

**CARCINOMA MUCINOSO DA MAMA: ESTUDO DOS
INDICADORES PROGNÓSTICOS COM ÊNFASE NA
DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA**

BRIGITTE van EYLL

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADOR: PROF. DR.
FERNANDO AUGUSTO SOARES

São Paulo
2001

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

ANA MARIA R. A. KUNINARI
Coordenadora de Pós-Graduação

EXEMPLAR
ESPECIAL

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Bibliotecária do Centro de Tratamento e Pesquisa

Hospital do Câncer A . C. Camargo

Eyll, Brigitte Marie Hélène Roberte Adam van

Carcinoma mucinoso da mama: estudo dos indicadores prognósticos com ênfase na diferenciação neuroendócrina. / Brigitte Marie Hélène

Roberte Adam van Eyll. -- São Paulo, 2001.

p. 125

Dissertação (mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia

Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1. NEOPLASIA MAMÁRIAS/prognóstico. 2. CARCINOMA MUCINOSO. 3. DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA. 4. MARCADORES TUMORAIS.

Agradecimentos

Esta tese não seria sido possível sem o apoio do Dr Fernando Augusto Soares que mais do que Orientador colocou a minha disposição todos os recursos necessários para os estudos imunohistoquímica contidos neste trabalho. Um agradecimento especial a Dra Suely Nonogaki que realizou todas as etapas desta preparação.

Agradeço toda a equipe da secretaria da pos-graduação que sempre me forneceu todas as informações dos cursos e horários a cumprir.

Por fim agradeço meus filhos e futuros genros que muito colaboraram com a ajuda no computador.



RESUMO

O carcinoma da mama é a neoplasia maligna mais freqüentes nas mulheres sendo causa de elevada morbidade e mortalidade em nosso meio. A grande maioria dos carcinomas da mama é do tipo ductal usual, sendo que menos do que 5 a 10% dos casos são dos tipos histológicos especiais como o carcinoma papilífero, tubular, medular, metaplásico ou mucinoso. O adenocarcinoma mucinoso da mama geralmente acomete mulheres mais velhas, têm comportamento mais indolente e mostra diferenciação especializada. Há controvérsias na literatura acerca do quanto de componente mucinoso é o suficiente para caracterizar este tipo histológico. As comparações entre os adenocarcinomas mucinosos puros e aqueles que além da diferenciação mucinosa apresentam concomitantemente componente ductal invasivo são escassas na literatura. Os objetivos do presente trabalho são estudar comparativamente os adenocarcinomas com diferenciação mucinosa com os carcinomas ductais infiltrantes sem outras especificações em relação à expressão imunohistoquímica da diferenciação neuroendócrina, receptores hormonais, oncoproteína relacionada ao gene c-erbB-2, proteína p53 e oncoproteína relacionada ao gene bcl-2. Estes mesmos parâmetros serão comparados entre os carcinomas mucinosos puros com aqueles que apresentam diferenciação mucinosa e componente ductal invasivo, acrescidos dos indicadores clínico-patológicos de faixa etária, estado hormonal, tamanho do tumor, estadiamento clínico-patológico. Finalmente será estudada a sobrevida

comparada dos três grupos de estudos, ou seja, os carcinomas mucinosos puros, os carcinomas ductais invasivos com diferenciação mucinosa e os carcinomas ductais invasivos sem outras especificações. Quarenta e dois casos cujos parâmetros histopatológicos e clínicos eram avaliáveis e cujo diagnóstico era de carcinoma mucinoso da mama foram recuperados do arquivo médico da Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A C Camargo, correspondendo o período de 1980 a 1997. Os casos selecionados foram revistos pelo mesmo patologista. No presente estudo, um tumor foi considerado como adenocarcinoma mucossecretor (ADMS) se pelo menos 75% da área tumoral representada na histologia era constituído por mucina extracelular. Outro critério é que não houvesse área infiltrativa de CDI usual. A presença de carcinoma intraductal de qualquer padrão histológico não foi considerado critério para exclusão. Um segundo grupo foi caracterizado como carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa (CDIDM) como aquele tumor onde mais do que 33% do tumor eram constituídos por mucina extracelular, mas que havia parte da neoplasia constituída por CDI usual. A quantificação da mucina extracelular foi realizada na área tumoral sendo desprezado o estroma adjacente. A quantificação da mucina foi estabelecida pela observação de 20 campos de médio aumento (objetiva de 16x, ocular de iOx). Utilizou-se uma ocular estequiométrica de 25 pontos, perfazendo portanto 500 pontos. Neste tipo de ocular foram consideradas áreas mucossecretoras as quais a intersecção com o ponto do quadriculo acontecia com o aspecto histológico característico da mucina. Todas as demais áreas, cuja coincidência com o reticulado não correspondeu a este aspecto, foram consideradas negativas. O resultado foi expresso em porcentagem de mucina por área tumoral. O estudo imunohistoquímico analisou a expressão dos

receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), oncoproteína p53 (p53), produto do oncogene HER2/neu (c-erbB-2), oncoproteína ligada à apoptose bcl-2 (bcl-2) e marcadores neuroendócrinos cromogranina A (CrA), enolase neurônio-específica (NSE) e sinaptofisina (SNF). As reações foram realizadas pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®). A pesquisa foi considerada positiva quando foram observados depósitos de coloração acastanhada intensa. Para os receptores hormonais foi considerado o caso como positivo se houvesse mais do que 10% de coloração dos núcleos. A oncoproteína bcl-2 foi considerada positiva quando mais do que 10% das células apresentassem coloração citoplasmática. Em relação à oncoproteína c-erbB-2, o caso foi considerado positivo quando houve coloração da membrana citoplasmática de forma completa, de intensidade moderada no mínimo, em pelo menos 10% das células tumorais. Para os marcadores neuroendócrinos considerou-se a positividade quando houve coloração forte na maioria das células tumorais, sendo que um caso foi considerado com esta diferenciação quando a CrA ou a SNF foi expressa em conjunção com a NSE. Casos de expressão isolada de NSE não foram considerados como diferenciação neuroendócrina. Para o cálculo da significância dos dados obtidos dos diferentes marcadores biológicos comparando-se inicialmente os ADDM com os CDI SOE. Posteriormente foram testados os resultados comparativos entre os dois sub-tipos de ADDM, ou seja, os ADMS versus os CDIDM. Para tal foi realizado o teste exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado. Para o cálculo de sobrevida, usamos o teste de Kaplan-Meier. Os resultados obtidos permitiram-nos concluir que os carcinomas da mama que apresentam diferenciação mucinosa quando comparados aos carcinomas ductais infiltrantes sem outras especificações

pareados por idade e estadiamento apresentam significativamente maior frequência de diferenciação neuroendócrina, expressão de receptores de estrógeno e expressão de oncoproteína bcl-2. Por outro lado, os tumores com diferenciação mucinosa menos frequentemente expressam proteína c-erbB-2 e apresentam diferenças marginalmente significativas em relação à expressão de proteína p53. Finalmente, não há diferenças entre a expressão de receptores de progesterona entre os dois grupos no presente material. Quando comparados os adenocarcinomas mucinosos puros com aqueles que apresentam a diferenciação mucinosa somada a componente de carcinoma ductal infiltrante não houve diferenças no que diz respeito a todos os parâmetros testados, exceto o comprometimento linfonodal, mais freqüente nos CDIDM, e diferença marginal entre a expressão de receptores de progesterona, mais freqüente nos ADMS. Os parâmetros que os dois sub-tipos histológicos foram similares incluem a idade, estado hormonal, tamanho do tumor, estadiamento, diferenciação neuroendócrina, receptores de estrógeno, proteína p53, proteína c-erbB-2 e oncoproteína bcl-2. Apesar de não apresentarem diferenças em relação aos marcadores tumorais, os adenocarcinomas mucossecretores puros mostraram sobrevida em 5 anos significativamente melhor do que os adenocarcinomas ductais infiltrantes com diferenciação mucinosa e os carcinomas ductais infiltrantes sem outras especificações, com a ressalva em relação ao tamanho da amostra.

ABSTRACT

The carcinoma of the breast is the most frequent tumor in the women being cause of high mortality in Brazil. The great majority of carcinomas of the breast are ductal infiltrating carcinomas, and less than 5-10% of the cases are special histologic types as papillary, tubular, medular, metaplastic or mucinous. The mucinous adenocarcinoma of the breast usually occurs in older women, has more indolent behavior, and the mucinous differentiation is a kind of specialized differentiation. There are controversies in the literature concerning the proportion of the mucinous component is enough to characterize a carcinoma as mucinous. The comparisons among the pure mucinous adenocarcinomas and those that present concomitantly a ductal infiltrating carcinoma and the mucinous differentiation are scarce in the literature. The objectives of the present work are to study the mucinous adenocarcinomas comparatively with infiltrating ductal carcinomas with mucinous differentiation in relation to the immunohistochemical expression of the neuroendocrine differentiation, hormonal receptors, oncoprotein related to the gene her-neu-2, protein p53 and oncoprotein related to the gene bcl-2. These same parameters will be compared among the pure mucinous carcinomas with those that present mucinous differentiation and invasive ductal component, added of the clinical- pathological aspects of age group, state hormonal, size of the tumor, and stage clinical-pathological. Finally it will be studied the compared survival of the three groups, the pure mucinous carcinomas, the

ductal carcinomas with concomitant mucinous differentiation, and the infiltrating ductal carcinomas without other specifications. Forty-two cases whose histopathologic and clinical parameters were estimable and whose the histological diagnosis was of mucinous carcinoma of the breast were recovered of the medical files of the Department of Anatomical Pathology of the Center of Treatment and Research Hospital A C Camargo, corresponding the period from 1980 to 1997. The same pathologist reviewed the selected cases. In the present study, a tumor was considered as mucinous adenocarcinoma (ADMS) if at least 75% of the tumor area represented in the histologic sections was constituted by extracellular mucin. Another criterion is that there was not infiltrating ductal carcinoma. The presence of intraductal carcinoma of any histologic pattern was not considered for exclusion. A second group was characterized as infiltrating ductal carcinoma with mucinous differentiation (CDIDM) as that tumor where more than 33% of the tumor were constituted by extracellular mucin, but that there was part of the neoplasm constituted by usual CD1. The quantification of the extracellular mucin was accomplished in the area tumoral being despised the adjacent stroma. The quantification of the mucin was established by the observation of 20 fields of medium increase (objective of 16x, ocular of 10x) and a stechiometric ocular of 25 points (total 500 points). Mucinous areas were considered when the intersection with the point was coincident with the mucinous characteristic aspect. All the other areas, whose coincidence with points did not correspond to east aspect, they were considered negatives. The result was expressed in mucinous area in percentage by area tumoral. The imunohistochemical analyzed the expression of the estrogen (RE) and progesterone (RP) receptors, oncoprotein p53 (p53), product of the oncogene HER2/neu (c-erbB-2), apoptosis markers as bcl-2

(bcl-2) and markers of neuroendocrine differentiation, as cromogranin E (CrA), neuron-specific enolase (NSE) and sinaptofisin (SNF). The reactions were done by the technique of complex estreptavidin-biotin-peroxidase (StreptABC, DAKO). The result was considered positive when brown deposits were observed. For the hormonal receptors the case was considered as positive if there were more than 10% of the nuclei were stained. The bcl-2 protein was considered positive when more than 10% of the cells presented cytoplasmatic staining. In relation to the c-erbB-2 protein, the case was considered positive when there was a stain in the cytoplasmatic membrane in a complete way in at least 10% of the tumor cells. For the neuroendocrine markers they were considered positive when the brown cytoplasmatic deposit was observed in most of the tumor cells, and the case was considered neuroendocrine differentiation when CrA or SNF was expressed in conjunction with NSE. Cases of isolated expression of NSE were not considered as neuroendocrine differentiation. For the calculation of the level of significance of the obtained data of the different biological markers being compared between ADDM with CDI. Later the comparative results were tested between the two subtypes of ADDM, in other words, the ADMS versus CDIDM. For such it was accomplished the exact test of Fisher or the test of the qui-square. For the survival curve, we used the test of Kaplan-Meyer. The obtained results allowed to conclude us that the breast carcinomas with mucinous differentiation when compared to the usual infiltrating ductal carcinomas without other specifications with the same for age and stage presented significantly larger frequency of neuroendocrine differentiation, estrogen receptor expression and expression of oncoprotein bcl-2. On the other hand, the tumors with mucinous differentiation less frequently express protein

c-erbB-2 and they present differences marginally significant in relation to the expression of protein p53. Finally, there are not differences in the expression of progesterone receptors between the two groups in the present material. When compared pure mucinous adenocarcinomas with those that present the mucinous differentiation added to component of usual infiltrating ductal carcinoma there were not differences in all the tested parameters, except the lymph node involvement, more frequent in infiltrating ductal carcinoma plus mucinous differentiation than in pure mucinous adenocarcinoma. The parameters in the two histologic sub-types were similar including age, hormonal state, size of the tumor, stage, neuroendocrine differentiation, estrogen receptors, p53 protein, c-erbB-2 protein and bcl-2 oncoprotein. In spite of there are no differences in relation to the tumor markers, pure mucinous showed 5-years global survival better than the infiltrating ductal carcinomas with mucinous differentiation and the infiltrating ductal carcinomas with no other specifications.

I) INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Aspectos gerais do carcinoma da mama.....	5
1.2. Aspectos histopatológicos dos adenocarcinomas mucossecretores da mama.....	5
1.3. Diferenciação neuroendócrina divergente	11
1.4. Diferenciação neuroendócrina divergente no ADDM.....	15
1.5. Indicadores prognósticos no carcinoma da mama com ênfase nos ADDM.....	18
1.5.1. Receptores hormonais.....	18
1.5.2 Produto de gene HER2/neu (c-erbB-2).	20
1.5.3. Gene TP53 e a expressão da proteína p 53.....	22
1.5.4. Produto do oncogene bcl-2.....	25
II) OBJETIVOS.....	28
III) MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Caracterização da amostra.....	32
3.2. Estudo morfológico tradicional.....	33
3.3. Estudo imunohistoquímico	37
3.4. Análise estatística	42
IV) RESULTADOS	44
4.1. Compilação dos dados	44
4.2. Caracterização da amostra.....	44
4.2.1 Idade.....	44
4.2.2 Estado hormonal.....	45
4.2.3 Tamanho dos tumores.....	46
4.2.4 Estado linfonodal axilar.....	48
4.2.5 Estadiamento clínico patológico pelo sistema TNM	51
4.3 Resultados do estudo imunohistoquímico com os diversos indicadores testados.....	53
4.3.1. Diferenciação neuroendócrina.....	53
4.3.2. Expressão dos receptores hormonais	59

4.3.3. Expressão da oncoproteína relacionada com o gene c-erbB-2	65
4.3.4. Expressão da proteína p53	69
4.3.5. Expressão da oncoproteína bcl-2	72
4.4 Análise de sobrevida	75
V) DISCUSSÃO	79
VI) CONCLUSÕES	91
VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
VIII) ANEXOS	



TABELA 1 - Lista dos anticorpos utilizados	38
TABELA 2 - Distribuição dos casos em relação à idade em anos	45
TABELA 3 - Distribuição dos casos em relação ao status hormonal	46
TABELA 4 - Distribuição dos casos em relação ao tamanho do tumor medido pelo maior diâmetro	47
TABELA 5 - Distribuição dos casos em relação ao estado linfonodal axilar	49
TABELA 6 - Distribuição dos casos em relação ao estadiamento	51
TABELA 7 - Distribuição dos casos em relação à diferenciação neuroendócrina	54
TABELA 8 - Expressão dos receptores hormonais	60
TABELA 9 - Distribuição dos casos em relação à expressão da oncoproteína ligada ao gene c-erbB-2	66
TABELA 10 - Distribuição dos casos em relação à expressão da proteína p53	69
TABELA 11 - Distribuição dos casos em relação à expressão da oncoproteína bcl-2	72
TABELA 12 - Análise de sobrevida de acordo com os grupos de estudo	75
TABELA 13 - Evolução em relação à sobrevida de acordo com os grupos de estudo	76

GRÁFICOS 1 e 2: Comprometimento linfonodal axilar	50
GRÁFICOS 3 e 4 : Estadiamento	52
GRÁFICOS 5 e 6: Diferenciação neuroendócrina	55
GRÁFICOS 7 e 8: Receptor de estrógeno	61
GRÁFICOS 9 e 10: Rceptor de progesterona	63
GRÁFICOS 11 e 12: c-erbB-2	67
GRÁFICOS 13 e 14: Proteína p53	70
GRÁFICOS 15 e 16: bcl-2	73
GRÁFICO 17: Sobrevida global das pacientes de acordo com os 3 tipos histológicos	77

FIGURA 1 - Adenocarcinoma mucossecretor	35
FIGURA 2 - ADMS	35
FIGUA 3 - CDIMS	36

FIGURA 4 - CDIDM	36
FIGURA 5 - Enolase neuendócrina	56
FIGURAS 5 e 6 Sinaptofisina	57
FIGURA 8 - Cromogranina	58
FIGURAS 9 e 10 - Receptor de estrógeno	62
FIGURAS 11 e 12 - Receptor de progesterona	64
FIGURAS 13 e 14 - c-erbB-2	68
FIGURAS 15 e 16 - p53	71
FIGURAS 17 E 18 - bcl-2	74

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do carcinoma da mama

O carcinoma da mama é a neoplasia maligna mais comum das mulheres nos países desenvolvidos e sua incidência vem aumentando globalmente. No Brasil a maioria dos casos está localizada nos estados mais desenvolvidos.(INCA, 1999). De acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer, a incidência no Brasil é de 44/100.000 habitantes, totalizando aproximadamente 32.500 casos novos por ano (INCA, 1999). No estado de São Paulo as estatísticas demonstram aumento da mortalidade passando de 11,7/100.000 no biênio 1987-88 para 12,9/100.000 em 1997-98 (FOSP, 2000). Também o câncer da mama foi a primeira causa de morte em mulheres com câncer no estado de São Paulo nos biênios 1987-88, 1992-93 e 1997-98 (FOSP, 2000).

O carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações (CDI SOE) é o tipo histológico mais comum entre as neoplasias malignas da mama, constituindo 65 a 80% de todos os carcinomas. A classificação dos tumores mamários da Organização Mundial da Saúde caracteriza este tipo histológico por exclusão, ou seja, deve ser dada esta denominação quando não for possível classificar a neoplasia em nenhuma das outras categorias de carcinomas

mamários invasivos (WHO, 1981). Para qualificar um carcinoma com CDI SOE, este padrão deve estar presente em mais de 90% do tumor, com a ressalva da amostragem seja adequada (Tavassoli, 1999). Os carcinomas são considerados infiltrantes quando as células neoplásicas invadem o estroma mamário, independentemente da presença de componente de carcinoma intrductal (Tavassoli, 1995). O CDI SOE ocorre tipicamente em mulheres após a menopausa, geralmente entre os 47 a 55 anos de idade. Vários são os aspectos que unem o carcinoma mamário e o estado hormonal da mulher. O risco de câncer de mama é aumentado entre mulheres que tiveram a menarca precoce, menopausa tardia ou primeira gravidez após os 35 anos de idade. Por outro lado, pacientes que sofreram ooforectomia antes dos 35 anos de idade têm risco diminuído de apresentar câncer de mama. Os mecanismos que estão implicados nesta relação do estado hormonal e o risco de câncer são ainda controversos na literatura.

O segundo grande grupo de carcinomas mamários é o constituído pelos lobulares (Rosen, 1997). Estes geralmente constituem-se cerca de 5-10% dos casos nas grandes séries. Tem padrão de infiltração estromal característico, com quadro histológico mais monomorfo que os carcinomas ductais e tendência a bilateralidade. Os fatores prognósticos correlacionados com estes dois tipos de tumores são assunto de amplo debate na literatura e serão comentados na próxima seção. Outros tipos histológicos de carcinomas mamários são encontrados menos freqüentemente. Entre eles são reconhecidos os carcinomas tubulares, medulares, metaplásicos, epidermóides, com células gigantes, papilíferos, adeno-císticos, secretores, com diferenciação apócrina,

rico em glicogênio, cribiformes, a doença de Paget e os adenocarcinomas com diferenciação mucosecretora.

O adenocarcinoma com diferenciação mucossecretora (ADDM) é um dos tipos histológicos mais raros sendo reconhecido como tendo um comportamento menos agressivo, incidindo numa faixa etária mais tardia e que possivelmente poderia ser tratado de maneira menos agressiva que os CDI SOE (Northridge *et al.*, 1997; Avisar *et al.*, 1998). Estes tumores são encontrados na literatura médica com vários sinônimos, tais como carcinoma colóide, mucóide, mucíparo ou gelatinoso (Rosen, 1997). Aparentemente é importante se separar o ADDM em dois tipos histológicos, a adenocarcinoma mucossecretor puro (ADMS) e o carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa (CDIDM), como veremos adiante. Os principais sintomas e sinais da doença não diferem daqueles vistos no CDI SOE. O principal achado é um nódulo na mama. A descarga mamilar e a dor são incomuns, mas fixação na pele e na parede torácica podem ocorrer nas lesões maiores. A palpação revela um massa variando de consistência macia a moderadamente firme. Na mamografia o tumor aparece usualmente como uma massa lobulada pouco definida, que eventualmente contém calcificações.(Goodman *et al.*,1995; Chopra *et al.*,1996; Tabar *et al.*, 1996). Como estes tumores raramente formam espiculações, podem passar despercebidos para o radiologista (Chopra *et al.*, 1996). São mais prevalentes em mulheres acima dos 60 anos de idade (Fissher *et al.*, 1997).

1.2. Os aspectos histopatológicos dos adenocarcinomas mucossecretores da mama

A presença de muco em meio a um tumor da mama pode estar presente em diversas manifestações histológicas. Destas os mais importantes são os ADMS, os CDIDM, as mucocèles, os adenocarcinomas mucinosos e os carcinomas de células em anel de sinete. Na classificação dos tumores da mama da Organização Mundial de Saúde (1981), o ADMS é definido como aquele que tem grande quantidade de muco extracelular, suficiente para ser visível macroscopicamente e reconhecido histologicamente envolvendo as células tumorais e seu citoplasma. Este aspecto histológico característico é comum nas neoplasias mucossecretoras de vários órgãos. Diferenciação mucinosa é vista em cerca de 2 a 3% dos carcinomas da mama (Chinayama and Davies, 1996; Rosen, 1997). Avisar *et al.* (1998) revisaram 6083 casos de carcinoma de mama e encontraram 135 tumores (2%) com diferenciação mucinosa, mas apenas 30 (0,5%) destes foram considerados ADMS. Todavia, células isoladas com grânulos mucíparos citoplasmáticos são vistas em mais de 7% dos carcinomas da mama (Fischer *et al.*, 1975). A importância de se separar as ADMS com aqueles com diferenciação mucinosa focal é enfatizada desde 1930 por Geschickter. Apesar disso, ainda hoje não se tem o consenso da definição correta para classificar um tumor da mama como ADMS. O problema na separação destas lesões é que o ADMS é, na verdade, uma variante do CDI SOE. Carcinomas intraductais são encontrados em mais de 75% dos casos de ADMS (Chinyama and Davies, 1996) e pode ser de qualquer padrão histológico, incluindo cribiforme, papilífero micropapilífero, sólido ou

comedocarcinoma. Em poucas ocasiões pode-se identificar a diferenciação mucinosa no carcinoma intraductal (Chinyama and Davies, 1996).

Vários são os critérios propostos para distinguir-se os ADMS dos CDIDM (Maluf and Koerner, 1995; Rosen, 1997). De modo geral os tumores são separados em grupos de acordo com a relação muco e células neoplásicas. A porcentagem desta relação é estabelecida de forma arbitrária. Há três "pontos de corte" para se considerar um ADMS, de acordo com os diferentes autores: lesão com mais de 90%, 75% ou 50% de componente mucinoso extracelular. De fato não há critério objetivo para esta classificação. Komaki *et al.* (1988), estudando os prognósticos dos ADDM, mostraram que tumores com porcentagem de área mucinosa de 83,5+/- 14,3% foram considerados ADMS contra 68,3 +/-16,6% de área mucinosa nos chamados CDIDM. Rosen (1997) estabeleceu que na prática um carcinoma de mama não deve ser classificado como ADMS se mais de 10% do componente invasivo forem não-mucinosos ou se qualquer componente invasivo seja não bem diferenciado. Capela *et al.* (1980) dividiram os ADMS em três tipos, baseados no tipo de arranjo de células neoplásicas e o aspecto citoplasmático. O critério básico seria que pelo menos 33% do tumor fosse representado por mucina. O tipo A incluiria células que se organizariam em cordões, anéis ou trabéculas, com mucina abundante, geralmente extracelular. No tipo B as células formariam pequenos blocos, com mucina e grânulos intracitoplasmáticos. Arranjos cribiformes poderiam ser vistos em ambos os tipos. O terceiro foi chamado de AB e descrito como de achados indeterminados, numa forma intermediária entre os dois grupos. Em uma classificação semelhante, Page *et al.* (1987) distinguiram três tipos de apresentação: tipo A se compõe de finos cordões, baixa celularidade, pequenos

focos de células e áreas cribiformes; tipo B possui intensa celularidade com nódulos sólidos e contém mais frequentemente grânulos argirofílicos tipo C misto com abundantes células em anel de sinete com citoplasma abundante em mucina do CDI. Em estudo de microscopia eletrônica demonstrou um grande heterogeneidade dos aspectos ultraestruturais dos grânulos de mucina, impedindo que os tumores sejam sub-divididos em grupos distintos (Fergusson *et al.*, 1986).

Em realidade pode-se observar vários padrões histológicos com a produção de mucina. A formação tubular é incomum, sendo que as células geralmente formam pequenos grupos. Há uma variante de células em anel de sinete, também conhecido como carcinoma mucocelular, que é uma variante do carcinoma lobular e não do CDI SOE. Neste caso dificilmente observa-se mucina extracelular.

