

**DETECÇÃO DO PRODUTO DE TP53 e c-erbB-2,
EM CARCINOMA MAMÁRIO ESTADIO CLÍNICO I
E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICA**

ANDREA BRAGA GODOY

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

Área de concentração: Oncologia

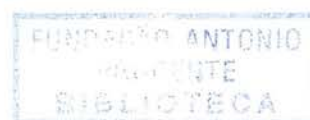


ORIENTADOR:

DR. ANDREW JOHN GEORGE SIMPSON

São Paulo

2001



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Godoy, Andréa Braga

Detecção do produto de TP53 e erbB-2, em carcinoma mamário estadio clínico I e sua correlação clínica / Andréa Braga Godoy. -- São Paulo, 2001.
50 p.

Dissertação(mestrado)–Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Andrew John George Simpson.

Descritores: 1. NEOPLASIAS MAMÁRIAS. 2. c-erbB-2, GENES. 3. TP53, GENES. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA. 5. ANÁLISE SOBREVIDA.

DEDICATÓRIA

Minha mãe

“Aninha-me em teu colo como outrora

Dize-me bem baixo assim: — Filho, não temas

Dorme em sossego, que tua mãe não dorme.”

(Vinícius de Moraes)

Para minha mãe, **Alzira Braga Godoy**, que, na infância, afugentava medos e perigos, compartilha hoje de alegrias e angústias da vida adulta, mas permanece com doçura e o amor incondicional das mães abnegadas.

EXEMPLAR
ESPECIAL

AGRADECIMENTO ESPECIAL

“O HOMEM que pensa
Tem a fronte imensa
Tem a fronte pensa
Cheia de tormentos.
O homem que pensa
Traz nos pensamentos
Os ventos preclaros
Que vêm das origens.
O homem que pensa
Pensamentos claros
Tem a fronte virgem
De ressentimentos.
Sua fronte pensa
Sua mão escreve
Sua mão prescreve
Os tempos futuros.
Ao homem que pensa
Pensamentos puros
O dia lhe é duro
A noite lhe é leve:
Que o homem que pensa
Só pensa o que deve
Só deve o que pensa.”

Fernando Pessoa

Ao meu orientador, **Andrew John George Simpson**, por toda a paciência e dedicação.

Com muita admiração



AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho e apoio incondicional.

Aos meus amigos, por dividirem comigo todas as horas.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani**, diretor do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer-São Paulo, pela oportunidade de realizar meu trabalho nesta instituição.

Ao **Dr. Luiz Fernando Lima Reis**, diretor da pós-graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente, por ter me acolhido no curso e pela orientação dispensada.

Ao **Dr. Humberto Torloni**, por toda orientação clínica, revisão anátomo-patológica dos casos estudados e principalmente por sua generosidade e disponibilidade.

À Dra. **Angela Flávia Logullo Waitzberg**, pela interpretação imunohistoquímica, além de participação constante no estudo, mas principalmente pelo incentivo e amizade inesgotáveis.

À Dra. **Annamaria Aranha Camargo**, pelos ensinamentos na área de Biologia Molecular e toda dedicação.

Ao **Dr. Mário Mourão Neto**, por ter permitido a utilização da casuística do Departamento de Mastologia do Hospital do Câncer e por sua amizade.

À estas mulheres, **Dra. Maria Mitzi Brentani, Dra. Maria Aparecida Nagai, Dra. Luiza Lina Vila e Dra. Vilma Regina Martins**, que com seu exemplo de vida, me mostraram o espírito da Ciência.

Ao **Departamento de Anatomia Patológica** por ter me cedido material para o estudo.

A todos os amigos do laboratório **José Cláudio Casali, Valéria Paixão, Edina Pires, Elisangela Monteiro, Ricardo Moura, Ricardo Correa, Anna Cristina Matos Salim, Silvana Cláudia Fernandes** e as pessoas dos outros laboratórios pelo convívio agradável, amizade, ajuda e carinho.

Aos funcionários da Anatomia Patológica em especial: **Carlos Ferreira do Nascimento, Miyuki Fukuda da Silva e João Simão Pereira Sobrinho**, por tanto trabalho realizado durante este estudo.

À **Suely Nomogaki**, pela realização da técnica de imunohistoquímica com esmero e pela enorme atenção dispendida.

À **Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari e Márcia Miwa Hiradatani**, funcionárias da pós-graduação, pelo suporte administrativo durante todo curso, pelas valiosas informações, disponibilidade e carinho.

À **Lourdes Cardoso e Eliane Lopes Ribeiro** por todo apoio e atenção , durante estes anos no Instituto Ludwig.

Aos **funcionários do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre Câncer** pelo valioso convívio.

À **Sra. Hirde Contesini**, responsável pela Serviço de Arquivo Médico do Hospital do Câncer, modelo em todo país e responsável pelo invejável índice de registro seguimento clínico deste estudo.

À **Suely Francisco**, por toda sua orientação bibliográfica e empenho dispendido.

À **Patrícia Logullo**, pela dedicação e auxílio na formatação deste estudo.

Aos amigos de todo momento, especialmente **Roberto Lasalvia Schimdt**, por todo amor, suporte em informática e outros assuntos.

Aos **membros da banca de qualificação** por todo o estímulo e orientação durante a realização do trabalho.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro dado ao trabalho e pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Fatores predisponentes	2
1.2. História natural da doença	4
1.3. Fatores prognósticos	6
1.3.1. Extensão anatômica tumoral	6
1.3.2. Biologia tumoral	7
1.3.3. Biologia molecular do tumor	10
1.3.3.1. TP53	10
1.3.3.2. c-erbB-2	15
2. Objetivos	18
3. Materiais e métodos	19
3.1. População/critérios de inclusão	19
3.2. Métodos laboratoriais	19
3.3. Análise estatística	22
4. Resultados	23
4.1. População	23
4.2. Imunohistoquímica para p53	26
4.3. Imunohistoquímica para c-erbB-2	27
4.4. Correlações clínicas	28
5. Discussão	33
6. Conclusões	38
7. Referências bibliográficas	39
8. Anexo 1	49

RESUMO

A grande incidência do câncer de mama no mundo ocidental orienta os esforços pela identificação e utilização adequada de fatores prognósticos, que, às vezes, podem falhar na previsão do curso da doença e não individualizar subgrupos de maior risco. Um exemplo são os 20 a 30% de pacientes com estágio inicial sem comprometimento linfonodal axilar que apresentam recidiva. O desenvolvimento da biotecnologia permitiu a identificação de alterações genéticas relacionadas aos tumores. Nos carcinomas mamários, as mais importantes e frequentes alterações, atingem o gene supressor de tumor TP53 e o oncogene c-erbB-2. Este estudo objetivou avaliar o valor prognóstico da detecção das proteínas de TP53 e c-erbB-2 em câncer de mama, estágio inicial. Foram estudados 156 casos de mulheres com carcinoma primário de mama, ductal invasivo de estágio clínico I (T1 N0 M0), submetidas a cirurgia conservadora e radioterapia (QUART), entre 1993 e 1994, com análise laboratorial feita por imunohistoquímica, sendo usados para p53 os anticorpos DO7 e PAB1801 e para c-erbB-2 o anticorpo NCL-B11. A detecção de p53 correlacionou com diminuição da sobrevida global ($p=0,0081$) e livre de doença ($p=0,0052$). C-erbB-2 esteve correlacionado com sobrevida livre de doença ($p=0,00001$). Ambas proteínas, quando analisadas em conjunto conseguiram ser ligadas a sobrevida global e livre de doença, respectivamente ($p=0,0019$ e $p=0,00001$). A identificação por imunohistoquímica obteve os índices descritos na literatura para o estágio em questão, devendo portanto ser utilizada no carcinoma mamário inicial. A identificação de grupo com risco tão aumentado para recidiva e óbito torna p53 e c-erbB-2 fatores de prognóstico de fundamental avaliação. O emprego desses resultados na seleção do melhor esquema terapêutico será no futuro breve realidade.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama vem ocupando lugar de destaque nos últimos anos, tendo enorme impacto sobre a saúde da mulher. Anualmente, nos Estados Unidos, 180.000 mulheres apresentam diagnóstico e 44.000 morrem de câncer de mama. O câncer mamário contribui com 30% da incidência total de câncer entre mulheres e é a segunda *causa mortis* por câncer, sendo superado somente pelo câncer de pulmão na população em geral (NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS, 1998).

No Brasil, segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (Inca), são diagnosticados 28.340 casos novos de câncer de mama por ano com taxa bruta de incidência de 33,58/100.000 e 8.245 óbitos por ano (taxa bruta de mortalidade de 9,78/100.000). Muitos países, inclusive o Brasil, adotaram, nas últimas décadas, o programa de detecção do câncer de mama com rastreamento mamográfico seriado. O diagnóstico precoce de tumores em estágio clínico inicial tem sido mais freqüente e permitido redução das taxas de morbidade e mortalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

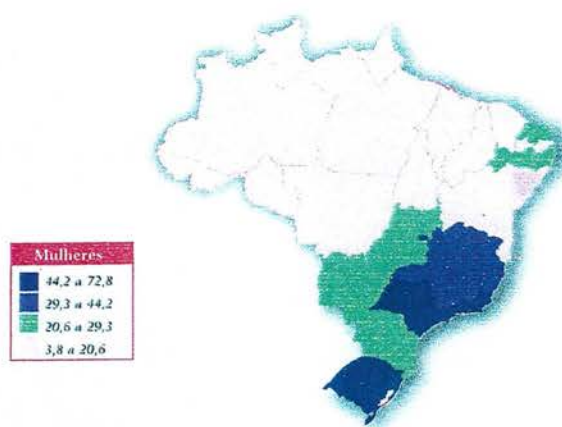


Figura 1. Representação espacial da taxa de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres estimada para o ano 2000 segundo a Unidade da Federação (Brasil, Ministério da Saúde, 2000)

Pacientes no estágio clínico I, isto é, com tumores de até 2 cm e ausência de comprometimento de gânglios axilares — em que se espera curso natural da doença favorável — apresentam taxa de recidiva local e metástase à distância de cerca de 20% (CHU, 1996). Na última década, pesquisadores têm concentrado esforços a fim de separar, entre os casos de mesmo estágio clínico, grupos de maior risco, por meio da identificação de novos fatores prognósticos. A necessidade de individualizar os tumores, aliada ao desenvolvimento tecnológico atual, possibilitou a detecção das alterações genéticas em células malignas (BIÈCHE e LIDEREAU, 1995).

1.1. FATORES PREDISPONENTES

Vários fatores tornam parte da população mais predisposta a desenvolver o câncer de mama e a identificação deste grupo permite estabelecer o rastreo e diagnóstico precoce. O sexo é fator de risco mais facilmente evidenciado, pois, a cada 100 mulheres acometidas, somente um homem apresenta câncer de mama (NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS, 1998).

A idade é um dos mais relevantes fatores de risco para câncer em geral. O câncer de mama é raro antes dos 20 anos e incomum entre mulheres de 30 anos. A incidência aumenta agudamente da menacme até menopausa e, depois, sofre uma diminuição. O comportamento da incidência do câncer de mama em relação a sexo e idade sugere envolvimento etiopatogênico dos hormônios sexuais (NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS, 1998).

