cirúrgico () 1-MRH 2-MRM 3-Quad+Axil 4-MRM+RI
13. Tratamento radioterápico: sim () não ()
14. Local da radioterapia: mama () plastrão () FSC () mamária interna ()

15. Tratamento quimioterápico: sim () não () 9. Esquema de quimioterapia: | | | |
16. Status atual da doença: SAT () AT ()
17. Padrão mamográfico (WOLF): M1 () P1 () P2 () Dy ()
18. Tamoxifeno desde ____ / ____ / ____
-

Avaliação do patologista

1. Estudo morfológico: atrófico () não atrófico ()
2. Avaliação imunoistoquímica do receptor de estrógeno: focal () moderado () alto ()
3. Avaliação imunoistoquímica do receptor de progesterona: focal () moderado () alto ()
4. Avaliação imunoistoquímica do Ki67: 0-25% () 26-50% () 51-75% () 76-100% ()
-

Nome: _____ HC: _____

9.2. Anexo 2 – Avaliação Anatomopatológica

Identificação:

Número do caso: _____

Data: _____ / _____ / _____

A) Proliferação da amostra:

1- proliferativa ()

2- não proliferativa ()

3- outros achados: _____

B) RE:

0% ()

0-10% ()

10-30% ()

>50% ()

C) RP:

0% ()

0-10% ()

10-50% ()

>50% ()

D) Ki-67

Leve ()

Moderado ()

Intenso () _____

9.3. Anexo 3 - Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ACHADOS NÃO-PROLIFERATIVOS E EXPRESSÕES DO MARCADOR KI-67 E DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO EM MAMA CONTRALATERAL DE MULHERES TRATADAS DE CÂNCER DE MAMA, EM USO DE TAMOXIFENO

Eu, _____, com ____ anos de idade, portadora do R.G.: _____, através deste documento, declaro que estou de acordo em participar do projeto de pesquisa sobre “a avaliação da influência do tamoxifeno na atrofia tecidual mamária e nos receptores de estrógeno em mulheres tratadas de câncer de mama”, que serve para estudar melhor a ação do tamoxifeno (droga usada no tratamento do câncer de mama) que talvez nos ajude a sabermos como tratarmos melhor e prevenir novos tumores.

Fui então informada de que será feita a retirada de um pequeno pedaço (do tamanho de um grão de arroz) com uma agulha grossa da minha mama normal, que sei que não tem nenhum problema ou lesão, sabendo também que esta biópsia é desnecessária para o meu tratamento.

Sei que esta biópsia será realizada com anestesia local, podendo ou não ficar no local biopsiado uma pequena cicatriz, além de um risco pequeno de sangramento ou formação de uma mancha roxa (hematoma).

Talvez a retirada desse pedaço da minha mama normal traga alguma informação que possa ser útil, visto que eu tenho um risco aumentado de câncer nessa mama.

Este procedimento será realizado pelo Dr. José Fernando e pelo Dr. César Cabello e qualquer problema que aconteça relacionado com a biópsia entrarei em contato com eles pelos telefones (19) 6232466 ou 6332490.

Durante toda a pesquisa posso ser esclarecida de qualquer coisa que eu quiser a respeito, como por exemplo, o resultado do exame do pedaço retirado.

Se eu não quiser participar, ou quiser me retirar desta pesquisa a qualquer momento, não vou ter qualquer prejuízo no meu tratamento ou no meu relacionamento com a equipe que me trata.

Sei que não ganharei dinheiro participando desta pesquisa, sendo a participação totalmente voluntária.

Também fui informada que o pesquisador ao apresentar os resultados desta pesquisa em congressos, publicações ou quaisquer outras atividade, manterá completo sigilo sobre a minha identidade, e que posso abandonar este estudo sem nenhum prejuízo ao meu tratamento, a qualquer momento.

Campinas. ___ de _____ de _____

Voluntária

Pesquisador responsável

9.4. Anexo 4 - Fórmulas estatísticas utilizadas no cálculo do tamanho amostral

O tamanho da amostra depende do erro da amostra (não é o nível de significância) que você deseja assumir.