Também o tipo de mucina é aparentemente importante no entendimento da histogênese do ADMS e na sua relação com o CDI SOE. Em estudo comparativo de 50 casos de ADMS com outros 50 casos de CDI SOE, O'Connell *et al.* (1998) mostraram que os tumores colóides têm um grande aumento de mucina MUC2 e os ductos adjacentes mostraram aumento do sinal de MUC5, enquanto que os tumores não-mucinosos apresentaram aumento de sinal de MUC1, mas não de MUC2 ou MUC5. Nos casos de CDIDM havia manutenção destas características, com as áreas mucinosas positivas para MUC1 (O'Connell *et al.*, 1998). Estas alterações foram observadas também nos ductos normais adjacentes, levando os autores a inferir que a alteração de diferenciação mucinosa se iniciava nos ductos normais do epitélio adjacente.

Outra distinção importante é a de ADMS com tumores do tipo mucocoele. A mucocoele da mama é um tumor cístico, com conteúdo mucinoso, cujos cistos são revestidos por células mucossecretóreas achatadas e há pequenos elementos papilares. Ao contrário dos ADMS, onde as células tumorais são encontradas imersas na substância mucóide, na mucocoele é muito raro o achado de células epiteliais intracístos e há extravasamento de mucina para o estroma adjacente (Chinyama & Davies, 1996). As séries de estudo com lesões do tipo mucocoele são escassas na literatura. Analisando uma série de 1297 casos, Chinyama & Davies (1996) encontraram 38 casos com ductos dilatados por mucina, sendo que 27 deles eram do tipo mucocoele. Nesta mesma série havia 30 casos de ADMS, sendo que deste 3 estavam associado com lesões do tipo mucocoele (Chinyama & Davies, 1996). Hamele-Bene *et al.* (1996) estudaram 49 casos de mucocoele e encontraram áreas de ADMS em 25 ocasiões.

Cistoadenocarcinoma mucinoso é uma outra variante de tumores da mama com diferenciação mucinosa e foram assim designados por Kroenin & Tavassoli (1998). São muito raros os casos publicados para que possamos ter uma melhor avaliação em relação a particularidades específicas. Recentemente, Domoto *et al.* (2000) demonstrou a presença de sulfomucinas, um tipo de mucina diferente do usualmente presente nos ADMS, que são caracteristicamente mucinas neutras ou sialomucinas (Hanna & Corkill, 1988). Os únicos carcinomas de mama com demonstração de sialomucinas são os carcinomas lobulares (Domoto *et al.*, 2000).

Outra lesão mamária que apresentava diferenciação mucinosa é a chamada de mucinose nodular rara (Michal, Ludvikavá & Zámecnik, 1998). É uma lesão benigna, extremamente rara, descrita inicialmente como mixoma da bainha nervosa da mama (Wee, Tan & Raju, 1989). Em pacientes com síndrome de Carney, esta lesão se localiza na aréola, mas pode ser de ocorrência esporádica ((Michal, Ludvikavá & Zámecnik, 1998). O aspecto histológico pode ser confundido com carcinomas intraductais com diferenciação mucinosa, como os micropapilíferos ou cribiformes, mas a ausência de células com características histológicas de malignidade fazem o diagnóstico diferencial.

Muitos estudos mostraram que o ADMS é geralmente associado com bom prognóstico. Um dos problemas de análise da literatura pertinente é decorrente que nem sempre os grupos de ADMS são bem definidos, misturando os ADMS com CDIDM. As séries que assim o fazem mostram que as pacientes portadoras de ADMS puro apresentam melhor sobrevida livre de doença aos 5 e 10 anos do que aquelas com CDIDM (Lee *et al.*, 1934; Melamed *et al.*, 1961; Wulsin & Schreiber, 1962; Silverberg *et al.*, 1971; Avisar *et al.*, 1998). além disso os ADMS tendem a ser menores e desenvolverem menos metástases linfonodais (Melamed *et al.*, 1961; Silverberg *et al.*, 1971; Snynder & Tobon, 1977; Rasmussen *et al.*, 1987; Komaki *et al.*, 1988; Toikkanen & Kujari, 1989; Scopi *et al.*, 1994). Em estudo de 30 casos, Avisar *et al.* (1998) encontraram 12% dos casos com metástases linfonodais e todos apresentavam alto grau nuclear e eram aneuplóides.

A comparação de dados entre os ADMS e os CDIDM não é muito bem explicada na literatura, Fentiman *et al.* (1997) comparavam os dados clínicos e morfológicos de 24 pacientes com ADMS com 49 outros casos de CDIMS. Os ADMS foram significativamente menores e com menor comprometimento linfonodal axilar do que os casos de CDIDM. Também a sobrevida a longo termo foi melhor nos ADMS (Fentiman *et al.*, 1997). Em relação aos aspectos histológicos praticamente não se observavam diferenças no grau histológico dos dois grupos. Kato *et al.* (1999) estudaram 33 ADDM, sendo que destes 16 eram do tipo ADMS, 7 do tipo CDIDM e criaram um terceiro grupo constituído por 10 casos de adenocarcinoma mucinoso com componente intraductal. Estes autores não encontraram diferenças quando compararam os três grupos em relação ao índice proliferativo medido pelo ki-67, expressão de proteína p53 e expressão do produto do gene Her2/neu. Todavia os tumores mucinosos puros foram significativamente menos metastáticos para os linfonodos axilares quando comparados com CDIMS (Kato *et al.*, 1999). Já Pereira *et al.* (1995) mostraram que casos de ADMS puros, de baixo grau histológico, se mostraram melhor do que quando havia componente de CDI SOE associado com outro tipo histológico especial. Infelizmente, dos 39 casos de CDI SOE com associação com outro tipo histológico especial não é possível saber-se quanto destes eram associados com diferenciação mucinosa.

Um grande estudo populacional comparou os carcinomas tubulares e mucinosos da mama com os CDI SOE (Diab *et al.*, 1999). Este estudo foi feito em registro de base populacional, em mais de 370 instituições acadêmicas e comunitárias diferentes, e não houve revisão de casos. Os resultados mostraram que os ADMS ocorreram em mulheres mais velhas, de tamanho similar, com

menor frequência de envolvimento dos linfonodos axilares, menor índice proliferativo medido pela fase S da ploidia do DNA quando comparado com os CDI SOE. Os ADMS tiveram sobrevida livre de doença aos 5 anos de 90% e sobrevida global de 80%, enquanto que os CDI SOE a sobrevida livre de doença aos 5 anos foi de 80% e sobrevida global de 77% (Diab *et al.*, 1999). Clayton (1986) analisou 53 casos de ADMS sendo que especificamente excluiu todos os casos com qualquer tipo de carcinoma invasivo de outro tipo, e encontrou uma idade média de 63 anos, com sobrevida a longo termo de 68%, com sobrevida média de 11,3 anos. O melhor preditor de prognóstico foi a presença de metástases axilares, sendo que das cinco (10%) pacientes que tinham linfonodos comprometidos na época da mastectomia, quatro faleceram em decorrência de comprometimento sistêmico (Clayton, 1986).

1.3 A diferenciação neuroendócrina divergente

A presença de células que são capazes de produzir algum tipo de peptídeo é reconhecida desde a muito em praticamente todos os tecidos. Estas células foram conhecidas como as que compunham um sistema celular difuso pelo organismo conhecido com APUD (do inglês, amine precursor uptake decarboxilation). Os tumores decorrentes de proliferação destas células eram conhecidos como apudomas. Também o fato que neoplasias diferenciadas poderiam apresentar quantidades variáveis destas células de permeio é motivo de debate na literatura a longo tempo.

As células neuroendócrinas apresentam grânulos neurosecretórios em seu meio citoplasmático resultando em aspecto granular pela microscopia

óptica. (Damiani *et al.*, 1999). Inicialmente a diferenciação neuroendócrina (DNE) era reconhecida através de métodos histoquímicos usuais. A coloração pela prata de Grimelius dividia estas células em argirofílicas e argentafins. O grande problema desta coloração é que era tecnicamente difícil de se executar e a reprodução dos resultados, mesmo em um mesmo laboratório, era pobre e faltava especificidade. Estas colorações vieram sendo substituídas por técnicas imunohistoquímicas nos últimos trinta anos. Hoje as impregnações argênticas estão praticamente abandonadas, pois temos marcadores imunohistoquímicos de DNE específicos e sensíveis, bem como uma ampla possibilidade de demonstração do peptídeo específico produzido pela célula.

Dos marcadores de DNE os mais utilizados são a enolase neuroendócrina-específica (NSE), a cromogranina A (CrA), a sinaptofissina (SNF) e a molécula de adesão N-CAM. Anticorpos contra praticamente todos os peptídeos ou aminas biogênicas são disponíveis no mercado.

Existem três tipos de cromograninas, sendo identificadas como A, B e C (secretogranina). A CrA é uma glicoproteína encontrada em vesículas celulares e é provavelmente a responsável pela argirofilia presente nas células com DNE. A CrA é o marcador mais específico deles, mas a CrB é a mais frequentemente encontrada nos carcinomas de mama masculino e de mulheres na pós-menopausa (Battersby *et al.*, 1992; Scopsi *et al.*, 1992). A SNF é uma glicoproteína glicolisada trans-membrana que está presente em neurônios e células neuroendócrinas. A NSE foi o primeiro marcador neuroendócrino de DNE, mas é pouco específico. Este marcador é presente em mais de 20 a 50 % dos carcinomas mamários (Nseland *et al.*, 1986; Erikstein *et al.*, 1988;

Monaghans & Roberts, 1988; Ingelman-Sundber *et al.*, 1989). Todavia, esta marcação não corresponde a presença de grânulos densos, mostrando a falta de especificidade do marcador. Os RNA mensageiro de grânulos NSE são encontrados em células não-neuronais e alguns tumores (van Obberghen *et al.*, 1988). Portanto, a presença de NSE somente não define DNE.

A DNE em neoplasias de diversos sítios ganhou importância progressiva na literatura. Com a marcação específica, o achado de células neuroendócrinas isoladas em meio a um tumor epitelial é comum. Inicialmente, postulou-se que estas deveriam ser células não-neoplásicas, residuais de infiltração tumoral no órgão primário. Posteriormente observou-se que células com DNE estavam presentes também nas metástases destas neoplasias. Todavia a presença de DNE em tumores usuais é ainda de significado clínico e terapêutica pouco conhecidos.

Os tumores de padrão histológico usual podem apresentar quantidades significantes de células com DNE. Usualmente as células sem DNE nestes casos mostram uma diferenciação em outra linhagem bem definida como células mucossecretoras, de características exócrinas ou mesmo de epitélio de revestimento. Esta substituição é conhecida como DNE divergente. Este fenômeno é muito interessante e levanta diversas questões.

Uma primeira questão é se os dois componentes são realmente neoplásicos. As evidências nos leva a crer que sim, e nesta caso a segunda questão é se eles se originam de um mesmo clone de células. Em qual momento a capacidade de diferenciação divergente seria adquirida ? Outras

questões de ordem mais prática podem ser levantadas. Como devemos classificar estes tumores, como devemos tratar estas neoplasias e como criar um conhecimento prático sólido nesta área, são todas arguições em resposta ainda.

Ao autores geralmente concordam que tumores com DNE divergente são aqueles que pelo menos 10% das células tumorais apresentam grânulos NE (Damiani *et al.*, 1999). O comportamento clínico pode ser extremamente variável, desde benignos até muito agressivos. No polo benigno estão os carcinóides cujo comportamento não é influenciado pelo componente mucinoso e são encontrados no pulmão, trato digestório ou pâncreas. Nestes casos as células mostram diferenciação mucinosa e grânulos neuroendócrinos conjuntamente. O pólo maligno está associado a componente de carcinoma indiferenciado de pequenas células que pode ser encontrado juntamente com componente mucinoso ou epidermóide. Geralmente nestes casos o prognóstico do paciente é determinado pelo componente indiferenciado de pequenas células muito mais do que pela porção mais diferenciada do tumor.

Portanto, a DNE é um fascinante problema científico que deve ser abordado para melhor entendimento destas lesões com dupla diferenciação celular. Os próximos anos devem trazer exitantes aspectos novos no sentido de esclarecimento da histogênese destas neoplasias.

1.4 A diferenciação neuroendócrina divergente no ADDM

Na mama normal o encontro de células neuroendócrinas é apenas ocasional e em pequeno número de células. Células CrA positivas foram demonstradas em ter as células mioepiteliais e as células luminais ductais em tecido mamário normal (Bussolatti *et al.*, 1985). Este dado não é confirmado por outros autores (Cubilla *et al.*, 1977; Fischer *et al.*, 1979; Fetissof *et al.*, 1983). Lesões benignas ou hiperplásicas neuroendócrinas da mama nunca foram relatadas e todos os casos com DNE são consideradas como neoplasias malignas. Isto faz com que se levante a hipótese que mais do que lesões derivadas de células NE residentes na mama normal, a presença de DNE seja decorrente de uma diferenciação divergente de células carcinomatosas, que levaria a produção hormonal ectópica (Maluf & Kroener, 1994). Entretanto, carcinomas NE *in situ* foram descritos inicialmente por Cross *et al.* (1985) e mais recentemente por Tsang & Chan (1996) e Maluf & Kroener, 1995). Estes tumores freqüentemente mostram diferenciação mucinosa e quando invadem o estroma adjacente o fazem na forma de ADMS (Tsang & Chan, 1996).

As séries de carcinomas da mama com DNE são bastante rara na literatura. Sapino *et al.* (2000) reviram 47 casos de carcinomas mamários com DNE. Estes autores encontram 5 diferentes padrões morfológicos: sólido coesivo (11 casos), alveolar (6 casos), de pequena célula (11 casos), sólido-papilífero (8 casos) e mucinoso celular (11 casos). Estes últimos casos de ADMS com DNE corresponderam histologicamente aqueles descritos por Capella *et al.* (1980) como tipo B, mais Sapino *et al.* (2000) preferiram o termo carcinoma mucinoso celular por acreditarem ser mais descritivo. Em

contraste com ADMS puro, estes tumores seriam mais celulares, com menos mucina e formando ilhas celulares sólidas ou cribiformes no meio ao muco extracelular. Por vezes, as células poderiam ter mucina intracelular e adquirir um aspecto em anel de sinete. Mitoses eram escassas e o grau nuclear sempre foi baixo. Em relação a marcação da DNE, dos 11 casos estudados, 8 deles expressaram CrA, 10 CrB e 7 foram positivos para SNF.

Fentiman *et al.* (1997) praticamente não encontraram diferenças entre os ADMS e os CDIDM no que se refere a DNE. Estes estudaram a DNE apenas pela coloração de Grimelius e encontraram que 25% dos ADMS apresentavam DNE, contra 14% dos CDIDM, sendo que a divisão nos tipos A, B e AB de Capella foram praticamente idênticas.

A existência de dupla diferenciação celular divergente, a mucinosa e a neuroendócrina, é uma evidência indireta de estas neoplasias devem ser originadas de uma célula-tronco, capaz de sofrer diferenciação multidirecional. Esta dupla diferenciação é bastante evidente em carcinomas intraepiteliais, que freqüentemente tem componente invasivo do tipo mucinoso (Maluf & Kroerner, 1995; Tsang & Chan, 1996). Este tipo peculiar de tumor *in situ* ocorre em mulheres mais velhas e quando invadem o estroma muito raramente são do tipo sólido coesivo ou indiferenciado de pequenas células.

Maluf *et al.* (1991) discordam que a expressam de DNE e de mucina corresponde a dupla diferenciação divergente e acreditam que a mucina representa uma desordem na formação dos grânulos NE, mais do que indicar uma função exócrina. A presença de glicosaminoglicanas em grânulos

neuroendócrinos é bem conhecida e a produção excessiva destas substâncias leva a formação de células em anel de sinete. Todavia esta hipótese encontra pouco respaldo para os casos de ADMS que não apresentam DNE, como aqueles tumores conhecidos como tipo A de Capella.

Alguns outros tumores da mama apresentam células NE ocasionais ou em menos do que 50% do componente tumoral. Aparentemente, este tipo de diferenciação NE focal não carrega nenhuma significância prognóstica ou terapêutica especial (Sapino *et al.*, 2000). Esta coloração foi inicialmente posta por Taxy *et al.* (1981) que na época questionou a especificação de carcinoides mamários. Estes casos com células isoladas mostram também diferenciação lactacional (Clayton *et al.*, 1982). Este fenômeno tem sido descrito em adenocarcinomas de colon como secundários a diferenciação terminal das células neoplásicas e provavelmente o mesmo pode ser aplicado em relação ao carcinoma da mama.

Os tumores neuroendócrinos puros da mama também são reconhecidos desde a muito tempo. Cubilla & Woodruff (1977) foram os primeiros a relatar os carcinoides da mama separando-os dos tumores com diferenciação mucinosa. Em 1979, Fisher *et al.* dividiram os chamados carcinóides mamários em sólidos e com diferenciação mucinosa. Os autores encontraram 8 casos cujo componente epitelial lembrava o tumor carcinóide em uma revisão de 19 carcinomas mamários com diferenciação mucinosa (Fisher *et al.*, 1979). Posteriormente, Azzopardi *et al.* (1982) relataram 14 casos de tumores “carcinóides” da mama, preferindo a denominação de carcinomas argilofílicos. Destes casos, apenas cinco mostravam diferenciação mucinosa concomitante.

Os autores defenderam que estes tumores constituíam um pequeno grupo a parte dos carcinomas convencionais. Mais recentemente Birsak *et al.* (1996) estudaram os receptores hormonais em nove tumores carcinóides, sendo que todos os casos expressavam receptores de estrógeno e mais da metade expressavam receptores de progesterona e de estrógeno, indicando que as células neuroendócrinas dos tumores de mama mantêm o padrão de receptores hormonais.

Além dos tumores de padrão carcinóide, carcinomas neuroendócrinos puros são também descritos na mama. Fukunaga (1998) descreveu um caso de carcinoma neuroendócrino, mas cujas fotografias e descrição lembram o anteriormente descrito com carcinoma argirofílico da mama por Azzopardi *et al.* (1982). Carcinomas neuroendócrinos indiferenciados de pequenas células, de padrão *oat cell*, são eventualmente descritos e geralmente apresentam comportamento agressivo (Fukunaga & Ushigome, 1998). Outros tumores com diferenciação neuroendócrina, como por exemplo, simulando carcinomas de células de Merckel encontra vários relatos na literatura (Papotti, 1989; Fukunaga, 1998).

1.5 Os indicadores prognósticos no carcinoma da mama com ênfase nos ADDM

1.5.1 Os receptores hormonais

Os receptores hormonais são importantes critérios para determinação na conduta terapêutica adjuvante. Os receptores de estrógeno (RE) e de

progesterona (RP) são proteínas localizadas no núcleo da células epiteliais responsáveis pela medição dos efeitos dos respectivos hormônios no epitélio mamário. Sua presença é um indicador da diferenciação tumoral nos carcinomas ductais. Pode-se indentificar a presença destes receptores por métodos bioquímico ou imuno-histoquímico, sendo que estes apresentam boa correspondência entre si. Os receptores hormonais são positivos no epitélio mamário normal ou hiperplásico e não são marcadores específicos para o carcinoma mamário, pois são encontrados com a produção de estrógeno e progesterona, como em adenocarcinomas gástricos.

A expressam dos receptores hormonais guarda uma boa relação com o tipo histológico e diferenciação da neoplasia (Rosen, 1975). Carcinomas mucinosos e papilíferos são frequentemente positivos. Na literatura relativa aos ADDM, a positividade para RE varia de 43 a 75% (Rosen *et al.*, 1975; McCarthy *et al.*, 1980; Papotti *et al.*, 1987). Em 20 casos de ADMS, Avisar *et al.* (1998) encontraram positividade para RE em 90% dos casos e somente entre os casos negativos foi encontrado metástases nos linfonodos axilares. Em estudo de 1221 casos de ADDM foi encontrada expressam de RE em 92% dos casos e de RP em 68% dos tumores (Diab *et al.*, 1999).

Uma vez que a expressão de RP é regulada pela função dos RE, geralmente quando um tumor é RE positivo é também RP positivo. Menos do que 10% das neoplasias são RP positivo sem a expressão de RE e estas pacientes aparentemente tem períodos livres de doença mais longos (Clark & McGuire, 1988). As pacientes com tumores que não expressam RP, mas expressam proteína p53 têm pior prognóstico (Silvestrini *et al.*, 1996). O

impacto da expressão de RE em relação ao prognóstico é mais notável nas pacientes com linfonodos axilares comprometidos (Nomura *et al.*, 1992). O RE é um importante indicador da resposta hormonioterapia em pacientes com carcinomas avançados ou recidivas (Howell *et al.*, 1984; Bezwoda *et al.*, 1991). Cerca de 78 a 80% dos tumores com receptores hormonais respondem ao tratamento com hormônios e a perda dos receptores nas recidivas e metástases geralmente tem pior resposta ao tratamento endócrino (Kuukasjarvi *et al.*, 1996).

1.5.2 O produto do gene HER2/neu (c-erbB-2)

O gene HER2/neu (c-erbB-2) é um membro da família do oncogenes tironino-quinase, que codifica uma glicoproteína trans-membrana bastante similar ao fator de crescimento epidérmico. Em tecidos humanos a expressão do c-erbB-2 é associado com adenocarcinomas, especialmente o mamário (Yokota *et al.*, 1986; Zhou *et al.*, 1987). Uma das vantagens de se estudar o c-erbB2 é o que os resultados de imunohistoquímica são plenamente comparáveis aos obtidos por técnicas de biologia molecular. Isto mostra que a expressão do c-erbB-2 está quase sempre relacionada com a mutação no gene.

Com todos os indicadores de prognóstico, a expressão de c-erbB-2 em carcinomas da mama apresenta resultados contraditórios. O Consenso do Colégio Americano de Patologistas de 1999 coloca a expressão do c-erbB-2 na categoria 2, ou seja, daqueles que já foram extensamente estudados biológica e clinicamente, mas ainda necessitam ser validados por estudos mais abrangentes (Fitzbbons *et al.*, 2000). A maioria dos trabalhos não mostra correlação entre o

tamanho do tumor e a expressão da oncoproteína c-erbB-2 (Tsuda *et al.*, 1990; Battifora *et al.*, 1991; Gasparini *et al.*, 1992; Seshadri *et al.*, 1993; Rosen *et al.*, 1995). Outros trabalhos mostram associação da superexpressão em tumores maiores do que 2 cm (van de Vijver *et al.*, 1988; Rilke *et al.*, 1991) ou 5 cm (Schimmelpenning *et al.*, 1992). Aparentemente o c-erbB-2 não é um bom preditor da ocorrência de metástases linfonodais (van de Vijver *et al.*, 1988; Clark & McGuire, 1991; Gasparini *et al.*, 1992; Schimmelpenning *et al.*, 1992; Seshadri *et al.*, 1993)

Também não há consenso quanto à relação do c-erbB-2 com o grau de diferenciação nuclear ou histológica. Vários trabalhos mostram que a expressão do c-erbB-2 é mais freqüente em tumores poucos diferenciados (Marx *et al.*, 1990; Schimmelpenning *et al.*, 1992), mas outros trabalhos não encontraram tal correlação (van de Vijver *et al.*, 1988; Gasparini *et al.*, 1992; Seshadri *et al.*, 1993; Rosen *et al.*, 1995). Em relação à diferenciação mucinosa, Diab *et al.* (1999) em estudo com 1221 casos de ADDM, encontraram expressão de c-erbB-2 em apenas 4 % dos casos. Já Kato *et al.* (1999) descreveram positividade em 7/16 casos de ADMS e em 11/17 CDIMS.

A controvérsia também se estende em relação da expressão do c-erbB-2 e os receptores hormonais. Alguns autores encontraram maior freqüência de expressão em tumores negativos para os receptores hormonais (Battifora *et al.*, 1991; Seshari *et al.*, 1993), achado não confirmado por outros trabalhos (Gasparini *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 1995)

A expressão de c-erbB-2 como fator prognóstico em pacientes com linfonodos axilares negativos tem sido motivo de muito debate na literatura, mas hoje quase todos os trabalhos são concordantes (Borg *et al.*, 1990; Clark & McGuire, 1991; Rilke *et al.*, 1991; Schimmelpenning *et al.*, 1995). Atualmente, a idéia prevalente é que a expressão de c-erbB-2 não tem valor prognóstico nestas pacientes e assim não teria sentido a sua pesquisa rotineira. Em relação às pacientes com linfonodos axilares comprometidos a importância da expressão de c-erbB-2 como fator prognóstico não está ainda clara. Tsuda *et al.* (1989) relataram intervalo livre de doença menor nas pacientes com tumores c-erbB-2 positivos. Tandon *et al.* (1989) encontraram resultado semelhante inclusive relacionado com sobrevida global. Outros autores não confirmaram esta correlação (Ali *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 1989).

A despeito de toda esta controvérsia acerca da correlação da expressão do c-erbB-2 com os demais fatores prognósticos, uma ampla perspectiva se abre na seleção de pacientes a serem submetidas a uma nova estratégia terapêutica com o uso de anticorpos contra tumores que expressam c-erbB-2, cujos resultados são muito promissores.

1.5.3 O gene TP53 e a expressão da proteína p53

Um marcador dos mais importantes que tem sido amplamente pesquisado é a proteína p53. O gene TP53 está localizado no cromossomo 17, sendo que mutações deste gene são a mais comum alteração em neoplasias humanas. Mais do que 50% de todos os tumores apresentam mutações no gene TP53. De fato, a maior função do gene TP53 é prevenir que as células com

genoma defeituoso consigam se perpetuar. A proteína codificada por este gene é conhecida como proteína p53. Esta localizada no núcleo e sua função é controlar a transcrição de outros genes. Este é o produto que se identifica na reação imunohistoquímica. Em condições normais, a proteína p53 tem vida média extremamente curta. A função desta proteína é parar a célula que entre em ciclo celular na fase G1, pouco antes do início da síntese do DNA. Desta forma, os mecanismos reparadores do DNA têm tempo de corrigir os defeitos intrínsecos do DNA. Se estes mecanismos não forem efetivos, a proteína p53 funcionará como sinal para a indução da apoptose. Quando o gene p53 está mutado, a proteína defeituosa não mais é capaz de parar o ciclo celular. É importante realçar que a expressão da proteína p53 por imunohistoquímica nem sempre indica mutação do gene. A interação com outros produtos de oncogenes podem fazer com que esta proteína seja acumulada e tenha uma vida média mais longa, resultando em expressão imunohistoquímica.

