

CINÉTICA CELULAR EM LESÕES PROLIFERATIVAS
PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS DO EPITÉLIO
MAMÁRIO. PAPEL DA APOPTOSE, PROTEÍNA
BCL-2, PRODUTO DE ONCOGENE HER-2/NEU,
PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR E
PROLIFERAÇÃO CELULAR: UM MODELO DE
PROGRESSÃO DE DOENÇA


FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
ANA MARIA R. A. KUNINART
Coordenadora de Pós-Graduação

VICTOR EDUARDO ARRÚA ARIAS

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Oncologia

**ORIENTADOR: PROF. DR.
FERNANDO AUGUSTO SOARES**

**São Paulo
2002**

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Arias, Victor Eduardo Arrúa

Cinética celular em lesões proliferativas pré-malignas e malignas do epitélio mamário - papel da apoptose, proteína bcl-2, produto de oncogene HER-2/neu, proteínas reguladoras do ciclo celular e proliferação celular: um modelo de progressão de doença / Victor Eduardo Arrua Arias. – São Paulo, 2002.

p. 144.

Tese(doutorado)–Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1. CICLO CELULAR. 2. APOPTOSE. 3. HIPERPLASIA/patologia. 4. CARCINOMA MAMÁRIO/patologia.

Dedico este trabalho de doutoramento à memória de

Dr. Victor Arias Ledesma

Prof. Dra. Maria Angeles S. Llorach Velludo

Prof. Dr. A.M. Cardoso de Almeida

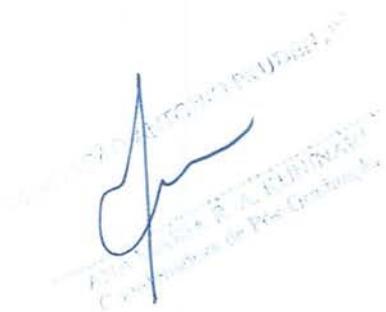
NAO ENVIADA

FUNDAÇÃO ANTONIO BRUDEM
ALFONSO M. ALFONSO
Coordenação de Pós-graduação

EXEMPLAR
ESPECIAL

A morte dentro da graça da vida

Lygia Fagundes Telles



DEATH, be not proud, though some have callèd thee
Mighty and dreadful, for thou art not so:
For those whom thou think'st thou dost overthrow
Die not, poor Death; nor yet canst thou kill me.

From Rest and Sleep, which but thy picture be,
Much pleasure, then from thee much more must flow;
And soonest our best men with thee do go—
Rest of their bones and souls' delivery!

Thou'rt slave to fate, chance, kings, and desperate men,
And dost with poison, war, and sickness dwell;
And poppy or charms can make us sleep as well

And better than thy stroke. Why swell'st thou then?
One short sleep past, we wake eternally,
And Death shall be no more: Death, thou shalt die!


FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
ANA MARIA R. A. KUNINARI
Coordenadora de Pós-Graduação

John Donne (1573– 1631)

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todas as pessoas que contribuíram técnica ou moralmente para a realização deste trabalho. Desejo agradecer em especial aos seguintes profissionais, sem os quais a realização do estudo não teria sido possível.

Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO SOARES, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo, orientador e modelo de Patologista e Pesquisador.

JAIME DOMINGOS DE OLIVEIRA SOBRINHO e SEVERINO DA SILVA FERREIRA, funcionários do serviço de arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo que sempre se mostraram dispostos e responderam rapidamente às necessidades do trabalho durante a coleta do material.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

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

MAGDA APARECIDA MATUCHENKO e RICARDO C. AOKI, técnicos do Laboratório Pró-Biopsia Histotecnologia Aplicada pela preparação dos cortes histológicos e pela amizade.

MARIA DE LOURDES ALMEIDA SANTOS, histotécnica, pelo carinho e profissionalismo com que realizou as reações utilizadas no presente trabalho.

Prof. Dra. SILVIA NAGIB ELIAN, docente do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo (IMESP-USP), pela ajuda e orientação no estudo estatístico dos dados obtidos neste trabalho.

SUELY FRANCISCO, bibliotecária do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo, pela inestimável ajuda na revisão bibliográfica, no preparo final do manuscrito, revisão das referências e no preparo da ficha catalográfica.

ANA MARIA RODRIGUES ALVES KUNINARI e MÁRCIA MIWA HIRATANI, secretárias da Seção de Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, por nunca me deixarem esquecer os compromissos com a PG.

Ao LABORATÓRIO Dra. GRIGNA T. CARVALHO pela cessão de alguns casos utilizados neste estudo.