Por exemplo: “Exemplificando, se o pesquisador estabelece um erro absoluto de 2% ($\varepsilon = 0.02$) para a estimação de uma prevalência que ele acredita ser de 30%, então ele estaria satisfeito com qualquer valor entre 28% e 32% para a sua estimativa;”

Através das Fórmulas de cálculo de amostra, e de Intervalo de Confiança, chegamos a seguinte tabela.

Prevalência Estimada = 86,7% (Estudo piloto)
Nível de Significância = 5,00%

Erro Amostral	n	Intervalo de Confiança da Prevalência	
		Limite Inferior	Limite Superior
1,00%	4.430	85,7%	87,7%
2,00%	1.107	84,7%	88,7%
3,00%	492	83,7%	89,7%
4,00%	277	82,7%	90,7%
5,00%	177	81,7%	91,7%
6,00%	123	80,7%	92,7%
7,00%	90	79,7%	93,7%
8,00%	69	78,7%	94,7%
9,00%	55	77,7%	95,7%
10,00%	44	76,7%	96,7%
11,00%	37	75,7%	97,7%

Qualquer um destes valores estaria correto. Com uma amostra de tamanho $n=44$, teremos 95% de chance que o valor da prevalência esteja entre 76,7% e 96,7%.

I - Intervalo de Confiança:
$$\hat{P} - z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} \leq P \leq \hat{P} + z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}$$

II - Tamanho da Amostral:
$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 P(1-P)}{\varepsilon^2}$$

9.5. Anexo 5 - TABELA 16

Distribuição do estado do receptor de estrógeno do tumor primário segundo o receptor de estrógeno da mama contralateral

RE tumor	RE**								p valor*
	0%		1 a 9%		10 a 49%		≤ 50%		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
negativo	5	17	0	0	0	0	0	0	0,63
positivo	16	60	6	88	3	100	0	0	
desconhecido	7	23	1	12	0	0	0	0	
Total	30	100	8	100	5	100	0	0	

(*) teste exato de Fisher

(**) excluí 6 mulheres que não têm RE

9.6. Anexo 6 - TABELA 17

Distribuição do padrão mamográfico de Wolfe segundo a idade (n=44)

	Idade (anos)				<i>p</i> valor*
	< 50		≤ 50		
	n	(%)	n	(%)	
WOLF					0,03
denso	10	71	10	33	
não-denso	4	29	20	67	
Total	14	100	30	100	

(*) teste exato de Fisher

9.7. Anexo 7 - TABELA 18

**Distribuição do padrão mamográfico de Wolfe
segundo o tempo de menopausa (n=44)**

	Tempo de menopausa (anos)				<i>p</i> valor*
	< 50		≤ 50		
	n (18)	(%)	n (31)	(%)	
WOLFE					0,06
denso	11	65	9	67	
não-denso	6	35	18	33	
Total	17	100	27	100	

(*) teste exato de Fisher
(ALVARENGA,1996)

9.8. Anexo 8 - TABELA 19

Distribuição de algumas variáveis clínico-epidemiológicas

Variável	n	Média	Desvio Padrão	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Mínimo	Máximo
idade	44	60,6	14,03	47,5	61,0	73,0	32,0	86,0
IMC	44	28,6	5,18	23,8	24,0	32,9	19,7	37,8
gestação	44	3,7	3,33	1,5	3,0	4,5	0,0	15,0
paridade	44	3,1	3,11	1,0	2,5	4,0	0,0	15,0
menarca	44	13,1	1,68	12,0	13,0	14,0	10,0	18,0
menopausa*	40	47,0	5,33	43,5	47,0	51,0	35,0	56,0
tempo de tamoxifeno	43	23,0	11,11	13,0	22,0	30,0	12,0	52,0
tempo de menopausa*	40	15,6	12,23	3,0	15,5	24,0	1,0	46,0

*Excluídas 4 pacientes que estão no menacme

9.9. Anexo 9 – TABELA 20

Distribuição das pacientes com diagnóstico de carcinomas, lesões proliferativas e não-proliferativas da mama contralateral segundo a idade

Contralateral	Idade			
	≤ 50		> 50	
	n	(%)	n	(%)
carcinomas	4	3,7	10	10,1
prolif. atípicas	4	3,7	7	7,1
prolif. sem atipias	52	48,1	54	54,5
não-proliferativas	48	44,5	28	28,3
Total	108	100,0	99	100,0

$\chi^2=8,31$
 $p=0,0399$