

**MARCUS VINICIUS MARTINS DE MENEZES**

---

---

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS bcl-2, c-erbB-2 E p53 NO  
TECIDO NÃO-NEOPLÁSICO, NO CARCINOMA DUCTAL  
*IN SITU* E NO CARCINOMA INVASIVO DA MESMA MAMA**

---

---

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

**ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO  
CO-ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> MARIA SALETE COSTA GURGEL**

**UNICAMP  
2002**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

|         |           |
|---------|-----------|
| IADE    | CB2       |
| HAMADA  | T/UNICAMP |
|         | M524e     |
| EX      |           |
| IBO DCI | 48557     |
| C       | 16-837102 |
| C       |           |
| PD      | R\$ 11,00 |
| A       |           |
| CPD     |           |

M00166690-6

3 ID 237912

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

M524e

Menezes, Marcus Vinicius Martins

Expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p-53 no tecido não-neoplásico, no carcinoma ductal *in situ* e no carcinoma invasivo da mesma mama. / Marcus Vinicius Martins. Menezes. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador: Luiz Carlos Zeferino, Maria Salete Costa Gurgel  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imuno-histoquímica. 2. Mama-câncer. 3. Carcinoma *in situ*. 4. Expressão genética. I. Luiz Carlos Zeferino. II. Maria Salete Costa Gurgel. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

## **BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno: MARCUS VINICIUS MARTINS MENEZES**

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

**Co-Orientadora: Profª Drª MARIA SALETE COSTA GURGEL**

### **Membros:**

1.

2.

3.

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

**Data: 26/02/2002**

20847802

## ***Dedico este trabalho...***

*... aos meus pais Vicente e Lúcia,  
por terem plantado a semente  
e aos meus estimados filhos, Lucas e Tiago,  
porque colherão os frutos.*

*... à minha adorada esposa Maria Antonieta que,  
apesar das horas de convívio subtraídas,  
nunca deixou de incentivar-me.*

# Agradecimentos

---

*Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, pela infinita paciência e prestimosa ajuda em cada etapa desta dissertação.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Salete Costa Gurgel, por ter-me apoiado nos momentos mais difíceis da execução deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Marcelo Alvarenga, pela inestimável colaboração na leitura e fotografia das lâminas histológicas.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glauce Aparecida Pinto, pela eterna boa vontade e incomensurável paciência comigo e todos que a ela recorrem.*

*A toda equipe de técnicos do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM / UNICAMP, em especial à técnica Marisa Almeida Matsura, pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas.*

*À Anna Leticia de Oliveira Cestari pela enorme ajuda e incentivo.*

*Ao Edson Z. Martinez, pela valiosa ajuda na análise estatística desta dissertação.*

*À Margareth Amado S. Donadon, pela torcida e vibração em cada etapa desta dissertação.*

*À Márcia Regina B. A. Siqueira pelo exemplo de candura e dedicação aos que dela necessitam.*

*À Sueli Chaves e à ASTEC, pela dedicação nas etapas finais deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Roberto Vieira, por ter despertado em mim um interesse maior pela Mastologia.*

# Sumário

---

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Resumo

Summary

|        |                                                  |    |
|--------|--------------------------------------------------|----|
| 1.     | Introdução .....                                 | 13 |
| 2.     | Objetivos .....                                  | 26 |
| 2.1.   | Objetivo geral.....                              | 26 |
| 2.2.   | Objetivos específicos.....                       | 26 |
| 3.     | Sujeitos e Métodos.....                          | 28 |
| 3.1.   | Apresentação e desenho do estudo.....            | 28 |
| 3.2.   | Tamanho amostral e seleção dos sujeitos .....    | 28 |
| 3.2.1. | Critérios de Inclusão.....                       | 29 |
| 3.2.2. | Critérios de Exclusão .....                      | 30 |
| 3.3.   | Variáveis .....                                  | 30 |
| 3.3.1. | Variáveis Independentes.....                     | 30 |
| 3.3.2. | Variáveis Dependentes .....                      | 35 |
| 3.3.3. | Variáveis de Controle .....                      | 36 |
| 3.4.   | Conceitos.....                                   | 37 |
| 3.5.   | Técnicas, Testes e Exames .....                  | 37 |
| 3.5.1. | Seleção do material biológico .....              | 37 |
| 3.5.2. | Processamento laboratorial.....                  | 37 |
| 3.5.3. | Cortes histológicos .....                        | 38 |
| 3.5.4. | Técnica da Imuno-histoquímica .....              | 38 |
| 3.5.5. | Reação da Imunoperoxidase .....                  | 39 |
| 3.5.6. | Leitura dos resultados .....                     | 40 |
| 3.6.   | Instrumento para Coleta de Dados.....            | 41 |
| 3.7.   | Processamento e Análise dos Dados.....           | 41 |
| 3.8.   | Aspectos Éticos .....                            | 42 |
| 4.     | Resultados .....                                 | 44 |
| 5.     | Discussão.....                                   | 53 |
| 6.     | Conclusões .....                                 | 62 |
| 7.     | Referências Bibliográficas.....                  | 64 |
| 8.     | Bibliografia de Normatizações .....              | 73 |
| 9.     | Anexos .....                                     | 74 |
| 9.1.   | Anexo 1 - Ficha para Coleta de Dados .....       | 74 |
| 9.2.   | Anexo 2 - Listagem dos Pacientes Estudados ..... | 76 |

# **Símbolos, Siglas e Abreviaturas**

|               |                                                              |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>CAISM</b>  | Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher                 |
| <b>CDK</b>    | Kinase dependente de ciclina                                 |
| <b>DAB</b>    | 3,3'tetra-hidrocloreto diaminobenzidina                      |
| <b>DNA</b>    | Ácido desoxirribonucleico                                    |
| <b>DTG</b>    | Departamento de Tocoginecologia                              |
| <b>et al.</b> | e outro(s)                                                   |
| <b>FCM</b>    | Faculdade de Ciências Médicas                                |
| <b>GH</b>     | Grau histológico                                             |
| <b>GN</b>     | Grau nuclear                                                 |
| <b>HE</b>     | Hematoxilina e eosina                                        |
| <b>IC 95%</b> | Intervalo de confiança com amplitude de 95% ( $1 - \alpha$ ) |
| <b>kg</b>     | Quilograma                                                   |
| <b>ml</b>     | Mililitro                                                    |
| <b>n</b>      | Tamanho amostral                                             |
| <b>OMS</b>    | Organização Mundial da Saúde                                 |
| <b>p</b>      | Significância estatística                                    |
| <b>PBS</b>    | Tampão salina de fosfato                                     |
| <b>pH</b>     | Potencial hidrogeniônico                                     |

|                |                                     |
|----------------|-------------------------------------|
| <b>UICC</b>    | União Internacional Contra o Câncer |
| <b>UNICAMP</b> | Universidade Estadual de Campinas   |
| <b>%</b>       | Porcentagem                         |
| $\alpha$       | Erro tipo I – critério estatístico  |
| $\beta$        | Erro tipo II – critério estatístico |
| $\mu\text{m}$  | Micrômetro                          |

# Resumo

---

Este estudo teve como objetivo avaliar a associação entre a expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 com o tecido mamário não-neoplásico, o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasivo da mesma mama, através da imuno-histoquímica, e verificar se há um padrão de variação identificável da expressão destas proteínas com a gravidade das lesões. Foram incluídas 56 mulheres que apresentaram na mesma mama carcinoma invasivo associado com carcinoma *in situ*. Foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para bcl-2 (MxH, clone 124, DAKO, código M0887-1, diluição 1:40), c-erbB-2 (RxH, DAKO, código A0485-1, diluição 1:300) e p53 (MxH, DO-7, DAKO, código M7001-1, diluição 1:100). Foi considerado como expressão positiva quando pelo menos 1% das células corou. A prevalência da expressão da proteína bcl-2 foi de 98%, 75% e 64%, respectivamente, no tecido não-neoplásico, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo e estas diferenças foram estatisticamente significantes. O *odds ratio* mostrou que a magnitude destas diferenças foi maior entre o tecido não-neoplásico e o carcinoma *in situ*. Não houve expressão da proteína c-erbB-2 no tecido não-neoplásico e a prevalência da expressão foi de

68% e 61%, respectivamente, para o carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. A diferença observada entre o tecido não-neoplásico e carcinoma *in situ* foi estatisticamente significativa. A prevalência da expressão da proteína p53 foi de 2%, 18% e 16%, respectivamente, no tecido não-neoplásico, carcinoma *in situ* carcinoma invasivo e estas diferenças foram estatisticamente significantes entre os dois primeiros componentes. A expressão da proteína bcl-2 foi mais freqüente no carcinoma *in situ* do subtipo não-comedo e grau nuclear 1 ou 2 e no carcinoma invasivo grau nuclear 1 ou 2. A expressão da proteína c-erbB-2 foi mais freqüente no carcinoma *in situ* grau nuclear 3 e a expressão da proteína p53 foi mais freqüente no carcinoma invasivo grau nuclear 3. Sessenta e quatro por cento das mulheres apresentaram expressão da proteína bcl-2 nos três componentes e 23% apresentaram apenas no componente não-neoplásico. Sessenta e um por cento das mulheres apresentaram expressão da proteína c-erbB-2 apenas nos componentes carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo e 32% não apresentaram expressão em nenhum dos componentes. Setenta e oito por cento das mulheres não apresentaram expressão da proteína p53 em nenhum dos componentes e 14% apresentaram apenas nos componentes *in situ* e invasivo. Os resultados deste estudo permitem inferir que os genes Bcl-2, C-erbB-2 e P53 estão envolvidos nas fases mais iniciais da carcinogênese mamária, ou seja, na transformação do ducto não-neoplásico em carcinoma *in situ*. Uma vez instalada a lesão intra-epitelial, a progressão para a forma invasiva dependeria de outros genes.

# Summary

---

The present study aims to evaluate the association among the expression of the proteins bcl2, c-erbB-2 and p53 and the non-neoplastic mammary tissue, the ductal carcinoma in situ and the invasive carcinoma of the same breast using the immunohistochemical technique. Through this evaluation it aims to find out if there is an identifiable pattern of variation of the expression of these proteins with the gravity of the lesions. Fifty six women were included in this study and all of them had, in the same breast, the association between invasive carcinoma and carcinoma in situ. It has been used specific monoclonal antibodies for bcl-2 (MxH, clone 124, DAKO, code M0887-1, dilution 1:40), c-erbB-2 (RxH, DAKO, code A0485-1, dilution 1:300) and p53 (MxH, DO-7, DAKO, code M7001-1, dilution 1:100). Positive expression has been considered when, at least 1% of the cells dyed. The prevalence of the expression of the protein bcl-2 was 98%, 75% and 64%, respectively in the non-neoplastic tissue, carcinoma in situ and invasive carcinoma and these differences were statistically significant. The odds ratio confirmed that the magnitude of these differences was higher between the non-neoplastic tissue and the carcinoma in situ. There

was no expression of the protein c-erbB-2 in the non-neoplastic tissue and the prevalence of expression of this protein was 68% and 61%, respectively in carcinoma in situ and invasive carcinoma. The difference found between the non-neoplastic tissue and the carcinoma in situ was statistically significant. The prevalence of expression of protein p-53 was 2%, 18% and 16%, respectively in the non-neoplastic tissue, carcinoma in situ and invasive carcinoma and these differences were statistically significant between the two formers only. The expression of the protein bcl-2 was more frequent in carcinoma in situ noncomedo type, nuclear degrees 1 or 2 and in invasive carcinoma nuclear degrees 1 or 2. The expression of protein c-erbB-2 was more frequent in carcinoma in situ nuclear degree 3 and the expression of protein p53 was more frequent in invasive carcinoma nuclear degree 3. Sixty four per cent of women studied showed expression of protein bcl-2 in all three components and 23% of women showed it only in the non-neoplastic component. Sixty one per cent of women showed expression of protein c-erbB-2 only in carcinoma in situ and invasive carcinoma and 32% did not show expression at all. Sixty eight per cent of women did not show expression of protein p53 in none of the components and 14% showed it only in the components 'in situ' and 'invasive'. The results of the present study allow us to conclude that the genes Bcl-2, C-erbB-2 and P53 are linked to the initial stages of mammary carcinogenesis, in other words, they are linked to the transformation of the non-neoplastic duct in carcinoma in situ. Once the intra-epithelial lesion has started, the progression to invasive form would depend on other genes.

# 1. Introdução

---

O câncer de mama é a forma mais comum de câncer feminino nos Estados Unidos e sua incidência vem aumentando nas últimas duas décadas (CANCERNET, 2001). Estima-se que uma em cada oito norte-americanas nascidas hoje desenvolverá câncer de mama ao longo de sua vida (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2001).

No Brasil, o câncer de mama também é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. Estimativas apontam que no ano de 2001 teriam sido diagnosticados 31.590 casos novos e teriam falecido desta doença 8.670 mulheres, o que a transforma na principal causa de óbito por neoplasia maligna no sexo feminino (INCA, 2001).

A introdução da mamografia de rastreio aumentou a detecção das formas mais iniciais do carcinoma de mama, sobretudo os carcinomas *in situ* que passaram a ser diagnosticados numa fase assintomática da doença (EVANS et al., 1994; TABÁR et al., 1999).

Dos carcinomas da mama, os ductais são os mais freqüentes, quer na forma invasiva, quer na forma *in situ* (MATSUKUMA, ENJOJI, TOYOSHIMA, 1991). Os carcinomas ductais *in situ* são caracterizados pela proliferação de células epiteliais com atipia celular, traços de hiperplasia e figuras de mitose no interior dos ductos, respeitando os limites da membrana basal (LAGIOS, 1990). Do ponto de vista arquitetural, o carcinoma ductal *in situ* forma um grupo heterogêneo, englobando dois subtipos histológicos, o subtipo não-comedocarcinoma com as formas sólida, micropapilífera, cribriforme e intracística, que apresentam em geral núcleos monomórficos, pouca ou nenhuma mitose e ausência de mitoses significativas. E o subtipo comedocarcinoma, que apresenta polimorfismo nuclear, numerosas mitoses e significativa necrose com calcificações, além das formas mistas, que são difíceis de avaliar quanto ao prognóstico, por não existir um guia sobre qual tipo de lesão é mais importante que outra (ZHANG et al., 1997).