A primeira descrição da associação dos carcinomas mamários com a proteína p53 foi realizada em 1982, onde sua expressão foi correlacionada com a presença de metástases (Crawford *et al.*, 1982). Desde então são inúmeros os trabalhos correlacionando a expressão da proteína p53 com o comportamento biológico dos carcinomas ductais. Fitzgibbons *et al.* (2000) colocam a expressão da proteína p53 na mesma categoria do c-erbB-2, ou seja, daqueles marcadores que já foram extensamente estudados mas que necessitam ainda comprovar sua importância em estudos mais abrangentes. Cerca de 35% dos carcinomas mamários expressam a proteína p53 por imunohistoquímica. Seu valor como marcador prognóstico está bem estabelecido naqueles casos com metástase linfonodal axilar, enquanto que nos casos com linfonodos axilares

negativos seu valor é muito debatido na literatura. Vários outros estudos têm mostrado que a expressão da proteína p53 é aumentada em tumores com alto índice proliferativo e aneuploidia. Silvestrini *et al.* (1993) mostraram que a incorporação de timidina pelas células tumorais é maior em carcinomas que expressam proteína p53. A correlação positiva entre as expressões de proteína p53 e Ki-67 foi demonstrada por outros estudos (Barbareschi *et al.*, 1992; Bosari *et al.*, 1992; Isola *et al.*, 1992), mas há também estudos que negam esta relação (Walker *et al.*, 1991). Tumores aneuplóides consistentemente expressam maior índice de proteína p53 (Allred *et al.*, 1992; Bosari *et al.*, 1992; Isola *et al.*, 1992).

Há diferenças de expressão da proteína p53 em relação aos tipos histológicos. Os carcinomas tubulares, papilíferos e mucinosos têm menor expressão de proteína p53 quando comparado com os carcinomas ductais infiltrantes (Marchetti *et al.*, 1993), e o máximo de expressão ocorre nos carcinomas medulares (Poller *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 1995). Também carcinomas com alto grau nuclear apresentam maior frequência de expressão da proteína p53 (Bosari *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 1995) e esta correlação é também observada em relação aos graus histológicos (Walker *et al.*, 1991; Barbareschi *et al.*, 1992; Bosari *et al.*, 1992; Poller *et al.*, 1992). A superexpressão da proteína p53 é mais comum nos carcinomas que são RE negativos, sendo que quase todos os trabalhos da literatura são concordantes com este ponto (Walker *et al.*, 1991; Bosari *et al.*, 1992; Isola *et al.*, 1992; Mazars *et al.*, 1992; Thopson *et al.*, 1992; Silvestrini *et al.*, 1993; Rosen *et al.*, 1995).

Os ADDM apresentam menor frequência de expressão de proteína p53 do que os casos definidos como CDI SOE. Kato *et al.* (1999) relataram que nenhum dos 16 ADMS estudados expressaram proteína p53 e dos 17 casos de CDIDM somente 1 tumor em 17 analisados foi positivo. Casos de ADMS com expressão de proteína p53 podem apresentar comportamento mais agressivo. Di Palma *et al.* (1999) relataram um caso pouco usual de uma paciente de 30 anos de idade com ADMS clássico, mas com metástases em 15 linfonodos axilares de padrão de carcinoma indiferenciado. O estudo de mutação do gene p53 mostrou que tanto o tumor primário como as metástases apresentavam alterações no códon 248, resultado consistente com origem monoclonal de ambos os tumores. Este dado levanta a possibilidade de utilizar-se as alterações do gene p53 como indicadoras de mau prognóstico nos ADMS.

1.5.4. O produto do oncogene bcl-2

O produto do oncogene bcl-2 é uma proteína de 26 kd que tem efeito inibitório em relação a apoptose. O gene bcl-2 foi descrito como um oncogene celular que está envolvido na programação da morte celular porque codifica uma proteína que inibe a apoptose, prolongando a sobrevivência celular (Barbareschi *et al.*, 1996). Sua primeira descrição como importante na patogênese de neoplasias humanas foi relacionada com os linfomas foliculares, cuja produção estava relacionada com a translocação t (14;18). A proteção contra a apoptose exercida pela proteína bcl-2 depende do balanço com outras proteínas reguladoras como bad, bax e bag-1. A proteína bcl-2 inibe apoptose através de função mitocondrial e regulando o nível de cálcio intracelular.

Estudos recentes mostram a relação da expressão protéica com a produção de esteróides. No câncer de mama a expressão da oncoproteína bcl-2 está associada com tumores de baixo grau histológico e com receptores hormonais positivos (Eissa *et al.*, 1999, Holmqvist *et al.*, 1999; Rochaix *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Outro dado interessante é que as áreas de carcinoma *in situ* expressam mais frequentemente proteína bcl-2 do que as áreas de carcinoma infiltrativo, indicando talvez que o crescimento celular por parada da apoptose é um evento precoce no desenvolvimento do CDI SOE (Nakapoulou *et al.*, 1999). Todavia, carcinomas intraductais de alto grau, como o comedocarcinoma, geralmente não expressam proteína bcl-2 (Zolota *et al.*, 1999).

O valor da expressão da oncoproteína bcl-2 como indicador prognóstico tem sido observado em alguns trabalhos. O consenso do Colégio Americano de Patologia recentemente classificou a oncoproteína bcl-2 como dentro daqueles fatores não suficientemente estudados para terem demonstrado seu valor como indicador prognóstico (Fitzgibbons *et al.*, 2000). Em outro estudo de 175 carcinomas de mama, apenas o número de linfonodos comprometidos e a expressão de bcl-2 tiveram significância estatística na análise multivariada (Le *et al.*, 1999). Bankfalvi *et al.* (2000) mostraram que a não-expressão da oncoproteína bcl-2 foi um fator prognóstico independente, sendo que quando havia o padrão bcl-2-/p53+, estes tumores apresentavam pior comportamento. Nakopoulou *et al.* (1999) encontraram que tumores com expressão de proteína bcl-2 tiveram melhor comportamento e este resultado foi independente da expressão de proteína p53. Em pacientes menopausadas e com linfonodos

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

ANA MARIA R. A. KUNINARI
Coordenadora de Pós-Graduação

axilares com metástases, a expressão de oncoproteína bcl-2 foi melhor discriminante prognóstico do que o tamanho do tumor (Jalava *et al.*, 2000).

A expressão de bcl-2 por células tumorais *in vitro* correlacionou-se com a resistência a drogas como a mitomicina C, o 5-fluoracil, adriamicina, cisplatina e ciclofosfamida em 177 casos de carcinomas mamário humano em histoculturas (Yang *et al.*, 2000). Elledge *et al.* (1998) relataram que a expressão da proteína bcl-2 está associada à boa resposta hormonal. Além disso, seu valor discriminante prognóstico foi melhor quando se consideram as pacientes submetidas a tratamento sistêmico (Barbareschi *et al.*, 1996). Jalava *et al.* (2000) encontraram relação entre a expressão de proteína bcl-2 em pacientes menopausadas e com linfonodos metastáticos com a não-resposta à hormonioterapia. Todavia, Hamilton & Picard (2000) revendo os resultados de estudos *in vivo*, concluíram que não há evidências suficientes para que a expressão de bcl-2 seja um guia para a seleção de pacientes a serem submetidos a hormônio, quimio ou radioterapia.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Considerando-se as colocações da literatura atual, os objetivos do presente trabalho são:

1. Estudar comparativamente os adenocarcinomas com diferenciação mucinosa com os carcinomas ductais infiltrantes sem outras especificações em relação à expressão imunohistoquímica de:
 - 1.1. diferenciação neuroendócrina;
 - 1.2. receptores hormonais;
 - 1.3. oncoproteína relacionada ao gene c-erbB-2;
 - 1.4. proteína p53;
 - 1.5. oncoproteína relacionada ao gene bcl-2.
2. Comparar os carcinomas mucinosos puros com aqueles que apresentam diferenciação mucinosa e componente ductal invasivo em relação aos indicadores morfológicos tradicionais e expressão imunohistoquímica conforme descrito abaixo:

- 2.1. Faixa etária;
- 2.2. Estado hormonal;
- 2.3. Tamanho do tumor;
- 2.4. Estadiamento clínico-patológico
- 2.5. diferenciação neuroendócrina;
- 2.6. receptores hormonais;
- 2.7. oncoproteína relacionada ao gene c-erbB-2;
- 2.8. proteína p53;
- 2.9. oncoproteína relacionada ao gene bcl-2.

3. Estudar a sobrevida comparada dos três grupos de estudos, ou seja, os carcinomas mucinosos puros, os carcinomas ductais invasivos com diferenciação mucinosa e os carcinomas ductais invasivos sem outras especificações.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. Material e Métodos

III.1. Caracterização da amostra

Sessenta e cinco casos cujos laudos registravam o diagnóstico de carcinoma mucinoso da mama foram recuperados do arquivo médico da Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A C Camargo, correspondendo o período de 1980 a 1997. Destes foram excluídos os casos dos quais não foram localizadas as lâminas ou os blocos de parafina. Casos de pacientes sem história médica completa no prontuário foram igualmente descartados. Em decorrência destes critérios foram excluídos 21 casos. Finalmente, foram excluídos 2 casos de carcinoma mucinoso em homem por considerar-se que esta é uma patologia diferente, já que a mama masculina não sofre o bombardeamento hormonal mensal como na mulher (Tan *et al.*, 1997). Portanto, para o estudo restaram 42 casos cujos parâmetros histopatológicos e clínicos eram avaliáveis.

Para o estudo clínico foi criada uma ficha clínica de cada paciente contendo os seguintes dados: idade, sexo, estado hormonal e estágio pelo sistema TNM (ver referência). Para o efeito de avaliação do comportamento biológico foram consideradas quatro datas: a data da mastectomia, que foi escolhida como data inicial para o cálculo da sobrevida, a data do óbito escolhido como sendo a data final na curva de sobrevida, a data do último seguimento, sendo considerado apenas os casos com no mínimo três anos de

seguimento e a data da primeira metástase. Cumpre realçar que na época não era realizada quimioterapia neoadjuvante e todo caso abordado por biópsia fora do hospital era submetido a radioterapia prévia.

Não foi anotado o uso de quimioterapia pois o arsenal terapêutico da época não incluía antracíclicos, tendo a maioria das pacientes recebido o esquema CMF (ciclofosfamida, metotrexate e fluorouracil) de maneira adjuvante ou terapêutica. Como nossa pesquisa não pretende comparar resultados terapêuticos com diferentes drogas antineoplásicas, não foram incluídos estes dados na pesquisa.

Para cada caso de ADDM foi escolhido um caso controle de CDI SOE da mesma idade, estado hormonal e TNM do ano subsequente a fim de permitir a comparação deste tipo histológico com o clássico carcinoma ductal.

III.2. Estudo morfológico tradicional

Os 42 casos selecionados foram revistos pelo mesmo patologista. Os respectivos blocos de parafina foram cortados sendo a primeira lâmina corada pela técnica tradicional de hematoxilina e eosina para efeito de classificação. Um dos blocos significativos foi escolhido e cortes subsequentes deste bloco de parafina foram reservados para o estudo imunohistoquímico conforme técnica descrita no tópico seguinte.

No presente estudo, um tumor foi considerado como adenocarcinoma mucossecretor (ADMS) se pelo menos 75% da área tumoral representada na

histologia era constituído por mucina extracelular (Figuras 1 e 2). Outro critério é que não houvesse área infiltrativa de CDI usual. A presença de carcinoma intraductal de qualquer padrão histológico não foi considerado critério para exclusão. Um segundo grupo foi caracterizado como carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa (CDIDM) como aquele tumor onde mais do que 33% do tumor eram constituídos por mucina extracelular, mas que havia parte da neoplasia constituída por CDI usual (Figuras 3 e 4).

A quantificação da mucina extracelular foi realizada na área tumoral sendo desprezado o estroma adjacente. A quantificação da mucina foi estabelecida pela observação de 20 campos de médio aumento (objetiva de 16x, ocular de 10x). Utilizou-se uma ocular estequiométrica de 25 pontos, perfazendo portanto 500 pontos. Neste tipo de ocular foram consideradas áreas mucossecretoras as quais a interseção com o ponto do quadrículo acontecia com o aspecto histológico característico da mucina. Todas as demais áreas, cuja coincidência com o reticulado não correspondeu à este aspecto, foram consideradas negativas. O resultado foi expresso em porcentagem de mucina por área tumoral.

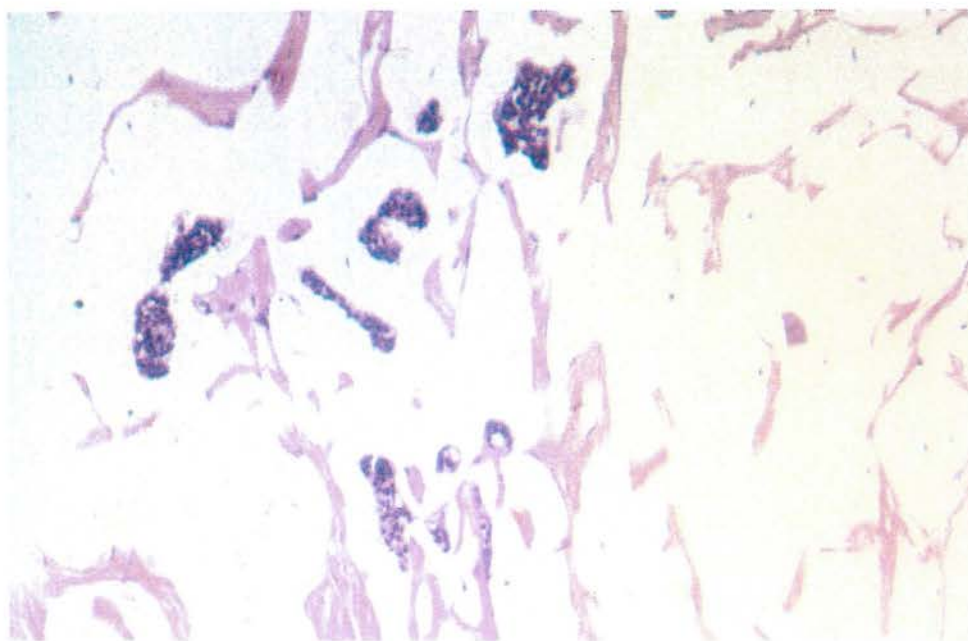


Figura 1: Adenocarcinoma mucossecrator – pequenos blocos de células neoplásicas em meio a matriz mucinosa



Figura 2: ADMS – pequenos blocos celulares com secreção de muco intracelular em meio a grande quantidade de matriz de mucina.

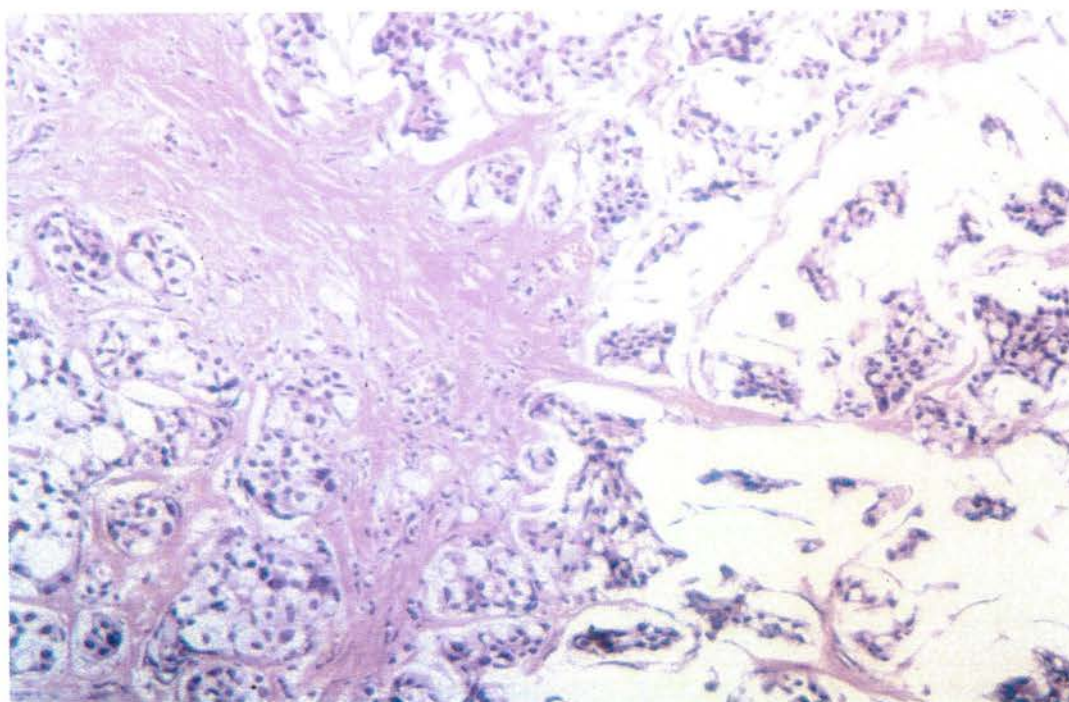


Figura 3: CDIMS – microfotografia demonstrando área com diferenciação mucinosa à direita, com foco de carcinoma ductal infiltrante SOE à esquerda

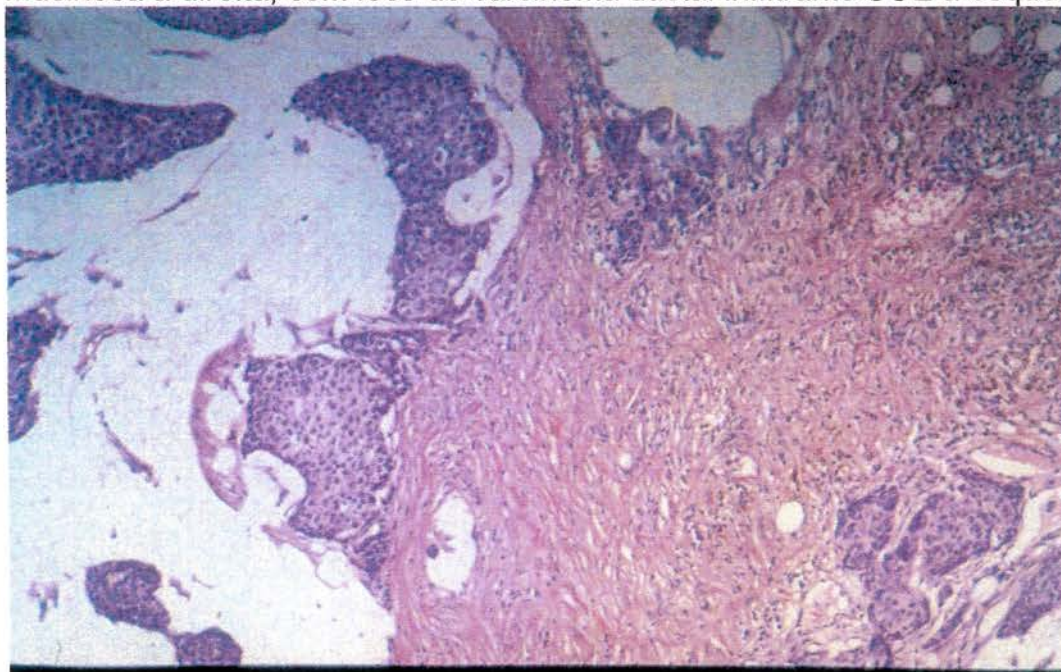


Figura 4: CDIDM – Neoplasia composta com diferenciação mucinosa à esquerda e com foco de carcinoma ductal infiltrante à direita

III.3. Estudo imunohistoquímico

O estudo imunohistoquímico analisou a expressão dos receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), oncoproteína p53 (p53), produto do oncogene HER2/neu (c-erbB-2), oncoproteína ligada à apoptose bcl-2 (bcl-2) e marcadores neuroendócrinos: cromogranina A (CrA), enolase neurônio-específica (NSE) e sinaptofisina (SNF). As reações foram realizadas pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO). Os passos técnicos realizados foram os já tradicionalmente descritos na literatura e podem ser vistos em livros texto e são descritos brevemente adiante (Santos *et al.*, 1999).

Os anticorpos estudados foram todos provenientes da firma DAKO. Os clones utilizados foram 1D5 (DAKO M7047), 1A6 (DAKO M3259), DO-7 (DAKO M7001), c-erb-B2 (DAKO A485), BCL-2 124 (DAKO M0887), DAK-A3 (DAKO M0869), NSE BBS/NCNI-H14 (DAKQ M0873) e SY38 (DAKO M0776) para o RE, RP, p53, oncoproteína c-erbB-2, oncoproteína bcl-2, CrA, NSE e SNF, respectivamente. As diluições e método de recuperação dos antígenos podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista dos anticorpos utilizados

Anticorpos	Título	Recuperação Antigênica (RA)
Rabbit anti-human c-erbB-2 oncoprotein	1:500	Sem RA
Rabbit anti-neuron specific enolase NSE	1:700	Sem RA
Mouse anti human p53 protein	1:100	Forno de Microondas
Mouse anti Synaptophysin	1:100	Sem RA
Mouse anti human chromogranin A	1:400	Forno de Microondas
Mouse anti human bcl-2 oncoprotein	1:20	Forno de Microondas
Mouse anti human progesteron receptor	1:30	Panela de Pressão
Mouse anti human estrogen receptor	1:50	Panela de Pressão

O método utilizado está resumido a seguir. As lâminas onde os cortes foram colhidos foram previamente revestidas por solução de silano (APTS –

Sigma A3648) diluído a 4% em acetona. Os cortes obtidos foram de 3µm de espessura após microtomia mecânica. Os cortes foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos a recuperação antigênica pelo calor com irradiação por forno de microondas, utilizando-se tampão citrato.

Uma vez preparados os cortes, o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol e reação realizado *overnight* com os anticorpos indicados. As diluições finais de trabalho utilizadas foram de 1/50 para os RE, 1/30 para os RP, 1/100 para a p53 e 1/500 para o c-erbB-2. As reações foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, Sigma®) a 60mg% e contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck®).

As reações sempre foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e dois controles negativos. O primeiro deles era realizado pelo não uso do anticorpo primário e o segundo através da retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação. Todos os protocolos utilizados estão detalhadamente descritos por Santos et al. (1999). Os resultados imunohistoquímicos foram avaliados da forma tradicional, sendo considerado positivo o depósito marrom de DAB. Foram sempre consideradas as áreas de maior expressão (hot spots). Os RE e RP foram considerados positivos quando o núcleo da célula era intensamente corado em mais do que 10% das células tumorais. Como controle positivo interno foi considerado o epitélio mamário adjacente. Do mesmo modo, a expressão da oncoproteína p53 foi considerada positiva quando a coloração

nuclear era evidente em pelo menos 10% das células tumorais. O c-erbB-2 foi considerado positivo quando a coloração das células tumorais foi de padrão membranoso, desenhando os limites das células individualmente, e por consequência, os blocos celulares. Diferenciação neuroendócrina foi considerada quando houve expressão de CrA ou de SNF, acompanhada da expressão de NSE. A expressão isolada de NSE não foi suficiente para a inclusão do caso como de diferenciação neuroendócrina.

Foram utilizados três protocolos na imunohistoquímica: protocolo de reação sem recuperação de antígenos, protocolo utilizando panela de pressão e protocolo utilizando forno de microondas (Vide Tabela 1). No protocolo sem recuperação de antígenos, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (a 3%, 10 volumes) com 4 trocas de 5 minutos cada. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e em seguida com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM em pH 7,4 por 5 minutos. No protocolo utilizando panela de pressão, ferveu-se uma solução de ácido nítrico 10mM com pH 6,0 em panela de pressão destampada e as lâminas foram mergulhadas, lacrando a panela com válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, abaixou-se a válvula de segurança e aguardou-se a pressurização total. Contou-se 4 minutos após este sinal. Deixou-se a panela de pressão sob água corrente por 10 minutos. Destampou-se a panela com as lâminas e deixou-se a temperatura ambiente por mais 10 minutos. As lâminas foram lavadas com água corrente e destilada e procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena e a imersão em solução salina tamponada com fosfatos como para o primeiro procedimento. No protocolo com forno de microondas, as lâminas foram incubadas em solução de ácido

cítrico 10mM pH 6,0 no forno de microondas na potência máxima de 1300 watts, 2 vezes, por 9 minutos cada. Esfriou-se por 20 minutos à temperatura ambiente e as lâminas foram lavadas em água corrente destilada. A seguir procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena e imersão em solução salina tamponada com fosfatos como nos outros dois procedimentos.

Todas as lâminas foram incubadas com anticorpo primário diluído em título estabelecido em tampão salina fosfato (PBS) contendo albumina bovina (BSA) 1% (SIGMA A 9647 USA) e um conservante, a azida sódica (NaN_3) 0, 1% por 16 a 18h a 40 graus Celsius em câmara úmida, a fim de realçar a antigenicidade. O BSA bloqueia os sítios inespecíficos de ligação e diminui a reação de background. Foram lavadas após em tampão PBS com 4 trocas de três minutos cada.

A seguir incubou-se as lâminas com o anticorpo secundário biotinilado-reagente (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (DAKO A/S K492 Denmark) no título estabelecido, diluído em PSB por 30 minutos a 37 graus Celsius. Depois foram lavadas em tampão PBS com 4 trocas de 3 minutos cada. A seguir as lâminas foram incubadas com o complexo-reagente A (Streptavidin) no título estabelecido e reagente B (Biotinylated peroxydase) no título estabelecido diluído em PSB por 30 minutos a 37 graus Celsius. A seguir lavou-se as lâminas em tampão PBS com 4 trocas de 3 minutos cada.

Para revelação as lâminas foram incubadas em solução substrato cromógeno, sensível a luz 3,3" Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 60

mg% (SIGMA D-5637 USA); Dimetilsulfóxido (DMSO) 1ml. que altera a camada de lipídeos facilitando a penetração do cromógeno e preserva as células da cultura intensificando a reação; H2O2 6% (água oxigenada 20 vol) 1ml.; PSB 100ml; por 5 minutos a 37 graus Celsius ao abrigo da luz. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. e desidratadas em etanol 50% (30 segundos). etanol 80% (30 segundos), etanol 95% (30 segundos) e etanol 100% (3 vezes, 30 segundos cada) e enfim xilol 4 vezes (30 segundos cada). Montou-se as lâminas em Permount (Fisher Chemical US SP 15- 500).