A incidência de câncer de mama feminino varia marcadamente entre os países; sendo alta nos Estados Unidos e norte de Europa, intermediária no sul, leste da Europa e também na América do Sul e baixa na Ásia. Lugares que, historicamente, apresentam baixa incidência têm sofrido alterações dessas taxas nos últimos anos, devido à adoção do estilo de vida ocidental e mudança do comportamento reprodutivo (PIKE et al., 1991; PARKIN et al., 1992).

O nível socioeconômico e comportamentos reprodutivos de risco influenciam decisivamente a incidência em diferentes raças. Afroamericanas apresentam menor incidência de câncer de mama comparada com americanas brancas. Este fato pode ser explicado pelo número aumentado de gestações a termo e em idade precoces entre as afroamericanas (PARKIN et al., 1992; STURGEON et al., 1995).

Idade de menarca precoce, ciclos menstruais curtos, nuliparidade, baixa paridade, idade tardia da primeira gestação a termo, abortos induzidos ou espontâneos, menopausa tardia, entre outros, aumentam a exposição aos hormônios sexuais e manutenção das células em estado indiferenciado de desenvolvimento. Este cenário favorece a susceptibilidade aos carcinógenos e acúmulo de mutações (ROSNER et al., 1994; PALMER et al., 1997).

A análise dos fatores reprodutivos enriquece a detecção dos grupos com risco mais elevado para câncer de mama. O uso de anticoncepcionais orais em idade precoce e terapia de reposição hormonal por mais de 10 anos proporciona discreto aumento do risco relativo de câncer de mama (WHITE et al., 1994; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 1997).

Aspecto de especial relevância atualmente é a história familiar de câncer de mama. A grande maioria dos tumores de mama é tida como esporádica; porém, em torno de 5 a 10% dos casos apresentam características de envolvimento dos fatores hereditários (BREAST CANCER LINKAGE CONSORTIUM PATHOLOGY OF FAMILIAL BREAST CANCER, 1997). Os principais genes identificados até o momento nos casos de câncer de mama hereditário são BRCA1, BRCA2, TP53 e ATM. Várias síndromes descritas relacionadas ao câncer de mama hereditário são as síndromes mama-ovário, Li-Fraumeni, ataxia-telangectasia, doença de Cowden, Peutz-Jeghers e Muir-Torre (BREAST CANCER LINKAGE CONSORTIUM PATHOLOGY OF FAMILIAL BREAST CANCER, 1997).

Outros elementos ligados principalmente ao estilo de vida, como sedentarismo, obesidade, além de consumo habitual de gorduras e álcool, são relacionados, na literatura, ao risco relativo aumentado para câncer de mama (SMITH-WARNER et



al., 1998; HOLMES et al., 1998; ZHANG et al., 1999).

1.2. HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA

O longo período de evolução da doença é um dos aspectos mais marcantes da história natural do câncer de mama. O tempo médio de duplicação tumoral é de 100 dias, sendo necessários, então, oito anos para uma única célula maligna se transformar em tumor de 1 cm clinicamente detectável (NORTON, 1998).

Apesar de fórmulas matemáticas baseadas no esquema de progressão logarítmica tumoral terem grande apelo didático, a realidade se traduz com mais complexidade, tornando o tempo de duplicação tumoral uma resultante entre a fração de crescimento celular e a perda celular. O aumento tumoral pode também ser cíclico, com fase de crescimento que obedece a ritmo logarítmico, entremeado por fase latente (NORTON, 1998).

O câncer primário de mama obedece a um modelo de disseminação que consiste em infiltração direta no parênquima mamário, posteriormente por entre os ductos mamários em direção aos linfáticos mamários (QUIET et al., 1995; QUIET et al., 1996). O envolvimento dos gânglios linfáticos também segue um padrão de propagação, sendo primeiramente acometidos os linfonodos axilares homolaterais, seguidos pelos gânglios mamários internos e axilares contralaterais e, finalmente, pelos supraclaviculares. A propagação hematogênica assume papel de menor relevância, porém enriquecendo as possibilidades de apresentação clínica dos tumores (GRAY, 1939). A presença de metástases à distância pode se dar em inúmeros órgãos, sendo os mais freqüentemente acometidos os ossos, pulmão e fígado. O período de desenvolvimento de metástases à distância é muito variável e influenciado pelo tamanho tumoral e acometimento linfonodal e pode se tornar extremamente longo, o que faz com que o critério de cura seja muito problemático (WARREN, 1993).

O estadiamento tumoral adotado para câncer de mama (*tumor node metastasis*

— TNM) agrupa os tumores em estádios clínicos para facilitar o manuseio terapêutico, bem como estabelece faixas de comportamento prognóstico (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 1997) (Tabela 1).

Tabela 1. Estadiamento clínico de carcinoma mamário de acordo com a quinta edição do American Joint Committee on Cancer (1997)

Tumor primário			
TX	Tumor primário que não pode ser avaliado		
T0	Sem evidência de tumor primário		
Tis	Carcinoma in situ		
T1	Tumor de 2 cm ou menos no maior diâmetro		
T1mic	Microinvasão de 0,1 cm ou menos no maior diâmetro		
T1a	Tumor maior que 0,1 cm e menor que 0,5 no maior diâmetro		
T1b	Tumor maior que 0,5 cm e menor que 1 cm no maior diâmetro		
T1c	Tumor maior que 1 cm e menor que 2 cm no maior diâmetro		
T2	Tumor maior que 2 cm e menor que 5 cm no maior diâmetro		
T3	Tumor maior que 5 cm no maior diâmetro		
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta para: parede torácica e pele, como descrito a seguir		
T4a	Extensão a parede torácica		
T4b	Edema, ulceração da pele da mama, nódulos satélites na pele confinados à mesma mama		
T4c	Ambos (T4a e T4b)		
T4d	Carcinoma inflamatório		
Linfonodos regionais			
NX	Linfonodos regionais que não podem ser avaliados		
N0	Sem metástases em linfonodos regionais		
N1	Metástases móveis em linfonodos axilares ipsilaterais		
N2	Metástases fixas a outras estruturas em linfonodos axilares ipsilaterais		
N3	Metástases em linfonodos mamários internos ipsilaterais		
Metástases			
MX	Metástases à distância, que não podem ser avaliadas		
M0	Ausência de metástases à distância		
M1	Metástases à distância		
Estadiamento clínico			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
Estádio IIIB	T3	N2	M0
	T4	qualquer N	M0
	qualquer T	N3	M0
Estádio IV	qualquer T	qualquer N	M1

1.3. FATORES PROGNÓSTICOS

O câncer de mama se apresenta como uma doença de grande diversidade fenotípica, consistindo a identificação de grupos prognósticos um constante desafio para clínicos e pesquisadores. Alguns possíveis fatores prognósticos descritos na literatura são a extensão anatômica tumoral, a biologia e as características tumorais identificadas por técnicas de biologia molecular, como a presença de oncogenes e genes supressores de tumor.

1.3.1. Extensão anatômica tumoral

Inúmeros fatores concorrem para a identificação da extensão anatômica tumoral. O tamanho do tumor é fator importante e diretamente relacionado ao estado de comprometimento linfonodal (NEMOTO et al., 1983). Entre os pacientes com carcinoma mamário sem comprometimento de gânglios axilares, a determinação do tamanho tumoral é forte fator prognóstico, sendo relacionada às taxas de recorrência da doença (KOSCIELNY et al., 1984).

Inúmeros estudos têm examinado a relação entre tamanho tumoral e evolução clínica. As taxas de recidiva da doença geralmente aumentam na razão diretamente proporcional ao aumento tumoral (FISHER et al., 1969; ADAIR et al., 1974; NEMOTO et al., 1980; KOSCIELNY et al., 1984; CARTER et al., 1986; MOON et al., 1987; CARTER et al., 1989; ROSEN et al., 1989a; ROSEN et al., 1989b).

A utilização do tamanho do tumor em casos cujos linfonodos estão livres de invasão tumoral, a fim de definir o emprego de terapia adjuvante foi proposta e vem sendo observada em muitos centros terapêuticos (MCGUIRE e CLARK, 1992). Estudo realizado pelo National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) relatou uma taxa de recorrência de 25% entre pacientes livres de acometimento axilar e receptor estrogênico negativo (RE negativo) (FISHER et al., 1989).

A presença ou ausência de envolvimento metastático linfonodal axilar é o fa-

tor prognóstico mais poderoso disponível para pacientes com carcinoma mamário primário. Apesar de o envolvimento linfonodal estar associado a tumores maiores, apresenta-se como fator relativamente independente de outros marcadores biológicos, incluindo presença de receptores esteroídicos e medidas de proliferação tumoral (CHADHA et al., 1994).

A dissecação axilar provê, portanto, importante informação prognóstica, mas seu valor terapêutico em obter controle locoregional é questionado. Muitos investigadores têm conduzido pesquisas no intuito de substituir a dissecação axilar por dados fornecidos por meio do uso de outros fatores prognósticos disponíveis, mas sem sucesso (CHADHA et al., 1994; SILVERSTEIN et al., 1994; RAVDIN et al., 1994).

A prática médica vigente, baseada em estudos científicos clássicos — de ministrar terapia sistêmica adjuvante para todos os casos com comprometimento axilar comprovado, sem contra-indicação — mostra que o grupo de pacientes com necessidade de busca de novos fatores prognósticos é o aquele sem metástases linfonodais.

Quando colocados juntos os dados de tamanho do tumor e estado linfonodal, somados a presença de lesões à distância, obtemos a classificação por estadiamento clínico-patológico (TNM), que agrupa pacientes conforme a extensão da doença. A classificação atual é a quinta edição elaborada pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) (FISHER et al., 1969; CARTER et al., 1989; SMITH et al., 1997; CADY et al., 1996; AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 1997). A multicentricidade, bem como a invasibilidade dos vasos sangüíneos e linfáticos e invasão perineural, são dados complementares de grande relevância, fornecidos pelo exame anátomo-patológico (LESSER et al., 1982).

1.3.2. Biologia tumoral

As características histológicas apresentados pela anatomia patológica são fundamentais e, juntamente com o estadiamento clínico, norteiam, há muito, a definição prognóstica e orientação terapêutica, na grande maioria dos casos (PAGE e ANDER-

SEN 1987; HENSON et al., 1991; MANSOUR et al., 1994; GUPTA et al., 1997).

O tipo histológico, grau de diferenciação celular e nuclear, além do conhecimento dos receptores hormonais, são ricos em informação prognóstica e preditiva (WENGER et al., 1993; MOLINO et al., 1997; ROBERTI, 1997). Os tipos histológicos mais comuns são o ductal invasivo e lobular invasivo em suas formas puras ou em combinação com outros tipos tumorais. Pacientes com carcinoma ductal invasivo geralmente têm alta incidência de comprometimento axilar e evolução clínica desfavorável, quando comparados aos pacientes com tumores invasivos menos freqüentes, como por exemplo os medulares. O Quadro 1 expõe a classificação dos tipos histológicos dos carcinomas mamários.