No entanto, o aumento na detecção das formas pré-invasivas tem colaborado pouco na redução da mortalidade por causa desta patologia, que vem se mantendo mais ou menos estável desde a década de 50 (CANCERNET, 2001). Um dos fatores que possivelmente contribui para este sucesso limitado é a incompleta compreensão da história natural da doença (LAKHANI, 1999).

A história natural do câncer de mama pode ser dividida em **indução** e **progressão**. A fase de indução é definida pelos eventos moleculares que ocorrem no interior de uma célula até a sua transformação maligna, capaz de

dar origem a uma população de células cancerosas com multiplicação descontrolada e infinita. A fase de progressão começa quando uma população de células está permanentemente equipada com alterações genéticas que lhe conferem a capacidade de multiplicação infinita, ou seja, a “imortalidade” (PONTÉN, 1990).

Existem evidências cada vez maiores de que há diferentes rotas de progressão para o câncer invasivo de mama, dependendo do grau de diferenciação das lesões precursoras (MOMMERS et al., 2001). Sabe-se que lesões *in situ* bem diferenciadas tendem a evoluir para lesões invasivas bem diferenciadas. Lesões *in situ* pouco diferenciadas tendem a evoluir para lesões invasivas pouco diferenciadas, com maior risco de recorrência e necessidade de um tratamento mais extenso. (GUPTA et al., 1997; VAN DIEST, 1999).

Apesar de não ser incomum o encontro de áreas de carcinoma *in situ* intimamente relacionadas com carcinoma invasivo da mama no exame anatomopatológico, nem todos os carcinomas *in situ* evoluem para a forma invasiva. Em estudo de PAGE et al. (1982), que reviram 11.760 biópsias de mama por outra patologia, acharam 28 casos de carcinoma *in situ* que não tinham sido diagnosticados na época e apenas tinham sido tratados com a biópsia simples. O acompanhamento destas mulheres mostrou que 28% delas desenvolveram carcinoma invasivo ao longo de 15 anos de acompanhamento. Os fatores que se correlacionam com esta progressão ainda não são conhecidos.

Nos últimos anos, o interesse pela carcinogênese mamária aumentou muito (GUPTA et al., 1997; ZHANG et al., 1997; VAN DIEST; 1999). Existem muitas evidências de que o carcinoma ductal *in situ* possivelmente seja o precursor do carcinoma invasivo da mama, porém existe muita controvérsia sobre o início das lesões pré-malignas (MOMMERS et al., 1998; VAN DIEST, 1999). Em estudo para avaliar os fatores de risco para câncer de mama em mulheres com doença proliferativa da mama, DUPONT & PAGE (1985) acompanharam 3.303 mulheres em média por 17 anos e concluíram que a hiperplasia ductal sem atipia elevava o risco de desenvolver câncer em 1,9 vezes. Se tivesse hiperplasia ductal com atipia, este risco era de 5,3 vezes e se estivesse associado a uma história familiar esta alteração elevava para 11 vezes o risco de desenvolver um câncer de mama. Esse estudo foi baseado apenas na morfologia e seguimento das pacientes, não dispondo de informações como um “perfil genético” ou de marcadores biológicos destas lesões, que possivelmente dariam informações mais acuradas do risco futuro.

Os mecanismos através dos quais ocorre o desenvolvimento de células hiperplásicas em um epitélio ductal normal, a transformação em carcinoma e a progressão para a forma invasiva são mediados por fatores genéticos que controlam a população celular. Para que o equilíbrio dessa mediação seja estabelecido é necessária a regulação do balanço entre o crescimento celular e a morte celular programada na população do tecido (VIACAVA, NACCARATO, BEVILACQUA, 1999). Portanto, parece que um estudo sobre a expressão de

algumas proteínas envolvidas nestes dois eventos poderia melhorar a compreensão de alguns aspectos da indução e progressão tumoral.

O ciclo de divisão celular ou simplesmente ciclo celular é o conjunto de eventos moleculares coordenados que envolvem as diferentes fases da replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e da divisão celular (MARTIN, 1996).

É dividido em quatro fases bem distintas, conhecidas como G1 (do inglês *gap* ou lacuna), S (síntese), G2 e M (mitose). A sequência entre as fases deve ser mantida, pois cada uma delas prepara a célula para a etapa seguinte. A primeira fase ou G1 dura cerca de oito horas nas células eucarióticas humanas e é responsável pelo acúmulo de proteínas, organelas e outros materiais necessários para a replicação do DNA. A segunda fase, síntese, dura cerca de oito horas e quando ocorre a replicação do DNA. Na fase seguinte, G2, com duração de aproximadamente quatro horas, são armazenados materiais necessários para próxima fase, a mitose, que dura cerca de duas horas e termina com a divisão celular, originando duas células-filhas muito semelhantes entre si (CLURMAN & ROBERTS, 1998; REHEN, 2001).

Alguns sinais **extrínsecos** mitogênicos e antimitogênicos controlam a proliferação celular, estimulando a célula a iniciar ou parar o seu ciclo mitótico, geralmente na fase G1 ou G2 (CLURMAN & ROBERTS, 1998).

Sinais proliferativos e antiproliferativos extrínsecos intervêm no ciclo celular através do controle da atividade de proteínas reguladoras, conhecidas como quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Estas são enzimas fosforiladoras e

para se tornarem ativas necessitam associar-se a subunidades protéicas específicas, chamadas ciclinas. Existem ainda proteínas específicas que inibem as CDKs, conhecidas como proteínas inibidoras de CDK (CLURMAN & ROBERTS, 1998).

Nas células dos mamíferos, oito CDKs foram identificadas até o momento e se tornam ativas apenas em fases específicas do ciclo celular, com exceção à CDK5, que aparentemente não apresenta função relacionada ao ciclo celular, mas é crucial para o desenvolvimento do córtex cerebral em mamíferos (REHEN, 2001). A progressão através de G1 depende da atividade das CDK2, CDK3, CDK4 e CDK6, todas ativadas pela ciclina D. A delicada transição G1-S é regulada pela ciclina E-CDK2. Durante a fase S, atua a ciclina A-CDK2. A transição G2-M é mediada pela ciclina B/A-cdc 2 (CLURMAN & ROBERTS, 1998).

Por outro lado, a célula possui mecanismos *intrínsecos* de regulação da divisão celular. Um dos principais locais de controle intrínseco do ciclo celular é o ponto de restrição (R), que se situa no terço final da fase G1 e a partir do qual, independente de haver sinais extrínsecos mitogênicos ou anti-mitogênicos, a célula poderá escolher se seguirá o seu ciclo até a mitose ou entrará em uma fase quiescente (G0). Não havendo sinais apropriados para a progressão do ciclo celular, este é temporariamente interrompido nos chamados **pontos de verificação** que existem em G1, S, G2 e M. Algumas células neoplásicas perdem o controle sobre o ponto R, liberando a célula para sucessivas mitoses.

Surge assim uma espécie de “independência mitogênica”, podendo gerar um aumento do volume tumoral (CLURMAN & ROBERTS, 1998).

A apoptose é um “programa” inerente aos organismos multicelulares, o qual, quando deflagrado, desencadeia uma cascata bioquímica, reconhecível morfológicamente que resulta no suicídio da célula (SHIMAMURA & FISHER, 1996). É um componente crítico para o desenvolvimento, organogênese e diferenciação de organismos eucarióticos (RUDIN & THOMPSON, 1998).

Morfológicamente, diferencia-se da necrose porque leva a uma contração celular, formação de vesículas na membrana celular, condensação importante do núcleo celular e caracteristicamente, uma clivagem do DNA em fragmentos mais ou menos regulares de 50 a 350 Kb. Todo esse mecanismo é um processo ativo, com gasto de energia e não envolve trauma celular, nem reação inflamatória, como nos casos de necrose (MELLO, VIDAL MARIA, 2001).

Portanto, a carcinogênese pode começar com mudanças na regulação do ciclo celular através de duas maneiras: contornando o ponto de restrição e fazendo com que a célula ignore alarmes internos que sinalizam a presença de erros na duplicação cromossômica, o que levaria a uma instabilidade genética e permitiria a evolução para células malignas, ou alterando a via final da célula com alteração do genoma, ou seja, inibindo a apoptose (CLURMAN & ROBERTS, 1998).

As alterações da apoptose pela ativação dos proto-oncogenes e inativação dos genes supressores tumorais têm papel fundamental no desenvolvimento e progressão tumoral (ZHANG et al., 1997).

O gene P53 que está localizado no cromossomo 17 é um gene supressor tumoral e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 quilo-daltons (kDa), conhecida como proteína p53 (ISOBE et al., 1986). Geralmente esta proteína encontra-se em níveis muito baixos nas células normais e atua regulando o crescimento celular normal, ligando-se à região reguladora do gene, indispensável para a indução da transcrição pela RNA polimerase. O gene é ativado quando ocorre algum dano ao DNA em replicação, para que seja mantida a integridade do genoma (MOLL et al., 1995). A proteína p53 “selvagem” atua promovendo a paralisação do ciclo celular a nível de G1, provavelmente por intermédio da proteína p21, que inibe a ação de CDK, para que se façam os reparos do genoma antes de ocorrer a replicação (SHIMAMURA & FISHER, 1996). Caso esses reparos não sejam possíveis por causa de um dano muito grave ao DNA, o gene P53 do tipo “selvagem” induz a célula à apoptose. Um dos mecanismos pelo qual isto ocorreria, seria pelo aumento da expressão do gene Bax, que pertence à mesma família do Bcl-2, e atuaria diminuindo a expressão da proteína bcl-2 (KRAJEWSKI et al., 1997).

As mutações do gene P53 podem resultar na síntese de uma proteína sem a capacidade de se ligar às regiões específicas do DNA. Ocorre então a perda do controle da proliferação celular e a perpetuação das mutações que acontecem no DNA durante a replicação (PILLAI et al., 1998). Ao contrário da

forma “selvagem”, o gene P53 mutado parece bloquear a apoptose nas células neoplásicas da mama (HALDAR et al., 1994).

A proteína p53 mutada é mais estável, com meia-vida mais longa que a “selvagem” e por isso pode ser encontrada em maior quantidade nas células tumorais que contenham a forma mutante desta proteína (LANE & BENCHIMOL, 1990). Alguns autores atribuem o fato da proteína do tipo “selvagem” geralmente não ser detectada pela imuno-histoquímica por causa da sua meia-vida ser muito curta (SHEN et al., 1998).

A grande concentração da proteína p53 pode estar envolvida na indução e na progressão do carcinoma mamário, podendo ter significado prognóstico e terapêutico. O acúmulo da proteína p53 é considerado um fator de mau prognóstico (THOR et al., 1992).

A maioria dos casos de carcinoma ductal *in situ* do tipo não-comedocarcinoma não apresenta expressão do gene P53 detectável pela imuno-histoquímica e a concentração da proteína p53 geralmente é semelhante à do epitélio normal nestes casos (SIZIOPIKOU et al., 1996; ZHANG et al., 1997). A expressão da proteína p53 é mais freqüentemente detectada no carcinoma ductal *in situ* do tipo comedocarcinoma e nos carcinomas invasivos, sugerindo uma maior velocidade de proliferação celular e um fenótipo mais agressivo (QUERZOLI et al., 1998).

Outro gene relacionado com o crescimento celular e com o processo de indução de um carcinoma é o Bcl-2. Está localizado no cromossomo 18 e

codifica uma proteína que se encontra principalmente na membrana mitocondrial ou, menos freqüentemente, na membrana nuclear e é importante por bloquear a apoptose (HOCKENBERY et al., 1990). A proteína bcl-2 age inibindo a apoptose através de mecanismos não muito bem esclarecidos, possivelmente por uma ação antioxidante via supressão da peroxidação lipídica (HOCKENBERY et al., 1993).

A compreensão dos fatores que regulam a apoptose pode ser importante para determinar quais carcinomas *in situ* teriam maior capacidade proliferativa, independente da sua classificação morfológica.

Na mama, a expressão da proteína bcl-2 aparece no epitélio normal e nas hiperplasias benignas (SIZIOPIKOU et al., 1996; MUSTONEN et al., 1997). Cerca de 76% dos carcinomas ductais *in situ* apresentam expressão de bcl-2. Nos carcinomas invasivos, sua expressão é menor que nos dois tipos morfológicos anteriores e quando presente, sua expressão pode indicar bom prognóstico (SIZIOPIKOU et al., 1996).

Os genes Bcl-2 e P53 parecem estar envolvidos em uma via comum na regulação da apoptose (SHIMAMURA & FISHER, 1996; QUINN et al., 1998). Vários autores apontam uma relação inversa entre a ação das proteínas bcl-2 e p53 na forma “selvagem” na célula do epitélio mamário normal (PEZZELLA & GATTER, 1995; SIZIOPIKOU et al., 1996; ZHANG et al., 1997; VIACAVA et al., 1999).

O gene C-erbB-2, por sua vez, está localizado no cromossomo 17 e é responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembrana com atividade tirosina kinase (DE POTTER, 1994). Devido à sua semelhança com o receptor do fator de crescimento epidermal, acredita-se que seja uma proteína que forme um receptor de fator de crescimento e, portanto, esteja relacionado com a regulação da proliferação celular (HARRIS, MORROW, BONADONNA, 1993). Este fato também deu origem ao outro nome pelo qual o gene C-erbB-2 é conhecido: HER-2/*neu*, do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor* (DE POTTER, 1994).

A superexpressão deste oncogene ocorre em cerca de 20% a 30% dos casos de câncer de mama (DE POTTER & SCHELFHOUT, 1995; WANG et al., 2000). O gene C-erbB-2 costuma apresentar maior positividade na expressão de sua proteína nas lesões *in situ*, com cerca de 44% dos casos que na forma invasiva da neoplasia mama, com cerca de 22% dos casos. Geralmente está associado com a maior gravidade morfológica da lesão mamária (RÉVILLION, BONNETERRE, PEYRAT, 1998).