III.4. Análise estatística

Para o cálculo da significância dos dados obtidos dos diferentes marcadores biológicos comparando-se inicialmente os ADDM com os CDI SOE. Posteriormente foram testados os resultados comparativos entre os dois subtipos de ADDM, ou seja, os ADMS versus os CDIDM. Para tal foi realizado o teste exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado. Para o cálculo de sobrevida, usamos o teste de Kaplan-Meyer.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV. 1. Compilação dos dados

Todos os resultados compilados podem ser vistos no anexo 1. Este demonstra a lista descritiva dos dados coletados. Os resultados serão sempre apresentados inicialmente como dois grupos, comparando os 42 casos de adenocarcinomas com diferenciação mucinosa (ADDM) versus os 42 casos de carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações (CDI SOE). Posteriormente, o grupo de diferenciação mucinosa foi dividido em dois grupos diferentes com 21 casos de adenocarcinoma mucossecretor puro (ADMS) e outros 21 casos de carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa focal (CDIDM).

IV.2 Caracterização da amostra

IV.2.1. Idade

A análise da distribuição dos casos de acordo com a idade pode ser vista na Tabela 2, que apresenta a idade média+desvio-padrão da média e a mediana dos grupos estudados. Cumpre realçar que os casos do grupo CDI SOE foram selecionados a partir dos casos com diferenciação mucinosa para o pareamento do grupo, portanto não poderia haver diferenças entre os dois grupos. Portanto, a idade deste grupo não representa a média geral da idade dos CDI SOE

escolhido aleatoriamente, mas sim do grupo específico estudado. Não se observou diferença nos resultados em relação à idade quando comparados os ADMS e os CDIMS.

Tabela 2 - Distribuição dos casos em relação à idade em anos

Grupo	Idade Média+/-DP	Variação	Mediana
ADDM (n=42)	60,5+14, 1	33-82	64,5
ADMS (n=21)	60,9+17,7	35-82	65
CDIDM (n=21)	60,2+12,6	33-79	64
CDI SOE (n=42)	58,9+14,1	33-99	59,5

ADMS vs CDIDM: n.s.

Legenda: *ADDM: adenocarcinoma com diferenciação mucínosa; ADMS: adenocarcinoma mucossecretor; CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.: não significante.*

IV.2.2. Estado hormonal

A distribuição dos casos de acordo com o estado hormonal pode ser vista na Tabela 3. À semelhança da idade, os casos de CDI SOE foram coletados pareados com os casos de ADDM, portanto não sendo comparáveis. Dos 42

casos de ADDM, 33 casos estavam na pos-menopausa (79%) e 9 casos na pré-menopausa (21%). Em relação aos dois grupos com diferenciação mucinosa, o estado hormonal era semelhante, não havendo diferenças estatísticas significantes.

Tabela 3 - Distribuição dos casos em relação ao status hormonal

Grupo	Pré-menopausada	Pós-Menopausada
ADDM (n=42)	9 (21%)	33 (79%)
ADMS (n=21)	5 (24%)	16(76%)
CDIDM (n=21)	4 (19%)	17(81%)
CDI SOE (n=42)	9 (21%)	33 (79%)

ADMS vs CDIDM: n.s.

Legenda: *ADDM: adenocarcinoma com diferenciação mucinosa; ADMS: adenocarcinoma mucossecretor; CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.: não significante.*

IV.2.3. Tamanho dos Tumores

Foi possível a avaliação do tamanho dos tumores em seu maior eixo em 79 casos, sendo que em cinco ocasiões este não era mencionado no laudo

anatomo-patológico original O tamanho dos tumores variou entre 1,1cm a 8,5cm, com a média de 4,2+1,7cm. Não houve diferença entre o tamanho dos tumores nos grupos ADMS e CDIDM. A comparação entre os ADDM com os CDI SOE é prejudicada uma vez que estes grupos foram pareados também por estadiamento. Os dados do tamanho tumoral em seu maior eixo estão descritos na tabela 4, com média+desvio padrão da média e mediana.

Tabela 4 - Distribuição dos casos em relação ao tamanho do tumor medidos pelo maior diâmetro

Grupo	Média+DP	Mediana
ADDM (n=38)	4,1+1,7	3,85
ADMS (n=17)	4,1~1,4	3.5
CDIDM (N=19)	4,1+1,9	4
CDI SOE (n=21)	4,2~1,7	4

ADMS vs CDIDM: n.s.

Legenda: *ADDM: adenocarcinoma com diferenciação mucinosa; ADMS. adenocarcinoma ,mucossecretor; CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificaçõesl n.s.: não significante.*

IV.2.4. Estado linfonodal axilar

A tabela 5 e os gráficos 1 e 2 mostram o número de casos conforme o acometimento linfonodal axilar. Do grupo ADDM não foi possível avaliar 3 casos, sendo que destes dois eram de ADMS e um deles do grupo CDIDM. Do grupo CDI SOE, em 4 casos não foi possível avaliar o estado linfonodal. Como se pode observar, a maioria dos casos não mostrou comprometimento linfonodal axilar. Quando foi realizada a comparação entre ADDM e CDI SOE pelo teste exato de Fisher, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p=0,65$). Todavia, a comparação entre os dois grupos com diferenciação mucinosa, a diferença estatística foi marginal, sendo que os ADMS apresentaram menos freqüentemente comprometimento linfonodal metastático ($p=0,054$).

Tabela 5 - Distribuição dos casos em ao estado linfonodal axilar

Grupo	Metástases LNs axilares	LNs axilares não-comprometidos
ADDM (n=39)	17(43,6%)	22 (57,4%)
ADMS (n=19)	5 (26,3%)	14 (73,7%)
CDIDM (n=20)	12(60%)	8 (40%)
CDI SOE (n=38)	19 (50%)	19 (50%)

ADDM vs CDI SOE, p=n.s.; ADMS vs CDIDM, p=0.054

Legenda: ADDM: *adenocarcinoma com diferenciação mucinosa*; ADMS: *adenocarcinoma mucossecretor*. CDIDM: *carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa*; CDI SOE: *carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações*; n.s.: *não significante*.

Gráfico 1: Comprometimento Linfonodal Axilar

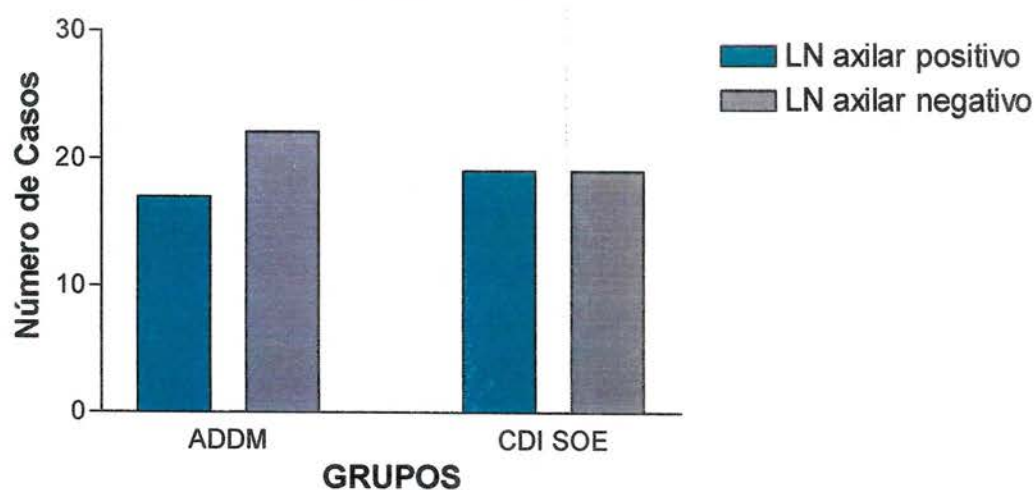
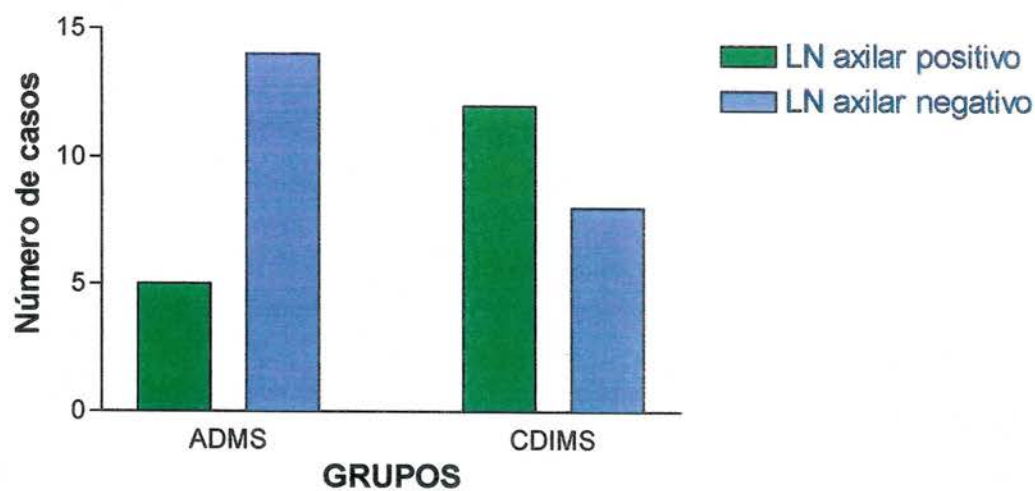


Gráfico 2: COMPROMETIMENTO LINFONODAL AXILAR



IV.2.5. Estadiamento clínico patológico pelo sistema TNM.

A distribuição dos casos de acordo com o estadiamento clínico pode ser visto na tabela 6. Como os casos foram pareados de acordo com o estadiamento clínico, não há como comparar os ADDM e os CDI SOE. Entre os dois grupos com diferenciação mucinosa, os ADMS não se diferenciaram dos CDIDM (gráfico 3). Embora este resultado não seja estatisticamente significativo ($p=0.13$), pode-se notar que os ADMS apresentaram-se em estádios mais precoces. O gráfico 4 mostra quando agrupamos os casos em estádios precoces (estádios I e II) e estádios avançados (estádios III e IV), a diferença estatística aumentou ($p=0,22$)

Tabela 6 - Distribuição dos casos de acordo com estadiamento

Grupo	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
ADDM (n=39)	2	19	18	3
ADMS (n=19)	2	11	08	0
CDIDM (n=20)	0	08	00	3
CDI SOE (n=38)	2	19	18	3

ADMS vs CDIDM, $p=n.s.$

Legenda: *ADDM: adenocarcinoma com diferenciação mucinosa; ADMS: adenocarcinoma mucossecretor, CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.: não significativo.*

Gráfico 3: ESTADIAMENTO

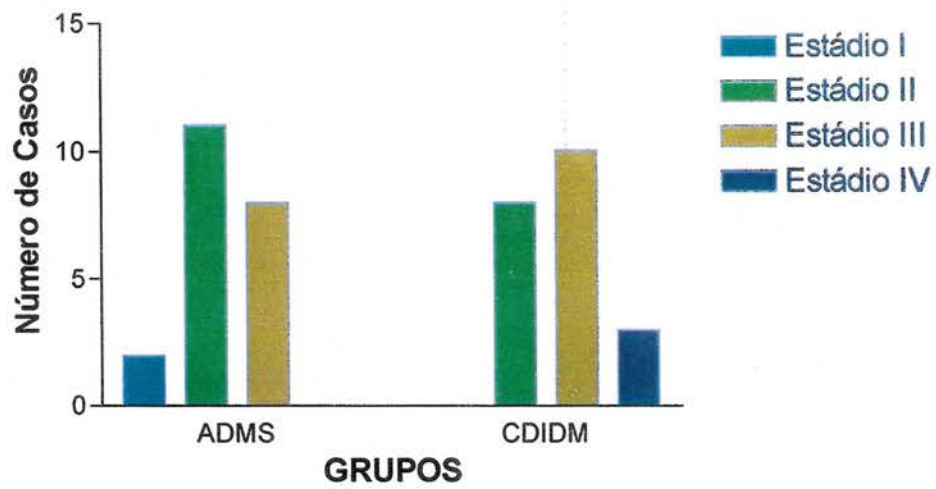
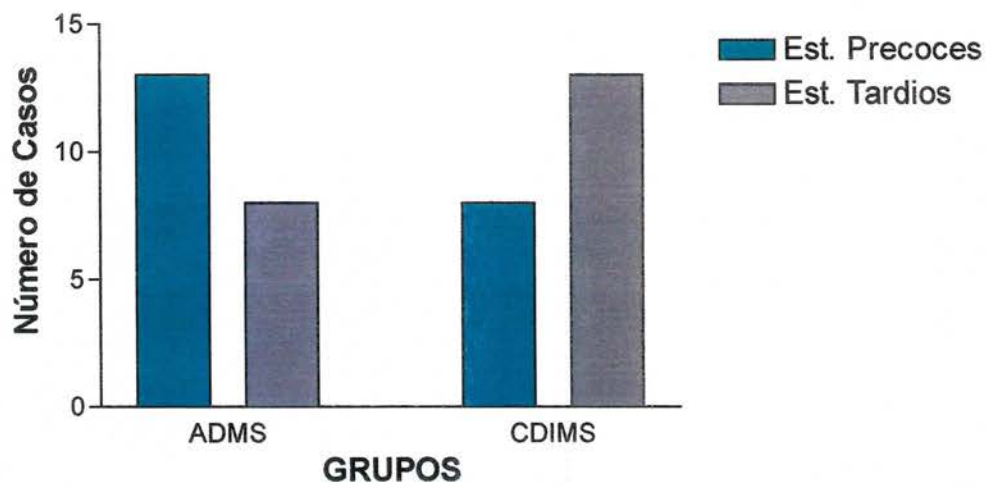


Gráfico 4: ESTADIAMENTO



IV.3. Resultados do estudo imunohistogulmico com os diversos indicadores testados.

IV.3.1. Diferenciação neuroendócrina

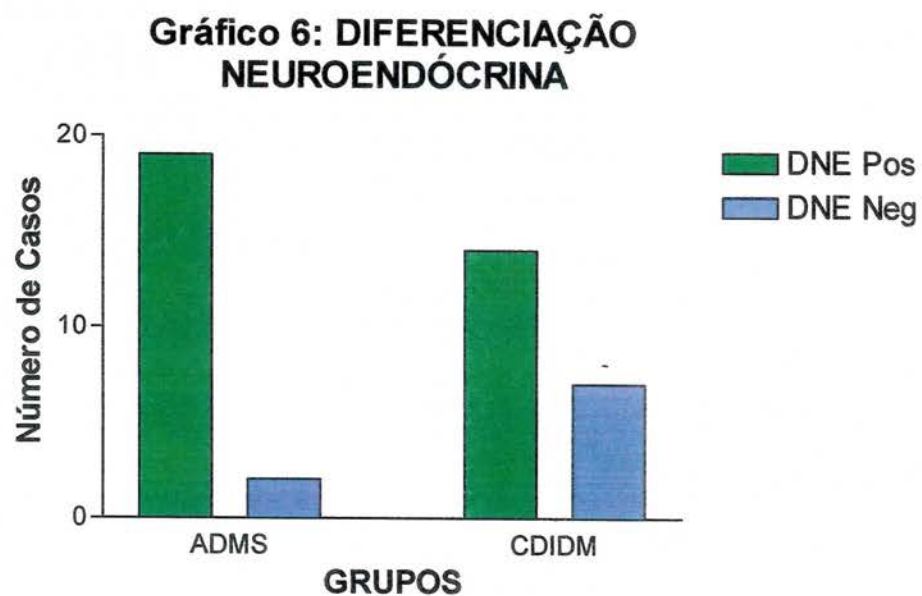
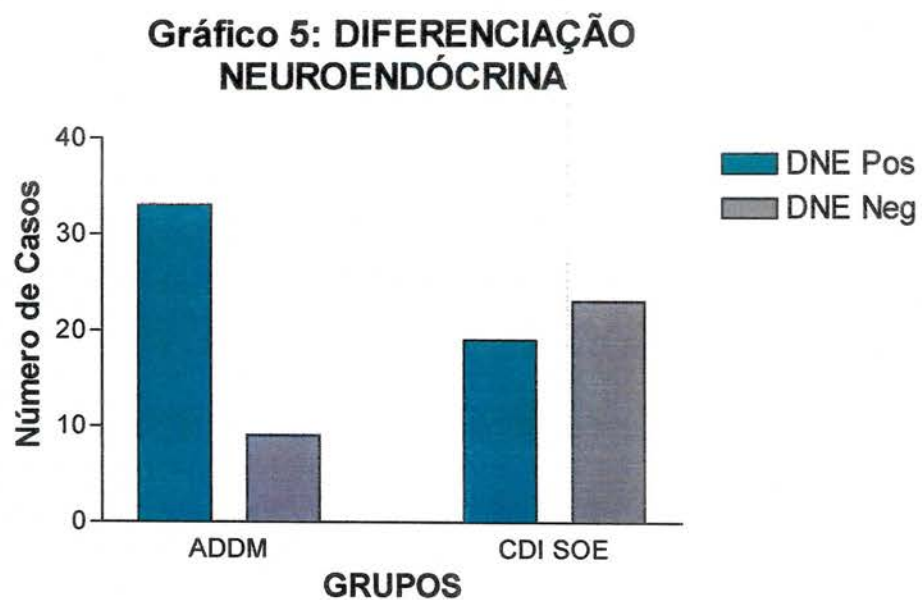
A diferenciação neuroendócrina foi considerada quando houve expressão de CrA ou SNF pelas células tumorais acompanhada da expressão de NSE. A expressão isolada de NSE não classificou o caso como de diferenciação neuroendócrina (DNE). A DNE foi observada em 33 (78,6%) casos de ADDM, sendo que 19/21 (90%) dos ADMS a apresentaram, contra 14/21 (67%) dos CDIDM (gráfico 5). A comparação estatística entre os dois grupos com diferenciação mucinosa não foi significativa ($p=0.13$). Do grupo dos CDI SOE, 19/42 (45%) casos mostraram expressão imunohistoquímica característica da DNE. Quando comparado com o grupo total dos casos com diferenciação mucinosa, o resultado foi estatisticamente fortemente significativo (gráfico 6, $p=0,0032$). A figura 5 mostra a expressão de NSE em um ADMS. As figuras 6 e 7 são relativas a imunoreatividade para sinaptofisina, observada tanto no componente imerso no lago mucoso, como no carcinoma in situ correspondente.

Tabela 7 - Distribuição dos casos em relação à diferenciação neuroendócrina

Grupos	DNE positiva	DNE negativa
ADDM (n=42)	33 (78,6%)	9 (12,4%)
ADMS (n=21)	19 (90%)	2 (10%)
CDIDM (n=21)	14 (67%)	7 (33%)
CDI SOE (n=42)	19 (45%)	23 (55%)

ADMS vs CDIDM, p=n.s.; ADDM vs CDI SOE, p=0.0032

Legenda: DNE: *diferenciação neuroendócrina*; ADDM: *adenocarcinoma com diferenciação mucinosa*; ADMS: *adenocarcinoma mucossecretor*; CDIDM: *carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa*; CDI SOE: *carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações*; não-significante.



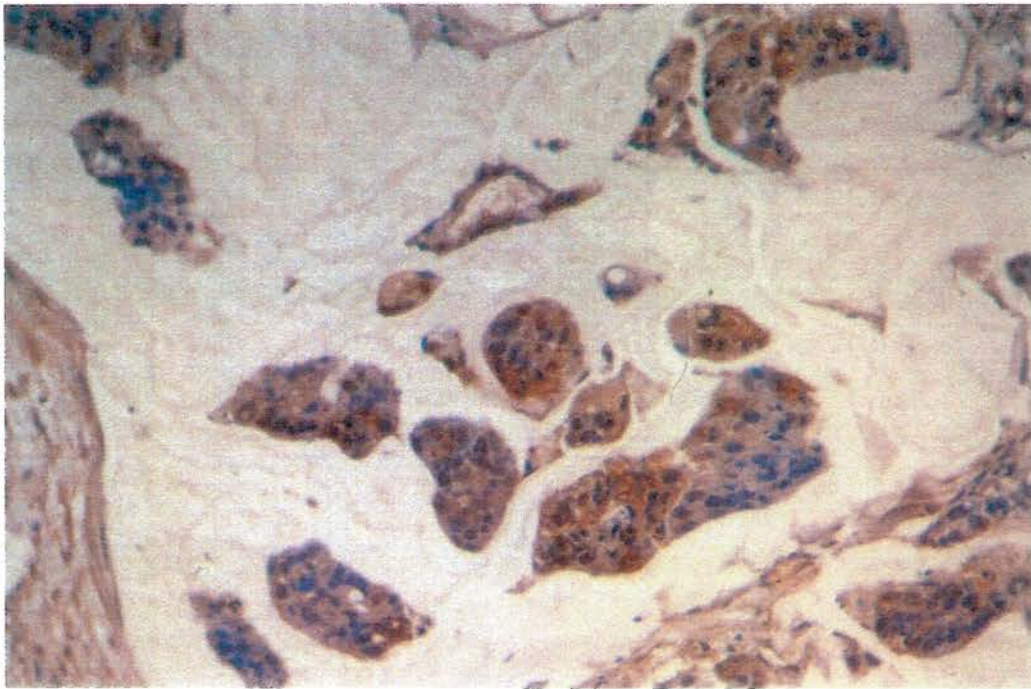


Figura 5: Expressão de enolase neurônio específica em ADMS

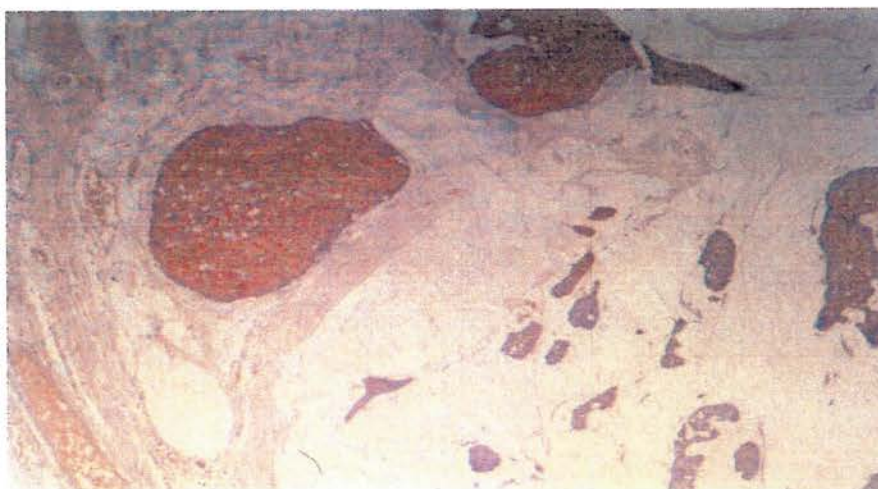


Figura 6: Expressão de sinaptofisina em ADMS. A expressão ocorre tanto no componente *in situ* (à esquerda), bem como no componente celular mucinoso

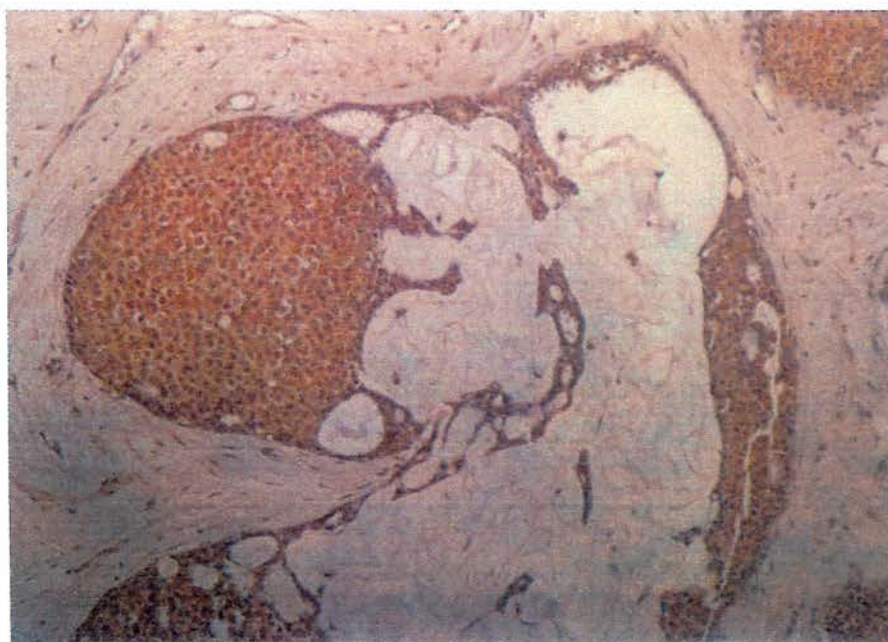


Figura 7: detalhe da expressão de sinaptofina em área de diferenciação mucinosa do carcinoma *in situ*.