Quadro 1. Tipos histopatológicos de carcinomas mamários

Carcinoma sem outras especificações

Ductal

intraductal (*in situ*)
 invasivo com predominância do componente intraductal
 invasivo
 comedocarcinoma
 inflamatório
 medular
 mucinoso ou colóide
 papilar
 esquirroso
 tubular
 outros

Lobular

in situ
 invasivo com componente *in situ* predominante
 invasivo

Mamilar

doença de Paget
 doença de Paget com carcinoma intraductal
 doença de Paget com carcinoma ductal invasivo

Carcinoma indiferenciado

Outros

O grau histopatológico tumoral é componente padrão dos laudos de anatomia patológica, porém a falta de reprodutibilidade e de concordância entre diferentes observadores só conseguiu ser superada quando tomou-se a iniciativa de criar classificações padronizadas. A mais usada é de Scarf-Bloom-Richardson (SBR), que avalia grau de diferenciação celular, pleomorfismo e índice mitótico (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 1997) (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação histopatológica tumoral de Scarf-Bloom-Richardson

GX	Grau não pode ser avaliado
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pouco diferenciado ou indiferenciado

O estado do receptor esteroídico, determinado por ensaio com ligantes, tem sido usado há muitos anos nas decisões terapêuticas em câncer de mama avançado. O primeiro relato da significância prognóstica na detecção de receptor estrogênico (RE) foi feito em 1977 (KNIGHT et al., 1977). Apesar de alguns resultados conflitantes, os estudos com casuística ampla e seguimento longo demonstraram que tumores com RE positivo apresentam intervalo livre de doença prolongado, atingindo uma vantagem de 10% (CLARK e MCGUIRE, 1988).

A presença do receptor de progesterona (RP) é indicativa de via de resposta estrogênica intacta, pois esta proteína é produzida por estímulo estrogênico (HOROWITZ et al., 1975). Em análises multivariadas de pacientes sem linfonodos axilares comprometidos, ambos RE e RP correlacionam-se com a evolução clínica. Frequentemente o estado de RE correlaciona-se fortemente com intervalo livre de doença e RP com sobrevida global, provavelmente por ser melhor como fator preditivo da resposta à terapia endócrina depois de doença recorrente. Os níveis de RP e RE são relacionados inversamente aos índices proliferativos e diretamente ao grau histológico tumoral (SILVESTRINI, 1994; WENGER et al., 1993). As concentrações de RE aumentam linearmente com a idade; entretanto, as de RP são dependentes do estado menopausal (CLARK et al., 1984).

O estudo atual da cinética celular com o reconhecimento da fração celular que se encontra em fase S (síntese de DNA), a análise da ploidia celular, além de outros índices proliferativos, como o antígeno Ki67, ANPC (antígeno nuclear de proliferação celular), índice mitótico e de timidina, são elementos relevantes para o conhecimento do comportamento das células malignas (WENGER et al., 1993).

1.3.3. Biologia molecular do tumor

O câncer é uma doença com origem fundamentada em alterações em vários tipos de genes; os genes supressores de tumor, os proto-oncogenes e genes de reparo de DNA (FISHER et al., 1988; WENGER et al., 1998; DICKSON e LIPPMAN, 1997). No câncer de mama, um esquema de progressão tumoral, a exemplo do que ocorre com câncer de cólon, sempre foi de difícil construção, pois mesmo o evento inicial é discutível. Ainda assim, a passagem de epitélio ductal normal para lesões proliferativas típicas, atípicas, carcinoma *in situ* e invasor é acompanhada por mutações com inativação em genes supressores de tumor, bem como ativação de oncogenes, ambos ligados ao ciclo celular. Dentre as alterações genéticas mais importantes em câncer de mama, as mais explicativas são as que atingem o TP53, um gene supressor de tumor, e o c-erbB-2, um oncogene (SATO et al., 1991; NAGAI, 1993).

1.3.3.1. TP53

Em 1979, a proteína p53 foi identificada, complexada a oncoproteínas virais, e, em 1983, o gene TP53 foi clonado (LANE e CRAWFORD, 1979). Desde 1989, foi classificado como gene supressor de tumor (Figura 2), nomeado guardião do genoma e, hoje, é tema da maioria das publicações científicas do gênero (ELIYAHU et al., 1984; PARADA et al., 1989; DONE HOWER e BRADLEY, 1993; LANE, 1993).

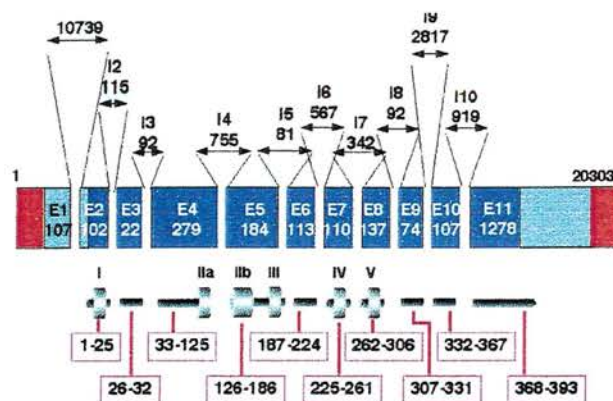


Figura 2. Estrutura do gene TP53

O TP53 (Figura 3) é um fator transcricional que orchestra a resposta celular que se segue ao dano do DNA. É responsável pela estabilidade genômica, agindo por meio do bloqueio da replicação celular (fase G1/S), até o reparo do dano, ou pelo início do processo de apoptose (bax, Fas APO-1), se o dano for extenso demais para o reparo (WAHL et al., 1996). TP53 age também na angiogênese, no processo de senescência e na diferenciação celular (EL-DEIRY et al., 1993; HINDS et al., 1989; VOGSTEIN e KINZELER, 1992).

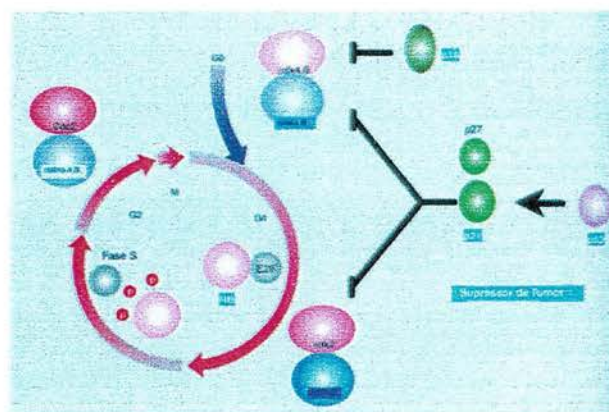


Figura 3. Função de TP53 em relação ao ciclo celular

Localizado no braço curto do cromossomo 17, banda 13.1, apresenta 11 éxons e 20 Kb de DNA. Cinco domínios são evolutivamente conservados, o que coincide com sua importância funcional (MC BRIDGE et al., 1986).

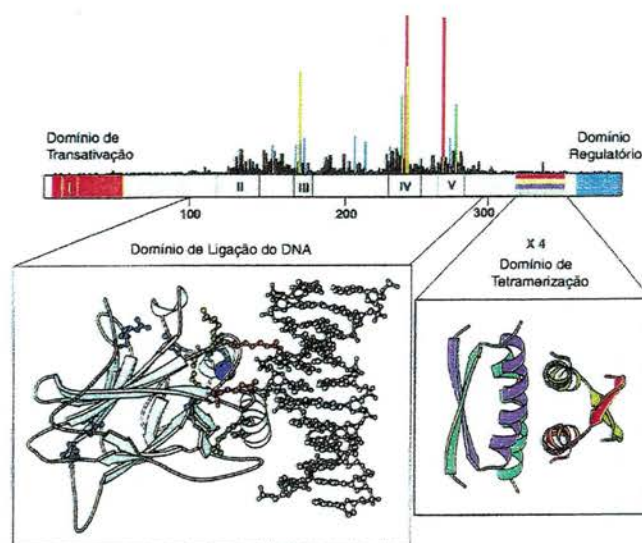


Figura 4. Estrutura de p53 e indicação de sítios freqüentes de mutações

O gene codifica uma fosfoproteína de localização nuclear de 393 aminoácidos, que se liga ao DNA-alvo específico através de alças mantidas unidas por um átomo de Zinco, identificada por estudo tridimensional (CHO et al., 1994). A proteína p53 se apresenta em forma de tetrâmeros, bastando a alteração de um dos monômeros para modificação da conformação estrutural e perda da função. É o efeito dominante de TP53, que difere do modelo tradicional para genes supressores de tumores (KNUDSON, 1971; HANN e LANE, 1995).

A proteína mutada apresenta ainda um aumento de sua estabilidade, tendo sua meia-vida prolongada, o que a torna detectável através de ensaios de imunohistoquímica (ELLEGDE et al., 1994). Mutações que alterem ou eliminem a função da proteína p53 são as alterações genéticas mais comuns observadas em cânceres humanos, surgindo como um passo necessário para o processo de carcinogênese. Estas mutações são geralmente associadas a perda do segundo alelo do gene (HOLLSTEIN et

al., 1991). Mecanismos epigenéticos, segregação nuclear da proteína, formação de complexos com oncoproteínas virais e mdm2, além do aumento da degradação da proteína via ubiquitina, são eventos que inativam p53 em vários tipos de tumores (MOLL et al., 1992).

As mutações em p53 não são aleatórias, mas se concentram entre os éxons 5 a 8, que correspondem a quatro dos cinco domínios conservados evolutivamente e à porção central ligadora de DNA. São três focos principais de mutações, localizados nos códons 175, 248 e 273 (HARTMANN et al., 1995).

Existem dois tipos de alterações genéticas que motivam as mutações; aquelas derivadas de processos endógenos relacionados ao metabolismo do DNA e as exógenas, originárias de fatores ambientais. A transição C→T é a mais freqüente e ocorre, na maioria das vezes, nos dinucleotídeos CpG. A deaminação espontânea da 5-metilcitosina é uma causa importante nesta transição. De fato, os três códons, 175, 248 e 273, contêm esse dinucleotídeo e mais de 90% dos eventos mutacionais nestes códons são compatíveis com o fenômeno de deaminação (MAGEWU e JONES, 1994).

Em câncer de mama, a caracterização das mutações é muito complexa. Diferenças raciais e populacionais que refletem processos endógenos somados à exposição a carcinógenos ambientais aumentam a diversidade das mutações. Deleções ou inserções e transversões também podem ocorrer (MAGEWU e JONES, 1994).

As alterações de p53 podem ser avaliadas por vários métodos, diretos e indiretos. Detecção da proteína mutada de p53 através de imunohistoquímica é rápida, simples e barata. A proteína alterada p53 pode ser detectada, pois sua vida média passa a ser de 4 a 20 horas, enquanto que a proteína normal tem vida média de 5 a 20 minutos (HALL e LANE, 1994).

Há anticorpos específicos para proteínas mutantes e outros, que detectam também proteínas normais estáveis, não conseguindo diferenciá-las. Por isso, o uso combinado de dois ou mais anticorpos é alternativa estratégica importante.

O uso combinado da dupla de anticorpos PAb 1801 e D07 proporciona localização antigênica favorável. O anticorpo PAb1801 detecta o epitopo 1-45 aminoáci-

dos e o D07, o epítopo 32-79 aminoácidos (VOJTESEK et al., 1992).

A detecção da proteína p53 por imunohistoquímica em carcinoma mamário é possível em 20% a 45% dos casos e depende dos anticorpos utilizados, da qualidade de fixação utilizada e do estágio clínico estudado (UMEKIT et al., 1994). Recentemente, a recuperação antigênica através do uso de microondas ocasionou resultados mais precisos. A escolha de padrões rígidos para leitura da imunohistoquímica, bem como análise semiquantitativa adotada, aumentaram a sensibilidade e especificidade do método (SHI et al., 1991; O'MALLEY et al., 1996).