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
ANA MARIA R. ALVES KUNINARI
Secretária de Pós-Graduação



Aos colegas da PATOLOGIA CARDOSO DE ALMEIDA e da DIVISÃO DE PATOLOGIA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ por terem me substituído na rotina diária, deixando-me à vontade para conduzir o presente estudo.

A todos os colegas, funcionários e amigos do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo.


ANTONIO PELLEGRINI
COORDENADOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

LISTA DE TABELAS, QUADROS, GRÁFICOS E FIGURAS.

Tipo	Título	Pág.
Tabela 1	Padrões de Proliferação do Epitélio Mamário segundo Bodian <i>et al.</i> Cancer 1993, 71: 3896-907.	5
Tabela 2	Definições dos Padrões de Diagnóstico das Lesões do Epitélio Mamário segundo Bodian <i>et al.</i> Cancer 1993, 71:3896-907.	5
Tabela 3	Crítérios de Page para avaliação de lesões proliferativas do epitélio ductal da mama. Schnitt <i>et al.</i> AJSP 1992, 16:1133-43.	11
Quadro 1	Risco relativo para carcinoma invasivo da mama com base nos achados histopatológicos benignos do tecido mamário Fitzgibbons <i>et al.</i> Arch Pathol Lab Med 1998, 122:1053-5.	18
Quadro 2	Sistema de Lagios para gradação histológica do carcinoma ductal <i>in situ</i> .	54
Figura 1	Fotomicrografia representativa do tecido controle utilizado para a reação pelo método TUNEL (kit ApoptagPlus, marca Intergen). As setas indicam alguns exemplos de elementos celulares apoptóticos. Endométrio, 400x.	59
Figura 2	Fotomicrografia mostrando resultado negativo para reação imuno-histoquímica para oncoproteína c-erbB-2 (a), reação com positividade 1+ (b), positividade 2+ (c) e positividade 3+ (d).	63
Tabela 4	Valores médios dos índices de proliferação celular e de apoptose segundo a lesão mamária (valores expressos em %).	70
Tabela 5	Valores médios dos quocientes IP/IA segundo a lesão mamária.	70
Gráfico 1	Boxplot mostrando mediana e quartis dos índices de proliferação celular para cada grupo.	71
Gráfico 2	Boxplot mostrando mediana e quartis dos índices de apoptose para cada grupo.	71
Gráfico 3	Gráfico mostrando as médias dos índices de proliferação celular e de apoptose segundo a progressão histológica para o carcinoma invasor da mama.	72
Gráfico 4	Gráfico mostrando o quociente índice de proliferação celular/índice de apoptose (IP/IA) segundo a progressão histológica para o carcinoma invasor da mama.	72
Gráfico 5	Diagrama de dispersão mostrando correlação entre índice de apoptose e índice de proliferação celular ($r=0,64$, $p<0,00001$).	73

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE



LISTA DE TABELAS, QUADROS, GRÁFICOS E FIGURAS (cont.)

Tipo	Título	Pág.
Tabela 6	Valores médios dos índices de proliferação celular, de apoptose e das proteínas associadas ao ciclo celular (p27, p53 e bcl-2) segundo a lesão mamária (valores expressos em %). Os valores entre parênteses indicam a mediana. Os valores relativos à quantificação da proteína c-erbB-2 indicam a mediana.	76
Figura 3	Fotomicrografias mostrando exemplos de reações positivas na hiperplasia ductal típica. A seta na figura de apoptose indica um corpo apoptótico.	79
Figura 4	Fotomicrografias que mostram exemplos de cortes histológicos casos classificados como hiperplasia ductal atípica. As figuras (a), (b) e (c) mostram lâminas de três casos diferentes coradas por HE (200x). As lâminas (d), (e) e (f) referem-se ao caso (c) e mostram, respectivamente, corpo apoptótico (seta) em região periférica do ducto (ApoptagPlus, Intergen), núcleo marcado com anticorpo anti-DNA topoisomerase II α em situação apical (seta) e reação positiva para proteína bcl-2.	80
Figura 5	Fotomicrografias mostrando exemplos de reações positivas no carcinoma intraductal. As setas no quadro de apoptose indicam corpos apoptóticos.	81
Figura 6	Fotomicrografias mostrando exemplos de reações positivas no carcinoma ductal invasivo, SOE. A seta na figura de apoptose indica um corpo apoptótico.	82