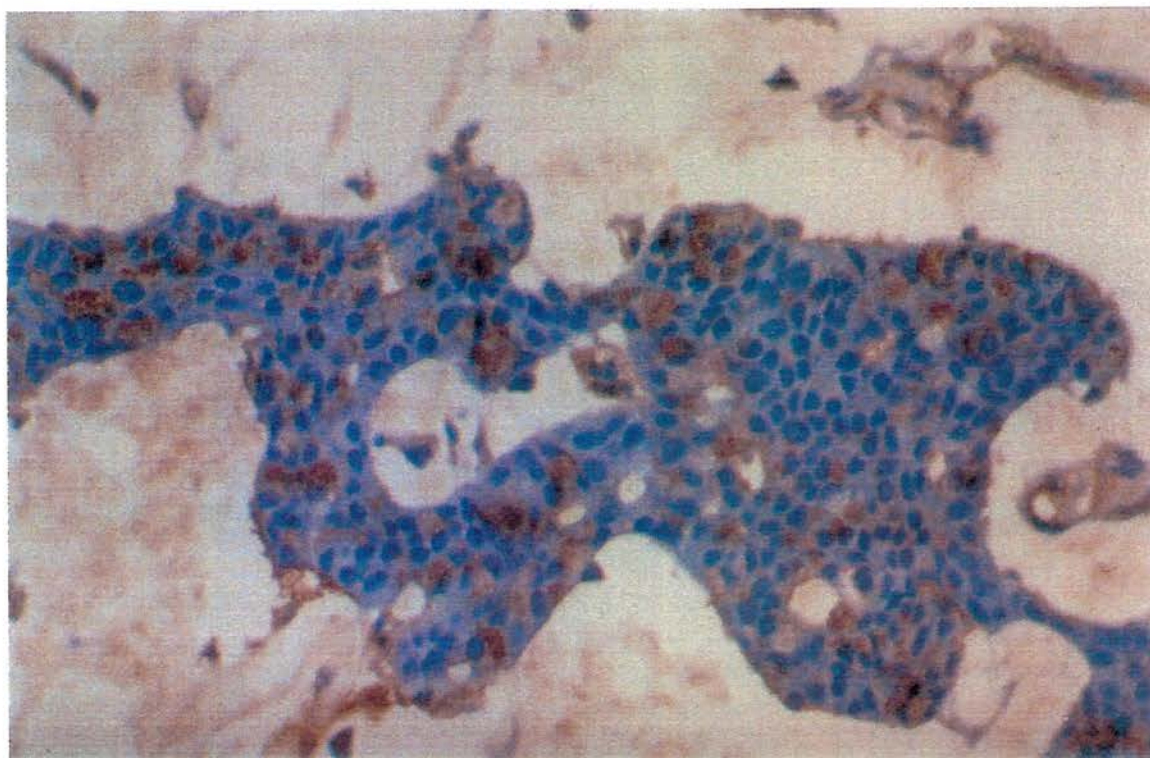


Figura 8: Expressão de cromogranina A em área celular de ADMS. Notar que nem todas as células expressão o marcador, mas a marcação citoplasmática é bastante forte, mesmo no grupo isolado a parte do bloco maior.

IV.3.2. Expressão dos receptores hormonais

A expressão de receptores de estrógeno pelas células tumorais foi significativamente mais presente nos carcinomas com diferenciação mucinosa ($p=0.0084$). A comparação entre os ADMS e os CDIDM não mostrou diferenças ($p=0,10$). Em relação à expressão dos receptores de progesterona não houve a mesma significância. Quando comparamos os ADDM com os CDI SOE ou os dois grupos de diferenciação mucinosa, os resultados não mostraram correlação, embora a diferença entre o ADMS e o CDIDM fosse marginal ($p=0,17$ e $p=0,06$, respectivamente). Estes resultados podem ser observados na Tabela 8 e gráficos 7 a 10. A figura 9 mostra a expressão de RE nos ADMS, enquanto que a figura 10 mostra o padrão usual de positividade nuclear observado nos CDI SOE bem diferenciados. A figura 11 exibe a positividade para RP nos ADMS. A figura 11 demonstra positividade para RP em um caso de CDIDM, sendo que ambos os componentes expressam o marcador.

Tabela 8 - Expressão dos receptores hormonais

Grupo	REpos	RE neg	RP pos	RP neg
ADDM (n=42)	28(67%)	14(33%)	19(45%)	23(55%)
ADMS (n=21)	17(81%)	4(19%)	13(62%)	8 (38%)
CDIDM (N=21)	11(52%)	10(48%)	6 (29%)	15(71%)
CDI SOE (n=42)	15(36%)	27 (64%)	12(29%)	30 (71%)

RE: ADDM vs CDI SOE, $p=0,0084$; ADMS VS CDIDM, $p=0,10$.

RP: ADDM vs CDI SOE, $p=n.s.$; ADMS VS CDIDM, $p=0,06$

Legenda: RE receptores de estrógeno; RP: receptores de progesterona; ADDM: adenocarcinoma com diferenciação mucinosa; ADMS: adenocarcinoma mucossecretor, CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.: não significante

Gráfico 7: Receptores de Estrógeno

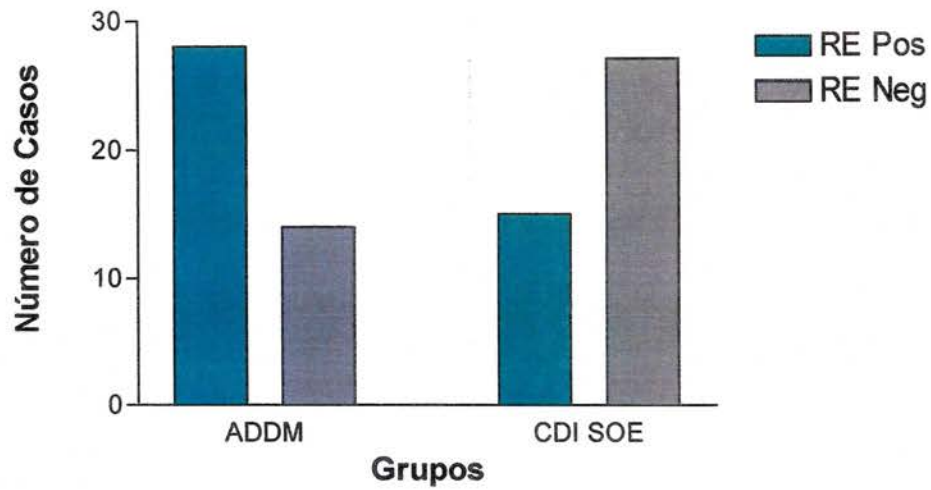
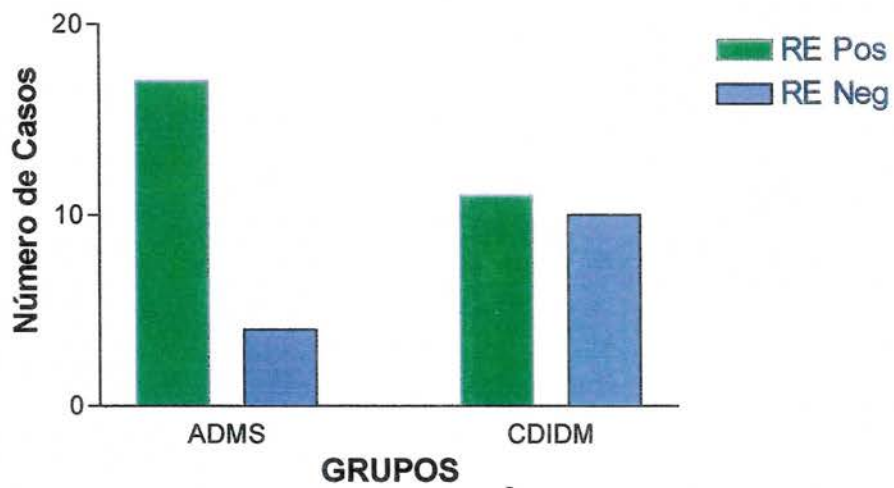


Gráfico 8: Receptores de Estrógeno



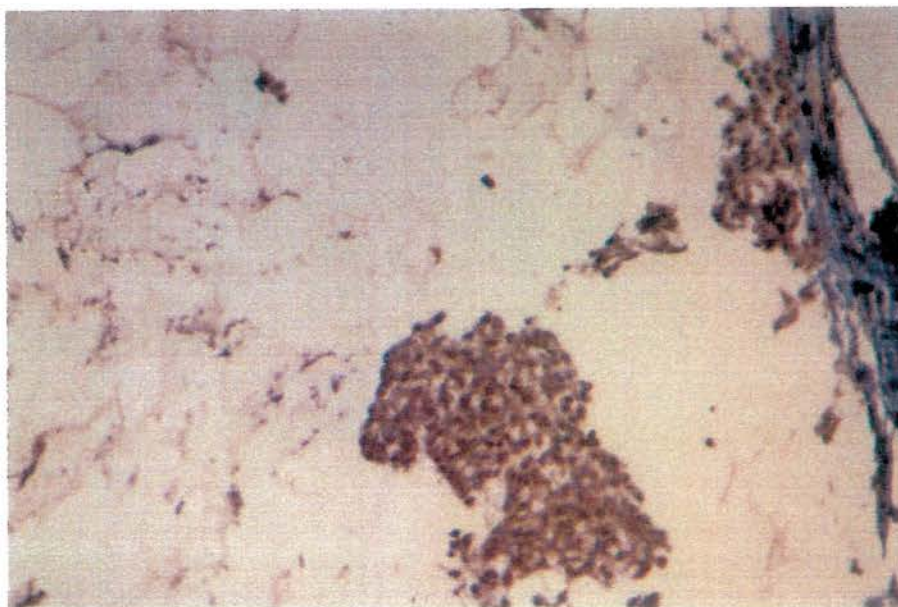


Figura 9: Expressão de receptores de estrógeno em 100% das células de um ADMS

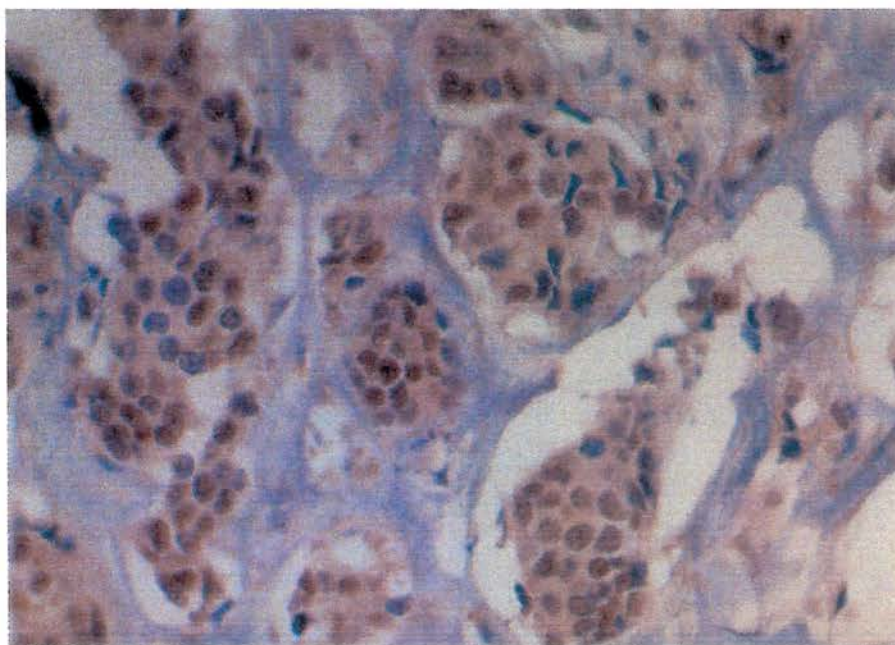


Figura 10: Expressão de receptores de estrógeno em CDI SOE bem diferenciado

Gráfico 9: RECEPTORES DE PROGESTERONA

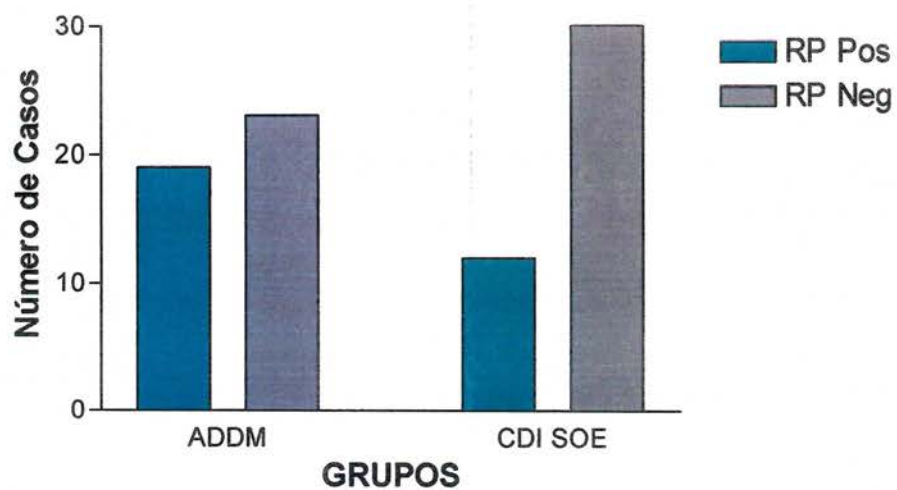
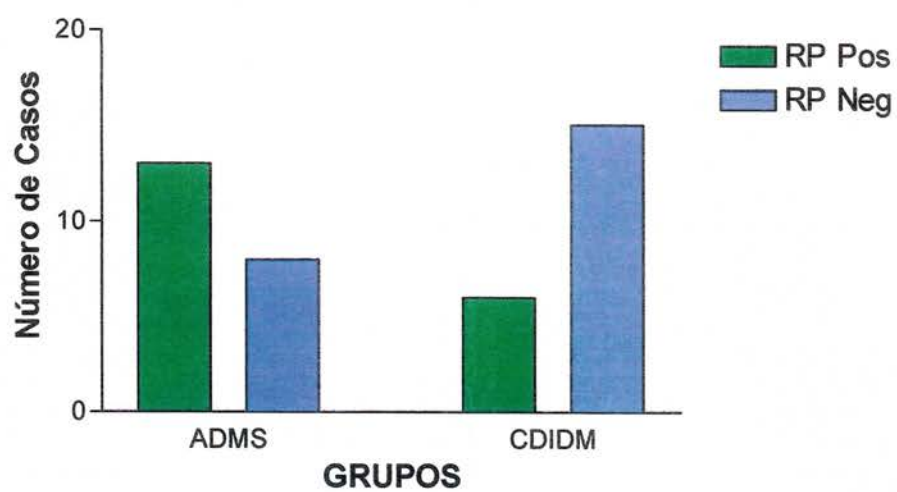


Gráfico 10: RECEPTORES DE PROGESTERONA



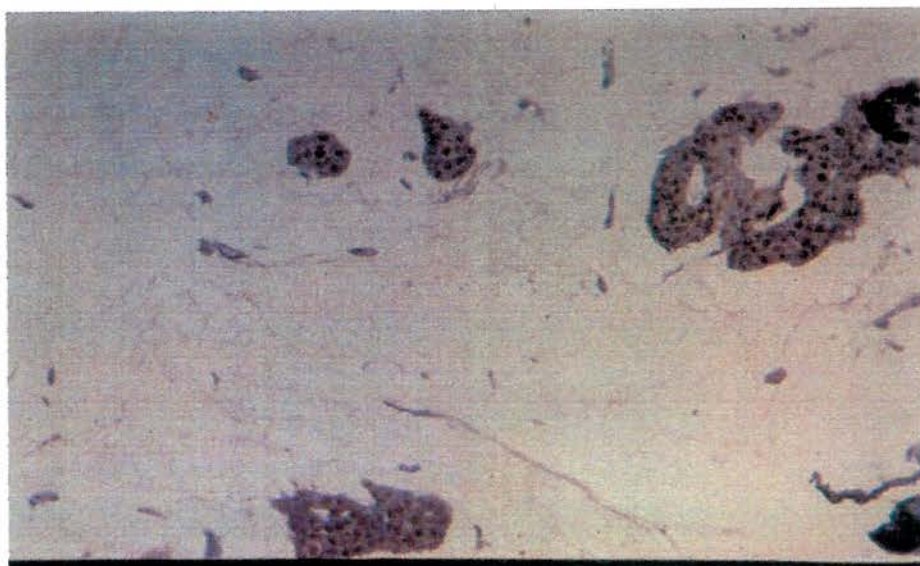


Figura 11: Expressão de RP em ADMS

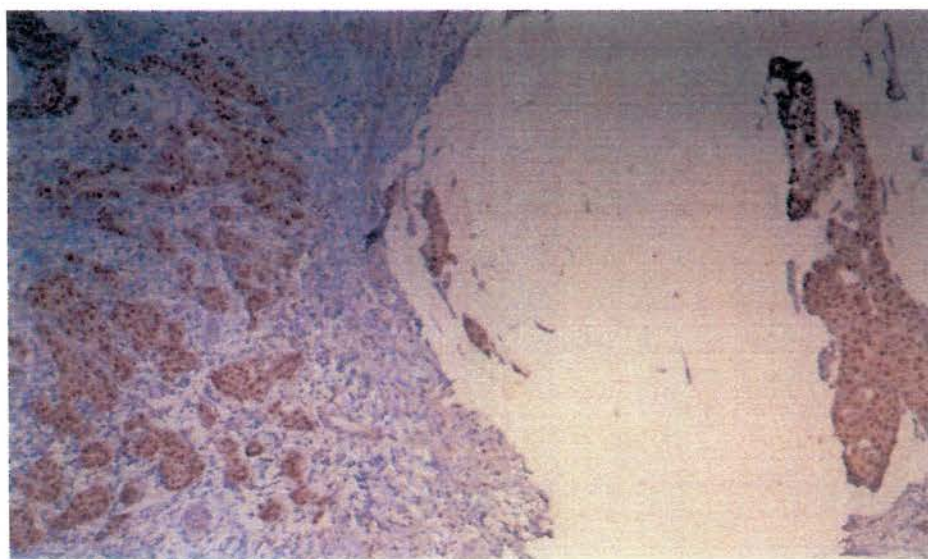


Figura 12: Expressão concomitante dos RO no componente mucinoso e de carcinoma infiltrante em um caso de CDIDM

IV.3.3. Expressão da oncoproteína relacionada com o gene c-erbB-2

Os carcinomas com diferenciação mucinosa expressam menos frequentemente a oncoproteína c-erbB quando comparados com os CDI SOE. Dos 42 casos de ADDM, somente em 5 ocasiões observamos a expressão de membrana da proteína ligada ao gene Her-neu, enquanto que dos 18 dos 42 CDI SOE foram positivos. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,003$). Quando se comparou os ADMS com os CDIMS, não foram observadas diferenças. Estes resultados podem ser vistos na Tabela 9, gráficos 11 e 12. A figura 13 mostra a expressão de c-erbB-2 limitada ao componente invasivo do CDIDM, enquanto que na figura 14 observa-se expressão em ambos os componentes.

Tabela 9 - Distribuição dos casos em relação à expressão da oncoproteína ligada ao gene c-erbB-2

Grupos	c-erbB-2 pos	c-erbB-2 neg
ADDM (n=42)	5(12%)	37 (88%)
ADMS (n=21)	2 (14%)	19(86%)
CDIDM (n=21)	3 (67%)	18(33%)
CDI SOE (n=42)	18(43%)	24(57%)

ADDM vs CDI SOE, $p=0,003$; ADMS VS CDIDM, $p=n.s.$

Legenda: *ADDM: adenocarcinoma com diferenciação mucinosa; ADMS: adenocarcinoma mucossecretor; CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.: não significante.*

Gráfico 11: c-erbB-2

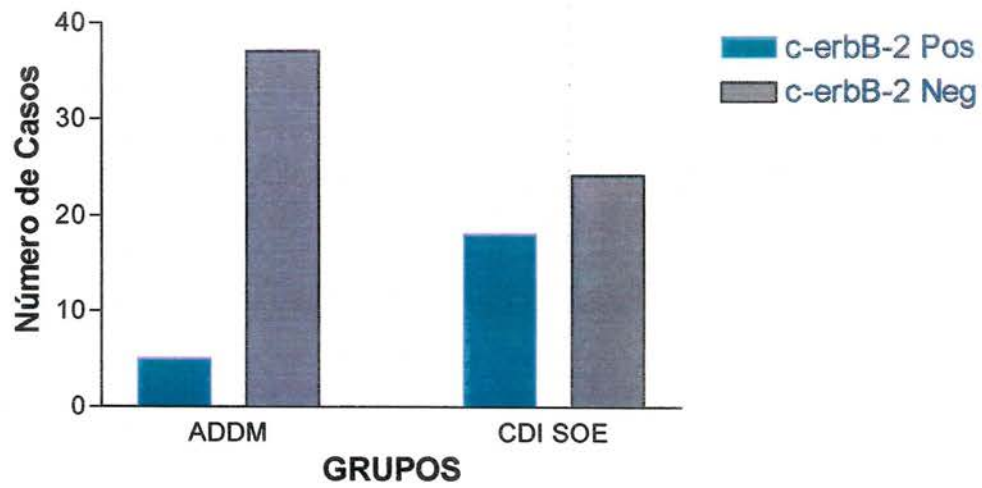
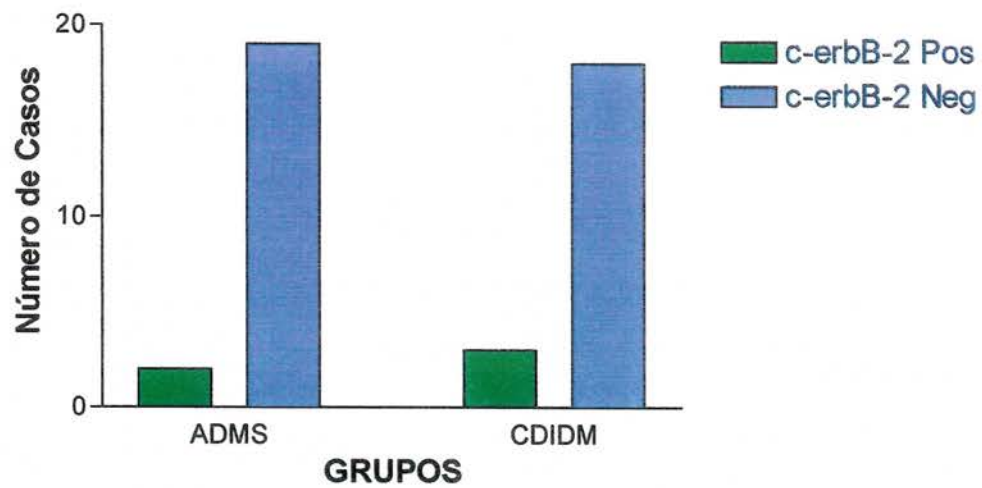


Gráfico 12: c-erbB-2



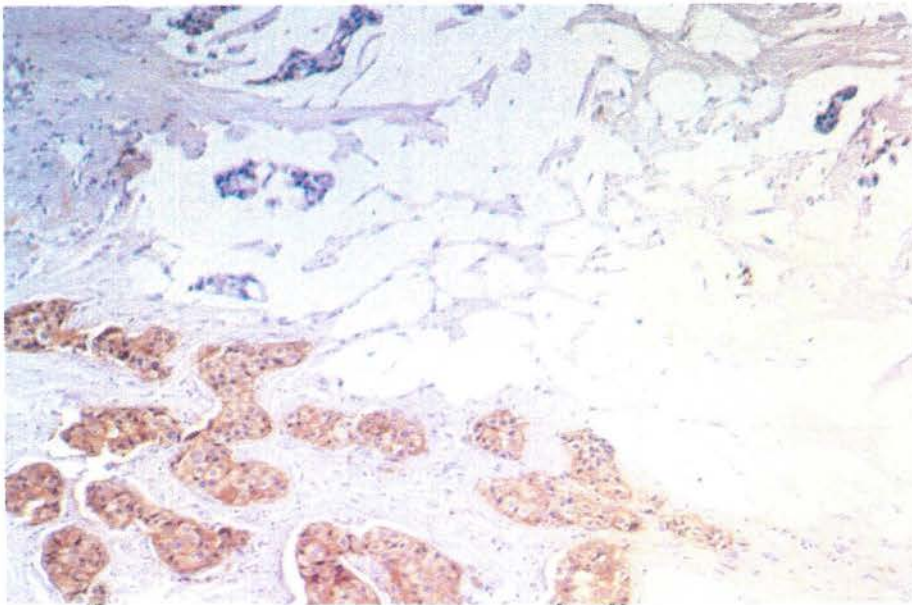


Figura 13: expressão de c-erbB-2 em CDIDM, onde somente o componente invasivo expressa o marcador, sendo negativo no componente mucinoso

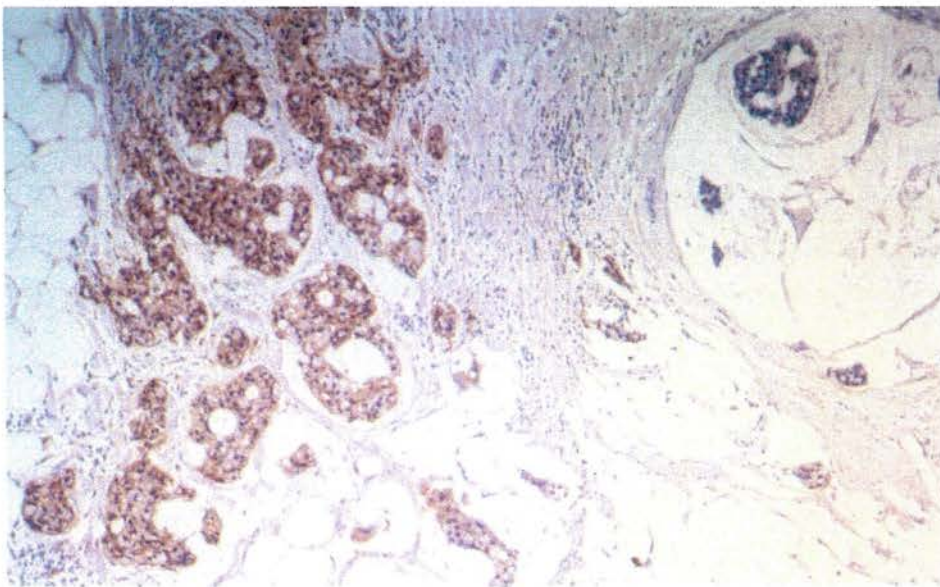


Figura 14: Caso de CDIDM com expressão em ambos os componentes

IV.3.4. A expressão da proteína p53

A expressão da proteína p53 foi mais observada nos CDI SOE do que nos ADDM. Apenas três casos de ADDM expressaram a proteína p53, enquanto que dez casos (24%) do tipo CDI SOE assim o fizeram. Esta diferença apresenta diferença estatística marginal ($p=0.07$). A comparação entre os dois grupos com diferenciação mucinosa não mostrou diferenças, devendo ser considerado o pequeno número de casos que expressaram proteína p53. Os resultados da expressão da proteína p53 podem ser vistos na Tabela 10 e gráficos 13 e 14. A figura 15 é o único caso de ADMS com expressão da proteína p53, enquanto que a figura 16 mostra expressão nos componentes mucinoso e invasivo de um caso de CDIDM.

Tabela 10 - Distribuição dos casos em relação à expressão da proteína p53

Grupos	p53 pos	p53 neg
ADDM (n=42)	3(7%)	39(93%)
ADMS (n=21)	1(5%)	20(95%)
CDIDM (n=21)	2(10%)	19(90%)
CDI SOE (n=42)	10(24%)	32(76%)

ADDM vs CDI SOE, $p=0,07$; ADMS VS CDIDM, $p=n.s.$.