Em suma, há diferentes fatores genéticos que determinam o controle populacional de um tecido específico. A formação de um tumor é tida como resultado de alterações genéticas que levam à ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais. O desenvolvimento de uma neoplasia está ligado a um desequilíbrio do balanço entre o crescimento e a morte da população celular. Os fatores genéticos, portanto, parecem ter influência direta sobre a indução da neoplasia na forma *in situ* e a sua progressão através da

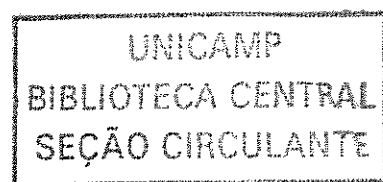
criação de uma solução de continuidade na membrana basal com invasão do estroma e seus vasos sangüíneos e linfáticos.

Baseado na história natural do câncer de mama, acredita-se que por inibir a apoptose a proteína bcl-2 tenha maior expressão nas fases mais iniciais da carcinogênese, talvez na fase de indução, pois levaria a uma longevidade maior da célula, permitindo que as alterações genéticas e bioquímicas mais profundas aconteçam. A proteína p53 mutada também estaria envolvida nas fases iniciais da carcinogênese, tendo em vista que a sua função é alterada pela mutação e também atua inibindo a apoptose. Por fim, a proteína c-erbB-2 parece ser um receptor de superfície para fator de crescimento, o que a tornaria necessária na fase de indução da carcinogênese quando sinais extrínsecos estimulariam a célula na indução. Uma vez que a célula tenha adquirido as alterações bioquímicas e genéticas necessárias para a sua "independência" ou "imortalidade", este receptor de membrana não seria mais tão necessário nas fases mais evoluídas da carcinogênese.

O estudo das variações nas expressões das proteínas pode ter significado preditivo da indução e progressão de um ducto não-neoplásico para uma lesão *in situ*, e da lesão *in situ* para um carcinoma invasivo. Todavia, os estudos identificados analisaram a expressão destas proteínas em mamas de diferentes mulheres, de tal forma que seguramente há uma variabilidade genética, não controlada nos estudos, que pode influenciar na expressão destas proteínas e ação destes genes (ALLRED et al., 1992; UMEKITA, TAKASAKI, YOSHIDA,

1994; SIZIOPIKOU et al., 1996; MUSTONEN et al., 1997; ZHANG et al., 1997; SHEN et al., 1998; VIACAVA et al., 1999; MEGHA et al., 2000).

Portanto, a proposta deste estudo foi analisar, na mesma mama, a expressão das proteínas bcl-2, p53 e c-erbB-2 em tecido não-neoplásico, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Conseqüentemente, a análise e comparação da expressão dessas proteínas foram pareadas, uma vez que todas as variáveis em estudo foram pesquisadas na mesma mulher, eliminando o efeito confundidor das diferenças genéticas existentes nos estudos identificados na literatura.



## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação entre a expressão das proteínas bcl2, c-erbB-2 e p53 com o tecido não-neoplásico, o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasivo na mesma mama e verificar se há um padrão de variação identificável da expressão destas proteínas com a gravidade das lesões.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Calcular as prevalências da expressão da proteína bcl-2 no tecido não-neoplásico, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo da mama.
2. Calcular as prevalências da expressão da proteína c-erbB-2 no tecido não-neoplásico, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo da mama.
3. Calcular as prevalências da expressão da proteína p53 no tecido não-neoplásico, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo da mama.
4. Determinar se há associação da expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 com o subtipo histológico e o grau nuclear do carcinoma *in situ*.

5. Determinar se há associação da expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 com os graus histológico e nuclear do carcinoma invasivo.
6. Identificar o padrão mais freqüente da expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 no tecido não-neoplásico, no carcinoma *in situ* e no carcinoma invasivo da mesma mama.

## **3. Sujeitos e Métodos**

---

### **3.1. Apresentação e desenho do estudo**

Trata-se de um estudo que integra um conjunto de projetos sobre análise imuno-histoquímica em neoplasias malignas mamárias e ginecológicas. Estes projetos fazem parte da linha de pesquisa "Carcinogênese das Neoplasias Ginecológicas e Mamárias".

O estudo realizado foi do tipo corte transversal.

### **3.2. Tamanho amostral e seleção dos sujeitos**

Foram identificadas 188 mulheres submetidas à biópsia de mama no período de 1994 a 1999, com diagnóstico de carcinoma invasivo de mama estádios clínicos I e II (UICC, 1991). Cento e dezesseis mulheres foram atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e 72 foram atendidas em outros hospitais; porém, os blocos de parafina estavam armazenados em um

laboratório privado na cidade de Campinas. Foram lidos todos os laudos anatomopatológicos das peças cirúrgicas da mama, com o objetivo de identificar os casos que possuíam componentes de carcinoma *in situ* associado ao carcinoma invasivo, o que reduziu o total de casos para 98. Foram localizados todos os blocos de parafina que continham fragmentos da mama previamente biopsiados e fixados em formol a 10%. Os blocos foram recortados inúmeras vezes e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) para localizar os componentes dos carcinomas invasivo e *in situ*, e áreas de tecido não-neoplásico. Todo o trabalho de microscopia foi realizado pelo mesmo anatomopatologista no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM/UNICAMP. Em 56 casos foram encontrados os três componentes e estes blocos foram separados para o presente estudo. Em 42 casos não foram identificados nos blocos disponíveis um dos componentes, *in situ* ou invasivo, possivelmente porque se tratavam de casos cujo componente era escasso e os blocos foram exaustivamente recortados no momento do exame anatomopatológico da peça cirúrgica com o objetivo de estabelecer um diagnóstico mais seguro.

### **3.2.1. Critérios de Inclusão**

Foram incluídas as mulheres com diagnóstico anatomopatológico de carcinoma invasivo de mama de qualquer tipo histológico, estádios clínicos I e II da UICC (1991), associado a carcinoma ductal *in situ* e tecido não-neoplásico.

### 3.2.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídas as mulheres que apresentaram:

- ausência de qualquer um dos três componentes: carcinoma invasivo, carcinoma ductal in situ ou tecido mamário não-neoplásico;
- presença de carcinoma lobular in situ como única manifestação de carcinoma in situ;
- mulheres que receberam qualquer tratamento antes da cirurgia da mama.

### 3.3. Variáveis

A seguir são apresentadas as variáveis e suas respectivas categorias:

#### 3.3.1. Variáveis Independentes

- Expressão da proteína bcl-2 – obtida da imuno-histoquímica (Fig. 1) categorizada em:

|     |                                                |
|-----|------------------------------------------------|
| 0   | não corou nenhum citoplasma celular            |
| +   | corou até 10% dos citoplasmas das células      |
| ++  | corou de 10% a 50% dos citoplasmas das células |
| +++ | corou acima de 50% dos citoplasmas das células |

- Expressão da proteína c-erbB-2 – obtida da imuno-histoquímica, segundo WANG et al., 2000 modificada (Fig. 2) e categorizada em:

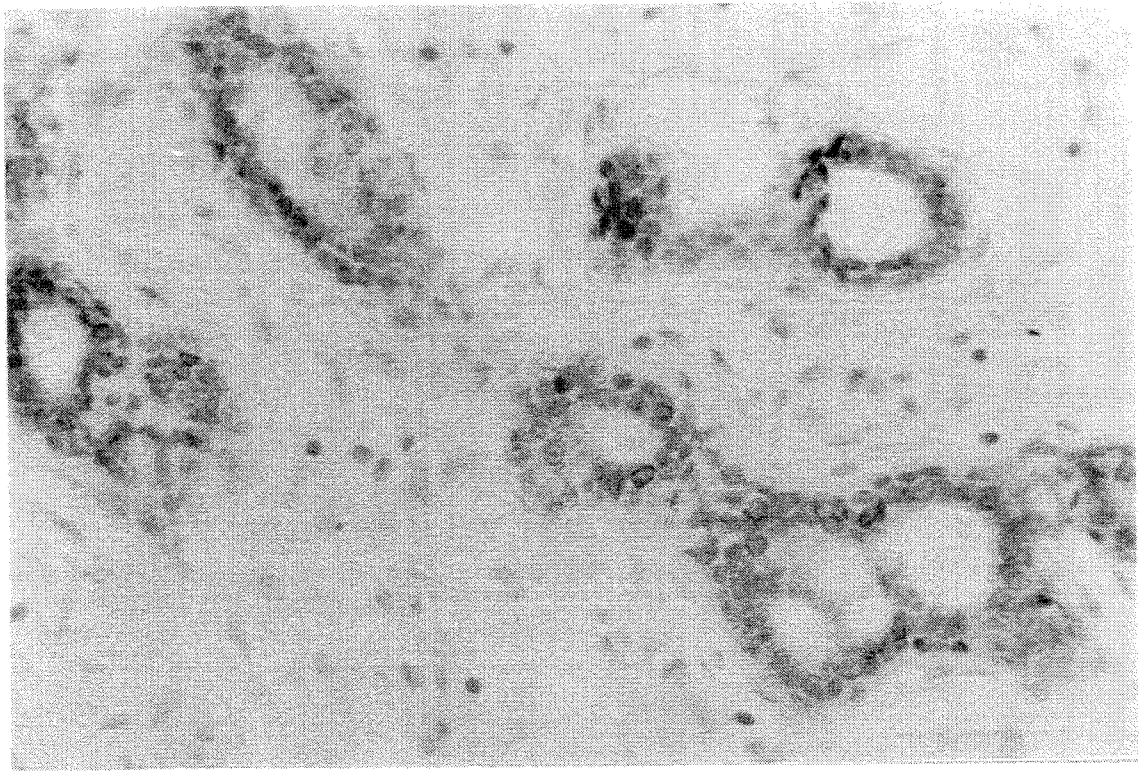
|     |                                                                                             |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0   | não corou nenhuma membrana celular                                                          |
| +   | corou parte das membranas celulares em até 10% das células                                  |
| ++  | corou as membranas celulares com intensidade fraca ou moderada em mais de 10% das células   |
| +++ | corou completamente as membranas celulares com intensidade forte em mais de 10% das células |

- Expressão da proteína p53 – obtida da imuno-histoquímica (Fig. 3), categorizada em:

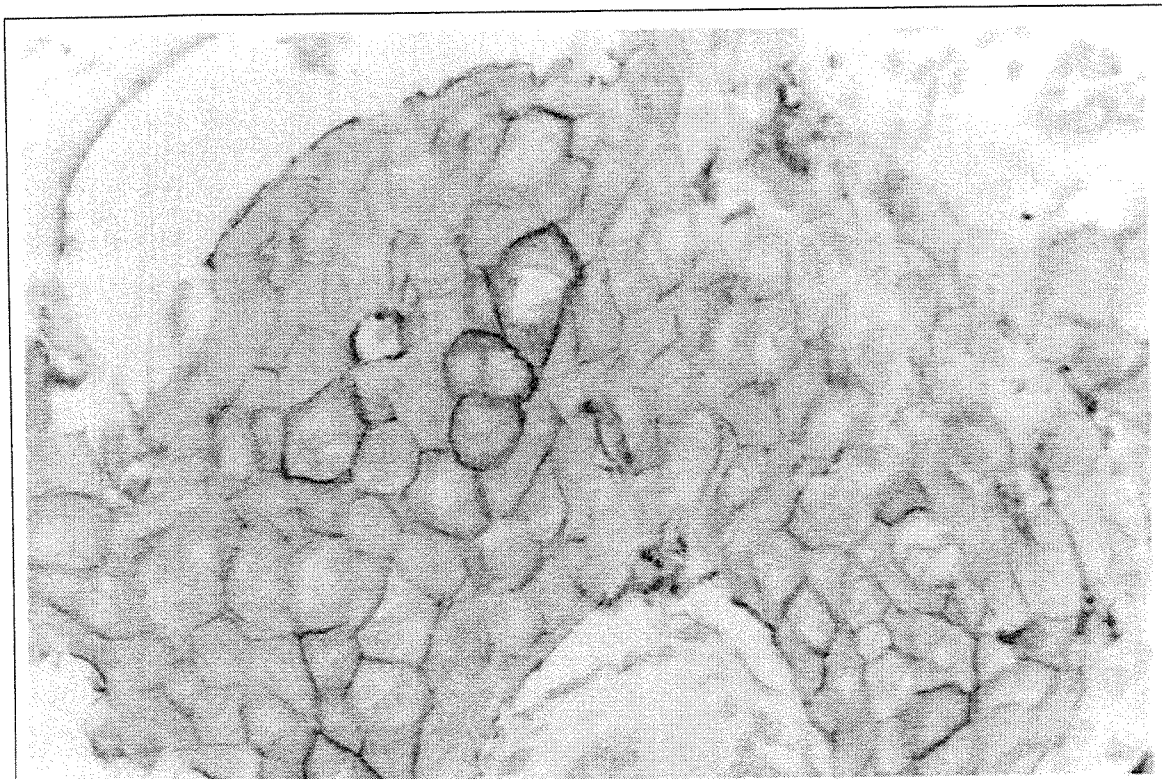
|     |                                             |
|-----|---------------------------------------------|
| 0   | não corou nenhum núcleo celular             |
| +   | corou até 10% dos núcleos celulares         |
| ++  | corou entre 10% e 50% dos núcleos celulares |
| +++ | corou mais de 50% dos núcleos celulares     |

Para análise da associação da expressão das proteínas bcl-2, c-erb-B2 e p53, foi adotada a seguinte recodificação:

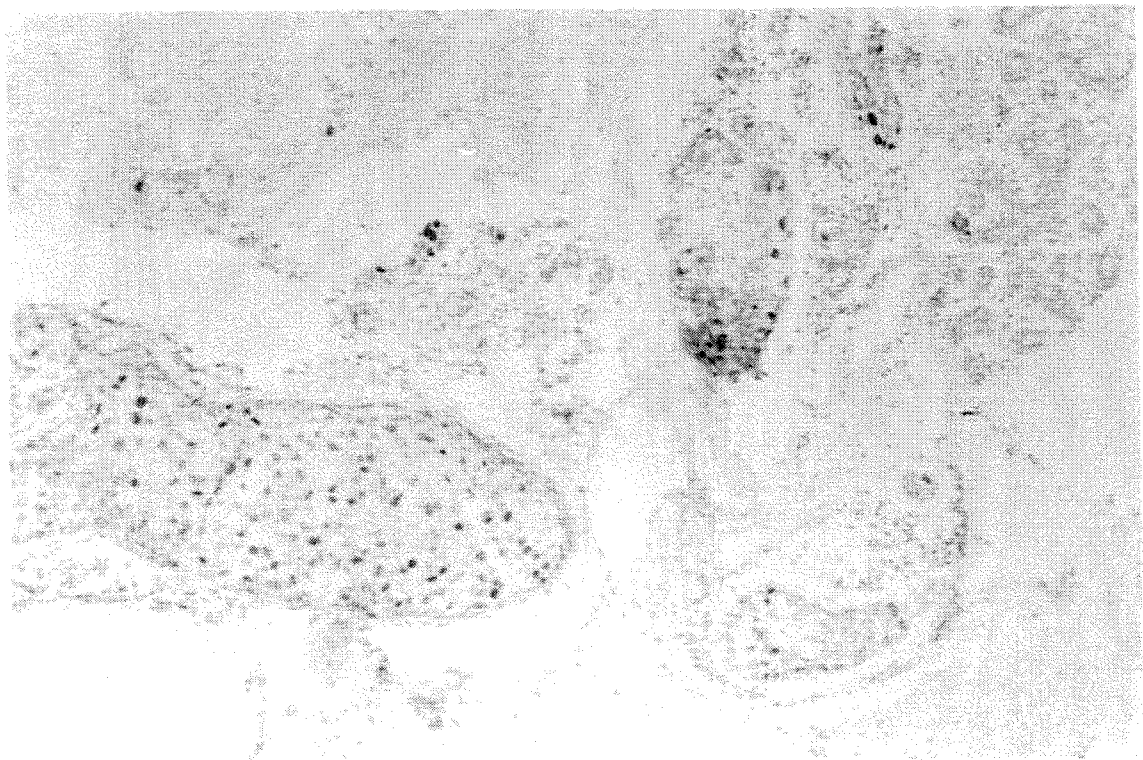
|          |                 |
|----------|-----------------|
| Negativo | 0               |
| Positivo | +, ++ ou +++ 99 |



*Figura 1. Aumento de 40X mostrando expressão da proteína bcl-2 no citoplasma de células de ductos mamários normais, classificada em ++.*



*Figura 2. Aumento de 40X mostrando expressão da proteína c-erbB-2 na membrana citoplasmática de células de um carcinoma ductal invasivo, classificada em +++.*



*Figura 3. Aumento de 10X mostrando expressão da proteína p53 no núcleo das células de um carcinoma ductal in situ (à esquerda), classificada em +++ e ausência de expressão nas células do tecido não-neoplásico da mama (à direita).*

### 3.3.2. Variáveis Dependentes

- Subtipo histológico do carcinoma ductal *in situ* – subdividido segundo DUPONT & PAGE (1985) em:
  - comedocarcinoma: ductos preenchidos por células epiteliais com intensa atipia citológica, núcleos grandes e graus variados de necrose que pode sofrer microcalcificações.
  - não-comedocarcinoma: compreende quatro lesões:
    - ♦ cribriforme: pontes de células epiteliais que se unem para formar espaços regulares dentro dos ductos, de forma e tamanho semelhantes entre si, com leve ou moderada atipia nuclear.
    - ♦ micropapilífero: estruturas papilíferas, de tamanho e formas regulares, sem eixo conjuntivo-vascular, projetando-se para dentro dos espaços ductais, com leve ou moderada atipia nuclear.
    - ♦ sólido: obliteração total da luz do ducto por população celular uniforme, sem necrose, com leve ou moderada atipia nuclear.
    - ♦ intracístico: cisto total ou parcialmente preenchido por população celular uniforme.
- Grau Nuclear (GN) do carcinoma ductal *in situ* – obtido do exame histopatológico do tumor, classificado de acordo com HOLLAND et al. (1994) em três grupos:
  - Grau 1: tumor bem diferenciado
  - Grau 2: tumor moderadamente diferenciado
  - Grau 3: tumor indiferenciado

- Grau Histológico (GH) do carcinoma invasivo – obtido a partir do resultado do exame histopatológico do tumor, segundo os critérios de BLOOM & RICHARDSON (1957), definiram-se três grupos:
  - *GH I*: a maior parte do tumor é composta de túbulos com luz central visível. Tumor bem diferenciado.
  - *GH II*: moderada quantidade de formação de túbulos associada com áreas sólidas de crescimento tumoral. Tumor moderadamente diferenciado.
  - *GH III*: massas sólidas ou cordões de células neoplásicas, sem formação de túbulos. Tumor indiferenciado.
  
- Grau Nuclear (GN) do carcinoma invasivo – obtido do exame histopatológico do tumor, classificado de acordo com FISHER, GREGORIO, FISHER, (1975) em três grupos:
  - *GN 1*: núcleos uniformes em forma e tamanho, cromatina finamente granular, fina e igualmente dispersa por todo o núcleo. Tumor bem diferenciado.
  - *GN 2*: núcleos moderadamente irregulares em forma e tamanho, com cromatina grosseiramente agrupada ou com aspecto nuclear vacuolado. Tumor moderadamente diferenciado.
  - *GN 3*: pleomorfismo nuclear intenso. Tumor indiferenciado.

### 3.3.3. Variáveis de Controle

- Idade - calculada em anos completos de vida, desde a data do nascimento até a data do diagnóstico da neoplasia, obtida do prontuário.

### **3.4. Conceitos**

- Tecido mamário não-neoplásico – presença de ductos revestidos por até quatro camadas de células, desde que sem atipias nucleares (ALVARENGA, 1994).
- Carcinoma ductal *in situ* – originam-se dentro dos ductos e da unidade ductal terminal-lobular, limitados pela membrana basal epitelial (ALVARENGA, 1994).
- Carcinoma invasivo da mama – rompimento da integridade da membrana basal do ducto mamário pela célula epitelial maligna, invadindo o estroma subjacente (ALVARENGA, 1994).

### **3.5. Técnicas, Testes e Exames**

#### **3.5.1. Seleção do material biológico**

Foram identificados os números das lâminas e dos blocos de parafina correspondentes às mulheres selecionadas para o estudo. Este material foi procurado nos arquivos dos laboratórios de patologia do CAISM/UNICAMP e do laboratório de patologia privado.

#### **3.5.2. Processamento laboratorial**

Todos os blocos de parafina contendo material de mama previamente fixados em formol a 10% foram processados no Laboratório de Patologia Experimental – CAISM e no Departamento de Anatomia Patológica da

Faculdade de Ciências Médica (FCM) -UNICAMP. Os blocos de parafina foram recortados e confeccionadas lâminas coradas em HE. Estas lâminas foram analisadas pelo mesmo médico patologista do projeto para confirmação do diagnóstico e certificação da presença das áreas não-neoplásica, *in situ* e invasiva, antes do recorte dos mesmos para a técnica proposta. Nesse momento do estudo também foi feita a classificação do subtipo histológico e do grau nuclear do carcinoma ductal *in situ*, do tipo histológico e dos graus nuclear e histológico do carcinoma invasivo.

### **3.5.3. Cortes histológicos**

Cortes de 4µm de espessura realizados nos blocos de parafina foram colocados em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas com solução de organosilano a 4% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma, código A3648). As lâminas com os cortes foram colocadas em estufa a 110° C durante uma hora para fixação das secções nas lâminas. Em seguida, foram retiradas e mantidas à temperatura ambiente por uma hora até o momento da reação.

### **3.5.4. Técnica da Imuno-histoquímica**

Foram utilizados anticorpos primários monoclonais específicos para *bcl-2* (MxH, clone 124, DAKO, código M0887-1, diluição 1:40), p53 (MxH, DO-7, DAKO, código M7001-1, diluição 1:100) e c- erbB-2 (RxH, DAKO, código A0485-1,

diluição 1:300). As diluições dos mesmos foram realizadas com soro albumina bovina (BSA).

### **3.5.5. Reação da Imunoperoxidase**

As secções foram desparafinadas em banho de xilol a 110°C e a seguir, banhos subseqüentes em xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos de água oxigenada a 10 volumes cada um, com duração de três minutos, seguidos de lavagens em PBS (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 a 7,6). Para a recuperação antigênica foi utilizada panela a vapor T-fall® com o objetivo de desmascarar antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio pH 6,0 a 95°C, durante 30 minutos. A seguir, foram lavadas em água corrente. Após esta etapa, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico a 4°C, *overnight*. Após a incubação, as lâminas foram passadas por três lavagens em PBS sob agitação, secadas e incubadas com *Evision Labeled Polymer Component* (DAKO, código K1491) a 37°C, durante uma hora e a seguir, três lavagens em PBS com agitação. A revelação foi feita com substrato cromógeno DAB (3-3'-diaminobenzidine, SIGMA código D5637) na proporção de 0,06g para 100ml de PBS, 500µl de água oxigenada a 30 volumes e 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C, durante cinco minutos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas com

hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. As secções foram desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizadas em três banhos de xilol e a seguir montadas com lamínulas e resina Entellan. Para atestar a positividade da reação imuno-histoquímica, foram usados controles externos sabidamente positivos. Para o controle positivo do bcl-2 foi usado o fragmento de um linfonodo com linfoma de células do manto, fortemente positivo para bcl-2 (bloco 9045/00). Para c-erbB-2, o controle positivo foi retirado de um carcinoma ductal invasivo de mama, fortemente positivo para c-erbB-2 (bloco 375.752QE) e para o p53, o controle positivo foi retirado de um tumor de ovário *borderline*, fortemente positivo para p53 (bloco 1200/98). Todos estes blocos estão guardados no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM/UNICAMP.

#### **3.5.6. Leitura dos resultados**

Foi realizada em microscópio óptico comum, no aumento de 40 vezes, por um único médico anatomopatologista, de modo semi-objetivo, examinando-se todos os campos de todos os fragmentos do tumor. Foram considerados positivos todos os núcleos celulares corados de marrom, independente da sua intensidade, para p53, todos os citoplasmas corados de marrom, independente da sua intensidade, para bcl-2 e todas as membranas celulares coradas de marrom que variou com a intensidade, para c-erbB-2. As lâminas foram analisadas e classificadas semiquantitativamente, conforme descrito acima.

### **3.6. Instrumento para Coleta de Dados**

A coleta de dados foi realizada através do preenchimento de uma ficha criada para este estudo (ANEXO 1). Para cada caso foi atribuído um número de identificação.

Os dados foram obtidos do prontuário médico das pacientes atendidas no CAISM ou do sistema de informação do laboratório de patologia privado. Os resultados da análise imuno-histoquímica foram anotados na mesma ficha do ANEXO 1.

### **3.7. Processamento e Análise dos Dados**

Os dados transcritos na ficha foram revisados manualmente para detecção de possíveis erros de seleção e preenchimento. A partir do Epi-info versão 6.04 (DEAN et al., 1994), foi criado um banco de dados com codificação das variáveis. A digitação do banco foi feita com conferência manual através da listagem dos dados, na ordem em que foram digitados. A revisão da consistência dos dados foi feita através de tabelas descritivas. Em seguida, o arquivo gerado foi transportado para o programa *Statistical Analysis System for Personal Computer*, versão 6.12 (CARY, 1989) para realização da análise dos resultados, através dos seguintes testes estatísticos:

- Teste de McNemar para análise da associação de dados pareados (ALTMAN, 1991),

- Teste exato de Fisher para análise da associação de dados não-pareados (ALTMAN, 1991),
- *Odds ratio* para estimar a magnitude da associação, com intervalo de confiança de 95% (ALTMAN, 1991).

Estipulou-se um erro  $\alpha$  de 0,05 e um erro  $\beta$  de 0,20. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando o “p-valor” foi menor ou igual a 0,05.

### 3.8. Aspectos Éticos

O estudo foi retrospectivo e realizado a partir dos blocos de parafina contendo material de peças cirúrgicas das mulheres. Estes blocos estavam arquivados no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM e em um laboratório privado de Campinas e foram localizados a partir do levantamento de laudos anatomopatológicos dos prontuários médicos ou do sistema de informações do laboratório privado. Nenhuma mulher foi identificada pelo nome, mas sim pelos números do prontuário ou da biópsia. A conduta clínica permaneceu inalterada e, portanto, não houve riscos nem benefícios diretos para as mulheres incluídas neste estudo.

Entende-se que não foi necessário o Termo de Consentimento porque:

- os dados foram colhidos após o atendimento;
- nenhum dos pesquisadores teve contato direto com as mulheres;

- não houve qualquer alteração na rotina assistencial;
- as variáveis foram colhidas de prontuários, sistema de informações e análise de material armazenado em blocos de parafina oriundos de cirurgias prévias.

Os dados obtidos foram utilizados de maneira confidencial, obedecendo os preceitos do Código de Ética Médica para utilização científica de dados de pacientes e respeitados os princípios enunciados na DECLARAÇÃO DE HELSINQUE III (2000) e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996).

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia do CAISM e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

## 4. Resultados

---

A maioria das amostras de tecido analisadas foi positiva para bcl-2, tanto no tecido não-neoplásico quanto nos carcinomas *in situ* e invasivo. A prevalência da expressão da proteína bcl-2 no tecido não-neoplásico foi de 98%, no carcinoma *in situ* foi de 75% e no carcinoma invasivo foi de 64%, e essas diferenças foram estatisticamente significativas. A magnitude da diferença entre a expressão da proteína bcl-2 foi maior entre o tecido não-neoplásico e o carcinoma ductal *in situ*, com *odds* de 0,05, do que entre o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasivo, cujo *odds* foi de 0,60. Deve-se considerar que a técnica para estimar os valores do *odds* e seus respectivos intervalos de confiança (IC) foram para grupos não-pareados, o que explica ter-se obtido um p-valor menor do que 0,05 para a diferença da prevalência da expressão entre o carcinoma *in situ* e o invasivo e um *odds* com IC não-significativo, mas não inviabiliza a comparação da magnitude da associação (Tabela 1).