Métodos indiretos de detecção de mutação em TP53 são principalmente o *single strand conformation polymorphism* (SSCP), *constant denaturant gel eletrophoresis* (CDGE) e *denaturant gel gradient eletrophoresis* (DGGE), baseados em diferenças conformacionais e elétricas que o produto de amplificação assume em corrida eletroforética específica (BORRESEN et al., 1991; MOYRET et al., 1994; GUMERLOCK et al., 1997).

O sequenciamento direto semi-automático é o padrão ouro de detecção das mutações, porém a obtenção de seqüências adequadas para análise de mutações pontuais requer produto adequado amplificado através de reação de polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction* — PCR) (BERGH et al., 1995). O estudo funcional da proteína, bem como a detecção sorológica de anticorpo para TP53, também faz parte da avaliação do estado de TP53.

Correlação prognóstica entre alterações detectadas em TP53 varia conforme a metodologia aplicada para sua detecção, mas está presente de maneira evidente em diversos estudos (NAYAK et al., 1996; SOONG et al., 1996; VISSCHER et al., 1996).

Nas pacientes com comprometimento axilar evidenciado, a presença de alteração em TP53 associou-se a diminuição do tempo livre de doença e sobrevida global (ANDERSEN et al., 1993; THORLACIUS et al., 1993). No entanto, os casos de pacientes sem positividade linfonodal apresentam correlação com alta taxa de proliferação celular e grau de diferenciação celular, além de curta taxa de sobrevida livre de doença (ALLRED et al., 1993; ELLEDGE et al., 1993; SILVESTRINI et al., 1993;

SILVESTRINI et al., 1996).

TP53 surge como fator preditivo em câncer de mama, ligado a resistência a doxorubicina e outros agentes terapêuticos que lesam o DNA (WU e EL-DEIRY, 1996, AAS et al., 1996). A transfecção de adenovírus que expressa p53 elimina a resistência terapêutica. O mecanismo através do qual se dá essa resistência é a inibição dos mecanismos apoptóticos, bem como a ativação via p53 do gene *multiple drug resistance* (MDR) (GUDAS et al., 1996).

Radiorresistência foi observada em vários estudos, porém a relação entre alterações de TP53 e radioterapia permanece controversa (BERGH et al., 1995; JANS-SON et al., 1995). A ótima resposta aos taxóides, entre tumores com TP53 mutado, aparece como alternativa de tratamento. Os taxóides agem nos microtúbulos em via que independe de TP53 (WAHL et al., 1996).

1.3.3.2. *c-erbB-2*

Ativados por mudanças quantitativas ou qualitativas, os oncogenes influenciam direta ou indiretamente funções ligadas ao crescimento celular, fazendo com que seja iniciada uma cascata de transdução de sinais que ocasiona transformação oncogênica. Células transformadas perdem restrições impostas às células normais, como dependência de soro e inibição de contato célula-célula. Adquirem novas propriedades como habilidade de invadir e metastatizar. Muitas propriedades fenotípicas mudam nas células tumorais quando comparadas a células normais. Genes podem ser identificados individualmente associados a essa transformação. (SHACKNEY et al., 1997).

Entre os grupos de proto-oncogenes, os receptores para fatores de crescimento celular ocupam lugar de destaque, devido ao fato de estarem frequentemente alterados nos cânceres sólidos. Estes receptores têm como ligantes pequenos polipeptídeos, ou citocinas, que estimulam classes específicas de células (Figura 5) (BERGMAN et al., 1986).

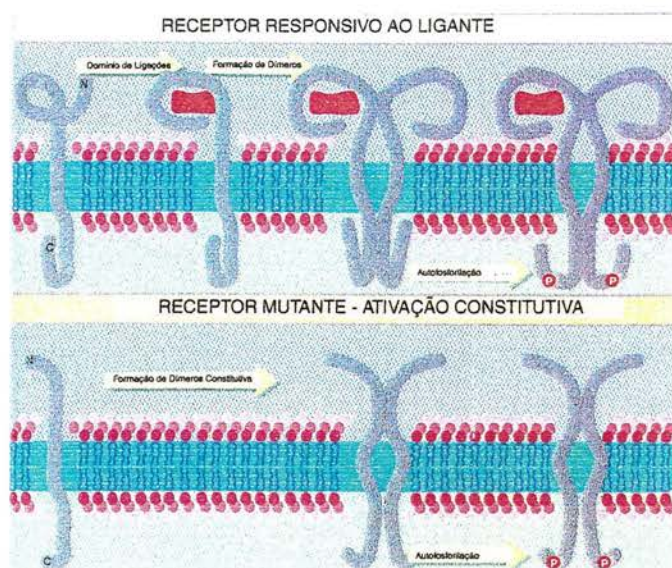


Figura 5. Ativação constitutiva de c-erbB-2 mutado

Os receptores de fatores de crescimento têm uma estrutura comum; uma porção extracelular (N-terminal), uma porção transmembrânica e, finalmente, a porção citoplasmática (C-terminal). Existem três tipos de receptores classificados conforme os aminoácidos que fosforilam nas proteínas-alvo, são as proteínas tirosina-quinase, serina/treonina-quinase e as quinases de dupla especificidade (SEBASTIAN et al., 1998).

O mecanismo de ação é desencadeado quando o ligante se acopla no domínio extracelular e promove mudança conformacional, induzindo a dimerização. Isto leva à aproximação dos domínios citoplasmáticos, catalíticos e ativação das quinases, possibilitando a autofosforilação, evento chave pelo qual esses receptores são ativados (SLAMON et al., 1987).

Oncogene c-erbB-2 é gene da família que codifica para o receptor de membrana, cujo ligante é o fator epitelial de crescimento. Identificado em 1981, foi denominado neu, pois foi isolado em neuroblastomas induzidos em ratos. Em 1985, foi identificado seu homólogo humano Her-2/neu. Finalmente, evidenciou-se a semelhança com o gene que codifica o receptor para fator epitelial de crescimento (WEN et al., 1992).

Localizado também no cromossomo 17, codifica glicoproteína transmembrânica de 185 Kd, com atividade tirosina-quinase. Mutação na porção transmembrânica possibilita a formação de dímeros e autofosforilação independente do ligante com a ati-

vação constitutiva do receptor e dos mecanismos mitogênicos (PIETRAS et al., 1995).

Superexpressão de c-erbB-2 ocorre em torno de 20% dos casos de câncer de mama e representa evento precoce da tumorigênese (SLAMON et al., 1987). Correlaciona-se, em pacientes com comprometimento dos gânglios axilares, com diminuição do tempo de sobrevida global e aumento das taxas de recidiva precoce (BORG et al., 1990; RAVDIN e CHAMNESS, 1995). Pacientes sem comprometimento axilar têm risco aumentado de desenvolver doença recorrente quanto maior for a superexpressão de c-erbB-2 (PATERSON et al., 1991; ALLRED et al., 1992; KLYN et al., 1994; REED et al., 2000).

A superexpressão de c-erbB-2 é também fator preditivo, pois interfere na terapêutica com tamoxifeno, mesmo na presença de receptores estrogênicos; bem como diminui a resposta à doxurubicina (PAIK et al., 1998). A presença de superexpressão de c-erbB-2 mostra uma relação negativa com os receptores hormonais (SAINSBURY et al., 1995).

Instabilidade genética, invasão vascular e presença de componente intraductal extenso apresentam-se, com freqüência, nos casos de superexpressão de c-erbB-2. A detecção de proteína c-erbB-2 é facilmente evidenciada por imunohistoquímica, que marca fortemente a membrana celular. Tecidos emblocados não representam impedimento para aplicação da técnica, tendo boa correlação, portanto, em parafina (PRESS et al., 1994).

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

1. identificar na população estudada os possíveis grupos de maior risco para recorrência e morte por câncer mamário;
2. detecção da proteína p53 em pacientes com carcinoma primário de mama em estágio clínico I (EC I) e estabelecer correlações clínicas;
3. detecção da proteína c-erbB-2 em pacientes com carcinoma primário da mama em estágio clínico I (EC I) e estabelecer correlações clínicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO/CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

O trabalho retrospectivo avaliou 156 casos consecutivos atendidos entre 1993 e 1994. Os critérios de inclusão foram o sexo feminino, diagnóstico de carcinoma primário de mama, tipo histológico ductal invasivo, cujo tumor não ultrapassou 2 cm de maior diâmetro (T1), sem comprometimento linfonodal axilar (N0) ou à distância.

Todos os casos incluídos foram submetidos a terapêutica cirúrgica conservadora (quadrantectomia/axilectomia) seguida de radioterapia, ambas realizadas no Hospital A.C. Camargo (“Hospital do Câncer”), respectivamente pelos Departamentos de Mastologia e Radioterapia. O diagnóstico foi obtido por meio de exame anátomo-patológico da peça cirúrgica no departamento de Patologia.

Ao todo, 44 casos de carcinoma de mama, de um total de 200 atendidos no mesmo centro nessa época, foram excluídos por não obedecerem aos critérios de inclusão ou pelo fato de o material emblocado não estar adequado à análise anátomo-patológica.

Os casos incluídos foram avaliados por intermédio de ficha analítica, onde dados epidemiológicos, clínicos, histopatológicos, terapêuticos e de seguimento foram coletados (Anexo 1).

3.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

Revisão anátomo-patológica foi realizada por um único observador por meio de microscopia óptica (MO), sendo estabelecidos tipo histológico, invasibilidade, grau tumoral e presença de metástases linfonodais. O tumor de tamanho de até 2 cm

foi estratificado segundo American Joint Comitee on Cancer, em T1a, T1b e T1c (AMERICAN JOINT COMITEE ON CANCER, 1997). A revisão de todas as lâminas de cada caso foi realizada, com a finalidade da escolha dos blocos de parafina mais representativos do tumor.

A técnica imunohistoquímica utilizada para análise dos 156 casos para detecção de p53 é detalhada a seguir, sendo o anticorpo utilizado o DO7 (DAKO, Carpinteria, CA) e PAB1801 (Novocastra Lab, UK).