Legenda: *ADDM: adenocarcinoma com diferenciação mucinosa; ADMS. adenocarcinoma mucossecretor; CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.- não significante.*



Gráfico 13: PROTEÍNA p53

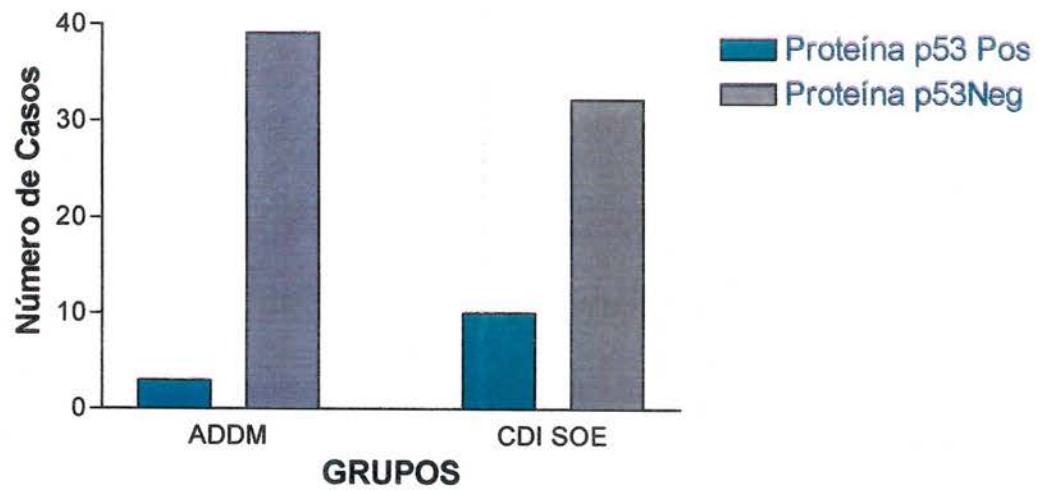
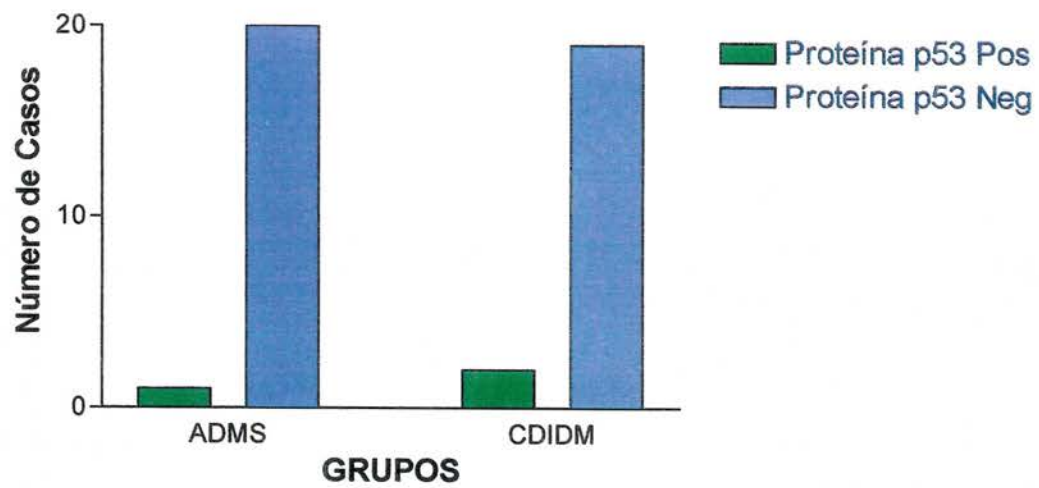


Gráfico 14: PROTEÍNA p53



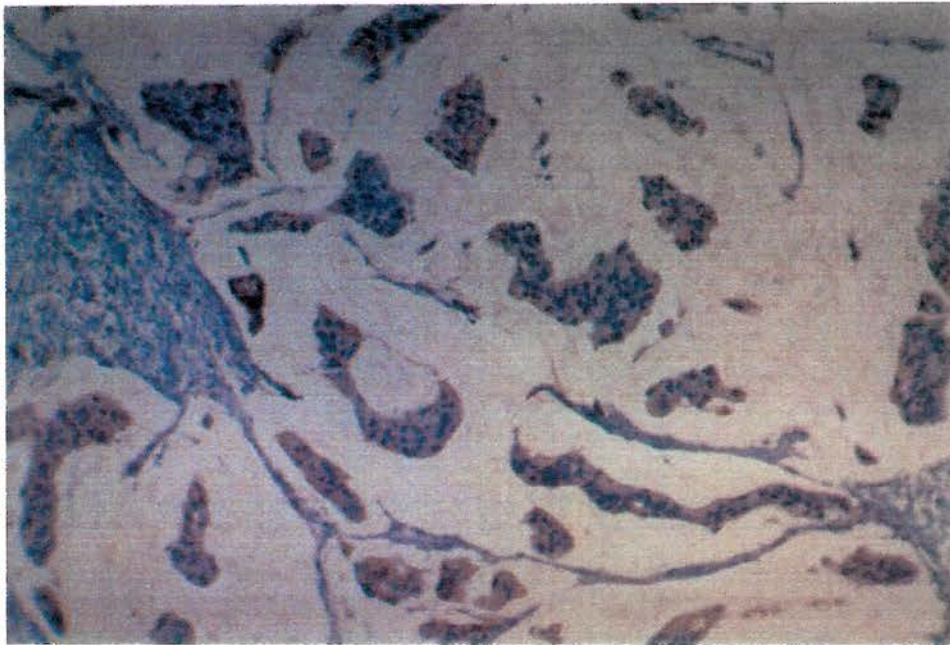


Figura 15: Expressão de proteína p53 em caso de ADMS

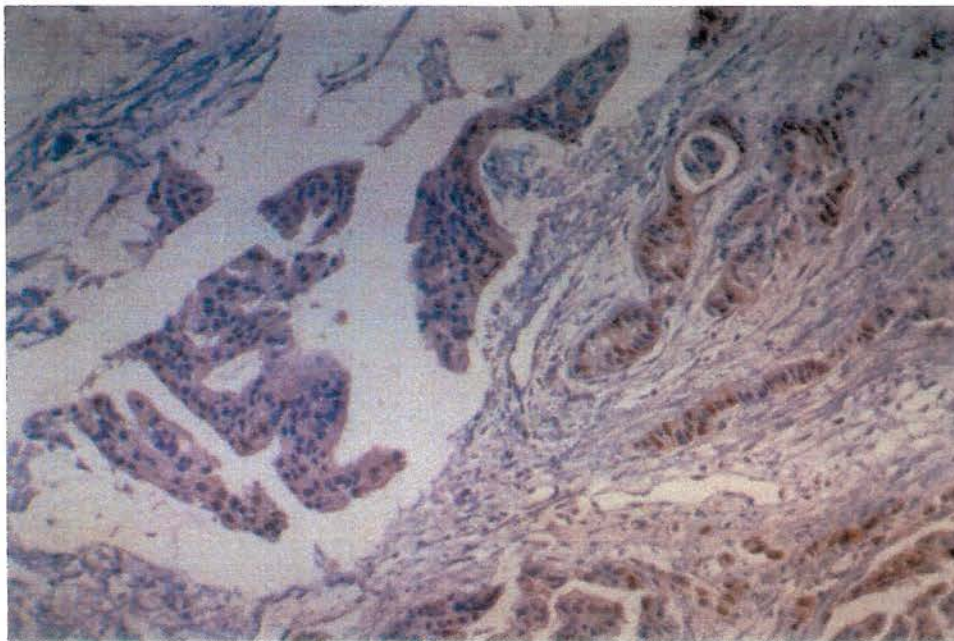


Figura 16: Expressão concomitante de proteína p53 nos componentes mucinoso e invasivo em caso de CDIDM.

IV.3.5.. A expressão da oncoproteína bcl-2

A expressão da oncoproteína bcl-2 em relação aos casos estudados pode ser vista na Tabela 11 e gráficos 15 e 16. Os ADDM expressaram mais freqüentemente este indicador quando comparados com o CDI SOE ($p=0,026$). Dos 42 casos de ADDM, 23 (55%) foram positivos para oncoproteína bcl-2, enquanto que apenas 12 casos (29%) de CDI SOE mostraram reação. A comparação entre os dois grupos com diferenciação mucinosa não mostrou diferença estatística. A expressão da oncoproteína bcl-2 nos ADMS é exemplificada na figura 17, enquanto que a figura 18 mostra um caso de CDI SOE expressando o marcador.

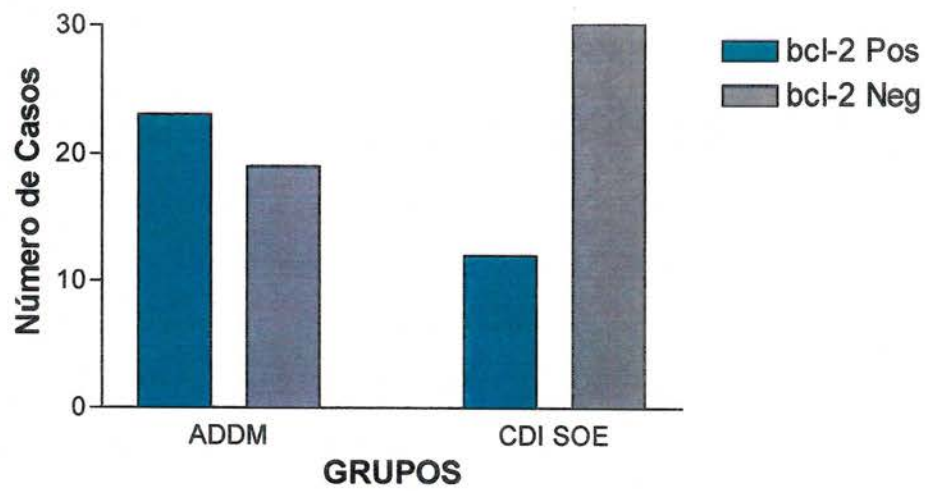
Tabela 11 - Distribuição dos casos em relação à expressão da oncoproteína bcl-2

Grupo	Bcl-2 positiva	Bcl-2 negativa
ADDM (n=42)	23 (55%)	19(45%)
ADMS (n=21)	11(52%)	10(48%)
CDIDM (n=21)	12(58%)	9 (42%)
CDI SOE (n=42)	12(29%)	30 (71%)

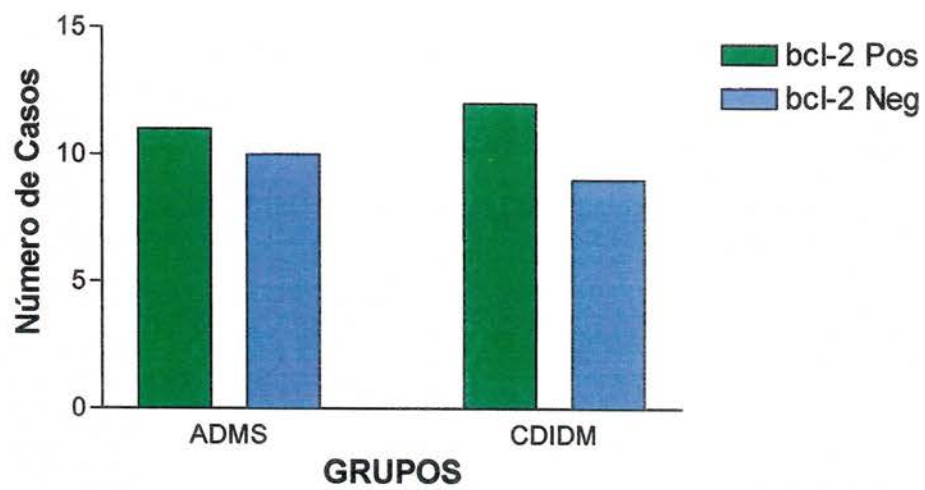
ADDM vs CDI SOE, $p=0,026$; ADMS VS CDIDM, $p=n.s.$

Legenda: *ADDM: adenocarcinoma com diferenciação mucinosa; ADMS: adenocarcinoma mucossecretor; CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.: não significante.*

**Gráfico 15: ONCOPROTEÍNA
bcl-2**



**Gráfico 16: ONCOPROTEÍNA
bcl-2**



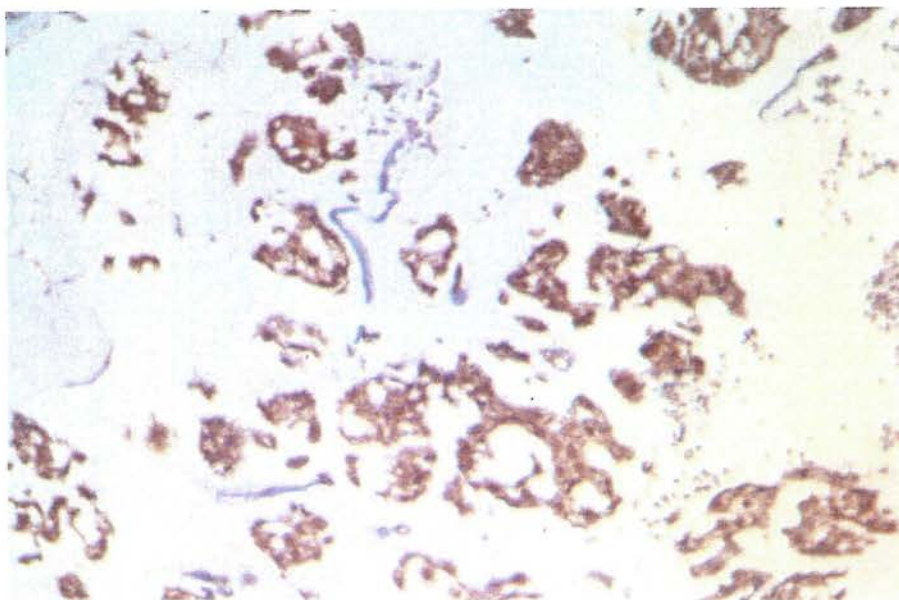


Figura 17: expressão difusa da proteína bcl-2 em caso de ADMS.

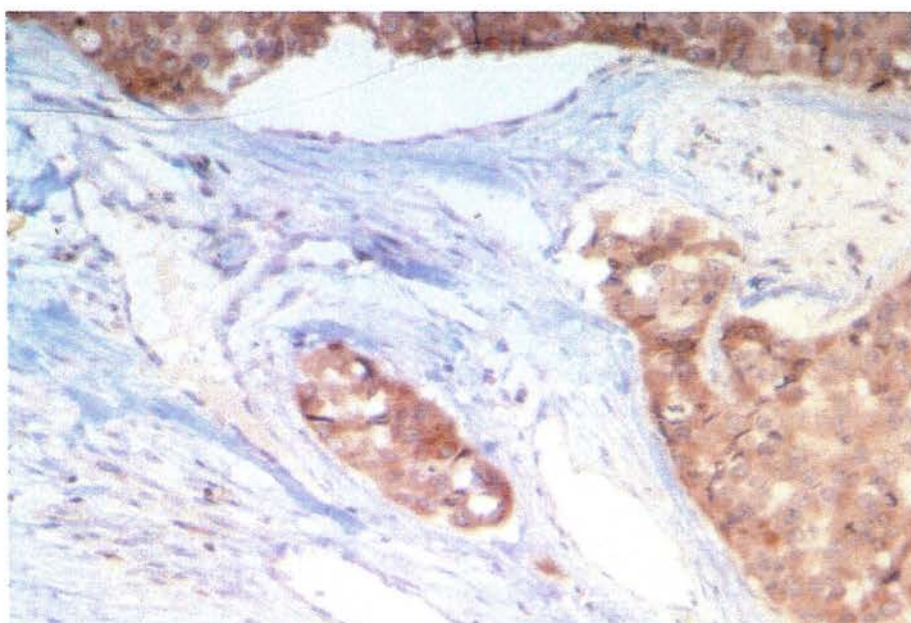


Figura 18: CDI SOE expressando fortemente proteína bcl-2

4.9. Análise da Sobrevida

A média de seguimento do total da nossa amostra foi de 67+53 meses com uma mediana de 55,5 meses. Os óbitos secundários à neoplasia foram 33 casos. (38%) no total, sendo que das pacientes com ADDM observaram-se 13 óbitos. Destes, cinco pacientes eram portadores de ADMS e 9, de CDIDM. A sobrevida global em meses ou probabilidade de sobrevida ao 50% foi de 79,6, 100,2 e 112,7 meses respectivamente para os ADMS, CDIDM e CDI SOE. A sobrevida aos cinco anos foi de 95,2% para os ADMS, de 52,9% para os CDIDM e 61,7% para os CDI SOE. Tivemos 14 casos dos quais não conseguimos o seguimento aos três anos e consideramos-os como perdidos de vista, totalizando 16% do total da amostra., o que prejudicou a análise da curva de sobrevida, pois está acima dos 15% autorizados. Cabe ressaltar que trata-se de uma população idosa, com média de 60 anos de idade, cuja morbidade por outras doenças tais diabetes, hipertensão leva a conduta terapêutica menos agressiva. Os resultados podem ser observados na Tabela 12 e 13, e gráfico 17.

Tabela 12 - Análise da sobrevida de acordo com os grupos de estudo

Grupo	Sobrevida em 5 anos
ADMS (n=16)	95,2%
CDIDM (n=18)	52,9 %
CDI SOE (n=36)	61,7%

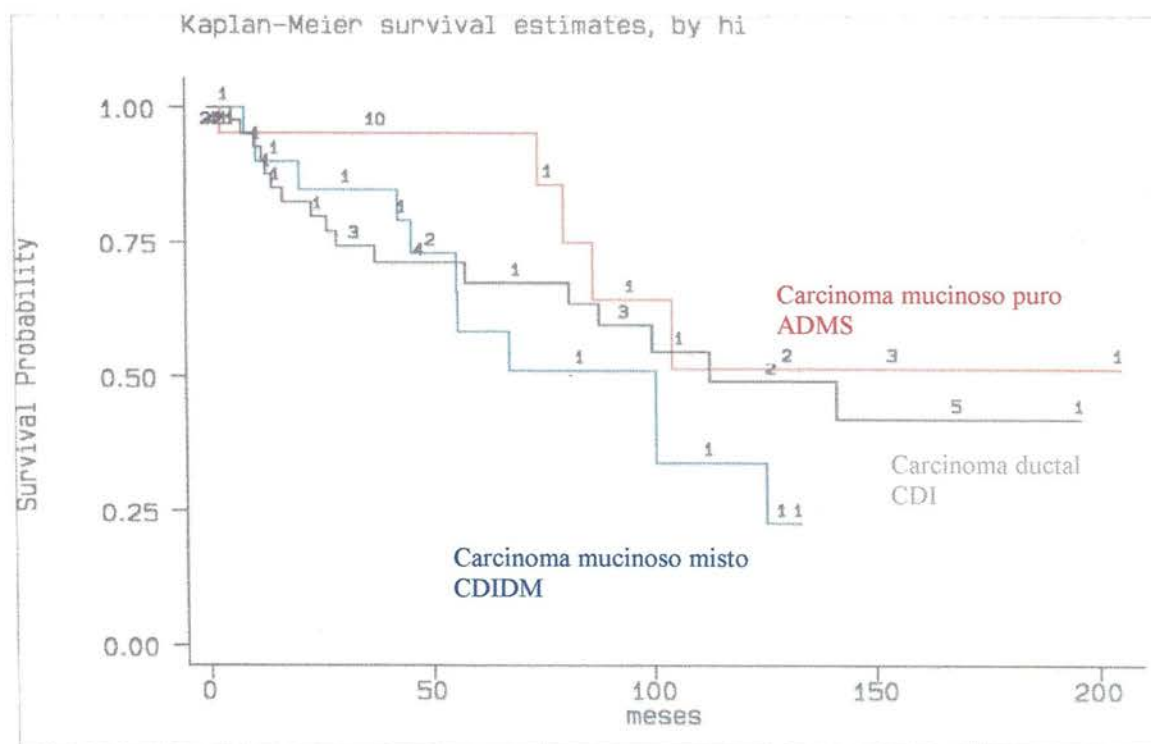
Legenda: ADMS: adenocarcinoma mucossecretor~ CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.: não significante.

Tabela 13 - Evolução em relação à sobrevida de acordo com os grupos de estudo

Grupos	Vivos	Mortes pelo câncer	Mortes por outras causas	Perdidos de Vista
ADMS (n=21)	10(47%)	4(20%)	0(0%)	7 (33%)
CDIDM (n=21)	8 (38%)	9 (42%)	2 (10%)	2(10%)
CDI SOE (n=42)	19(45%)	20 (48%)	0 (0%)	4(7%)

Legenda: ADMS: adenocarcinoma mucossecretor; CDIDM: carcinoma ductal infiltrante com diferenciação mucinosa; CDI SOE: carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações; n.s.: não significativa.

Gráfico 17: Sobrevida global das pacientes de acordo com os 3 tipos histológicos



V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

O câncer da mama é um dos maiores problemas atuais de saúde pública em oncologia. É um dos tumores mais prevalentes e mais letais da mulher e sua incidência vem crescendo no mundo todo. O tratamento destas lesões modificou-se muito nos últimos anos e a identificação de situações em que o comportamento biológico seja particular é muito desejável. Um dos aspectos mais importantes neste sentido é o entendimento da diferenciação celular. Neste trabalho abordou-se a diferenciação especializada em duas direções, a mucinosa e neuroendócrina, tradicionalmente relacionadas na literatura.

A diferenciação mucinosa conferiu às neoplasias estudadas neste trabalho várias características diferentes quando comparadas com os carcinomas ductais infiltrantes usuais, tais como a maior frequência de diferenciação neuroendócrina, de expressão de receptores de estrógeno e da proteína bcl-2 e o achado menos freqüente de expressão de c-erbB-2. , as diferenças biológicas entre os chamados carcinomas mucinosos puros e aqueles com duplo componente, mucinoso e de carcinoma ductal infiltrante, não são tão claramente separadas.

Embora seja de conhecimento corrente que os adenocarcinomas com diferenciação mucossecretora acometam pacientes mais idosas e que tenham comportamento biológico, ainda persistem muitas dúvidas como definir um carcinoma da mama neste grupo. As diversas publicações citam diversas relações entre a quantidade de mucina e células neoplásicas, mas de modo

geral o estabelecimento destes "pontos de corte" não é baseada em nenhum critério mais objetivo. O único trabalho que estabeleceu número em bases estatísticas foi o de Komaki et al. (1988) que partiu do prognóstico comparando com a quantidade de mucina nos cortes histológicos. Estes autores demonstraram que as pacientes que evoluíram bem apresentavam $83,5(+/-)14,3$ de área percentual de mucina, enquanto que aqueles com $68,3(+/-)16,6$ de área relativa mucinosa comportaram-se com CDI SOE. No presente trabalho escolheu-se como ponto de corte a relação de mais do que 75% de área mucinosa. Foram encontradas diferenças entre os tumores com diferenciação mucinosa quando comparados com o carcinoma ductal infiltrante clássico, mas a comparação entre os grupos que apresentaram diferenciação mucossecretora não foi observada. Talvez este resultado mostre que o "ponto de corte" em 75% não seja o mais adequado. Este dado passa a ter uma importância maior quando há diferenças na sobrevida entre os dois grupos com diferenciação mucossecretora. O critério de Rosen (1997), que estabelece que um adenocarcinoma da mama somente seja chamado de mucossecretor quando há menos do que 10% de componente invasivo não-mucinoso ou que este componente, em qualquer proporção, não seja pouco diferenciado, talvez seja mais adequado. Estudos futuros com uma maior amostra pode estabelecer objetivamente os critérios para o diagnóstico de adenocarcinoma mucossecretor da mama.

A comparação entre o grupo de 42 casos de carcinoma da mama que apresentavam diferenciação mucinosa e os CDI SOE pareados por estágio e idade mostrou várias diferenças biológicas entre os dois grupos maiores. Tumores com diferenciação mucinosa mostraram maior expressão de receptores de estrógeno, diferenciação neuroendócrina e proteína bcl-2,

enquanto que o grupo dos CDI SOE mais freqüentemente expressaram proteínas c-erbB-2 e p53, esta última apenas marginalmente significativa. Em conjunção, estes dados falam a favor da melhor diferenciação dos tumores mucinosos do que os CDISOE, com maior especialização celular e provável mecanismo de crescimento por diminuição da apoptose do que por distúrbio primário do ciclo celular.

A expressão mais freqüente de receptores hormonais, especialmente dos receptores de estrógeno, foi um achado esperado e concordante com a literatura. A expressão dos receptores hormonais guarda uma boa relação com o tipo histológico e diferenciação da neoplasia (Rosen, 1975). Carcinomas com diferenciação mucossecretora são quase que sempre positivos para receptores de estrógeno. Embora a literatura mais antiga cite índices variáveis, chegando até a relatar somente 43% de positividade, os trabalhos mais atuais, e portanto, que utilizaram técnicas de recuperação antigênica mais adequada, reportam índices maiores do que 90% (Rosen et al., 1975; McCarthy et al., 1980; Pappoti *et al.*, 1987; Avisar *et al.*, 1998; Diab *et al.*, 1999). O índice encontrado por este trabalho foi relativamente baixo, pois cerca de 67% dos casos com diferenciação mucossecretora expressaram RE. Quando analisados somente os ADMS, o índice subiu para 81% contra 52% dos casos mistos (CDIDM). Estas diferenças podem ser parcialmente justificadas pela utilização de casos antigos, quando a preservação antigênica pelo formol ácido foi longe da ideal (Bertheau et al., 1998). Mas, de qualquer forma, este resultado mostrou que os ADDM expressão mais freqüentemente do que os CDI SOE. Chamou a atenção a baixa expressão dos receptores de progesterona, especialmente no grupo CDIDM, mas é sabido que a reação histoquímica a este antígeno é ainda mais sensível aos aspectos técnicos.