TABELA 1

Distribuição percentual da expressão da proteína bcl-2 no tecido não-neoplásico, no carcinoma *in situ* e no carcinoma invasivo da mama

| Proteína bcl-2 | Tec. Não-neoplásico |     | Carcinoma <i>in situ</i> |     | Carcinoma invasivo |     |
|----------------|---------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------|-----|
|                | n                   | %   | n                        | %   | n                  | %   |
| Positivo       | 55                  | 98  | 42                       | 75  | 36                 | 64  |
| Negativo       | 1                   | 2   | 14                       | 25  | 20                 | 36  |
| TOTAL          | 56                  | 100 | 56                       | 100 | 56                 | 100 |

Tecido não-neoplásico x carcinoma *in situ*:

*p*-valor < 0,01 (Teste de McNemar), odds 0,05 - IC 95% (0 – 0,42);

Carcinoma *in situ* x invasivo:

*p*-valor = 0,03 (Teste de McNemar), odds 0,60 - IC 95% (0,24 – 1,46)

Não foi observada expressão da proteína c-erbB-2 no tecido não-neoplásico, enquanto que a prevalência no carcinoma *in situ* foi de 68% e no carcinoma invasivo foi de 61%. Portanto, houve um aumento estatisticamente significativo da positividade entre o tecido não-neoplásico e o carcinoma *in situ*. Por outro lado, não houve variação estatisticamente significativa da expressão da proteína c-erbB-2 entre o carcinoma *in situ* e o carcinoma invasivo (Tabela 2).

TABELA 2

Distribuição percentual da expressão da proteína c-erbB-2 no tecido NÃO-NEOPLÁSICO, no carcinoma *in situ* e no carcinoma invasivo da mama

| Proteína c-erbB-2 | Tec. Não-neoplásico |     | Carcinoma <i>in situ</i> |     | Carcinoma invasivo |     |
|-------------------|---------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------|-----|
|                   | n                   | %   | n                        | %   | n                  | %   |
| Positivo          | 0                   | 0   | 38                       | 68  | 34                 | 61  |
| Negativo          | 56                  | 100 | 18                       | 32  | 22                 | 39  |
| TOTAL             | 56                  | 100 | 56                       | 100 | 56                 | 100 |

Tecido não-neoplásico x carcinoma *in situ*: *p* < 0,01 (Teste de McNemar);

Carcinoma *in situ* x invasivo: *p* = 0,13 (Teste de McNemar).

A prevalência da expressão da proteína p53 no tecido não-neoplásico foi de 2%, no carcinoma *in situ* foi de 18% e no carcinoma invasivo foi de 16%. Portanto, houve um aumento estatisticamente significativo da positividade entre o tecido não-neoplásico e o carcinoma *in situ* com *odds* de 11,96. No entanto, não houve variação da positividade entre o carcinoma *in situ* e o carcinoma invasivo, com *odds* de 0,88 (Tabela 3).

**TABELA 3**

**Distribuição percentual da expressão da proteína p53 no tecido não-neoplásico, no carcinoma *in situ* e no carcinoma invasivo da mama**

| Proteína bcl-2 | Tec. Não-neoplásico |     | Carcinoma <i>in situ</i> |     | Carcinoma invasivo |     |
|----------------|---------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------|-----|
|                | n                   | %   | n                        | %   | n                  | %   |
| Positivo       | 1                   | 2   | 10                       | 18  | 9                  | 16  |
| Negativo       | 55                  | 98  | 46                       | 82  | 47                 | 84  |
| TOTAL          | 56                  | 100 | 56                       | 100 | 56                 | 100 |

Tecido não-neoplásico x carcinoma *in situ*,  $p = 0,01$  (Teste de McNemar), *odds* 11,96 - IC95% (1,48 - 258,91) ;

Carcinoma *in situ* x invasivo,  $p = 1,00$  (Teste de McNemar), *odds* 0,88 - IC95% (0,29 - 2,62)

A expressão da proteína bcl-2 foi significativamente menor nos carcinomas *in situ* subtipo comedocarcinoma ( $p=0,02$ ), com *odds ratio* de 0,20. Não houve diferença estatisticamente significativa da expressão da proteína c-erbB-2 nos carcinomas *in situ* subtipo comedocarcinoma e não-comedocarcinoma ( $p=0,07$ ). A expressão da proteína p53 também não mostrou diferença

estatisticamente significativa entre o comedocarcinoma e o não-comedocarcinoma (Tabela 4).

**TABELA 4**  
**Expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 de acordo com o subtipo histológico do carcinoma *in situ* da mama**

| Proteína        | Comedo |    | Não-comedo |    | <i>p</i> valor <sup>(a)</sup> | <i>Odds ratio</i> | IC 95%       |
|-----------------|--------|----|------------|----|-------------------------------|-------------------|--------------|
|                 | n      | %  | n          | %  |                               |                   |              |
| <b>Bcl-2</b>    |        |    |            |    | 0,02                          | 0,20              | 0,04 – 0,85  |
| Positivo        | 11     | 55 | 31         | 86 |                               |                   |              |
| Negativo        | 9      | 45 | 5          | 14 |                               |                   |              |
| <b>c-erbB-2</b> |        |    |            |    | 0,07                          | 4,05              | 0,89 – 24,81 |
| Positivo        | 17     | 85 | 21         | 58 |                               |                   |              |
| Negativo        | 3      | 15 | 15         | 42 |                               |                   |              |
| <b>p53</b>      |        |    |            |    | 0,14                          | 3,43              | 0,67 – 18,83 |
| Positivo        | 6      | 30 | 4          | 6  |                               |                   |              |
| Negativo        | 14     | 70 | 32         | 94 |                               |                   |              |

(a) teste exato de Fisher

Obs.: IC 95%= Intervalo de Confiança a 95%

A expressão da proteína bcl-2 no carcinoma *in situ* foi significativamente menor no grau nuclear 3 do carcinoma *in situ*, em relação aos graus nucleares 1 e 2 analisados conjuntamente ( $p=0,04$ ), com *odds ratio* de 0,24. A expressão da proteína c-erbB-2 foi significativamente maior no grau nuclear 3 do

carcinoma *in situ*, em relação aos graus nucleares 1 e 2 analisados conjuntamente ( $p<0,01$ ), com *odds ratio* de 7,86. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína p53 no grau nuclear 3 e nos graus nucleares 1 e 2 do carcinoma *in situ* ( $p=0,07$ ) (Tabela 5).

**TABELA 5**  
**Expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 de acordo com o grau nuclear do carcinoma *in situ* da mama**

| Proteína        | GN1 <sup>(a)</sup> | GN 2 <sup>(a)</sup> | GN 1 e 2 <sup>(b)</sup> | GN 3 <sup>(a)</sup> |    | <i>p</i> valor <sup>(a)</sup> | <i>Odds ratio</i> | IC 95%       |
|-----------------|--------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|----|-------------------------------|-------------------|--------------|
|                 | n                  | n                   | %                       | n                   | %  |                               |                   |              |
| <b>bcl-2</b>    |                    |                     |                         |                     |    | 0,04                          | 0,24              | 0,06 – 0,90  |
| Positivo        | 3                  | 22                  | 86                      | 15                  | 60 |                               |                   |              |
| Negativo        | 2                  | 2                   | 14                      | 10                  | 40 |                               |                   |              |
| <b>c-erbB-2</b> |                    |                     |                         |                     |    | <0,01                         | 7,86              | 1,92 – 32,15 |
| Positivo        | 1                  | 13                  | 48                      | 22                  | 88 |                               |                   |              |
| Negativo        | 4                  | 11                  | 52                      | 3                   | 12 |                               |                   |              |
| <b>p53</b>      |                    |                     |                         |                     |    | 0,07                          | 5,25              | 0,98 – 28,2  |
| Positivo        | 0                  | 2                   | 7                       | 7                   | 28 |                               |                   |              |
| Negativo        | 5                  | 22                  | 93                      | 18                  | 72 |                               |                   |              |

Foram excluídos dois casos em que o grau nuclear não foi determinado

Foram agrupados os casos de graus nucleares 1 e 2 para a análise estatística (o agrupamento foi possível por se tratarem de variáveis categóricas e ordenadas)

(c) teste exato de Fisher

Obs.: GN = grau nuclear; IC 95%= Intervalo de confiança a 95%

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da proteína bcl-2 entre o grau histológico III do carcinoma invasivo, em relação aos

graus histológicos I e II analisados conjuntamente ( $p=0,32$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da proteína c-erbB-2 entre o grau histológico III do carcinoma invasivo, em relação aos graus histológicos I e II analisados conjuntamente ( $p=0,75$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da proteína p53 entre o grau histológico III do carcinoma invasivo, em relação aos graus histológicos I e II analisados conjuntamente ( $p=0,70$ ) (Tabela 6).

**TABELA 6**  
Expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 de acordo com o grau histológico (GH) do carcinoma invasivo da mama

| Proteína        | GH I <sup>(a)</sup> |    | GH I e II <sup>(b)</sup> | GH III <sup>(a)</sup> |    | <i>p</i> valor <sup>(a)</sup> | <i>Odds ratio</i> | IC 95%      |
|-----------------|---------------------|----|--------------------------|-----------------------|----|-------------------------------|-------------------|-------------|
|                 | n                   | n  |                          | n                     | %  |                               |                   |             |
| <b>bcl-2</b>    |                     |    |                          |                       |    | 0,32                          | 0,42              | 0,09 – 1,78 |
| Positivo        | 2                   | 10 | 80                       | 20                    | 63 |                               |                   |             |
| Negativo        | 0                   | 3  | 20                       | 12                    | 37 |                               |                   |             |
| <b>c-erbB-2</b> |                     |    |                          |                       |    | 0,75                          | 1,46              | 0,42 – 5,05 |
| Positivo        | 0                   | 8  | 53                       | 20                    | 63 |                               |                   |             |
| Negativo        | 2                   | 5  | 47                       | 12                    | 37 |                               |                   |             |
| <b>p53</b>      |                     |    |                          |                       |    | 0,70                          | 0,74              | 0,15 – 3,61 |
| Positivo        | 0                   | 3  | 20                       | 5                     | 16 |                               |                   |             |
| Negativo        | 2                   | 10 | 80                       | 27                    | 84 |                               |                   |             |

Foram excluídos nove casos em que o grau nuclear não foi determinado

Foram agrupados os casos de graus histológicos I e II para a análise estatística (o agrupamento foi possível por se tratarem de variáveis categóricas e ordenadas)

(c) teste exato de Fisher

Obs.: GH = grau histológico; IC 95%= Intervalo de confiança a 95%

A expressão da proteína bcl-2 no carcinoma invasivo foi significativamente menor no grau nuclear 3 em relação aos graus nucleares 1 e 2 analisados conjuntamente, porém com significância limitrofe ( $p=0,05$ ) e *odds ratio* de 0,24. A expressão da proteína c-erbB-2 não foi significativamente diferente no grau nuclear 3 em relação aos graus nucleares 1 e 2 analisados conjuntamente ( $p=0,06$ ). A expressão da proteína p53 foi significativamente maior no grau nuclear 3 em relação aos graus nucleares 1 e 2 analisados conjuntamente ( $p<0,01$ ), com *odds ratio* de 10,0 (Tabela 7).

**TABELA 7**  
**Expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 de acordo com o grau nuclear do carcinoma invasivo da mama**

| Proteína        | GN1 <sup>(a)</sup> | GN 2 <sup>(a)</sup> | GN 1 e 2 <sup>(b)</sup> | GN 3 <sup>(a)</sup> |    | <i>p</i> valor <sup>(a)</sup> | <i>Odds ratio</i> | IC 95%       |
|-----------------|--------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|----|-------------------------------|-------------------|--------------|
|                 | n                  | n                   | %                       | n                   | %  |                               |                   |              |
| <b>bcl-2</b>    |                    |                     |                         |                     |    | 0,05                          | 0,24              | 0,06 – 0,91  |
| Positivo        | 2                  | 23                  | 78                      | 7                   | 47 |                               |                   |              |
| Negativo        | 0                  | 7                   | 22                      | 8                   | 53 |                               |                   |              |
| <b>c-erbB-2</b> |                    |                     |                         |                     |    | 0,06                          | 4,0               | 0,94 – 16,92 |
| Positivo        | 0                  | 16                  | 50                      | 12                  | 80 |                               |                   |              |
| Negativo        | 2                  | 14                  | 50                      | 3                   | 20 |                               |                   |              |
| <b>p53</b>      |                    |                     |                         |                     |    | < 0,01                        | 10,0              | 1,71 – 58,43 |
| Positivo        | 0                  | 2                   | 6                       | 6                   | 40 |                               |                   |              |
| Negativo        | 2                  | 28                  | 94                      | 9                   | 60 |                               |                   |              |

Foram excluídos nove casos em que o grau nuclear não foi determinado

Foram agrupados os casos de graus nucleares 1 e 2 para a análise estatística (o agrupamento foi possível por se tratarem de variáveis categóricas e ordenadas)

(c) teste exato de Fisher

Obs.: IC 95%= Intervalo de Confiança a 95%

A maioria dos casos apresentou expressão positiva para bcl-2 nos três componentes. Dezenove casos apresentaram expressão positiva de bcl-2 no tecido não-neoplásico e negativa no carcinoma invasivo; destes casos, 13 foram negativos também para o carcinoma ductal *in situ* (Quadro 1).

| Tec. não-neoplásico | Carcinoma <i>in situ</i> | Carcinoma invasivo | Frequência | %  |
|---------------------|--------------------------|--------------------|------------|----|
| Positivo            | Positivo                 | Positivo           | 36         | 64 |
| Positivo            | Negativo                 | Negativo           | 13         | 23 |
| Positivo            | Positivo                 | Negativo           | 6          | 11 |
| Negativo            | Negativo                 | Negativo           | 1          | 2  |

 Positivo
  Negativo

**Quadro 1.** Variação da expressão da proteína bcl-2 entre o tecido não-neoplásico, o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasivo da mama.