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
 INSTITUTO DE PATOLOGIA
 LABORATÓRIO DE PATOLOGIA



ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	As Lesões Proliferativas Benignas e Pré-Malignas do Epitélio Ductal da Mama, o Risco Relativo para Desenvolvimento de Câncer, suas Inter-Relações Morfológicas e Evidências para um Modelo de Progressão de Doença	2
1.2.	O Ciclo Celular e as Lesões Proliferativas do Epitélio dos Ductos Mamários	25
1.3.	Apoptose e as Lesões Proliferativas do Epitélio dos Ductos Mamários	33
1.4.	A Oncoproteína c-erbB-2 (Produto do Oncogene HER2/neu) e as Lesões Proliferativas do Epitélio Ductal da Mama	41
1.5.	O Papel do Equilíbrio Apoptose/Proliferação Celular e o Ciclo Celular na Carcinogênese Mamária	45
2.	OBJETIVO	48
3.	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1.	Casos e Critérios Morfológicos	51
3.2.	Reação Imuno-Histoquímica	55

ÍNDICE (cont.)

3.3.	Detecção de Apoptose <i>In Situ</i>	57
3.4.	Mensuração dos Resultados	60
3.5	Análise Estatística dos dados	64
4.	RESULTADOS	66
4.1.	Proliferação Celular e Apoptose	67
4.2.	RAZÃO IP/IA	69
4.3.	Correlação entre os Índices de Apoptose e Proliferação Celular	73
4.4.	Proteína p27 ^{kip1} , Proteína p53, Proteína bcl-2 e Oncoproteína c-erbB-2	74
4.5.	Correlação entre Índice de Proliferação Celular e Proteínas Associadas ao Ciclo Celular	77
4.6.	Correlação entre Índice de Apoptose e Proteínas Associadas ao Ciclo Celular	78
5.	DISCUSSÃO	83
6.	CONCLUSÕES	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
8.	ANEXOS	134

RESUMO

Arias VEA. Cinética celular em lesões proliferativas pré-malignas e malignas do epitélio mamário - papel da apoptose, proteína bcl-2, produto de oncogene HER-2/neu, proteínas reguladoras do ciclo celular e proliferação celular: um modelo de progressão de doença. São Paulo; 2002. [Tese de doutorado - Fundação Antônio Prudente].

O equilíbrio entre proliferação celular e apoptose tem um papel fundamental na homeostasia tecidual e alterações nesse equilíbrio são importantes no desenvolvimento e progressão de neoplasias. Evidências epidemiológicas indicam que o carcinoma invasor da mama pode ser resultado de um fenômeno de múltiplas etapas iniciando-se em estados hiperplásicos do epitélio, passando pelo carcinoma *in situ*. O presente trabalho estudou retrospectivamente o tecido mamário de pacientes submetidas a mastectomia parcial ou total com diagnósticos de hiperplasia ductal típica (HT-20 casos), hiperplasia epitelial atípica (HA-15 casos), carcinoma ductal *in situ* (CIS-20 casos) e carcinoma ductal infiltrante (CA-20 casos) utilizando métodos para avaliação e quantificação de apoptose (TUNEL), proliferação celular e expressão de genes ligados ao ciclo celular (imuno-histoquímica). Os resultados mostraram que tanto o índice de proliferação celular (IP) quanto o índice de apoptose (IA) aumentam com a progressão da lesão epitelial ($p < 0,00001$). Os IP observados na HA e no CIS não mostraram diferenças estatísticas ($p = 0,26$), assim como os IP do CIS e do CA ($p = 0,68$). Em relação ao IA, houve diferença estatística entre os valores observados no CIS e na HT ($p = 0,0002$), mas não quando comparamos os valores observados na HT e na HA ($p = 0,21$) ou na HA e no CIS ($p = 0,35$). O quociente IP/IA foi calculado para se ter uma noção de como a cinética celular influencia no potencial de crescimento da lesão. Os resultados mostraram diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,00001$). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de HA e o de CIS ($p = 0,17$). No que se refere ao papel modulador das proteínas associadas ao ciclo celular no IA e IP, encontramos correlação positiva entre a expressão de oncoproteína c-erbB-2 e o IP e correlação inversa entre a expressão de proteína bcl-2 e o IA nas lesões associadas à progressão histológica do câncer de mama. Assim, nossos resultados permitem concluir que há um aumento progressivo no IP e no IA à medida que a lesão ductal mamária evolui em direção ao câncer. É possível dizer que o mesmo acontece com o índice de renovação celular (quociente IP/IA), pelo menos na progressão histológica até o carcinoma *in situ*. A HA relaciona-se ao CIS do ponto de vista de cinética celular. O índice de proliferação celular correlaciona-se positivamente com a expressão do produto de oncogene Her2/neu (proteína c-erbB-2) enquanto que o índice de apoptose correlaciona-se inversamente à expressão da proteína bcl-2 ao longo da progressão histológica desde a hiperplasia típica ductal até o carcinoma ductal invasor.