- A- Realizados cortes de 3 μ m de espessura no material incluído em bloco de parafina selecionado;
- B- tratamento das lâminas com 3-Aminopropil-triethoxi-silano, por 24 horas a 60° C (SIGMA A-3648 USA);
- C- desparafinização pelo método xilol/etanol, como se segue:
 - xilol a 60° C, por 20 minutos;
 - xilol à temperatura ambiente, por 20 minutos;
 - etanol 100% três vezes, por 30 segundos a cada passagem;
 - etanol 95% , por 30 segundos;
 - etanol 80%, por 30 segundos;
 - etanol 70%, por 30 segundos;As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada;
- D- as lâminas foram incubadas em tampão citrato 10mM pH 6,0 no microondas, em potência máxima (1300 watts), duas vezes, por nove minutos cada. Esfriadas por 20 minutos à temperatura ambiente e lavadas em água corrente e destilada;
- E- realizado bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, (água oxigenada a 10 volumes), com quatro trocas de cinco minutos cada. Lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7,4 por cinco minutos.
- F- Incubadas as lâminas com o anticorpo primário diluído em título estabelecido em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (SIGMA A9647, USA) e

- azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 16 a 18 horas a 4° C em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em tampão PBS com três trocas de três minutos cada;
- G- as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado-reagente C (*biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig*) do kit StreptABComplex/HRP Duet (*mouse/rabbit*) (DAKO A/S K492, Denmark) no título estabelecido, diluído em PBS, por 30 minutos a 37° C. Lavadas em tampão PBS com três trocas de três minutos cada;
- H- incubadas com o complexo-reagente A (Streptavidin) no título estabelecido e reagente B (*biotinylated peroxidase*) no título estabelecido diluído em PBS, por 30 minutos a 37° C. Lavadas em tampão PBS com três trocas de três minutos cada;
- I- incubadas as lâminas em solução substrato cromógeno 3,3' *diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) 60 mg% (SIGMA D-5637 USA); dimetilsulfóxido (DMSO) 1 ml, H_2O_2 6% (água oxigenada 20 vol.) 1 ml, PBS 100 ml, por quatro minutos a 37° C , ao abrigo da luz;
- J- as lâminas controles foram observadas ao microscópio para identificação do desenvolvimento de precipitado acastanhado dourado nuclear, como produto final da reação. Lavadas em água corrente e água destilada por três minutos;
- K- todas as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto. Lavadas com água corrente e destilada. Imersas duas vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), sendo lavadas, em seguida, com água corrente e destilada;
- L- as lâminas foram desidratadas como se segue:
- etanol 50%, 30 segundos;
 - etanol 80%, 30 segundos;
 - etanol 95%, 30 segundos;
 - etanol 100%, três vezes, 30 segundos cada;
 - xilol quatro vezes, 30 segundos cada;
- M- as lâminas foram montadas com Entellan (Merk, Germany).

A técnica de imunohistoquímica para c-erbB-2 foi a mesma aplicada para p53, exceto o passo D, de recuperação de antígenos por microondas, não aplicado ao c-erbB-2. O anticorpo utilizado para o ensaio de c-erbB-2 foi A 0485 (DAKO).

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre as variáveis obtidas foi verificada através dos testes Qui quadrado ou exato de Fisher, para frequências de acordo com as categorias obtidas, com nível de significância de 95% e poder do teste de 80%.

Para estimativa de probabilidades e cálculo das curvas de sobrevida global e livre de doença, foi aplicado o método de Kaplan-Meier. A comparação das curvas foi avaliada pelo teste de Mantel-Cox ou Logrank.

Foi utilizado o programa Stata 5.0 para a análise estatística.

4. RESULTADOS

4.1. POPULAÇÃO

A idade média identificada entre os 156 casos foi de 56,19 +/- 13,48 anos, com mediana de 55 anos. Houve prevalência da raça branca. A mama mais acometida foi a esquerda. A maioria das 156 pacientes é composta por mulheres menopausadas e sem antecedente familiar (Tabela 3).

Tabela 3. Dados epidemiológicos dos casos de carcinoma mamário (n = 156).

		n	%
Raça	Branca	140	89,74
	Não branca	16	10,26
Lateral	Direita	70	45,45
	Esquerda	86	54,55
Estado menopausal	Pré	53	33,97%
	Pós	103	66,03%
Antecedente familiar	Sim	21	13,46%
	Não	135	86,54%

A distribuição tumoral em relação aos quadrantes mamários evidenciou o quadrante súpero externo como o mais freqüentemente acometido. Evidenciou-se o T1c como tamanho tumoral mais encontrado. Os tumores foram revisados para grau de diferenciação celular, segundo Scarf-Bloom-Richardson (SBR), sendo a maioria de diferenciação tumoral intermediária. Os receptores hormonais apresentaram positividade, na maioria dos casos, especialmente o receptor estrogênico (RE). Os resultados descritos são detalhados na Tabelas de 4 a 7.

Tabela 8. Uso de terapia sistêmica adjuvante nos casos de carcinoma mamário (n = 156)

		n	%
Quimioterapia	Sim	30	19,23
	Não	126	80,77
Hormonioterapia	Sim	50	32,05
	Não	106	67,95%

Foram analisadas as ocorrências de recidiva local ou à distância. O tempo de seguimento clínico das pacientes, calculado entre a data do tratamento e a última informação ou óbito foi, em média, de 68 meses, com mediana de 70 meses. A recidiva ocorreu somente em 26 casos sendo a grande maioria à distância (Tabela 9).

Tabela 9. Seguimento clínico das pacientes com carcinoma mamário (n = 156)

		n	%
Recidiva	Não	130	83,33
	Sim	26	16,67
Localização	Local	5	19,23
	Distância	21	80,77

O estado vital da população estudada, demonstrou 12 óbitos pela doença e mais 13 pacientes vivos com câncer (Tabela 10).

Tabela 10. Estado vital da população com carcinoma mamário (n = 156)

Estado	n	%
Vivo, sem câncer	124	79,49%
Vivo, com câncer	13	8,33%
Vivo, SOE	0	
Morte, câncer	12	7,69%
Morte, outras	7	4,49%
Morte, SOE	0	

4.2. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA P53

A detecção, por imunohistoquímica, da proteína p53, por meio dos anticorpos monoclonais D07 (DAKO, Carpinteria, CA) e PAB 1801 (Novocastra Lab, UK), na amostra, foi de 26 casos (16,67%) positivos, conforme demonstrado na Tabela 11. As Figuras 6 e 7 mostram a representação fotográfica da positividade para p53 à microscopia.

Tabela 11. Detecção de p53 por análise imunohistoquímica em casos de carcinoma mamário (n = 156)

P53	n	%
Presente	26	16,67
Ausente	130	83,33

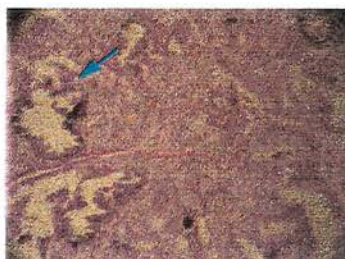


Figura 6. Ilustração de positividade para p53 por imunohistoquímica à microscopia (aumento 20 x)



Figura 7. Ilustração de positividade para p53 por imunohistoquímica à microscopia (aumento 40 x)

4.3. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA C-ERBB-2

Todos os 156 casos foram analisados por imunohistoquímica para c-erbB-2 através da detecção do anticorpo Ncl-B11 (Novocastra Lab, UK). Ocorreu positividade para imunohistoquímica de c-erbB-2 em 35 casos (22,4%). As Figuras 8 e 9 são representações fotográficas da positividade para c-erbB-2 à microscopia.

Tabela 12. Detecção por imunohistoquímica de c-erbB-2 nos casos de carcinoma mamário (n = 156)

c-erbB-2	n	%
presente	35	22,4
ausente	121	77,56



Figura 8. Ilustração de positividade para c-erbB-2 por imunohistoquímica à microscopia (aumento 20 x)

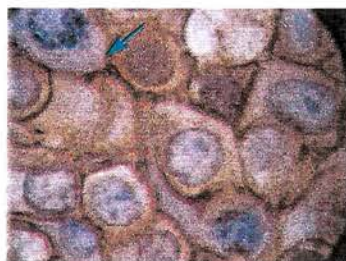


Figura 9. Ilustração de positividade para c-erbB-2 por imunohistoquímica à microscopia (aumento 40 x)

4.4. CORRELAÇÕES CLÍNICAS

Na tentativa de estabelecer possíveis correlações prognósticas, foi realizada análise estatística comparando p53 e todos os parâmetros estudados. Quanto a raça, lateralidade, estado menopausal, antecedentes familiares, localização tumoral, estratificação de T1 e grau de diferenciação histológico tumoral, nenhuma correlação com significância estatística foi observada. Também em relação a presença de receptores hormonais e realização de quimioterapia e hormonioterapia adjuvantes não foi estabelecida correlação estatística.

A detecção de p53 correlacionou-se com a idade (Tabela 13), ocorrendo em 29% das pacientes na faixa de 55 anos, com significância estatística ($p = 0,043$).

Tabela 13. Presença de p53 em relação a idade, nos casos de carcinoma mamário ($n = 156$; $p = 0,043$)

Idade		p53 presente	p53 ausente	total
até 45	(n)	4	37	41
	(%/45)	9,76	90,24	100
	(%/p53)	15,38	28,46	26,28
46 a 55	(n)	11	27	38
	(%/55)	28,95	71,05	100
	(%/p53)	42,31	20,77	24,36
56 a 65	(n)	2	29	31
	(%/65)	6,45	93,55	100
	(%/p53)	7,69	22,31	19,87
> 65	(n)	9	37	46
	(%/>65)	19,57	80,43	100
	(%/p53)	34,62	28,46	29,49
Total	(n)	26	130	156
	(%/p53)	16,67	83,33	100

Quando analisamos recidiva e presença de p53, observamos que em 36% das recidivas foi detectada a proteína ($p = 0,005$), sem que, todavia, a positividade estivesse correlacionada com o tipo de recidiva: se local ou à distância.

Tabela 14. Presença de recidiva em relação a presença ou ausência de p53, nos casos de carcinoma mamário ($n = 156$; $p = 0,007$)

	p53 presente	p53 ausente
Recidiva presente	34,62% ($n = 9$)	65,38% ($n = 17$)
Recidiva ausente	13,08% ($n = 17$)	86,92% ($n = 113$)

Entre os casos de óbitos observados na população em estudo, observamos que, entre os que morreram, 37% tiveram a proteína p53 detectada através de imunohistoquímica e somente 14% dos sobreviventes expressaram positividade para p53.

Tabela 15. Óbitos na presença ou não de proteína p53 nos pacientes com carcinoma mamário ($n = 156$; $p = 0,012$)

	p53 ausente	p53 presente
Mortos	63,16% ($n = 12$)	36,84% ($n = 7$)
Sobreviventes	86,13% ($n = 118$)	13,87% ($n = 19$)

Quando analisamos c-erbB-2 juntamente com os parâmetros em questão, não estabelecemos correlação estatística entre c-erbB-2 e idade, raça, lateralidade, estado menopausal, antecedentes familiares, localização tumoral e estratificação de T1. O mesmo ocorreu como grau de diferenciação histológico e presença de receptores esteroidicos, além de realização de quimioterapia e hormonioterapia.

A detecção de c-erbB-2, entretanto, tem significativa correlação com recidiva ($p = 0,0001$), com prevalência de recidivas à distância.

Tabela 16. Análise da recidiva local ou à distância em relação a presença de c-erbB-2 nos casos de carcinoma mamário ($n = 156$; $p = 0,0001$).

	c-erbB-2 ausente	c-erbB-2 presente
Recidiva Ausente	83,85% ($n = 109$)	16,15% ($n = 21$)
Recidiva Presente	46,15% ($n = 12$)	53,85% ($n = 14$)

Relacionando morte e c-erbB-2, observamos que 37% dos que tiveram óbito apresentavam presença da proteína, enquanto entre os sobreviventes o índice foi de 20%; apesar disso, não foi obtida significância estatística nesta análise.

Realizamos também os estudos de análise de sobrevida global e sobrevida livre de doença para a população estudada como um todo e, posteriormente, para os subgrupos que não expressam as duas proteínas, expressam somente uma delas e expressam ambas. A sobrevida global em cinco anos foi de 89,7% na população em geral. A sobrevida global para o grupo com presença da proteína p53 foi de 80,7% e de 82,4% para o grupo com c-erbB-2 expressa. No grupo onde ambas as proteínas foram encontradas, a sobrevida global foi de 56,7%. A Figura 10 mostra a curva de sobrevida global da população.