Em todos os casos analisados não se encontrou positividade da expressão da proteína c-erbB-2 no tecido não-neoplásico. Na maioria dos casos, houve expressão positiva de c-erbB-2 no carcinoma ductal *in situ* e no carcinoma invasivo. O segundo padrão mais freqüente foi ser negativa a expressão de c-erbB-2 nos três componentes (Quadro 2) .

| Tec. não-neoplásico | Carcinoma <i>in situ</i> | Carcinoma invasivo | Frequência | %  |
|---------------------|--------------------------|--------------------|------------|----|
|                     |                          |                    | 34         | 61 |
|                     |                          |                    | 18         | 32 |
|                     |                          |                    | 4          | 7  |

 Positivo
  Negativo

**Quadro 2.** Variação da expressão da proteína c-erbB-2 entre o tecido não-neoplásico, o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasivo da mama.

A maioria dos casos não apresentou expressão da proteína p53 no tecido não-neoplásico, no carcinoma ductal *in situ* e no carcinoma invasivo. O segundo padrão mais freqüente foi a expressão negativa da proteína p53 no tecido não-neoplásico e positiva para o carcinoma ductal *in situ* e carcinoma invasivo (Quadro 3).

| Tec. não-neoplásico | Carcinoma <i>in situ</i> | Carcinoma invasivo | Frequência | %  |
|---------------------|--------------------------|--------------------|------------|----|
|                     |                          |                    | 44         | 78 |
|                     |                          |                    | 8          | 14 |
|                     |                          |                    | 2          | 4  |
|                     |                          |                    | 1          | 2  |
|                     |                          |                    | 1          | 2  |

 Positivo
  Negativo

**Quadro 3.** Variação da expressão da proteína p53 entre o tecido não-neoplásico, o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasivo da mama.

## 5. Discussão

---

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a expressão da proteína bcl-2 é mais freqüente no tecido não-neoplásico do que no carcinoma *in situ*, que por sua vez é mais freqüente que no carcinoma invasivo da mama, ou seja, a expressão desta proteína diminui conforme aumenta a gravidade clínica da lesão histológica. A expressão das proteínas c-erbB-2 e p53 é praticamente ausente no tecido não neoplásico e está presente no carcinomas ductal *in situ* e invasivo, ou seja, nas lesões histológicas clinicamente mais graves.

Ao analisar a expressão da proteína bcl-2 nas células epiteliais normais ou nas hiperplasias típicas ou atípicas da mama, através da imuno-histoquímica, vários estudos encontraram expressão elevada, que variou de 96% a 100% dos casos (SIZIOPIKOU et al., 1996; MUSTONEN et al., 1997; ZHANG et al., 1997; VIACAVA et al., 1999). Este estudo obteve resultados semelhantes, com 98% dos casos com expressão positiva de bcl-2 no tecido não-neoplásico.

Vários estudos observaram também menor expressão da proteína bcl-2 em tecido não-neoplásico em relação ao carcinoma *in situ* e deste em relação ao carcinoma invasivo (MUSTONEN et al., 1997; ZHANG et al., 1997; MEGHA et al., 2000; MOMMERS et al., 2001).

A ausência da expressão da proteína p53 em tecido não-neoplásico da mama foi observada em diversos estudos (UMEKITA et al., 1994; SIZIOPIKOU et al., 1996; VIACAVA et al., 1999).

Na tentativa para melhor compreender a relação entre a proteína p53 e o controle da expressão do Bax e Bcl-2 *in vivo*, KRAJEWSKI et al. (1997) estudaram 149 tumores de mama, dos quais 135 eram imunopositivos para proteína p53. Eles encontraram uma associação inversamente significativa entre as expressões de bcl-2 e p53 e entre bcl-2 e bax, porém não encontraram associação entre as expressões de bax e p53.

O mecanismo através do qual o gene p53 selvagem induziria a apoptose seria pelo aumento da expressão do gene Bax, que atuaria diminuindo a expressão do gene Bcl-2 (KRAJEWSKI et al., 1997). A proteína p53 identificada na imuno-histoquímica está associada à diminuição da expressão da proteína bcl-2, ou seja, em condições normais a apoptose não estaria inibida. Porém, para que haja multiplicação da célula neoplásica e desenvolvimento do tumor, o ciclo celular precisaria ficar liberado e a apoptose inibida, o que ocorreria por algum mecanismo ainda não esclarecido, provavelmente envolvendo outros genes.

Neste estudo não foi possível demonstrar associação inversa das expressões de p53 e bcl-2 nos carcinomas ductal *in situ* e invasivo, visto que a positividade da expressão da proteína p53 nestes dois componentes foi muito baixa, insuficiente quantitativamente para viabilizar análises estatísticas conclusivas.

Outros estudos também não encontraram expressão da proteína c-erbB-2 no tecido não-neoplásico e parece ser um resultado consensual (DE POTTER et al., 1989; ALLRED et al., 1998). Nos carcinomas ductais, a expressão desta proteína foi cerca de duas vezes mais encontrada nas lesões *in situ* (43%) que nas lesões invasivas (22%) (RÉVILLION et al., 1998).

Dois estudos identificados avaliaram a associação da expressão de proteínas com lesões histológicas na mesma mama, porém só o fizeram em dois componentes morfológicos. MOMMERS et al. (1998), avaliaram 130 casos de hiperplasia ductal pela imuno-histoquímica, sendo que apenas 39 casos tinham um componente invasivo adjacente à lesão hiperplásica. Ao analisar a expressão de bcl-2, p53, c-erbB-2, ciclina D1, Ki-67, p21 e p27, não encontraram diferença significativa na expressão destas proteínas entre as áreas de hiperplasia ductal sem e com área invasiva adjacente. Eles aventaram a hipótese de que se a hiperplasia pertence a um espectro carcinogênico, ela precisaria passar por um estágio intermediário para evoluir para um carcinoma invasivo e provavelmente esta lesão intermediária seja o carcinoma *in situ*.

O outro estudo incluiu 61 casos de carcinoma ductal *in situ*, onde 22 casos (36%) estavam associados com carcinoma invasivo. Naquele estudo também não foi observada diferença significativa nas expressões das proteínas bcl-2, p53, c-erbB-2, Ki-67 e p27 entre as áreas *in situ* com e sem componente invasivo adjacente (MOMMERS et al., 2001).

No presente estudo, verificou-se que a maior redução da expressão da proteína bcl-2 ocorreu entre o tecido não-neoplásico e o carcinoma ductal *in situ* (*Odds ratio* de 0,05). De modo inversamente semelhante, as expressões das proteínas p53 e c-erbB-2 surgiram no carcinoma *in situ*, pois nenhum caso apresentou expressão da proteína c-erbB-2 e apenas um caso apresentou expressão da proteína p53 no tecido não-neoplásico.

Com relação ao subtipo histológico do carcinoma ductal *in situ*, este estudo mostrou que a expressão da proteína bcl-2 está diminuída no subtipo comedocarcinoma. Quanto ao grau nuclear 3 do carcinoma ductal *in situ*, a expressão da proteína bcl-2 está mais freqüentemente ausente e as expressões das proteínas c-erbB-2 e p53 estão mais freqüentemente presentes nas células classificadas neste grau nuclear. Nos carcinomas invasivos, o fenótipo de expressão destas proteínas observadas neste estudo em relação ao grau nuclear foi semelhante ao fenótipo do carcinoma ductal *in situ*. A proteína c-erbB-2 foi a que mais se associou com o grau nuclear do carcinoma *in situ* e a proteína p53 foi a que mais se associou com o grau nuclear no carcinoma invasivo.

Assim, o fenótipo imuno-histoquímico que foi observado do componente não-neoplásico para o carcinoma ductal *in situ* e deste para o carcinoma invasivo tem semelhança com o fenótipo que foi observado entre padrões morfológicos clinicamente menos agressivos para os clinicamente mais agressivos do carcinoma ductal *in situ* e do carcinoma invasivo.

Outros estudos correlacionaram a expressão da proteína bcl-2 com a morfologia da mama e verificaram que esta proteína se manifesta mais freqüentemente em lesões histológicas bem diferenciadas e moderadamente diferenciadas, tanto do carcinoma ductal *in situ* (SIZIOPIKOU et al., 1996; GANDHI et al., 1998; QUINN et al., 1998; VIACAVA et al., 1999) quanto do carcinoma invasivo (ZHANG et al., 1997; MOMMERS et al., 2001).

De modo contrário ao que ocorreu com a proteína bcl-2, em alguns estudos a expressão da proteína p53 foi mais freqüentemente encontrada nas lesões histológicas pouco diferenciadas, tanto no carcinoma ductal *in situ* (SIZIOPIKOU et al., 1996; QUINN et al., 1998; VIACAVA et al., 1999) quanto no carcinoma invasivo da mama (ZHANG et al., 1997; MOMMERS et al., 2001).

A associação da expressão da proteína c-erbB-2 com os padrões histológicos de maior agressividade clínica do carcinoma ductal *in situ* também foi observada por outros estudos (ALLRED et al., 1992; De POTTER et al., 1995; QUINN et al., 1998; RÉVILLION e al, 1998; LEAL et al., 1999).

O estudo de MOMMERS et al. (2001) não encontrou diferença significativa entre as expressões das proteínas bcl-2, p53, c-erbB-2, Ki-67 e p27

na hiperplasia ductal típica e no carcinoma ductal *in situ* bem diferenciado, porém encontrou diferença significativa na hiperplasia ductal típica e no carcinoma ductal *in situ* pouco diferenciado. Achou também uma significativa associação no padrão de expressão destas proteínas entre o carcinoma ductal *in situ* bem diferenciado e o invasivo bem diferenciado e nas expressões destas proteínas entre os carcinomas ductal *in situ* e o invasivo pouco diferenciado. Por fim, observou que a principal diferença nas expressões destas proteínas ocorrem na transição da hiperplasia ductal típica para o carcinoma ductal *in situ*, e uma vez que este padrão de expressão surja nesta transição, ele se mantém no carcinoma invasivo que tenha o mesmo grau de diferenciação.

O estudo acima está de acordo com GUPTA et al. (1997), que lançaram a hipótese de dois modelos de progressão do carcinoma ductal *in situ* para o invasivo da mama. No primeiro (Modelo A), a evolução seguiria o padrão de outras neoplasias epiteliais como a pele e o colo uterino: a partir de uma hiperplasia ductal típica evoluiria para uma hiperplasia ductal atípica e desta para o carcinoma ductal *in situ* bem diferenciado, depois para o moderadamente diferenciado e para o pouco diferenciado e somente depois deste é que evoluiria para o carcinoma invasivo. No outro modelo (Modelo B), as lesões hiperplásicas típicas ou atípicas evoluiriam para um dos tipos de lesão ductal *in situ*, ou seja, bem diferenciada, moderadamente diferenciada ou pouco diferenciada e destas lesões evoluiriam para o carcinoma invasivo correspondente, ou seja, bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado. Eles sugerem, baseados na classificação morfológica das

lesões *in situ* e invasivas e no seguimento das pacientes, que o Modelo B seria o mais provável na carcinogênese mamária.

Neste estudo, com casos pareados, obtiveram-se resultados semelhantes aos dos dois estudos acima citados, uma vez que a principal alteração na expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 ocorreu na transição do tecido não-neoplásico para o carcinoma ductal *in situ*.

Presumidamente, teria importância clínica identificar as lesões não-neoplásicas que teriam grande potencial para tornarem-se carcinoma *in situ* e os carcinomas *in situ* que teriam grande potencial para tornarem-se invasivos. Portanto, interessaria saber como a expressão das proteínas estudadas poderiam atuar como biomarcadores preditivos do potencial evolutivo das lesões do ducto mamário na trajetória da história natural do carcinoma da mama.

Neste sentido, merece destaque a variação da expressão destas proteínas nos três componentes da mesma mama, ou seja, na mesma mulher, já que não foi identificado nenhum estudo com resultado semelhante. Destaca-se que desta forma a “bagagem” genética seria semelhante e as variações encontradas na expressão das proteínas entre os componentes analisados seriam devido a modificações locais e pontuais e não à variação genética entre as mulheres.

Assim, em dois terços das mulheres estudadas, a expressão da proteína bcl-2 estava presente nos três componentes e em um quarto das mulheres a

expressão estava presente apenas no componente não-neoplásico. Em relação à expressão da proteína p53, cerca de três quartos das mulheres não apresentaram expressão nos três componentes. Portanto, apesar da variação detectada da expressão das proteínas bcl-2 e p53 entre os componentes não-neoplásicos e carcinoma ductal *in situ*, na maioria das mulheres a expressão foi positiva nos três componentes para a proteína bcl-2 ou negativa para a proteína p53. Esta característica pode restringir a possível utilização clínica da expressão destas duas proteínas para diferenciar o potencial de transformação carcinogênica das lesões não-neoplásicas.

Este resultado foi diferente em relação à expressão da proteína c-erbB-2, pois quase dois terços das mulheres não apresentaram expressão no componente não-neoplásico e apresentaram nos componentes de carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Supostamente, a expressão da proteína c-erbB-2 poderia ser explorada como biomarcador preditivo da evolução das lesões não-neoplásicas.

Em resumo, os resultados deste estudo permitem inferir que os genes Bcl-2, C-erbB-2 e p53, estudados através da expressão de suas respectivas proteínas, estão envolvidos nas fases mais iniciais da carcinogênese mamária (indução), ou seja, na transformação do ducto não-neoplásico em carcinoma ductal *in situ*. Uma vez instalada a lesão intra-epitelial, a progressão para a forma invasiva dependeria de outros mecanismos que envolveriam outros genes. Como consequência, estas proteínas não seriam bons biomarcadores preditivos da progressão do carcinoma ductal *in situ*.

Do ponto de vista clínico, também seria muito importante verificar se a expressão destas ou de outras proteínas poderiam identificar os casos de carcinoma ductal *in situ* da mama com maior potencial evolutivo para a forma invasiva, porém os resultados obtidos neste estudo não permitem fazer qualquer inferência neste sentido, visto que todos os casos estudados tiveram o mesmo desfecho, ou seja, evoluíram até a forma invasiva. Por este motivo, estudos adicionais deverão seguir no sentido de comparar o fenótipo imuno-histoquímico do componente *in situ* dos casos que já tiverem o carcinoma invasivo associado, com o fenótipo do componente *in situ* quando não tiver o carcinoma invasivo associado.