A proteína bcl-2 é um produto relacionado com o fenômeno de apoptose. É na verdade constituinte de uma família de proteínas, e que tradicionalmente tem sido relacionada com a proteção da célula contra o processo de apoptose, portanto uma proteína anti-apoptótica, e portanto representa que as células com defeito genético que deveriam fisiologicamente caminhar para um processo de morte celular, mantêm-se viáveis. Os ADDM expressaram em mais da metade dos casos a proteína bcl-2, enquanto que o grupo comparado expressou em menos de um terço dos casos. Os conhecimentos sobre a proteína bcl-2 na patogênese e evolução no câncer de mama não são tão explorados pela literatura. O consenso do Colégio Americano de Patologia recentemente classificou a oncoproteína bcl-2 como dentro daqueles fatores não suficientemente estudados para terem demonstrado seu valor como indicador prognóstico (Fitzgibbons *et al.*, 2000).

Proteína bcl-2 é freqüentemente expressa nos casos de carcinoma intraductal, especialmente naqueles de baixo grau histológico. Os carcinomas intraductais do tipo comedocarcinoma menos freqüentemente expressam esta proteína. No câncer invasivo da mama a expressão da proteína bcl-2 é associada com tumores bem diferenciados e com receptores hormonais positivos (Eissa *et al.*, 1999, Holmqvist *et al.*, 1999; Nakapoulou *et al.*, 1999; Rochaix *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Como os tumores de diferenciação mucossecretora são bem diferenciados, era esperado que a expressão da proteína bcl-2 fosse alta, como de fato ocorreu. Não encontramos literatura disponível que tenha estudado anteriormente a expressão de proteína bcl-2 e, ADDM. Este resultado abre a perspectiva do estudo da apoptose como mecanismo de progressão de lesão nos carcinomas de diferenciação mucinosa,

incluindo aí novos marcadores de apoptose e o uso de técnicas que determinem a apoptose *in situ*.

A relação da diferenciação neuroendócrina com a mucinosa é reconhecida por muitos trabalhos bastante antigos. Na década de 80, a literatura era um pouco confusa em relação a esta diferenciação divergente, levando a nomenclatura variada e interpretação polêmica (Taxy *et al.*, 1981; Auopardi *et al.*, 1982; Clayton *et al.*, 1982; Nesland *et al.*, 1986). Hoje a diferenciação neuroendócrina divergente é assunto ainda polêmico e de importância não esclarecida. Carcinomas neuroendócrinos da mama são hoje bem reconhecidos e apresentam todo o espectro histológico relatado em outros órgãos, como o pulmão. Carcinomas neuroendócrinos bem diferenciados (Fukunaga 1998A; Laforga & Lopez 1998), de células fusiformes (Paties *et al.*, 1996; Ruffolo, Maluf & Koerner, 1996; Lefort *et al.*, 1999) e do tipo indiferenciado de pequenas células similar aos oat cell carcinomas do pulmão (Fukunaga & Ushigome, 1998; Samli *et al.*, 2000) são motivos de relatos esparsos na literatura. Mas o que este estudo trata é da diferenciação neuroendócrina divergente, concomitante com a formação de mucina.

Tsang & Chan (1996) mostraram em um longo e bem documentado trabalho que há neoplasias intraductais mamárias de claro padrão neuroendócrino, chamando estes casos com o padrão histológico característico de carcinoma intraductal endócrino. Nos casos por eles descritos, 100% dos casos expressaram enolase neurônio específica, 82% foram positivos para cromogranina A e 94% coraram-se com o uso de sinaptofisina. Nestes mesmos casos, quando componente invasivo foi analisado, mostrou-se que este mantinha a diferenciação neuroendócrina com expressão de 100%, 68% e 95%

de enolase neurônio específica, cromagranina A e sinaptofisina, respectivamente. Estas neoplasias *in situ* apresentavam diferenciação mucinosa concomitante em cerca de 70%, mais uma vez atestando o paralelismo entre estes dois padrões de especialização celular. O material aqui estudado é um pouco diferente. Trata-se de carcinomas invasivos, geralmente grandes, com diferenciação mucossecretora. No presente trabalho cerca de 79% dos casos de ADDM mostraram marcação positiva para pelo menos dois indicadores imunohistoquímicos da presença de grânulos neuroendócrinos. Os adenocarcinomas mucinosos puros expressaram esta diferenciação em quase todos os casos, enquanto que aqueles mistos foram positivos em cerca de 70% dos casos. A diferença entre os dois grupos não foi significativa. A figura 7 mostra um aspecto morfológico muito interessante. Esta figura representa um ducto grande com o componente *in situ* sólido fortemente positivo para sinaptofisina e ao centro do ducto, as células vão formando pontes com células igualmente positivas para o marcador e há então o acúmulo de muco. As observações morfológicas somadas as observações de Tsang & Chan (1996) levam a hipótese que, em realidade, a diferenciação divergente seria a mucinosa, que se formaria em tumores neuroendócrinos em sua origem. Em outras palavras, o ADMS seria um neoplasia neuroendócrina bem diferenciada com diferenciação anômala para a produção de muco. Esta seria uma hipótese parcialmente anteposta à expressa por Maluf & Kroener (1995) que propõe que as células neoplásicas epiteliais passariam a produção hormonal ectópica. Estudos morfológicos de maior número de casos com especial atenção a áreas diferentes em um mesmo tumor podem prover interessantes conhecimentos em relação à origem das neoplasias mamárias.

Chamou a atenção que a DNE foi observada com alta frequência nos casos de CDI SOE. Cerca de 45% dos casos foram positivos para os marcadores imunohistoquímicos. Esta marcação não foi de células isoladas. O critério utilizado foi considerar-se positivo o caso onde a maioria das células tumorais expressaram SNF ou CrA em conjunção com NSE. Estes casos de CDI SOE foram escolhidos sem nenhuma particularidade, e nos casos positivos, nenhum apresentava indício histológico de diferenciação neuroendócrina. Portanto, não se trata de diferenciação divergente em seu conceito, pois este implica na positividade de menos de 10% das células neoplásicas. Este dado abre a perspectiva de estudo da real frequência e importância da DNE nos carcinomas ductais infiltrantes sem outras especificações da mama.

Se por um lado, estes marcadores da diferenciação histológica foram mais frequentes nos ADDM, outros marcadores que geralmente estão associados a tumores mais agressivos, como a proteína c-erbB-2 e proteína p53 foram mais comumente encontrados no grupo CDI SOE do que nos ADDM. Cerca de 43% dos CDI SOE expressaram a proteína c-erbB-2 enquanto que os tumores com diferenciação mucinosa apenas 12% foram positivos para o marcador (tabela 9, gráfico 11 e 12). Há poucos estudos na literatura acerca da expressão do c-erbB-2 em tumores com diferenciação mucossecretora. É sabida que as neoplasias que expressam receptores de estrógeno positivos são geralmente c-erbB-2 negativas (Battifora *et al.*, 1991; Seshadri *et al.*, 1993), embora este achado não seja confirmado por outros trabalhos (Gasparini *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 1995). O presente trabalho mostra que esta relação inversa entre a expressão de receptores hormonais e proteína c-erbB-2 é verdadeira. Os tumores histologicamente bem diferenciados também apresentam baixa

expressão de proteína c-erbB-2. Em relação à diferenciação mucossecretora são poucos os trabalhos na literatura. Como tumores bem diferenciados, deve-se esperar que esta expressão seja pouco freqüente, como demonstrado no presente estudo. Diab *et al.* (1999), em estudo com 1221 casos de ADDM, encontraram expressão de c-erbB-2 em apenas 4% dos casos. Estes dados, similares aos por nós encontrados, são um pouco discordantes com a experiência de Kato *et al.* (1999) que relataram positividade de 44% em de ADMS e em 65% CDIMS, índice este inclusive superior ao usualmente relatado na literatura para CDI SOE, que gira em torno de 30-40%. Em ampla revisão da literatura sobre a proteína c-erbB-2 em neoplasias de mama, Révillion *et al.* (1998) revendo a literatura sobre c-erbB-2 e tumores de mama encontraram apenas um trabalho que demonstraram a expressão deste marcador em 1 de 6 casos estudados.

A proteína P53 é provavelmente a proteína mais estudada na literatura médica oncológica nos últimos tempos. Entretanto, o consenso do Colégio Americano de Patologistas, coloca a expressão da proteína p53 no carcinoma da mama dentre os marcadores que necessitam maiores estudos (Fitzbbons *et al.*, 2000). Na nossa amostra, os CDI SOE quando comparados com os ADDM, expressaram mais freqüentemente o marcador, com limite marginal de significância (Tabela 10, gráficos 13), enquanto que não houve diferenças entre os dois sub-grupos de diferenciação mucinosa (Tabela 10, gráfico 14). Este resultado marginalmente significativo é provavelmente devido ao pequeno número da amostra. Caso ampliássemos a amostra do grupo CDI SOE provavelmente o poder do teste estatístico seria atingido. A literatura relata que cerca de 35% dos carcinomas mamários expressam a proteína p53 por imunohistoquímica e trabalho anterior de nosso grupo mostrou que a expressão

de proteína p53 em CDI SOE em nosso laboratório foi de 31% dos casos (Ferrini et al., 2001). Na presente amostra o índice de positividade para proteína p53 foi de 24%, um pouco abaixo do resultado anteriormente relatado. Este dado pode ser parcialmente explicado pelo fato da amostra escolhida ter sido pareada por estadiamento e idade com os casos de diferenciação mucinosa, geralmente de pacientes mais idosas, com estágio mais precoce e, geralmente, com tumores de comportamento mais indolente. Também é experiência de nosso laboratório que a expressão de proteína p53 ocorre mais frequentemente em carcinomas com estroma desmoplásico (Ferrini et al., 2001).

A literatura relaciona a expressão de proteína p53 com tipos histológicos menos diferenciados e comportamento mais agressivo (Marchetti et al., 1993), e o máximo de expressão ocorre nos carcinomas medulares (Poller et al., 1992; Rosen et al., 1995). Tumores com grau nuclear elevado apresentam maior frequência de expressão da proteína p53 (Bosari et al., 1992; Rosen et al., 1995) e o mesmo pode-se dizer em relação aos graus histológicos (Walker et al., 1991; Barbareschi et al., 1992; Bosari, 1992; Poller et al., 1992). A superexpressão da proteína p53 é mais comum nos carcinomas que são RE negativos, sendo que quase todos os trabalhos da literatura são concordantes com este ponto (Walker et al., 1991; Bosari et al., 1992; Isola et al., 1992; Mazars et al., 1992; Thompson et al., 1992; Silvestrini et al., 1993; Rosen et al., 1995). Desta forma, a expressão de proteína em apenas 7% dos casos com diferenciação mucossecretora era um resultado esperado. Os ADDM apresentam menor frequência de expressão de proteína p53 do que os casos definidos como CDI SOE. Alguns trabalhos não conseguiram demonstrar positividade para proteína p53 em nenhum caso estudado (Martinazzi et al., 1993; Kato et al., 1999). Casos de ADMS com expressão de proteína p53

podem apresentar comportamento mais agressivo e talvez este dado seja indicativo de pior prognóstico em ADMS. Di Palma *et al.* (1999) relataram um caso pouco usual de uma paciente de 30 anos de idade com ADMS clássico, mas com metástases em 15 linfonodos axilares de padrão de carcinoma indiferenciado. Na análise molecular do tumor primário e da metástase, os autores mostraram que havia mutação do gene p53, e nas duas amostras apresentavam alteração do mesmo códon, confirmando que as metástases pertenciam ao mesmo clone do tumor primário.

A análise da sobrevida pode ser vista nas Tabelas 12 e 13 e Gráficos 17. Um dado concordante com a literatura é que as neoplasias do tipo ADDM apresentaram melhor comportamento biológico do que os casos de CDI SOE. Todavia, a sobrevida de 5 anos dos pacientes com tumores mistos foi pior do que os tumores mucinosos puros. Este dado chama a atenção quando não foi demonstrada nenhuma outra diferença entre os marcadores biológicos nos dois sub-grupos com diferenciação mucossecretora. Em outras palavras, apesar dos dois sub-grupos biológicos serem similares, o comportamento clínico é distinto. Este fato traz a discussão novamente do limite do ponto de corte de componente invasivo para a separação destes casos. Uma possibilidade é que, na verdade, o tumor com componente de carcinoma ductal invasivo seja uma evolução do tumor indolente mucinoso puro. Infelizmente, o número de casos com seguimento clínico adequado foi muito pequeno. Talvez amostras mais abrangentes possam ser avaliadas para o estabelecimento mais objetivo do melhor critério para a separação entre tumores mucinosos puros e mistos, e então aí se encontrem diferenças dos indicadores biológicos de prognóstico. Por outro lado, embora o comportamento clínico do CDI SOE e do CDIDM, na presente amostra, fossem similares, estas duas apresentações mostram

importantes diferenças biológicas mostrando que a patogênese destes dois subgrupos deva ser diversa.

Apesar da maioria dos indicadores prognósticos estarem estatisticamente borderline na sua significância, a comparação entre os dois subtipos de carcinomas mucinosos mostrou que todos os indicadores foram de bom prognóstico. Sugerimos que a definição dos carcinomas mucinosos puros seja baseado numa porcentagem de 90% da mucina como também na positividade dos receptores hormonais, da DFN e bcl-2 e negatividade do p53 e c-erbB-2 .

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Os presentes resultados obtidos a partir da amostra analisada permitem concluir que:

1. Os carcinomas da mama que apresentam diferenciação mucinosa quando comparados aos carcinomas ductais infiltrantes sem outras especificações pareados por idade e estadiamento apresentam significativamente maior frequência de diferenciação neuroendócrina, expressão de receptores de estrógeno e expressão de oncoproteína bcl- 2. Por outro lado, os tumores com diferenciação mucinosa menos freqüentemente expressando proteína c-erbB-2 e apresentam diferenças marginalmente significativas em relação à expressão de proteína p53. Finalmente, não há diferenças entre a expressão de receptores de progesterona entre os dois grupos no presente material.

2. Quando comparados os adenocarcinomas mucinosos puros com aqueles que apresentam a diferenciação mucinosa somada a componente de carcinoma ductal infiltrante não houveram diferenças no que diz respeito a todos os parâmetros testados, exceto o comprometimento linfonodal, mais freqüente nos CDIDM, e diferença marginal entre a expressão de receptores de progesterona, mais freqüente nos ADMS. Os parâmetros que os dois sub-tipos histológicos foram similares incluem a idade, estado hormonal, tamanho

do tumor, estadiamento, diferenciação neuroendócrina, receptores de estrógeno, proteína p53, proteína c-erbB-2 e oncoproteína bcl-2.

3 . A despeito de não apresentarem diferenças em relação aos marcadores tumorais, os adenocarcinomas mucossecretores puros mostraram sobrevida em 5 anos significativamente melhor do que os adenocarcinomas ductais infiltrantes com diferenciação mucinosa e os carcinomas ductais infiltrantes sem outras especificações, com a ressalva em relação ao tamanho da amostra.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali IU, Merlo G, Callahan R, Lidereau R. The amplification unit on chromosome 11q13 in aggressive primary human breast tumors entails the bel-1 int2 and hst loci. **Oncogene** 1989; 4:89-92.

Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al. HER-2/neu in node negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. **J Clin Oncol** 1992; 10:599-605.

Avisar E, Khan MA, Axelrod D, Oza K. Pure mucinous carcinoma of the breast: a clinicopathologic correlation study. **Ann Surg Oncol** 1998; 5:447-51.

Azzopardi JG, Muretto P, Godeeris P, Eusebi V, Lauweryns JM. Carcinoid tumors of the breast: the morphological spectrum of argyrophil carcinomas. **Histopathology** 1982; 6:549-69.

Bankfalvi A, Tory K, Kemper M, et al. Clinical relevance of immunohistochemical expression of p53-targeted gene products mdm-2 p21 and bcl-2 in breast carcinoma. **Pathol Res Pract** 2000; 196:489-501.

Barbareschi M, Caffo O, Veronese S, et al. Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma: a study with long-term follow-u. **Hum Pathol** 1996; 27:1149-55.

Barbareschi M, Leonardi E, Mauri FA, Serio G, Dalla-Palma P. p53 and c-erbB-2 expression in breast carcinomas. **Am J Clin Pathol** 1992; 98:408-18.

Battersby S, Dely CJ, Hopkinson HE, Anderson TJ. The nature of breast dense core granules: chromogranin reactivity. **Histopathology** 1992; 20:107-14.

Battifora H, Gaffey M, Esteban J, et al. Immunohistochemical assay of neu-c-erbB-2 oncogene product in paraffin-embedded tissues in early breast cancer: retrospective follow-up study of 245 stage I and II cases. **Mod Pathol** 1991; 4:446-74.

Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. **J Clin Pathol** 1998; 51:370-4.

Bezwoda WR, Esser JD, Dansey R, Kessel I, Rad T, Lange M. The value of estrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer Estrogen receptor level but not progesterone receptor level correlates with response to tamoxifen. **Cancer** 1991; 68:867-72.

Birsak CA, Janssen JA, Van Vroonhoven CCJ, Peterse JL, Van Der Kwas TH. Sex steroid receptor expression in carcinoid tumors of the breast. **Breast Cancer Res Treat** 1996; 40:243-9.

Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. **Cancer Res** 1990; 50:4332-7.

Bosari S, Lee AK, Viale G, Heatley GJ, Coggi G. Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long term follow-up. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** 1992; 421:291-5.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999**. Rio de Janeiro: INCA; 1999.

Bussolati G, Gugliotta P, Sapino A, Eusebi V, Lloyd RV. Chromogranin reactive endocrine cells in argyrophilic carcinomas ("carcinoids") and normal tissue of the breast. **Am J Pathol** 1985; 120:186-92.

Capella C, Eusebi V, Mann B, Azzopardi JG. Endocrine differentiation in mucoid carcinoma of the breast. **Histopathology** 1980; 4:613-30.

Chinyama CN, Davies JD. Mammary mucinous lesions: congeners prevalence and important pathological associations. **Histopathology** 1996; 29:533-9.

Chopra S, Evans AJ, Pinder SE, et al. Pure mucinous breast cancer-mammographic and ultrasound findings. **Clin Radiol** 1996; 51:421-4.

Clark GM, Macguire WL. Follow-up study of HER2/neu amplification in primary breast cancer. **Cancer Res** 1991; 51: 944-8.

Clayton F. Pure mucinous carcinomas of breast: morphologic features and prognostic correlates. **Hum Pathol** 1986; 17:34-8.

Clayton F, Sibley RK, Ordonez NG, Hanssen G. Argyrophilic breast carcinomas evidence of lactational differentiation. **Am J Surg Pathol** 1982; 6:323-33.

Crawford L, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. **Int J Cancer** 1982; 30:403-8.

Cross AS, Azzopardi JG, Krausz T, Vannoorden S, Polak JM. A morphological and immunocytochemical study of a distinctive variant of ductal carcinoma in situ of the breast. **Histopathology** 1985; 9:21-37.

Cubilla AL, Woodruff JM. Primary carcinoid tumor of the breast: a report of eight patients. **Am J Surg Pathol** 1997; 21:283-92.

Damiani S, Dina R, Eusebi V. Eosiphilic and granular cell tumors of the breast. **Semin Diagn Pathol** 1999; 16:117-25.

Di Palma S, Lavarino C, Oggioni M, Pilotti S. Tp53 mutation in mucinous carcinoma of the breast. **Histopathology** 1999; 34:559-60.

Diab SG, Clark GM, Osborne CK, Libby A, Allred DC, Ellledge RM. Tumors characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. **J Clin Oncol** 1999; 17:1442-8.

Domoto H, Terahata S, Yamazaki T, Sato K, Takeo H, Tamai S. Mucinous cystadenomacarcinoma of the breast showing sulafamucin production. **Histopathology** 2000; 36:564-72.

Eissa S, Labib R, Khalifa A, Swelam N, Khalil F, El-Shenamy AM. Regulators of apoptosis in human breast cancer. **Clin Biochem** 1999; 32:321-6.

Elledge RM, Clark GM, Fuqua W, Yuy Y, Craig CA. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. **Cancer Res** 1994; 54:3752-7.

Erikstein B, Nesland JM, Ottestad L, Lund E, Johannessen JV. Neuron-specific enolase-positive breast carcinomas. **Histol Histopathol** 1988; 3:97-102.

Fentiman IS, Millis RR, Smith P, Ellul JPM, Lampejo O. Muroid breast carcinomas: histology and prognosis. **Br J Cancer** 1997; 75:1061-5.

Fergusson DJP, Anderson TJ, Wells CA, Battersby S. An ultrastructural study of muroid carcinoma of the breast: variability of cytoplasmic features. **Histopathology** 1986; 10:1219-30.

Ferrini FS, Ross MA, Mourão Neto M, Soares FA. Schirrous invasive ductal carcinoma of the breast overexpress p53 oncoprotein. **São Paulo Med J** 2001; 119:4-6

Fetissov F, Dubois M, Arbeille-Brassart B, et al. Argyrophilic cells in mammary carcinoma. **Hum Pathol** 1983; 14:127-34.

Fischer CJ, Egan MK, Smith P, Wicks K, Millis RR, Fentiman IS. Histopathology of breast cancer in relation to age. **Br J Cancer** 1997; 75:593-6

Fisher ER, Palekar AS. Solid and mucinous varieties of so-called mammary carcinoid tumors. **Am J Clin Pathol** 1979; 72:909-16.

Fitzgibbons L, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer College of American Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124:966-78.

Fukunaga M. Neuroendocrine carcinoma of the breast: a case report of pure type. **APMIS** 1998; 106:1095-100.

Fukunaga M. Neuroendocrine carcinoma of the breast with Mercker cell carcinoma-like features. **Pathol Internat** 1998 B; 48:557-61

Fukunaga M, Ushigome S. Small cell (oat cell) carcinoma of the breast. **Pathol Int** 1998; 48:744-8.

FOSP. Fundação Oncocentro de São Paulo. **Mortalidade por câncer no Estado de São Paulo 1988-1998**. São Paulo: Cadernos FOSP Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2000.

Gasparini G, Gullick WJ, Bevilacqua P, et al. Human breast cancer prognostic significance of the c-erbB-2 oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor, DNA ploidy and conventional pathologic features. **J Clin Oncol** 1992; 10:686-95.

Geschickter CF. Gelatinous carcinoma of the breast. **Arch Surg** 1930; 20:568-90.

Goodman DN, Boutross-Tadross O, Jong RA. Mammographic features of pure mucinous carcinoma of the breast with pathological correlation. **Can Assoc Radiol J** 1995; 46:296-301.

Hamele-Bena D, Cranor ML, Rosen PP. Mammary mucocele-like lesions: benign and malignant. **Am J Surg Pathol** 1996; 20:1081-5.

Hamilton A, Paccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2 p53 and bcl-2. **Ann Oncol** 2000; 11:647-63.

Hanna WM, Corkill M. Mucinous in breast carcinomas. **Hum Pathol** 1988; 19:11-4.

Holmqvist P, Lundstrom M, Stal O. Apoptosis and Bcl-2 expression in relation to age, tumor characteristics and prognosis in breast cancer: South-East Sweden Breast Cancer Group. **Int J Biol Markers** 1999; 14:84-91.

Howell A, Harland RNL, Bramwell HC, et al. Steroid hormone receptors and survival after first relapse in breast cancer. **Lancet** 1984; 1:588-91.

Ingelman-Sundber H, Wiktröm B, Stormby N, Sundelin P, Hjerpe A. A immunocytochemical reactivity of breast cancer tissue with antibodies to neuron-specific enolase and an adenocarcinoma-associated glycolipid antigen. **Virchows Arch** 1989; 415:539-44.

Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi O. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:1109-17.

Jalava PJ, Collan YU, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kronqvist P. Bcl-2 immunostaining: a way to finding unresponse postmenopausal N+ breast cancer patients. **Anticancer Res** 2000; 20:1213-9.

Kato N, Endo Y, Tamura G, Katayama Y, Motoyama T. Mucinous carcinoma of the breast: a multifaceted study with special reference to histogenesis and neuroendocrine differentiation. **Pathol Int** 1999; 49:947-55.

Koenig TA, Vassoli FA. Mucinous cystadenocarcinoma of the breast. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:698-703.

Komaki K, Sakamoto G, Sugano H, Morimoto T, Monden Y. Mucinous carcinoma of the breast in Japan a prognostic analysis based on morphologic features. **Cancer** 1988; 61:989-96.

Kuukasjarvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. **J Clin Oncol** 1996; 14:2584-9.

Lafora JBM, Lopez JJ. Breast carcinoma with endocrine features: report of a case with cytologic and immunohistochemical studies. **Acta Cytol** 1998; 42:1017-21

Le MG, Mathieu MC, Douc-Rasy S, et al. C-myc, p53 and bcl-2 apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2

protein overexpression and a lower risk of metastasis and death in operable patients. **Int J Cancer** 1999; 84:562-7.

Lee BJ, Hauser H, Pack GT. Gelatinous carcinoma of the breast. **Surg Gynecol Obstet** 1934; 59:841-57.

Lefort E, Groussard O, Jolinière JB, Degott C, Zafrani B. Carcinome mammaire à cellules fusiformes et différenciation neuro-endocrine. Une entité rare pouvant simuler une tumeur bénigne. **Ann Pathol** 1999; 19:309-11

Maluf HM, Koerner FC. Carcinoma of the breast with endocrine differentiation: a review. **Virchows Arch** 1994; 425:449-57.

Maluf HM, Koener FC. Solid papillary carcinoma of the breast: a form of intraductal carcinoma with endocrine differentiation frequently associated with mucinous carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1995; 19:1237-44.

Maluf HM, Zukenberg LR, Dickersin GR, Koemer FC. Spindle-cell argyrophilic mucin-producing carcinoma of the breast histological, ultrastructural, and immunohistochemical studies of two cases. **Am J Surg Pathol** 1991; 15:677-86.

Marchetti A, Buttita F, Pellegrini S, et al. p53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. **Cancer Res** 1993; 53:4665-7.

Martinazzi M, Crivelli P, Zampatti C, Martnazzi S. Relationship between p53 expression and other prognostic factors in human breast carcinoma: an immunohistochemical study. **Am J Clin Pathol** 1993; 100:213-7

Marx D, Schauer A, Reiche C, May A, Sauer R, Schumacher M. C-erbB2 expression in correlation to other biological parameters of breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 1990; 116:15-20.