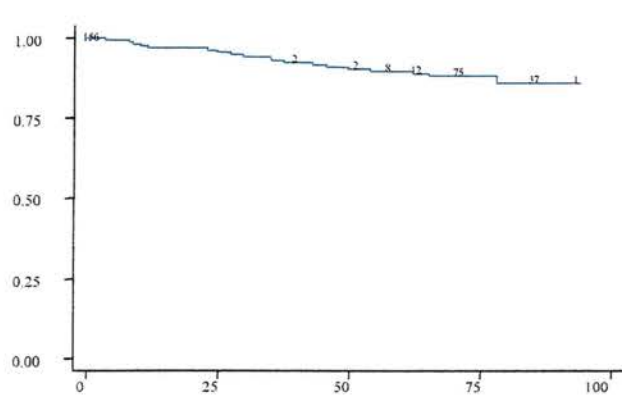


Figura 10. Sobrevida global da população estudada

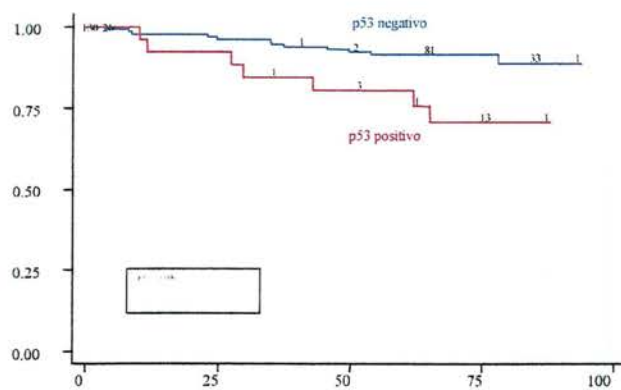


Figura 11. Sobrevida global em relação à presença de p53

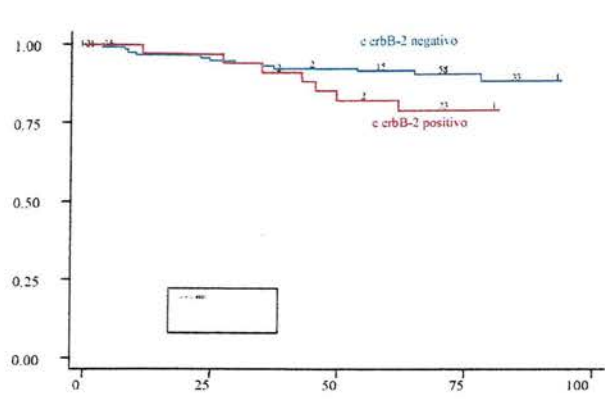


Figura 12. Sobrevida global em relação à presença de c-erbB-2

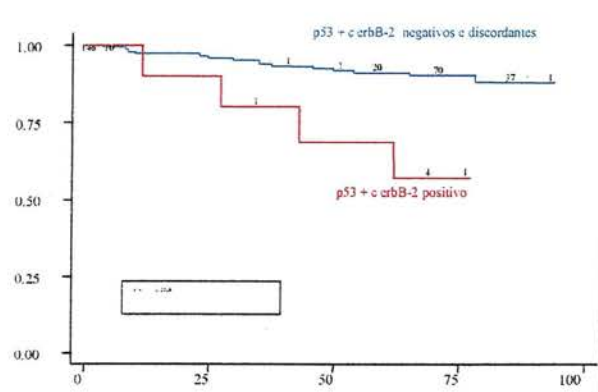


Figura 13. Sobrevida global em relação à presença de p53 e c-erbB-2

Sobrevida livre de doença em cinco anos para população em geral foi de 84,2%; para o grupo com p53 detectável, foi de 67,5% e, com c-erbB-2 presente, de 61,9%. Quando as duas proteínas estavam positivas a sobrevida caiu para 36,8%. As Figuras a seguir ilustram as curvas de sobrevida.

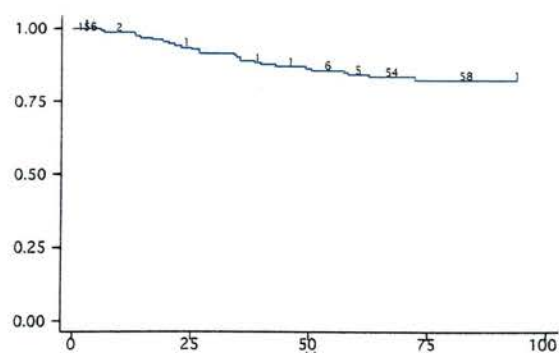


Figura 14. Sobrevida global livre de doença na população estudada

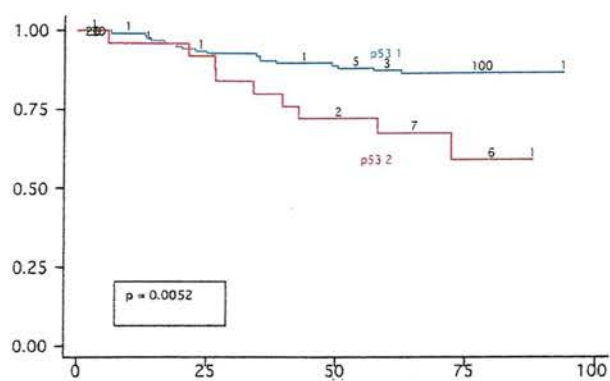


Figura 15. Sobrevida global livre de doença em relação à presença de p53

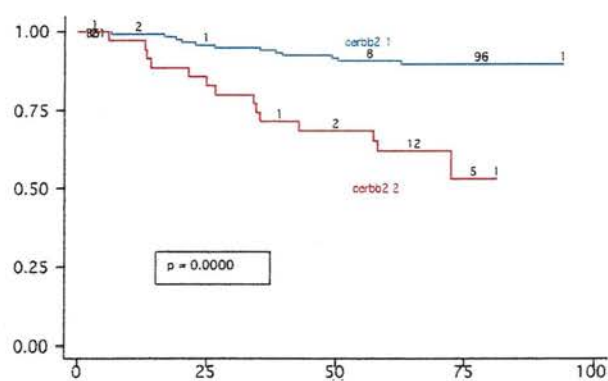


Figura 16. Sobrevida global livre de doença em relação à presença de c-erbB-2

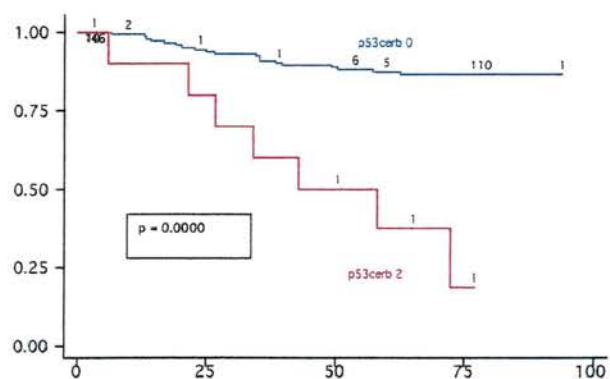


Figura 17. Sobrevida global livre de doença em relação à presença de p53 e c-erbB-2

5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma das principais causas de morte nos países ocidentais. Sua importância ultrapassa a estatística de incidência e mortalidade e chega aos aspectos psicológicos devastadores sobre a mulher de nossos tempos. Apesar de esforços mundiais, evidenciados por milhões de dólares investidos em instituições de tratamento e pesquisa, o câncer de mama continua a representar um grave problema de saúde pública da mulher, especialmente nos países desenvolvidos.

A instituição mundial de campanhas de prevenção, com a divulgação do auto-exame e o rastreio mamográfico seriado estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), visam estabelecer o diagnóstico precoce e, com isto, tentar diminuir a taxa de mortalidade e morbidade da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

O diagnóstico precoce do câncer de mama, realmente, tem se tornado mais frequente, mesmo em nosso meio, nas últimas décadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). O crescimento da população em estágio inicial da evolução clínica possibilitou a realização de ensaios clínicos mais amplos e com maior força estatística. Este grupo inicial encerra em si contradições, o que tem aumentado o interesse específico dos pesquisadores. O desenvolvimento de recidivas locais e à distância em estádios precoces contraria os fatores prognósticos conhecidos e mais empregados clinicamente.

Durante toda prática médica em oncologia, clínicos e pesquisadores utilizaram em, câncer de mama, como fatores prognósticos os dados epidemiológicos como idade, sexo, raça, antecedentes menstruais e obstétricos, tamanho e localização do tumor além das características tumorais fornecidas pelo exame anátomo-patológico, destacando-se a presença ou não de metástases linfonodais, tipo do tumor, grau de diferenciação histológico, invasão, estado dos receptores hormonais e índices proliferativos. Os índices de recidiva da doença nos estádios precoces entre 20% a 30% , demonstram que os fatores prognósticos em uso, não são suficientes para estabelecer a evolução clínica em todos os casos (CHU, 1995).

A evolução do conhecimento científico sobre as alterações genéticas dos tumores abriu uma nova porta para a elucidação do comportamento tumoral e sua evolução clínica. São três tipos de modificações celulares necessárias durante o processo de tumorigênese: imortalização, transformação e metastatização. Imortalização é a propriedade de crescer indefinidamente. Transformação é a falha dos mecanismos de restrição do crescimento, isto é a célula se torna independente dos fatores normalmente necessários para o seu crescimento. Metastatização é o estágio no qual as células adquirem a capacidade de invadir tecidos normais, mover-se, então, do tecido de origem, ganhar a corrente sanguínea e estabelecer uma nova colônia em outro lugar do corpo (CROSS e DEXTER, 1991).

Agentes carcinógenos exógenos, aliados a fenômenos metabólicos endógenos são, na maioria, os causadores da transformação celular. As modificações fenotípicas ocorrem, em princípio, em genes ligados direta ou indiretamente ao ciclo celular, ou a fatores de crescimento celular.

Estes genes pertencem principalmente a classe dos oncogenes ou genes supressores de tumor. Os oncogenes foram inicialmente identificados como genes associados aos vírus que ocasionam transformação celular, porém apresentam habitualmente seus pares, que desempenham funções celulares normais, os proto-oncogenes. A mutação ou ativação aberrante dos proto-oncogenes são associadas com formação tumoral. O surgimento de um oncogene representa um ganho de função para a célula onde o proto-oncogene foi ativado. Os oncogenes apresentam diferentes tipos de atividade, desde proteínas trans-membrânicas até fatores de transcrição e sua alteração pode levar a mudança estrutural, ativação constitutiva, superexpressão das proteínas, bem como falha no mecanismo de controle da expressão das mesmas (HUNTER, 1991).

Os genes supressores de tumores são genes ligados especialmente ao controle do ciclo celular ou crescimento celular e, quando funcionando normalmente, restringem o processo de tumorigênese. A inativação desses genes, ao contrário dos oncogenes, dá-se em dois passos, sendo o modelo mais didático o dos genes ligados a síndromes hereditárias, onde a herança de um alelo mutado é seguida posteriormente

por um segundo evento mutacional, inativando assim o gene (MARSHALL, 1991).

Em câncer de mama, vários genes apresentam deleções, outras mutações, e outros concorrem com alterações da expressão de proteínas. Entre o montante de alterações acumuladas, as mutações em TP53 e superexpressão de c-erbB-2 são importantes pela frequência e por se apresentarem precocemente durante o processo de tumorigênese (BIÈCHE e LIDERAU, 1995).