## 6. Conclusões

---

1. A expressão da proteína bcl-2 no tecido não-neoplásico foi de 98%, no carcinoma ductal *in situ* de 75% e no carcinoma invasivo foi de 64%.
2. Não houve expressão da proteína c-erbB-2 no tecido não-neoplásico. A expressão da proteína c-erbB-2 no carcinoma ductal *in situ* foi de 68% e no carcinoma invasivo foi de 61%.
3. A expressão da proteína p53 no tecido não-neoplásico foi de 2%, no carcinoma ductal *in situ* 18% e no carcinoma invasivo foi de 16%.
4. A expressão da proteína bcl-2 associou-se com o subtipo histológico não-comedocarcinoma e com os graus nucleares um e dois do carcinoma ductal *in situ*. A expressão da proteína c-erbB-2 associou-se ao grau nuclear. Não houve associação da expressão da proteína p53 com o subtipo histológico ou com o grau nuclear do carcinoma ductal *in situ*.
5. A expressão da proteína bcl-2 associou-se aos graus nucleares 1 e 2 do carcinoma invasivo. A expressão da proteína p53 associou-se ao grau

nuclear 3. Não houve variação da expressão das proteínas bcl-2, c-erbB-2 e p53 com o grau histológico do carcinoma invasivo.

6. A maioria dos casos apresentou expressão da proteína bcl-2 nos componentes não-neoplásico, no carcinoma ductal *in situ* e no carcinoma invasivo. A maioria das mulheres não apresentou expressão da proteína p53 nos componentes não-neoplásico, no carcinoma ductal *in situ* e no carcinoma invasivo. O padrão mais encontrado com a proteína c-erbB-2 foi ser negativa no tecido não-neoplásico e positiva nos carcinomas *in situ* e invasivo. O padrão mais encontrado com a proteína c-erbB-2 foi a ausência de expressão no tecido não-neoplásico e positiva nos carcinomas *in situ* e invasivo. A análise do conjunto dos padrões identifica que a maior variação da expressão das três proteínas é entre o componente não-neoplásico e o carcinoma ductal *in situ*.

## 7. Referências Bibliográficas

---

- ALLRED, D.C.; CLARK, G.M.; MOLINA, R.; TANDON, A.K.; SCHNITT, S.J.; GILCHRIST, K.W.; OSBORNE, C.K.; TORMEY, D.C.; McGUIRE, W. - Overexpression of Her-2/*neu* and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum. Pathol.*, **23**:974-9, 1992.
- ALLRED, D.C.; JENNET, H.M.; BERARDO, M.; CLARK, G.M. - Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol.*, **11**:155-68, 1998.
- ALVARENGA, M. - Anatomia patológica e imunohistoquímica: importância do patologista na mastologia atual. In: DIAS, E.Z.; CALEFFI, M.; SILVA, H.S.; FIGUEIRA FILHO, A.S.S. - **Mastologia atual**. Rio de Janeiro, Editora Revinter, 1994. p.127-53.
- ALTMAN, D.G. – **Practical statistics for medical research**. London. Chapman & Hall, 1991. 611p.
- BLOOM, H.J.G. & RICHARDSON, W.W. - Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer*, **11**:359-77, 1957.

BRASIL. Ministério da Saúde/Conselho Nacional de Saúde - Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. **Bioética**, 4(supl.2):15-25, 1996.

CANCERNET – Breast. U.S. racial/ethnic cancer patterns. 2001. [Acesso - 03/11/2001]. Disponível na Internet: <http://cancernet.nci.nih.gov>.

CARY, N.C. – **Statistical analysis system (SAS), version 6**. Chicago, SAS Institute Inc., 1989.

CLURMAN, B.E. & ROBERTS, J.M. – Cell cycle control: an overview. In: VOLGENSTEIN, B. & KINZLER, K.W. – **The genetic basis of human cancer**. New York. McGraw-Hill, 1998. p.175-91.

DEAN, A.G. ; DEAN, J.A. ; COULOMBIER, D. ; BURTON, A.H. ; DICKER, R.C. ; SULLIVAN, K. ; FAGAN, R.F. ; ARNER, T.G. **Epi Info, version 6: a word processing database and statistics program for epidemiology on microcomputers**. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention, 1994.

DECLARAÇÃO DE HELSINQUE III – Sobre os Princípios Éticos para as Pesquisas em Seres Humanos. 2000. [Acesso - 20/12/2001]. Disponível na Internet: <<http://www.ibemol.com.br>>.

DE POTTER, C.R. - The *neu*-oncogene: more than a prognostic indicator?. **Hum. Pathol.**, 25:1264-8, 1994.

DE POTTER, C.R. & SCHELFHOUT, A. - The *neu*-protein and breast cancer. **Virchows Arch.**, 426:107-15, 1995.

- DE POTTER, C.R.; SCHELFHOUT, A.; VERBEECK, P.; LAKHANI, S.R.;  
BRÜNKEN, R.; SCHROETER, C.A.; VAN DEN TWEEL, J.G.; SCHAUER,  
A.J.; SLOANE, J.P. - *neu* overexpression correlates with extent of disease  
in large cell ductal carcinoma in situ of the breast. **Hum. Pathol.**, **26**:601-6,  
1995.
- DE POTTER, C.R.; VAN DAELE, S.; VAN DE VIJVER, M.J.; PAUWELS, C.;  
MAERTENS, G.; DE BOEVER, J.; VANDEKERCKHOVE, D.; ROELS, H. -  
The expression of *neu* oncogene product in breast lesions and in normal  
fetal and adult human tissues. **Histopathology**, **15**:351-362, 1989.
- DUPONT, W.D. & PAGE, D.L. – Risk factors for breast cancer in women with  
proliferative breast disease. **N. Eng. J. Med.**, **312**:146-51, 1985.
- EVANS, A.J.; PINDER, S.; ELLIS, I.O.; SIBBERING, M.; ELSTON, C.W.;  
POLLER, D.N.; WILSON, R. – Screening-detected and symptomatic ductal  
carcinoma in situ: mammographic features with pathologic correlation.  
**Radiology**, **191**:237-40, 1994.
- FISHER, E.R.; GREGORIO, R.M.; FISHER, B. – The pathology of invasive breast  
cancer: a syllabus derived from findings of National Surgical Adjuvant  
Breast Project. **Cancer**, **36**:1, 1975.
- GANDHI, A.; HOLLAND, P.A.; KNOX, W.F.; POTTEN, C.S.; BUNDRED, N.J. -  
Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma  
in situ of the breast. **Br. J. Cancer**, **78**:788-94, 1998.
- GUPTA, S.K.; DOUGLAS-JONES, A.G.; FENN, N.; MORGAN, J.M.; MANSEL,  
R.E. - The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at  
the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). **Cancer**, **80**:1740-1745,  
1997.

- HALDAR, S.; NEGRINI, M.; MONNE, M.; SABBIONI, S.; CROCE, C.M. – Down-regulation of *bcl-2* by *p53* in breast cancer cells. **Cancer Res.**, **54**:2095-7, 1994.
- HARRIS, J.R.; MORROW, M.; BONADONNA, G. – Cancer of the breast. In: DE VITA, V.T.J.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. – **Cancer: principles & practice of oncology**. Filadelfia, 1993. p.1254-332.
- HOCKENBERY, D.; NUNEZ, G.; MILLMAN, C.L.; SCHREIBER, R.D.; KORSMEYER, S.J. - Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, **348**:334-6, 1990.
- HOCKENBERY, D.; OLTRAI, Z.N.; YIN, X-M; MILLMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. – bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, **75**:241-51, 1993.
- HOLLAND, R.; PETERSE, J.L.; MILLIS R.R.; EUSEBI V.; FAVERLY, D.; VAN DE VIJVER – Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. **Sem. Diagn. Pathol.**, **11**:167-80, 1994.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. 2001. [Acesso - 27/05/2001. Disponível na Internet: <<http://www.inca.org.br>>.
- ISOBE, M.; EMANUEL, B.S.; GIVOL, D.; OREN, M.; CROCE, C.M. - Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature**, **320**:84-5, 1986.
- KRAJEWSKI, S.; THOR, A.D.; EDGERTON, S.M.; MOORE II, D.H.; KRAJEWSKA, M.; REED, J. C. - Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. **Clin. Cancer Res.**, **3**:199-208, 1997.

LAGIOS, M.D. - Duct carcinoma in situ. Pathology and treatment. **Surg. Clin. North. Am.**, **70**:853-71, 1990.

LAKHANI, S.R. - The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. **J. Pathol.**, **187**:271-8, 1999.

LANE, D.P. & BENCHIMOL, S. - p53: oncogene or antioncogene? **Genes Dev.**, **4**:1-8, 1990.

LEAL, C.B.; SCHMITT, F.C.; BENTO, M.J.; MAIA, N.C.; LOPES, C.S. - Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. **Cancer**, **75**(8):2123-2131, 1999.

MARTIN, G.S. - Normal cells and cancer cells. In: BISHOP, J.M. & WEINBERG, R.A. – **Scientific American Molecular Oncology**. 2 ed. New York, Scientific American, Inc., 1996. p.13-40.

MATSUKUMA, A.; ENJOJI, M.; TOYOSHIMA, S. - Ductal carcinoma of the breast. An analysis of proportions of intraductal and invasive components. **Path. Res. Pract.**, **187**:62-7, 1991.

MEGHA T.; FERRARI, F.; ARCURI, F.; LALINGA, A.V.; LAZZI, S.; CARDONE, C.; CEVENINI, G.; LEONCINI, L.; TOSI, P. – Cellular kinetics and expression of bcl-2 and p53 in ductal carcinoma of the breast. **Oncol. Reports**, **7**:473-8, 2000.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; MARIA, S.S.- Morte celular. In: CARVALHO, H.F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. - **A célula**. Barueri. Manole, 2001. p.275-81.

- MOLL, U.M.; OSTERMEYER, A.G.; AHOMADEGBE, J.C.; MATHIEU, M.C.; RIOU, G. - p53 mediated tumor cell response to chemotherapeutic DNA damage: a preliminary study in matched pairs of breast cancer biopsies. **Hum. Pathol.**, **26**:1293-301, 1995.
- MOMMERS, E.C.M.; VAN DIEST, P.J.; LEONHART, A.M.; MEIJER, C.J.L.M.; BAAK, J.P.A. – Expression of proliferation and apoptosis-related proteins in usual ductal hyperplasia of the breast. **Hum. Pathol.**, **29**:1539-45, 1998.
- MOMMERS, E.C.M., LEONHART, A.M., FALIX, F.; MICHALIDES, R.; MEIJER, C.J.L.M.; BAAK, J.P.A.; VAN DIEST, P.J. – Similarity in expression of cell cycle proteins between *in situ* and invasive ductal breast lesions of same differentiation grade. **J. Pathol.**, **194**:327-33, 2001.
- MUSTONEN, M.; RAUNIO, H.; PÄÄKKÖ, P.; SOINI, Y. – The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. **Histopathology**, **31**:347-54, 1997.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE – Lifetime probability of breast cancer in American women. 2001. [Acesso - 03/11/2001. Disponível na Internet: <<http://cis.nci.nih.gov>>].
- PAGE, D.L.; DUPONT, W.D.; ROGERS, L.W.; LANDENBERGER, M. – Intraductal carcinoma of the breast: follow-up after biopsy only. **Cancer**, **49**:751-8, 1982.
- PEZZELLA, F. & GATTER, K. – What is the value of bcl-2 protein detection for histopathologists?. **Histopathology**, **26**:89-93, 1995.
- PILLAI, M.R.; KESARI, A.L.; CHELLAN, V.G.; MADHAVAN, J.; NAIR, P.; NAIR, M.K. – Spontaneous programmed cell death in infiltrating duct carcinoma: association with p53, bcl-2, hormone receptors and tumor proliferation. **J. Pathol. Res. Pract.**, **194**:549-57, 1998.

PONTÉN, J. – Natural history of breast cancer. **Acta Oncol.**, **29**:325-329, 1990.

QUERZOLI, P.; ALBONICO, G.; FERRETTI, S.; RINALDI, R.; BECCATI, D.;  
CORCIONE, S.; INDELLI, M.; NENCI, I. – Modulation of biomarkers in  
minimal breast carcinoma: a model for human breast carcinoma  
progression. **Cancer**, **83**:89-97, 1998.

QUINN, C.M.; OSTROWSKI, J.L.; HARKINS, L.; RICE, A.J.; LONEY, D.P. -  
Loss of bcl-2 expression in ductal carcinoma in situ of the breast relates to  
poor histological differentiation and to expression of p53 and c-erbB-2  
proteins. **Histopathology**, **33**:531-536, 1998.

REHEN, S.K.- Ciclo celular. In: CARVALHO, H.F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. –  
**A célula**. Barueri. Manole, 2001. p.235-247.

RÉVILLION, F.; BONNETERRE, J.; PEYRAT, J.P. – *ERBB2* oncogene in  
human breast cancer and its clinical significance. **Eur. J. Cancer**, **34**:791-  
808, 1998.

RUDIN, C.M. & THOMPSON, C.B. - Apoptosis and cancer. In: VOLGENSTEIN,  
B. & KINZLER, K.W. – **The genetic basis of human cancer**. New York.  
McGraw-Hill, 1998. p.193-204.

SHEN, K.L.; HARN, H.J.; HO, L.I.; YU, C.P.; CHIU, S.C.; LEE, W.H. – The  
extent of proliferative and apoptotic activity in intraductal and invasive  
ductal breast carcinomas detected by ki-67 labeling and terminal  
deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-11-dUTP nick end  
labeling. **Cancer**, **82**(12):2373-2381, 1998.

SHIMAMURA, A & FISHER, D.E. - p53 life and death. **Clin. Cancer Res.**,  
**2**:435-40, 1996.