Mazars R, Spinardi L, Bencheikh M, Simony-Lafontaine J, Jeanteur P, Theillet C. p53 mutations occur in aggressive breast cancer. **Cancer Res** 1992; 52:3918-23.

McCarthy Jr KS, Barton TK, Fetter BF, W, et al. Correlation of estrogen and progesterone receptors with differentiation in mammary carcinoma. **Cancer** 1980; 46:2851-8.

Melamed MR, Robbins GF, Foote Jr FW. Prognostic significance of gelatinous mammary carcinoma. **Cancer** 1961; 14:699-704.

Michal M, Ludviková M, Zámecnik M. Nodular mucinosis of the breast: report of three cases. **Pathol Int** 1998; 48:542-4

Monaghan P, Roberts JD. Immunocytochemical evidence for neuroendocrine differentiation in human breast carcinomas. **J Pathol** 1985; 147:281-9.

Nakopoulou L, Michalopoulou A, Gianopoulou I, et al. bcl-2 protein expression is associated with prognostically favourable phenotype in breast cancer irrespective of p53 immunostaining. **Histopathology** 1999; 34:310-9.

Nesland JM, Holm R, Johannessen JV, Gould VE. Neurone specific enolase immunostaining in the diagnosis of breast carcinomas with neuroendocrine differentiation: its usefulness and limitations. **J Pathol** 1986; 148:35-43.

Nesland JM, Holm R, Johannsen JV. A study of different markers for neuroendocrine differentiation in breast carcinomas. **Pathol Res Pract** 1986; 181:524-30.

Nomura Y, Miura S, Koyama H, et al. Relative effect of steroid hormone receptors on the prognosis of pateints with operable breast cancer a univariate and multivariate analysis of 3089 Japanese patients with breast cancer from the study Group for the Japanese Breast Cancer Society on hormone receptors and prognosis in breast cancer. **Cancer** 1992; 69:153-64.

Northridge ME, Rhoads GG, Waterenber GD, Koffmam G. The importance of histologic type on breast cancer survival. **J Clin Epidemiol** 1997; 50:283-90.

O'connell JT, Shao Z-M, Drori E, Basbaum CB, Barsky SH. Altered mucin expression is a field change that accompanies mucinous (cloid) breast carcinoma histogenesis. **Hum Pathol** 1998; 29:1517-23

Page DL, Anderson TA. Diagnostic histopathology of the breast: grading of invasive carcinoma of the breast. **Histopathology** 1987; 10:300-11

Papoti M, Macri L, Capella C, Eusebi V, Bussolati G. Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the breast: a study of 31 cases. **Semin Diagn Pathol** 1989; 6:174-88.

Paties C, Zangrandi A, Taccagni GL, Kindl S, Vassallo G. Spindle cell non-argyrophil carcinoma of the breast with neuroendocrine differentiation. **Histopathology** 1996; 29:471-3

Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV. Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. **Histopathology** 1995; 27:219-26

Poller DN, Hutchings CE, Galea M, et al. p53 protein expression in human breast carcinoma relationship to expression of epidermal growth factor receptor c-erbB-2 protein overexpression and oestrogen receptor. **Br J Cancer** 1992; 66:583-8.

Rasmussen BB, Rose C, Christensen I. Prognostic factors in primary mucinous breast carcinoma. **Am J Clin Pathol** 1987; 87:155-60.

Révillion F, Bonnettere J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene is human breast cancer and its clinical significance. **Eur J Cancer** 1998; 34:791-808

Rilke F, Colanghi MI, Cascinelli N, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. **Int J Cancer** 1991; 49:44-9.

Rochaix P, Krajewski S, Reed JC, Bonnet F, Voigt JJ, Brousset P. In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis. **J Pathol** 1999; 187:410-5.

Rosen PP, editor. **Breast pathology**. Philadelphia: Lippincott- Raven; 1997. p.405: Biological markers of prognosis.

Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. **J Clin Oncol** 1995; 13:821-30

Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma: a study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis. **Cancer** 1995; 75:1320-6

Rosen PP, Wang TY. Colloid carcinoma of the breast: analysis of 64 patients with long term follow-up. **Am J Clin Pathol** 1980; 73:30-43

Rosen PP, Mendez-Botez CJ, Nisselbaun JS, et al. Pathological review of breast lesions analyzed for estrogen receptor protein. **Cancer Res** 1975; 35:3187-94.

Ruffolo EF, Maluf HM, Roener FC. Spindle cell endocrine carcinoma of the mammary gland. **Virchows Arch** 1996; 428:319-24

Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CT, Nonogaki S, Pinto GA. Procedimentos laboratoriais em imunohistoquímica e hibridização in situ. In: Alves AF, Bacchi CE, Vassalo J, editores. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.237

Samali B, Celik S, Evrensel T, Orhan B, Tasdelen I. Primary neuroendocrine small cell carcinoma of the breast. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124:296-8.

Sapino A, Righi L, Papotti M, Pietribiasi F, Bussolati G. Expression of the neuroendocrine phenotype in carcinomas of the breast. **Semin Diag Pathol** 2000; 17:127-37.

Schimmelpenninck H, Eriksson ET, Falkmer UG, et al. Prognostic significance of immunohistochemical c-erbB2 proto-oncogene expression and nuclear DNA content in human breast cancer. **Eur J Surg Oncol** 1992; 18:530-7.

Scopsi L, Andreola S, Pilotti S, et al. Argyrophilia and granin (Chromogranin/secretogranin) expression in female breast carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1992; 16:561-76.

Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer: the South Australian Breast Cancer Study Group. **J Clin Oncol** 1993; 11:1939-42.

Silverberg SG, Kay S, Chitale AR, Levitt SH. Colloid carcinoma of the breast. **Am J Clin Pathol** 1971; 55:355-63.

Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, et al. p53 as an independent prognostic marker in lympho node-negative breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:965-70.

Silvestrini R, Benini E, Veronesiu S, et al. p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. **J Clin Oncol** 1996; 14:1604-10.

Sobin LH, editor. **Classificação dos tumores malignos TNM**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1998.

Stalberg H, Thomas DB. Age distribution of histologic types of breast carcinomas. **Int J Cancer** 1993; 54:1-7

Tabar L, Fagerberg G, Chen HH, Dffy SW, Gad A. A tumor development histology and grade of breast cancers: prognosis and progression. **Int J Cancer** 1996; 66:413-9.

Tan H, Ity SNG. Male breast cancer: a retrospective study with immunochemical analysis of hormone receptor expression. **Pathology** 1997; 29:2-6.

Tandon AK, Clark GM, Chemness GT, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. **J Clin Oncol** 1989; 7:1120-8.

Tavassoli FA. Infiltrating carcinoma: common and familiar special types. In: Tavassoli FA, editor. **Pathology of the breast**. 2nd ed. London: Prentice Hall International; 1999. p.401.

Taxy JB, Tisher AS, Insalaco SJ, Battifora H. Carcinoid tumor of the breast: a variant of conventional breast cancer?. **Hum Pathol** 1981; 12:170-9.

Thompson AM, Anderson TJ, Condie A, et al. p53 allele losses mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinicopathologic parameters. **Int J Cancer** 1992; 50:528-32.

Toikkanen S, Kujari H. Pure and mixed mucinous carcinomas of the breast: a clinicopathologic analysis of 61 cases with long term follow-up. **Hum Pathol** 1989; 20:758-64.

Tsang WYW, Chan JKC. Endocrine ductal carcinoma in situ (E-DCIS) of the breast. **Am J Surg Pathol** 1996; 20:921-43.

Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, et al. Correlations between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: hst-1/int2 and c-erbB2/ear-1. **Cancer Res** 1989; 49:3104-8.

Van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, et al. Neu-protein overexpression in breast cancer: association with comedo-type carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. **N Engl J Med** 1988; 319:1239-45.

Van Obberghen E, Kamholz J, Bishop III JG, Zomzely-Neurath C, Lazzarini RA. Human γ - enolasa: isolation of cDNA clone and expression in normal and tumor tissue of human origin. **J Neurosci Res** 1998; 19:450-6.

Walker RA, Dearing SJ, Lane D, Varley JM. Expression of p53 protein in infiltrating and in-situ breast carcinomas. **J Pathol** 1991; 165:203-11.

WHO. World Health Organization. Histological typing of breast tumors. **Tumori** 1982; 68:181-98.

Wulsin JH, Shreiber JT. Improved prognosis in certain patterns of carcinoma of the breast. **Arch Surg** 1962; 85:791-800.

Yang Q, Sakurai T, Jing X, et al. Expression of Bcl-2 but not Bax correlates with estrogen receptor status and tumor proliferation in invasive breast carcinoma. **Pathol Int** 1999; 49:775-80.

Yang Q, Sakurai T, Yoshimura G, et al. Expression of Bcl-2 but not Bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. **Breast Cancer Res Treat** 2000; 61:211-6.

Yokoda J, Terada M, Toyoshima K, et al. Amplification of the c-erb-B-2 oncogene in human adenocarcinoma in vivo. **Lancet** 1986; 1:765-7.

Zhou D-J, Ahuja H, Cline MJ. Proto-oncogene abnormalities in human breast cancer: c-erbB-2 amplification does not correlate with recurrence of disease. **Oncogene** 1989; 4:105-8.

Zolota V, Gerokosta A, Melachrinou M, Kominea A, Alerta C, Scopa CD. Microvessel density proliferating activity p53 and bcl-2 expression in situ ductal carcinoma of the breast. **Anticancer Res** 1999; 19:3269-74.

Compilação dos dados

Símbolo	Descrição	Subdivisão
C	Caso	
CC	Caso controle	
BIOPSIA	Biopsia	
PRONT	Prontuário	
HI	Histologia	0 = carcinoma mucinoso misto 1 = carcinoma mucinoso puro 2 = carcinoma ductal
IDA	Idade	
EH	Estado hormonal	
S	Sexo	
T	Tamanho	
GA	Axila	0 = axila negativa 1 = axila positiva 9 = indeterminado
G	Total dos linfonodos comprometidos	99 = indeterminado
TG	Total dos linfonodos dissecados	99 = indeterminado
E	Estadio	
TNM	TNM	
MASTEC	Mastectomia	
META	Data da primeira metástase	
OBITO	Data do óbito	
OB	Evento do óbito	9 = indeterminado
USEG	Data do último segmento	99/99/99 = indeterminado
SOBRE	Sobrevida em meses	999 = indeterminado
DN	Diferenciação neuroendócrina	
RE	Receptores de estrógenos	
RP	Receptores de progesterona	
p53	p53	
BCL	bcl-2	
CR	c-erbB-2	

C	CC	BIOPSIA	PRONT	HI	IDA	EH	S	T	GA	G	T	G	E	TNM	MASTEC	META	OBITO	OB	USEG	SOBRE	DN	RE	RP	p53	BC	CR
1	1	158 109	80.12.62	1	74	1	1	35	0	0	26	2	T2N1M0	25/04/1980				0	18/07/1980	2.763158	1	1	1	0	1	0
1	2	201 349	84.24.97	2	67	1	1	40	0	0	22	2	T2N1M0	16/07/1984	08/11/1989	02/11/1991	1	02/11/1991	87.66447	1	0	1	0	1	0	
2	1	161 707	80.30.65	1	77	1	1	40	0	0	22	2	T2N1M0	04/09/1980				0	06/11/1986	74.14474	1	1	1	0	1	0
2	2	189 254	83.19.67	2	72	1	1	35	0	0	26	2	T2N1M0	06/06/1983		05/02/1987	0	05/02/1987	44.07895	1	0	1	0	0	0	
3	1	162 238	80.33.03	1	54	1	1	40	0	0	26	2	T2N0M0	19/09/1980				0	07/07/1984	165.7566	1	1	1	0	1	0
3	2	194 505	83.41.90	2	50	1	1	30	0	0	25	2	T2N0M0	24/11/1984				0	08/06/1998	174.6711	0	0	0	1	0	0
4	1	166 608	81.07.28	0	52	1	1	110	1	21	27	3	T4N2M0	10/03/1981	03/04/1982	12/12/1984	1	12/12/1984	45.16447	0	0	0	0	1	0	
4	2	169 857	82.45.40	2	53	1	1	60	1	25	25	3	T4N2M0	13/07/1981		19/02/1982	1	19/02/1982	7.269737	0	0	0	0	0	1	
5	1	169 314	81.21.16	0	76	1	1	50	0	0	15	3	T4N1M0	26/06/1981	01/02/1982	19/02/1982	1	19/02/1982	7.828947	0	1	0	0	0	0	
5	2	189 618	82.20.23	2	67	1	1	30	0	0	9	2	T2N0M0	03/06/1983				0	21/12/1986	162.8289	0	0	0	0	0	0
6	1	169 953	81.11.31	1	55	1	1	50	0	0	21	2	T3N0M0	16/07/1981				0	27/07/1987	204.6053	0	1	1	0	0	0
6	2	194 437	83.42.47	2	55	1	1	40	0	0	32	2	T2N0M0	18/11/1983				0	05/03/1992	99.67105	0	0	0	0	0	0
7	1	170 257	81.05.96	1	48	1	1	70	0	0	16	3	T4N0M0	28/07/1981				0	05/08/1998	204.5066	1	0	0	0	0	0
7	2	194 048		2	99	9	9	99	9	9	99	9	T4N0M0	28/07/1981				9			1	0	0	1	0	0
8	1	171 564	81.31.51	0	64	1	1	180	1	2	24	3	T4N2M0	14/07/1981				0	12/07/1990	108.0592	1	1	0	0	1	0
8	2	176 963	82.10.01	2	59	1	1	85	1	3	29	3	T4N1M0	20/03/1982				0	02/02/1997	178.7171	1	0	0	0	0	1
9	1	173 563	81.23.66	0	55	1	1	30	1	21	23	3	T4N3M0	19/10/1981	27/05/1983			0	10/12/1983	25.72368	0	0	0	0	0	1
9	2	203 801	84.35.01	2	69	1	1	50	1	26	26	3	T4N1M0	04/10/1984	06/03/1987			0	13/07/1987	33.28947	0	1	1	0	0	0
10	1	173 080	81.36.49	1	41	0	1	50	1	3	21	3	T4N1M0	03/11/1981				0	20/12/1992	133.7171	1	1	1	0	0	0
10	2	205 061	84.41.36	2	40	0	1	60	1	1	14	3	T4N1M0	20/11/1984		20/04/1987	1	10/04/1987	29.24342	0	0	0	0	1	0	
11	1	173 369	81.39.24	1	43	0	1	70	1	5	21	3	T3N2M0	16/11/1981	10/04/1989	11/07/1990	1	11/07/1990	103.9145	1	1	0	0	0	0	
11	2	202 850	84.29.13	2	51	0	1	65	1	5	24	3	T4N1M0	06/09/1984				0	13/09/1987	36.25	1	1	1	0	1	0
12	1	174 455	81.44.49	1	72	1	1	85	9	99	99	3	T3N1M0	23/12/1981		06/03/1982	1	06/03/1982	2.401316	1	1	0	0	1	0	
12	2	161 628	80.28.77	2	69	1	1	80	9	99	99	3	T4N2M0	30/08/1980	08/07/1981	09/07/1981	1	09/07/1981	10.29605	1	1	0	0	1	0	
13	1	175 436	82.02.13	0	73	1	1	30	0	0	17	2	T2N1M0	04/02/1982				0	20/02/1993	132.6974	1	1	0	0	1	0
13	2	201 015	84.22.39	2	64	1	1	60	0	0	18	2	T2N1M0	06/07/1984	02/02/1990	04/04/1991	1	04/04/1991	81.01974	0	0	0	0	0	1	
14	1	175 457	82.02.13	0	73	1	1	30	0	0	17	2	T2N1M0	28/01/1982				0	20/10/1992	127.0197	1	1	0	0	1	0

C	CC	BIOPSIA	PRONT	HI	IDA	EH	S	T	GA	G	T	G	E	TNM	MASTEC	META	OBITO	OB	USEG	SOBRE	DN	RE	RP	p53	BC	CR
15	1	176 859	82.09.88	1	79	1	1	65	9	99	99	3	T4N2M0	23/03/1982				0	01/07/1983	15.29605	1	1	1	0	1	0
15	2	160 600	80.16.03	2	80	1	1	70	1	28	28	3	T3N1M0	02/12/1982				0	07/08/1986	44.21053	0	1	0	0	0	1
16	1	177 435	82.12.52	0	79	1	1	40	1	1	21	3	T4N1M0	12/04/1982	obito não		13/12/1983	1	13/12/1983	20.06579	1	1	0	0	1	0
16	2	184 227	82.33.78	2	64	1	1	35	1	3	14	3	T3N1M0	02/12/1982				0	07/08/1986	44.21053	0	0	0	0	0	1
17	1	178 730	82.84.40	1	82	1	1	30	0	0	3	2	T2N0M0	27/05/1982				0	19/05/1983	11.74342	1	1	1	0	1	0
17	2	181 795	82.32.83	2	78	1	1	25	0	0	9	2	T2N0M0	04/09/1982				0	02/12/1983	14.93421	0	1	0	1	0	1
18	1	182 092	82.30.26	0	49	1	1	50	0	0	24	3	T3N1M0	21/09/1982	obito não		27/03/1986	0	27/03/1986	42.20395	1	0	0	1	0	0
18	2	201 799	84.24.02	2	52	1	1	45	0	0	29	3	T4N1M0	03/08/1984	29/08/1988			0	26/09/1997	157.9605	1	0	0	0	1	1
19	1	182 539	82.33.30	0	54	1	1	35	1	20	20	3	T4N2M0	08/01/1983	12/08/1983		12/05/1991	1	12/05/1991	100.1974	1	0	0	1	0	1
19	2	201 977	84.27.39	2	50	1	1	50	1	23	23	3	T4N2M0	04/08/1984	29/07/1985		29/07/1985	1	29/07/1985	11.80921	1	0	0	1	0	1
20	1	189 493	83.19.62	0	68	1	1	230	0	0	17	4	T4N1M1	06/06/1983				0	18/12/1983	6.414474	1	0	0	0	0	0
20	2	170 360	81.22.58	2	77	1	1	75	0	0	0	4	T4N1M1	23/07/1981			21/04/1993	1	21/04/1993	141.1184	1	1	1	0	0	0
21	1	193 744	83.07.52	1	65	1	1	30	0	0	30	2	T2N0M0	24/10/1983	21/04/1989		10/12/1989	1	10/12/1989	73.65132	1	1	0	0	1	0
21	2	197 131	84.81.79	2	64	1	1	30	0	0	29	2	T2N0M0	21/02/1984				0	30/08/1990	78.35526	0	1	1	1	0	0
22	1	201 576	84.14.22	0	33	0	1	40	1	3	27	2	T2N0M0	27/07/1984	09/02/1994		28/12/1994	1	28/12/1994	125.1974	1	0	1	0	1	0
22	2	172 411	81.22.92	2	34	0	1	20	1	3	27	2	T2N0M0	13/10/1981				0	01/02/1998	195.8882	0	1	1	0	1	0
23	1	202 893	84.33.24	1	52	1	1	30	1	2	18	3	T4N2M0	08/09/1984	12/12/1990		25/04/1991	1	25/04/1991	79.60526	1	0	0	0	1	1
23	2	177 523	82.12.66	2	48	1	1	30	1	2	32	3	T3N1M0	19/04/1982	03/08/1983		01/07/1984	0	01/17/84	26.44737	0	0	0	0	0	0
24	1	202 946	84.33.19	1	37	0	1	60	1	1	27	3	T4N1M0	10/09/1984				0	25/10/1990	97.59868	1	0	0	1	0	1
24	2	301 115	93.11.58	2	42	0	1	40	1	2	24	3	T4N0M0	01/04/1993				0	02/05/1994	13.02632	0	1	1	0	0	0
25	1	203 671	84.35.41	1	82	1	1	45	0	0	2	3	T2N0M0	09/10/1984				0	09/11/1987	37.03947	1	1	1	0	1	0
25	2	187 286	78.12.12	2	79	1	1	40	0	0	37	3	T4N1M0	24/03/1983	01/04/1994			0	29/08/1994	137.3684	1	0	0	0	0	1
26	1	220 285	86.07.43	1	60	1	1	30	0	0	25	2	T2N1M0	02/04/1986				0	19/06/1998	146.7434	0	1	0	0	0	0
26	2	221 164	86.13.57	2	72	1	1	30	0	0	21	2	T2N1M0	25/04/1986	01/07/1997			0	01/01/1998	140.4276	0	1	0	0	1	1
27	1	220 384	22.03.84	1	65	1	1	20	0	0	12	2	T1N1M0	02/02/1986	03/04/1992		04/04/1993	1	04/04/1993	86.11842	1	1	1	0	1	0
27	2	272 904	90.13.94	2	55	1	1	30	0	0	19	2	T2N0M0	15/08/1990	05/12/1997			0	12/06/1998	94.01316	1	0	0	0	1	0
28	1	222 013	86.17.87	0	42	0	1	48	1	1	15	3	T4N1M0	19/05/1986	28/04/1989		03/01/1991	1	03/01/1991	55.59211	1	0	1	0	1	0

C	CC	BIOPSIA	PRONT	HI	IDA	EH	S	T	GA	G	T	G	E	TNM	MASTEC	META	OBITO	OB	USEG	SOBRE	DN	RE	RP	p53	BCCR	
29	1	222 675	86.20.56	1	69	1	1	30	0	0	16	2	T2N1M0	07/06/1986				0	12/12/1996	126.3487	1	1	1	0	1	0
29	2	178 257	82.16.15	2	69	1	1	20	0	0	12	2	T2N1M0	08.05/82			23/09/1991	1	23/09/1991	112.6645	1	1	1	0	1	1
30	1	244 822	87.41.39	0	72	1	1	50	0	0	13	2	T3N1M0	25/04/1988			29/08/1996	1	29/08/1996	100.2632	0	1	0	0	0	0
30	2	190 004	83.21.36	2	60	1	1	55	0	0	27	2	T3N1M0	21/06/1983	07/07/1986		08/04/1988	1	08/04/1988	57.66447	1	0	0	1	0	0
31	1	246 244	88.83.25	1	41	0	1	30	0	0	7	2	T2N0M0	02/06/1988				0	27/11/1996	101.9737	1	0	1	0	0	0
31	2	195 426	83.80.01	2	47	0	1	30	0	0	25	2	T2N0M0	21/08/1983	02/04/1998			0	28/04/1999	188.4539	1	0	0	1	0	0
32	1	262 592	85.16.21	0	53	1	1	30	1	16	30	3	T2N2M0	10/10/1989				0	10/07/1993	45.03289	0	0	0	0	1	0
32	2	165 310	81.01.10	2	50	1	1	30	1	18	18	3	T4N2M0	28/11/1980			15/04/1982	1	15/04/1982	16.54605	1	0	0	0	0	1
33	1	266 821	90.80.12	0	50	0	1	75	1	14	26	3	T4N2M0	21/03/1991	21/06/1991		02/02/1992	1	02/02/1992	10.46053	1	0	1	0	1	0
33	2	314 747	94.24.06	2	48	0	1	51	1	5	12	3	T4N2M0	19/04/1994	10/11/1994		23/03/1996	1	23/03/1996	23.15789	1	1	1	0	1	0
34	1	272 745	90.30.40	0	67	1	1	35	0	0	12	2	T2N0M0	07/08/1990				0	21/10/1994	50.52632	0	1	0	0	1	0
34	2	272 903	90.18.51	2	68	1	1	30	0	0	11	2	T3N0M0	04/09/1990	02/04/1991			0	12/03/1998	90.32895	0	0	0	0	0	0
35	1	281 085	91.05.63	0	42	0	1	110	1	33	36	4	T4N2M1	06/05/1991			06/12/1996	1	06/12/1996	67.13816	1	0	0	0	1	0
35	2	308 449	93.05.50	2	37	0	1	60	9	99	99	4	T4N2M1	02/03/1993			04/05/1994	1	04/05/1994	14.08	1	0	1	1	1	0
36	1	287 551	91.37.46	0	60	1	1	18	0	0	22	1	T1N0M0	09/01/1992				0	23/04/1998	75.52632	1	1	1	0	0	0
36	2	241 098	87.32.77	2	51	1	1	25	1	5	11	2	T2N1M0	20/12/1987			23/05/1988	1	23/05/1988	6.0123	1	1	0	1	0	0
37	1	301 068	93.06.36	0	70	1	1	60	9	99	99	4	T3N1M1	29/03/1993			04/11/1997	1	04/11/1997	55.29605	0	1	0	0	0	1
37	2	314 562	94.30.70	2	66	1	1	50	9	99	99	4	T4N0M1	10/06/1994			01/07/1995	1	01/07/1995	12.69737	0	1	0	0	0	1
38	1	314 405	68.06.70	0	66	1	1	37	1	1	19	2	T2N0M0	26/02/1994				0	12/02/1998	47.59868	1	1	1	0	1	0
38	2	272 900	90.29.54	2	76	1	1	45	1	1	12	2	T2N0M0	14/08/1990			23/09/1993	1	23/09/1993	37.36842	0	0	0	0	0	0
39	1	324 846	95.26.44	1	35	0	1	17	0	0	27	1	T1N0M0	20/07/1995				0	13/08/1998	36.84211	1	1	1	0	0	0
39	2	193 390	81.19.59	2	35	0	1	25	0	0	21	1	T1N0M0	10/10/1981	01/10/1983			0	22/07/1990	105.4934	0	1	1	0	0	1
40	1	97.11.43	97.09.20	1	69	1	1	13	0	0	23	2	T2N0M0	13/03/1997				0	02/03/1999	23.65132	1	1	0	0	0	0
40	2	97.16.37	97.09.06	2	51	1	1	11	0	0	24	2	T2N0M0	13/04/1997				0	14/04/1999	23.91447	0	0	0	1	0	1
41	1	97.23.23	97.16.13	0	66	1	1	50	1	1	32	2	T3N0M0	28/04/1997				0	24/08/1998	15.88816	1	1	1	0	0	0
41	2	314 272	94.20.28	2	60	1	1	25	1	1	28	2	T2N0M0	21/07/1994	22/11/1995		08/12/1996	1	08/12/1996	28.65132	0	0	0	0	0	1
42	1	97.23.76	97.10.67	1	79	1	1	28	1	1	32	2	T3N0M0	30/07/1997				0	23/03/1998	7.763158	1	1	1	0	0	0