TP53 é um gene supressor de tumor, que atua por intermédio de tetrâmeros de sua proteína, como fator transcricional para vários genes importantes do ciclo celular. É fator transcricional, por exemplo para p21 (inibidor universal da ciclinas, executor da parada em G1) e para GADD45 (proteína que atua no reparo do DNA). Suas ações seguem os caminhos de parada do ciclo celular e reparo de DNA, como também a morte celular programada, ou apoptose. Células que não apresentam a função normal de TP53 são incapazes de responder ao dano de DNA e tornam-se mais susceptíveis às mutações, levando a instabilidade genômica e tumorigênese.

TP53 é mutado em vários tipos de câncer e, na mama, tem uma ocorrência de mutação que varia de 20% a 40% dos casos, dependendo do estágio estudado (UMEKIT et al., 1994). O tipo de mutação mais frequente que ocorre em TP53 é a mutação pontual, dada pela troca de um único par de base nitrogenada, codificando, portanto, outro aminoácido, durante a formação da proteína. Esta nova proteína perde a propriedade de se complexar em tetrâmeros, sem exercer sua função (HANN e LANE, 1995). A nova proteína codificada tem também como característica aumento da sua meia-vida, tornando-a alvo para detecções através de estudos com anticorpos detectados por técnica de imunohistoquímica, permitindo avaliar indiretamente a presença ou não de mutações em TP53 (LOHMANN et al., 1993).

Várias outras técnicas podem inferir a presença de mutações, mas somente o seqüenciamento direto do produto amplificado, obtido por reação de cadeia polimerase, consegue definir a mutação com precisão e grande sensibilidade (BERGH et al., 1995). Neste estudo, a escolha de detecção das proteínas por meio de estudo imunohistoquímico deveu-se à disponibilidade, à rapidez, à facilidade, ao baixo custo da téc-

nica e, fundamentalmente, ao tipo de material utilizado. A técnica possui boa especificidade, porém perde em detectar mutações que não formam proteínas ou codificam proteínas menores (deleções e mutações com proteína truncada, respectivamente).

O uso de material arquivado emblocado em parafina não representou impedimento técnico para a detecção de anticorpos por imunohistoquímica (PAVELIC et al., 1992). Cabe ressaltar, entretanto, o esforço inicial para realização do seqüenciamento direto sem, contudo, atingir resultados satisfatórios para análise de mutações pontuais.

A utilização de técnica de imunohistoquímica para esta população apresentou resultados concordantes (16,67%, n = 26) com os índices que constam na literatura mundial de câncer de mama, muito embora sejam poucos os estudos que abordem uma população em estágio tão precoce (ECI), em uma população tão homogênea, o que torna este estudo bastante válido (SILVESTRINI et al., 1996).

Analisando os resultados da detecção de p53, surpreendemo-nos como um fator especialmente forte em prever tanto recidiva, quanto óbitos, o que é facilmente observado quando olhamos as curvas de sobrevida global e livre de doença. Este resultado bastante importante e animador nos faz acreditar que a detecção de p53 entre populações ditas de prognóstico favorável consegue evidenciar o grupo de maior risco evolutivo e nos enche de indagações futuras sobre o emprego clínico de tão valiosa informação prognóstica.

Os receptores para fatores de crescimento estão freqüentemente alterados no câncer de mama. Entre eles, merece destaque o c-erbB-2. c-erbB-2 é oncogene que codifica o receptor de membrana, cujo ligante é o fator epitelial de crescimento. O gene codifica uma glicoproteína, com atividade tirosina-quinase. A mutação neste gene leva a autofosforilação e ativação constitutiva do receptor, independentemente do ligante. Esse fenômeno tem como consequência o desencadeamento de cascata de sinal de transdução que leva aos mecanismos mitogênicos (SLAMON et al., 1987, WEN et al., 1992; PIETRAS et al., 1995; SEBASTIAN et al., 1998).

O uso de imunohistoquímica para a detecção de c-erbB-2 é a técnica mais utilizada, com boa sensibilidade e especificidade. Obtivemos resultados para c-erbB-2

de 22,74% (n = 35), que se encontra concordante com a literatura mundial. A correlação principal com c-erbB-2 foi a detecção das recidivas, observada quando se analisa a curva de sobrevida livre de doença. A propriedade de c-erbB-2 de ser fator prognóstico de recorrência, em pacientes sem comprometimento axilar foi confirmada em outros trabalhos (KLYN et al., 1994; PATERSON et al., 2000).

Quando analisados os grupos em relação à detecção de p53 e c-erbB-2 em conjunto, vislumbra-se um subgrupo que, embora pequeno (n = 10) apresenta prognóstico sombrio. Este resultado se torna extremamente relevante, quando selecionamos os pacientes para a terapêutica adjuvante e realizamos seu seguimento clínico.

6. CONCLUSÕES

O estudo, elaborado e realizado no Instituto Ludwig para Pesquisa sobre o Câncer, por meio do Curso de Pós-graduação do Hospital do Câncer - Fundação Antonio Prudente, teve todos os seus objetivos iniciais atingidos.

A detecção da proteína p53 em casos de melhor prognóstico clínico (ECI) conseguiu identificar o grupo onde as recidivas e óbito apresentam maior prevalência.

Em relação à detecção de c-erbB-2, em estágio precoce de evolução clínica, destaca-se sua vocação para detectar as recorrências locais e à distância.

O uso da técnica de imunohistoquímica para determinação da proteína p53 torna o estudo reprodutível em qualquer laboratório de anatomia patológica e esta facilidade, aliada a ótimos resultados prognósticos, torna o estudo mais relevante.

As informações prognósticas encontradas neste estudo e em outros semelhantes fundamentarão a busca de novos esquemas terapêuticos para a população de risco no estágio clínico I.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas T, Borresen A-L, Geisler S, et al. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. **Nature Med** 1996; 2:811-4.

Adair F, Berg J, Joubert L, et al. Long-term follow up of breast cancer patients: the 30 years report. **Cancer** 1974;33: 1145-52.

Allred DC, Clark GM, Elledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node negative breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:200-8.

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

American Joint Committee on Cancer. 5th.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.171: Breast Cancer.

Andersen TI, Holm R, Nesland J M, Heindal K R, Ottestad L, Borresen AL. Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. **Br J Cancer** 1993; 68:540-8.

Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. **Nature Med** 1995; 1:1029-34.

Bergman CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor related protein. **Nature** 1986; 319:226-31.

Bieche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. **Genes, Chromosome Cancer** 1995; 14:227-51.

Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. Her-2/*neu* amplification predicts poor survival in node positive breast cancer. **Cancer Res** 1990; 50:4332-40.

Breast Cancer Linkage Consortium Pathology of Familial Breast Cancer: differences between breast cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. **Lancet** 1997; 349:1505-10.

Cady B, Stone MD, Shuler JG, et al. The new era in breast cancer: inva-

sion, size and nodal involvement dramatically decreasing as a result of mammographic screening. **Arch Surg** 1996; 131:301-10.

Carter C, Allen C, Henson D. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer** 1989; 63:181-90.

Carter C, Allen C, Henson D. Five year survival of breast cancer by histology, tumor size and extent of axillary Lymph node involvement. **Proc 14th Int Cancer Congress** 1986; 3-53-61.

Chadha M, Chabon AB, Friedmann P, et al. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 Breast cancer: a multivariate analysis. **Cancer** 1994;73:350-58.

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a + p53 tumor DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science** 1994; 256:346-55.

Chu K, Tarone R, Kessler L. Recent trends in breast cancer incidence, survival and mortality rates. **J Natl Cancer Inst** 1996; 88:1571-9.

Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. **Semin Oncol** 1988;15:20-26.

Clark G M, Osborne C K, McGuire W L. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. **J Clin Oncol** 1984, 2:1102-9.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiologic studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. **Lancet** 1997; 350:1047-59.

Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, trnsformation and tumorigenesis. **Cell** 1991;64:271-80.

Dickson RR, Lippman ME. Molecular biology of breast cancer. In: De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5th ed. Philadelphia: J P Lippincott; 1997. p.1541-55.

Done Hower LA, Bradley A The tumor supressor p53. **Biochem Biophys Acta** 1993; 1155:181-205.

EL-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF-1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell** 1993; 75:817-25.

Eliyahu D, Raz A, Gruns P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. **Nature** 1984, 312:646-9.

Elledge RM, Fuqua SAW, Clark GM, et al. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 1993; 85:965-71.

Elledge RM, Clark GM, Fuqua S, et al. P53 protein accumulation detected by five different antibodies: Relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. **Cancer Res** 1994; 54:3752-7.

Fisher B, Redmond C, Fisher ER, et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. **J Clin Oncol** 1988; 6:1076-83.

Fisher B, Redmond C, Wickerham DL, et al. Systemic therapy in patients with node-negative breast cancer. **Ann Int Med** 1989; 111:703-9.

Fisher B, Slack N, Bross I, et al. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. **Cancer** 1969; 24:1071-77.

Gray J. The relation of lymphatic vessels to spread of cancer. **Br J Surg** 1939; 26:462-78.

Gudas JM, NguGyn H, Li T, et al. Drug-resistant breast cancer cells frequently retain expression of a functional wild-type p53 protein. **Carcinogenesis** 1996; 17:1417-27.

Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, et al. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage. **Cancer** 1997; 80:1740-51.

Hall PA, Lane DP. P53 in tumour pathology can we trust immunohistochemistry- revisited. **J Pathol** 1994; 172:1-4.

Hann BC, Lane DP. The dominant effect of mutant p53. **Nat Genet** 1995; 9:221-2.

- Hartmann A, Blasyk H, McGovern RM, et al. P53 mutations inside and outside of exons 5-8: The patterns differ in breast and other cancers. **Oncogene** 1995; 10:681-8.
- Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer: the basis for a prognostic index. **Cancer** 1991; 68:2142-50.
- Hinds P, Finlay C, Levine AY. The p53 proto oncogene can act as a supresor of transformation. **Cell** 1989; 57:1083-93.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. P53 mutations in human cancers. **Science** 1991; 253:48-53.
- Holmes MD, Hunter DJ, Stamples MJ, et al. Types of dietary fat and the risk of breast cancer. **Am J Epidemiol** 1998; 147:88-95.
- Horowitz KB, Mc Guire WL, Pearson OH, et al. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hyppothesis. **Science** 1975;189:726-32.
- Hunter,T. Cooperation between oncogenes. **Cell** 1991; 64:249-270.
- Jansson T, Inganas M, Sjogren S, et al. P53 status predicts survival in breast cancer patients treated with/without postoperative radiotherapy: a novel hypothesis based on clinical findings. **J Clin Oncol** 1995; 13:2745-51.
- Klyn JGM, Cook MP, Portengen H, Alexieva-Figus J, Van Putten WLJ, Fochans JA. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer : results of 10-year follow up study. **Breast Cancer Res Treat** 1994; 29:73-77.
- Knudson Jr AG. Mutation and cancer statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1971; 68:820-3.
- Knight WAI, Livingston RB, Gregory EJ, et al. Estrogen receptor as na independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. **Cancer Res** 1977; 37:4669-74.
- Koscienly S, Tubiana M, Le M, et al. Relationship between the size of primary tumor and the probability of the metastatic dissemination of distant metastases. **Br J Cancer** 1984;59: 775-82.