- SIZIOPIKOU, K.P.; PRIOLEAU, J.E.; HARRIS, J.R.; SCHNITT, S.J. – *bcl-2* expression in the spectrum of preinvasive breast lesions. **Cancer**, **77**:499-506, 1996.
- TABÁR, L.; DUFFY, S.W.; VITAK, B.; CHEN, H.; PREVOST, T.C. – The natural history of breast carcinoma. What have we learned from screening? **Cancer**, **86**:449-62, 1999.
- THOR, A.D.; MOORE II, D.H.; EDGERTON, S.M.; KAWASAKI, E.S.; REIHAUS, E.; LYNCH, H.T.; MARCUS, J.N.; SCHWARTZ, L.; CHEN, L.C.; MAYALL, B.H.; SMITH, H.S. – Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. **J. Natl. Cancer Inst.**, **84**:845-55, 1992.
- U.I.C.C. - UNIÃO INTERNACIONAL DE COMBATE AO CÂNCER. – **Câncer de mama**. Rio de Janeiro, 1991. p.159-278.
- UMEKITA, Y.; TAKASAKI, T.; YOSHIDA, H. - Expression of p53 protein in benign epithelial hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, non-invasive and invasive mammary carcinoma: an immunohistochemical study. **Virchows Arch.**, **424**:491-94, 1994.
- VAN DIEST, P.J. – Ductal carcinoma *in situ* in breast carcinogenesis. **J. Pathol.**, **187**:383-4, 1999.
- VIACAVA, P.; NACCARATO, A.G.; BEVILACQUA, G. – Different proliferative patterns characterize different preinvasive breast lesions. **J. Pathol.**, **188**:245-51, 1999.

WANG, S.; SABOORIAN, M.H.; FRENKEL, E.; HYNAN, L.; GOKASLAN, S.T.;  
ASHFAQ, R. – Laboratory assessment of the status of Her-2/*neu* protein  
and oncogene in breast cancer specimens: comparison of  
immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization  
assays. *J. Clin. Pathol.*, **53**:374-81, 2000.

ZHANG, G.; KIMIJIMA, I., ABE, R.; KANNO, M.; KATAGATA, N.; HARA, K.;  
WATANABE, T.; TSUCHIYA, A. – Correlation between the expression of  
apoptosis-related bcl-2 and the carcinogenesis and progression of breast  
carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **3**:2329-35, 1997.

## **8. Bibliografia de Normatizações**

---

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

HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses.  
BIREME, São Paulo, 1991. 45p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade  
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98.

## 9. Anexos

### 9.1. ANEXO 1 - FICHA PARA COLETA DE DADOS

Nº:    HC:  BIÓPSIA:

IDADE:   anos

ESTADO MENOPAUSAL: PRÉ-MENOPAUSA ☐  
PÓS-MENOPAUSA ☐

| LOCAL DA ANÁLISE    | IMUNO-HISTOQUÍMICA |     |          |
|---------------------|--------------------|-----|----------|
|                     | bcl-2              | p53 | c-erbB-2 |
| MAMA NÃO-NEOPLÁSICA |                    |     |          |
| CDIS                |                    |     |          |
| CARCINOMA INVASIVO  |                    |     |          |

#### TECIDO MAMÁRIO NÃO-NEOPLÁSICO:

☐ NORMAL ☐ HIPERPL. DUCTAL TÍPICA ☐ HIPERPL. DUCTAL ATÍPICA  
☐ ADENOSE ESCLEROSANTE ☐ OUTRA LESÃO

COMENTÁRIOS:

#### CDIS :

☐ COMEDO ☐ NÃO-COMEDO - TIPO: ☐ CRIBIFORME ☐ SÓLIDO ☐ GRAU NUCLEAR: ☐ ☐ MICROPAPILÍFERO ☐ INTRACÍSTICO

COMENTÁRIOS:

#### CARCINOMA INVASIVO:

TIPO: ☐ DUCTAL ☐ LOBULAR ☐ COLÓIDE ☐ MEDULAR  
☐ TUBULAR ☐ OUTROS

GRAU HISTOLÓGICO: ☐ GRAU NUCLEAR: ☐

COMENTÁRIOS:

## 9.2. ANEXO 2 - LISTAGEM DOS PACIENTES ESTUDADOS

| Caso | Idade (anos) | Estado menopausal | Nº lâmina | Nº blocos | Mama não-neoplásica e bcl-2 | Carcinoma invasivo e bcl-2 | Mama não-neoplásica e p53 | Carcinoma invasivo e p53 | Mama não-neoplásica e c-erbB-2 | CDIS e c-erbB-2 | Carcinoma invasivo e c-erbB-2 | Morfologia Mama não-neoplásica | Subtipo CDIS | Não-comedo tipo          | cribriforme/micropapilífero/aderente | Grau Nuclear CDIS | Morfologia Ca invasivo | Grau Histológico Ca invasivo | Grau Nuclear Ca invasivo |
|------|--------------|-------------------|-----------|-----------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 1    | 49           | pré               | 347,906   | 1         | 3+                          | 3+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 2+                            | normal                         | não-comedo   | cribriforme              | 2                                    | 2                 | ductal                 | III                          | 2                        |
| 2    | 68           | pós               | 345,806   | 1         | 2+                          | 2+                         | 0                         | 1+                       | 0                              | 0               | 0                             | normal                         | não-comedo   | cribriforme              | 2                                    | 2                 | ductal                 | II                           | 2                        |
| 3    | 53           | pré               | 351,012   | 1         | 3+                          | 3+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 2+                            | normal                         | não-comedo   | sólido                   | 2                                    | 2                 | ductal                 | III                          | 2                        |
| 4    | 56           | pós               | 351,371   | 1         | 3+                          | 3+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 1+                            | hiperplasia ductal típica      | não-comedo   | cribriforme/sólido       | 2                                    | 2                 | ductal                 | III                          | 2                        |
| 5    | 47           | pré               | 360,116   | 1         | 2+                          | 2+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | normal                         | não-comedo   | aderente                 | 1                                    | 1                 | tubular                | I                            | 1                        |
| 6    | 55           | pós               | 350,017   | 1         | 2+                          | 0                          | 0                         | 1+                       | 0                              | 0               | 3+                            | normal                         | comedo       |                          | 3                                    | 3                 | ductal                 | III                          | 3                        |
| 7    | 78           | pós               | 357,915   | 1         | 2+                          | 2+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | normal                         | não-comedo   | micropapilífero/aderente | 1                                    | 1                 | tubular                | I                            | 1                        |
| 8    | 32           | pré               | 331,743   | 1         | 1+                          | 0                          | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 3+                            | normal                         | comedo       |                          | 3                                    | 3                 | ductal                 | III                          | 3                        |
| 9    | 67           | pós               | 342,486   | 1         | 2+                          | 1+                         | 2+                        | 0                        | 0                              | 0               | 2+                            | normal                         | comedo       |                          | 3                                    | 3                 | ductal                 |                              |                          |
| 10   | 64           | pós               | 325,843   | 1         | 3+                          | 0                          | 0                         | 2+                       | 0                              | 0               | 3+                            | normal                         | comedo       |                          | 3                                    | 3                 | ductal                 | III                          | 3                        |
| 11   | 61           | pós               | 324,711   | 1         | 2+                          | 0                          | 0                         | 3+                       | 0                              | 0               | 3+                            | normal                         | não-comedo   | cribriforme/sólido       | 3                                    | 3                 | ductal                 |                              |                          |
| 12   | 48           | pós               | 320,864   | 1         | 2+                          | 2+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 2+                            | normal                         | não-comedo   | cribriforme/sólido       | 2                                    | 2                 | ductal                 | III                          | 2                        |
| 13   | 74           | pós               | 279,878   | 1         | 3+                          | 3+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 1+                            | normal                         | não-comedo   | cribriforme              | 2                                    | 2                 | tubular                |                              |                          |
| 14   | 42           | pré               | 282,880   | 1         | 3+                          | 3+                         | 0                         | 0                        | 1+                             | 0               | 3+                            | normal                         | comedo       |                          | 3                                    | 3                 | ductal                 | III                          | 3                        |
| 15   | 45           | pré               | 286,320   | 1         | 2+                          | 2+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | normal                         | não-comedo   | sólido                   | 2                                    | 2                 | ductal                 | II                           | 2                        |
| 16   | 77           | pós               | 292,919   | 1         | 2+                          | 2+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | HDT/adenose                    | não-comedo   | cribriforme/sólido       | 2                                    | 2                 | ductal                 | III                          | 2                        |
| 17   | 37           | pré               | 297,443   | 1         | 2+                          | 1+                         | 0                         | 3+                       | 0                              | 0               | 2+                            | normal                         | não-comedo   | sólido                   |                                      |                   | ductal                 | III                          | 3                        |
| 18   | 55           | pós               | 314,244   | 1         | 1+                          | 0                          | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | normal                         | comedo       |                          | 3                                    | 3                 | ductal                 | III                          | 2                        |
| 19   | 84           | pós               | 10.499/96 | 1         | 1+                          | 2+                         | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | normal                         | não-comedo   | cribriforme              | 2                                    | 2                 | ductal                 | III                          | 2                        |
| 20   | 48           | pré               | 10.129/95 | 2         | 1+                          | 0                          | 0                         | 0                        | 0                              | 0               | 1+                            | normal                         | comedo       |                          | 3                                    | 3                 | papilífero             |                              |                          |

| Caso | Idade (anos) | Estado menopausal | Nº lâmina | Nº blocos | Mama não-neoplásica e bcl-2 | CDIS e bcl-2 | Carcinoma invasivo e bcl-2 | Mama não-neoplásica e p53 | CDIS e p53 | Carcinoma invasivo e p53 | Mama não-neoplásica e c-erbB-2 | CDIS e c-erbB-2 | Carcinoma invasivo e c-erbB-2 | Morfologia Mama não-neoplásica | Subtipo CDIS              | Não-comedo tipo | Morfoloogia Ca invasivo              | Grau Nuclear CDIS | Morfoloogia Ca invasivo | Grau Histológico Ca invasivo | Grau Nuclear Ca invasivo |
|------|--------------|-------------------|-----------|-----------|-----------------------------|--------------|----------------------------|---------------------------|------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 21   | 78           | pós               | 08.016/97 | 2         | 3+                          | 3+           | 3+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | 0                              | normal                    | não-comedo      | sólido/cribriforme                   | 2                 | colóide                 | III                          | 2                        |
| 22   | 60           | pós               | 05.129/98 | 1         | 3+                          | 3+           | 3+                         | 0                         | 1+         | 1+                       | 0                              | 2+              | 1+                            | 0                              | normal                    | não-comedo      | sólido                               | 2                 | papilífero              | II                           | 2                        |
| 23   | 46           | pré               | 03.838/94 | 1         | 2+                          | 2+           | 0                          | 0                         | 2+         | 2+                       | 0                              | 3+              | 2+                            | 0                              | normal                    | comedo          |                                      | 3                 | ductal                  | II                           | 3                        |
| 24   | 44           | pré               | 09.454/97 | 1         | 3+                          | 3+           | 3+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 3+              | 3+                            | 0                              | hiperplasia ductal típica | comedo          |                                      | 3                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 25   | 43           | pré               | 08.171/94 | 2         | 2+                          | 2+           | 2+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | 0                              | hiperplasia ductal típica | não-comedo      | sólido                               | 3                 | ductal                  | III                          | 3                        |
| 26   | 73           | pós               | 02.814/94 | 1         | 2+                          | 2+           | 1+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 1+              | 1+                            | 0                              | normal                    | não-comedo      | sólido                               | 3                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 27   | 86           | pós               | 01.465/95 | 1         | 3+                          | 3+           | 3+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 1+              | 1+                            | 0                              | normal                    | não-comedo      | sólido/cribriforme                   | 3                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 28   | 58           | pós               | 06.367/97 | 2         | 1+                          | 0            | 0                          | 0                         | 1+         | 0                        | 0                              | 3+              | 3+                            | 0                              | normal                    | comedo          |                                      | 3                 | colóide                 |                              |                          |
| 29   | 54           | pré               | 08.836/94 | 1         | 2+                          | 2+           | 0                          | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 1+              | 0                             | 0                              | HDT                       | não-comedo      | cribriforme                          | 3                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 30   |              |                   | 05.679/96 | 1         | 2+                          | 2+           | 2+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 2+              | 2+                            | 0                              | normal                    | não-comedo      | sólido                               | 3                 | ductal                  | III                          | 3                        |
| 31   | 94           | pós               | 03.840/94 | 1         | 2+                          | 2+           | 0                          | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | 0                              | hiperplasia ductal típica | não-comedo      | cribriforme                          | 2                 | ductal                  | II                           | 2                        |
| 32   | 55           | pós               | 01.523/94 | 2         | 1+                          | 0            | 0                          | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 2+              | 0                             | 0                              | normal                    | comedo          |                                      | 3                 | ductal                  | III                          | 3                        |
| 33   | 66           | pós               | 06.452/94 | 1         | 2+                          | 2+           | 1+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 2+              | 1+                            | 0                              | normal                    | não-comedo      | cribriforme                          | 2                 | ductal                  | II                           | 2                        |
| 34   | 65           | pós               | 11.720/94 | 1         | 3+                          | 3+           | 2+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 2+              | 1+                            | 0                              | normal/elastose           | comedo          |                                      | 3                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 35   | 44           | pós               | 07.028/94 | 1         | 2+                          | 2+           | 2+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 1+              | 1+                            | 0                              | normal                    | não-comedo      | cribriforme/apócrino                 | 2                 | ductal                  | II                           | 2                        |
| 36   | 72           | pós               | 07.618/94 | 1         | 2+                          | 0            | 0                          | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | 0                              | normal                    | não-comedo      | cribriforme                          | 2                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 37   | 59           | pós               | 12.020/94 | 1         | 2+                          | 2+           | 2+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 1+              | 0                             | 0                              | adenose esclerosante      | comedo          |                                      | 3                 | ductal                  | III                          | 3                        |
| 38   | 49           | pré               | 01.349/95 | 1         | 2+                          | 2+           | 0                          | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | 0                              | normal                    | comedo          |                                      | 3                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 39   | 73           | pós               | 08.412/95 | 1         | 3+                          | 3+           | 3+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 2+              | 2+                            | 0                              | normal                    | comedo          |                                      | 3                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 40   |              |                   | 09.678/94 | 1         | 3+                          | 3+           | 3+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | 0                              | normal                    | não-comedo      | cribriforme                          | 2                 | ductal                  | III                          | 2                        |
| 41   | 66           | pós               | 07.376/98 | 1         | 3+                          | 3+           | 3+                         | 0                         | 0          | 0                        | 0                              | 0               | 0                             | 0                              | hiperplasia ductal típica | não-comedo      | cribriforme/micropapilífero/aderente | 1                 | tubular                 |                              |                          |