Lampe B, Hantschmann P, Dimpfl TH. Prognostic relevance of immunohistology, tumor size and vascular space involvement in axillary node negative breast cancer. **Arch Gynecol Obstet** 1998; 261:139-43.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV-40 transformed cells. **Nature** 1979; 362:261-3.

Lane D P. Guardian of the genome. **Nature** 1993; 358:15-6.

Legros Y, Meyer A, Ory K, Soussi T. Mutations in p53 produce a common conformational effect that can be detected with a panel of monoclonal antibodies directed toward the central part of the p53 protein. **Oncogene** 1994;9:3689-94.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature** 1998; 396:643-50.

Lesser M, Rosen PP, Kinne D. Multicentricity and bilaterality in invasive breast carcinoma. **Surgery** 1982; 91:234-40.

Lohmann D, Ruhri C, Schmitt M, Graef H, Hofler H. Accumulation of p53 protein as an indicator for p53 gene mutation in breast cancer. **Diag Mol Pathol** 1993;2:36-41.

Magewu AN, Jones PA. Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer. **Mol Cell Biol** 1994; 14:4225-32.

Mansour EG, Ravdin PM, Dreesler L. Prognostic factor in early breast carcinoma. **Cancer** 1994; 74:381-91.

Marshall, CJ. Tumor supressor genes. **Cell** 1991;64:313-26.

Mc Bridge OW, Merry D, Giwol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm(17p13). **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83:130-4.

Mc Guire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. **N Engl J Med** 1992; 326:1756-63.

Molino A, Micciolo R, Turassa M, et al. Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers: a comparison of immunohistochem-

ical and biochemical methods. **Breast Cancer Res Treat** 1997; 45:241-8.

Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:7262-7.

Moon TE, Jones SE, Bonadona G, et al. Development and use of a natural history data base of breast cancer studies. **Am J Clin Oncol** 1987; 10:396-406.

Nagai MA, Marques LA, Torloni H, Brentani MM. Genetic alterations in c-erbB-2 protooncogene as a prognostic markers in human primary breast tumors. **Oncology** 1993;50:412-7.

National Center for Health Statistics. **SEER cancer statistics review, 1973-1995**. Bethesda: US National Cancer Institute; 1998.

Nayak BK, Baral RN, Das BR. p53 gene mutation in relation to p53 protein accumulation in male and female breast cancer. **Neoplasma** 1996; 43:305-10.

Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R, et al. Breast cancer in the medial half: results of the 1978 National Survey of the American College of Surgeons. **Cancer** 1983;51:1333-9.

Nortom L. A gompertzian model of human breast cancer growth. **Cancer Res** 1998; 48:7067-71.

O'Malley FP, Saad Z, Kerkvliet N, et al. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erbB-2 in lymph node-negative breast cancer. **Hum Pathol** 1996; 27:9955-63.

Page DL, Andersen TJ. **Diagnostic histopathology of the breast**. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987. p.193-: .

Paik S, Bryant J, Park C, et al. Erb B-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node positive hormone receptor negative breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:1361-8.

Palmer J, Rosenberg L, Rao R. Induced and spontaneous abortion in relation to risk of breast cancer (United States). **Cancer Causes Control** 1997; 8:841-9.

Parada LF, Land H, Wernberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperations between gene encoding p53 tumor antigen and as in cellular transformation. **Cell** 1989; 312:649-51.

Parkin DM, Muir C, Whelan SL, et al. **Cancer incidence in five continents, vol VI**. Lyon, International Agency for Research on Cancer Scientific 1992. (IARC CancerBase n° 1)

Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, et al. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node negative breast cancer. **Cancer Res** 1991; 51:556-60.

Pavelic Z, et al. Improved Immunohistochemical detection of p53 protein in paraffin embedded tissues reveals elevated levels in most head and neck and lung carcinomas: Correlation with clinicopathological parameters. **Anticancer Res** 1992; 13:89-94.

Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, et al. Her-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promoter hormone independent growth in human breast cancer cells. **Oncogene** 1995; 10:2435-8.

Pike MC, Spicer DV, Dalimoush L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. **Epidemiol Rev** 1991; 15:48-65.

Press MF, Hung G, Godolphin W, et al. Sensivity of Her-2/*neu* antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. **Cancer Res** 1994; 54:2771-4.

Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, et al. Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long term follow up. **J Clin Oncol** 1995; 13:1144-51.

Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, et al. Natural history of node-positive breast cancer: the curability of small cancers with a limited number of positive nodes. **J Clin Oncol** 1996; 14:3105-12.

Ravdin PM, De Laurentis M, Vendely T, et al. Axillary lymph node status in breast cancer patients by use of prognostic indicators. **J Natl Cancer Inst** 1994; 73:664-74.

Ravdin PM, Chamness GC. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of

other macromolecular markers: a review. **Gene** 1995; 159:19-23.

Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Host H, Nesland JM. The prognostic value of p53 and c-erbB-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer** 2000; 88:804-13.

Roberti NE. The role of histologic grading in the prognosis of patients with carcinoma of the breast. Is this a neglected opportunity? **Cancer** 1997; 80:1708-14.

Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, et al. Pathological prognostic factors in stage I(T1N0M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow up of 18 years. **J Clin Oncol** 1989; 7:1239-45.

Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, et al. A long term follow up study of survival in stage I and II breast carcinoma. **J Clin Oncol** 1989;7:355-9.

Rosner B, Colditz GA, Willet WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses'Health Study. **Am J Epidemiol** 1994; 139:819-35.

Rosner B, Colditz G. Nurses' Health Study: Long incidence mathematic model of breast cancer incidence. **J Natl Cancer Inst** 1996; 88:359-64.

Sainsbury JRC, Farndon JR, Sherbert GV, Harris AL. Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptor in human breast cancers. **Lancet** 1995; 1:364-72.

Sato T, Aijama F, Sakamoto G, Kasami F, Nakamura I. Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. **Cancer Res** 1991; 51:5794-81.

Sebastian J, Richards RG, Walker MD, et al. Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. **Cell Growth Differ** 1998; 9:777-83.

Shackney S, Shankey TV. Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. **Cytometry** 1997;29:1-27.

Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J Histochem Cytochem** 1991; 39:741-8.

Silverstein MJ, Gierson ED, Waismann JR, et al. Axillary lymph node dissection of T1a breast carcinoma. Is it indicated? **Cancer** 1994;73:664-70.

Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, et al. P53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 1993; 26:225-33.

Silvestrini R. Cell Kinetics: prognosis and therapeutic implications in human tumors. **Cell Prolif** 1994;27:579-84.

Silvestrini R, Daidone MG, Benini I, et al. Validation of p53 accumulation as a predictor of distant metastasis at 10 years of follow up in 1400 node-negative breast cancers. **Clin Cancer Res** 1996; 2:2007-13.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/*neu* oncogene. **Science** 1987; 235:177-82.

Smith J, Gamez-Araujo J, Gallager H, et al. Carcinoma of breast: analysis of total lymph node involvement versus level of metastasis. **Cancer** 1997; 39:527-35.

Smith-Warner SA, Spielman D, Yaun S-S, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. **JAMA** 1998; 279:535-40.

Soong R, Robbins PD, Dix BR, et al. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. **Hum Pathol** 1996; 27:1050-5.

Sturgeon S, Schairer C, Gail M, McG Adams M, Brinton L, Hoover R. Geographic variation in mortality from breast cancer among white women in United States. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:1846-53.

Thor AD, Yandell DW. p53 analysis in diagnostic pathology. **Diag Mol Pathol** 1993;2:1-3.

Thorlacius S, Borresen A-L, Eyfjord JE. Somatic p53 mutations in human breast carcinomas in a Iceland population: a prognostic factor. **Cancer Res** 1993; 53:1637-41.

Umekit Y, Kobayashi K, Saheki T, Yoshida H. Nuclear accumulation of p53 protein correlates with mutations in the p53 gene on archival paraffin-

- embedded tissues of human cancer. **Jpn J Cancer Res** 1994; 85:825-30.
- Visscher DW, Sarkar FH, Shimoyama RK, et al. Correlation between p53 immuno-stainig patterns and gene sequence mutations in breast carcinoma. **Diag Mol Pathol** 1996; 5:187-93.
- Volgestein B, Kinzeler KW. p53 function and disfunction. **Cell** 1992; 70:523-6.
- Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunohistochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein-p53-new monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant-p53. **J Immunol Methods** 1992; 151:237-44.
- Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FYF, et al. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. **Nature Med** 1996; 2:72-9.
- Warren S, Witham E. Studies on tumor metastasis: the distribution of metastasis in cancer of the breast. **Surg Gynecol Obstet** 1993; 57:81-7.
- Wen D, Pelles E, Cupples R, et al. Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing EGF domain and an immunoglobulin homology unit. **Cell** 1992; 69:559-64.
- Wenger CR, Clark GM. S-phase fraction and breast cancer, a decade of experience. **Breast Cancer Res** 1998; 51:255-9.
- Wenger C, Beardslee S, Owens M, et al. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 1993; 28:9-16.
- White E, Malone KE, Weiss NS. Breast cancer amomg young US women in relation to oral contraceptive use. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:505-14.
- Wu GS, El-Deiry WS. p53 and chemosensitivity. **Nature Med** 1996; 2:724-5.
- Zhang S, Hunter DJ, Forman MR, et al. Dietary carotenoids and vitamins A, C and E and risk of breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:547-56.



8. ANEXO 1

IDENTIFICAÇÃO

1. Nº de ordem:
- 2.Registro Hospitalar:
3. Idade:

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS e CLÍNICOS

4. Raça:(1)Branca (2) Negra (3) Amarela (4) Outras (9) Ign. ☐
5. Lateralidade: (1) Direita (2) Esquerda (9)Ign. ☐
6. Estado Menopausal: (1) Pré (2) Pós (9) Ign ☐
7. Antecedentes Familiares: (1) Não (2) Sim (9) Ign. ☐
- 8.Data do Diagnóstico:
- 9.Local do Tumor: (1) QSE (2) QSI (3) QC (4) QIE (5) QII
(6) mais de 1(9) Ign. ☐
- 10.Tumor: (1) T1a (2) T1b (3) T1c(9) Tx ☐

III- DADOS ANÁTOMO PATOLÓGICOS e
RECEPTORES HORMONAIS

11. No do AP.(biópsia ou peça) ☐
12. Grau de Dif. Histo.: (1) I (2) II (3) III (9) Ign. ☐
13. Receptor Estrogênico : (1) negativo (2) positivo (9) Ign. ☐
14. Receptor Progestogênico: (1) negativo (2) positivo (9) Ign. ☐

DADOS TERAPÊUTICOS

15. Data de Início de Tratamento:
16. Quimioterapia: (1) Não (2) Sim (9) Ign.
17. Drogas utilizadas: (1) A (2) C (3) T (4) M (5) F
18. Hormônioterapia: (1) Não (2) Sim (9) Ign.

DADOS DE SEGUIMENTO

19. Data do seguimento
20. Recorrência: (1) Não (2) Sim (9) Ign.
21. Tipo da Recorrência: (1) Local (2) Distância (9) Ign.
22. Data da Recorrência:
23. Estado Vital: (1) vivo s/D (2) vivo c/D (3) vivo SOE (4) óbito D
(5) óbito outras causas (6) PV (9) Ign.

DADOS NOVOS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

24. Imuno de p53: (1) Negativo (2) Positivo
25. Imuno de c-erbB-2: (1) Negativo (2) Positivo