ABSTRACT

Arias VEA. Cinética celular em lesões proliferativas pré-malignas e malignas do epitélio mamário – papel da apoptose, proteína bcl-2, produto de oncogene HER-2/neu, proteínas reguladoras do ciclo celular e proliferação celular: um modelo de progressão de doença [Cellular kinetics in proliferative premalignant and malignant lesions of the mammary epithelium – roles of apoptosis, bcl-2 protein, HER-2/neu oncogene product, cell cycle associated proteins and cell proliferation: a model for disease progression]. São Paulo; 2002. [Tese de doutorado – Fundação Antônio Prudente].

The balance between cell proliferation and apoptosis plays a fundamental role in tissue homeostasis. Disruptions in this balance are important in tumor development and progression. Epidemiologic evidence indicates that invasive breast cancer may result from a multiple stage phenomenon beginning in hyperplastic states of the epithelium, passing by *in situ* carcinoma. We studied retrospectively tissues with usual breast duct hyperplasia (HT-20 cases), atypical ductal hyperplasia (HA-15 cases), *in situ* ductal carcinoma (CIS-20 cases) and invasive breast carcinoma (CA-20 cases) using methods for evaluating and quantifying apoptosis (TUNEL), cell proliferation and the expression of cell cycle associated genes (immunohistochemistry). The results showed that both cellular proliferation index (IP) and apoptosis index (IA) increase with the progression of the epithelial lesion ($p < 0,00001$). The IPs observed in HA and in CIS did not show statistical differences ($p = 0,26$), as well as those seen in CIS and CA groups ($p = 0,68$). Regarding the IAs, there were statistically significant differences among the values observed in CIS and in HT ($p = 0,0002$), but not when we compared the values observed in HT and in HA ($p = 0,21$) or in the HA and in CIS ($p = 0,35$). The IP/IA ratio was calculated in order to evaluate how cell turnover affects the growth potential of the lesion. The results showed statistically significant differences among the groups ($p < 0,00001$). There were not statistically significant differences between the HA group and the CIS group ($p = 0,17$). With regard to the modulating role of the cell cycle associated proteins on the IA and IP, we found a positive correlation between the IP and the expression of the c-erbB-2 and a inverse correlation between bcl-2 protein expression and IA among the lesions associated with the histologic progression to breast cancer. We conclude that there is a progressive increase of both the IP an IA as the epithelial breast duct lesion evolves to invasive cancer. It is possible to say that the same happens with the cell turnover (IP/IA ratio), at least in the preinvasive lesions. With regard to cell kinetics both HA and CIS are related lesions. The IP correlates positively with the expression of HER2/neu oncogene product (c-erbB-2protein) while IA correlates inversely to the expression of the bcl-2 protein along the histologic progression from usual ductal hyperplasia to invasive breast cancer.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. AS LESÕES PROLIFERATIVAS BENIGNAS E PRÉ-MALIGNAS DO EPITÉLIO DUCTAL DA MAMA, O RISCO RELATIVO PARA DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER, SUAS INTER-RELAÇÕES MORFOLÓGICAS E EVIDÊNCIAS PARA UM MODELO DE PROGRESSÃO DE DOENÇA

A necessidade de se melhorar ações clínicas e laboratoriais para a identificação das mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama é conseqüência do aumento da freqüência desta doença, principalmente nos países ocidentais (BODIAN *et al.* 1993; SHIRLEY 1999). Daí, pode-se dizer que é crítica a necessidade de desenvolvimento de métodos de estudo para melhor compreensão dos mecanismos patogênicos da doença.

O termo lesões proliferativas do epitélio mamário pode ser fonte de confusão desde que não há um sistema específico e claro que as classifique, havendo uma tendência à utilização de termos exclusivamente descritivos. Um sistema de classificação destas lesões deveria considerar: 1) o risco histológico de progressão para câncer

mamário associado a cada uma das lesões benignas e pré-malignas, 2) a correlação com os aspectos radiológicos e 3) a decisão terapêutica inerente ao diagnóstico (BODIAN *et al.* 1993; ZAFRANI e VINCENT-SALOMON 2000). BODIAN *et al.* (1993) definiram que cada lesão proliferativa pode ser categorizada em padrões diferentes de acordo com sua apresentação morfológica, um padrão proliferativo e um padrão diagnóstico. No primeiro, a lesão é considerada quantitativamente em relação ao número de células ou camadas celulares que a compõem. No segundo, a lesão é considerada segundo critérios anatomopatológicos descritivos. Uma lesão benigna do padrão proliferativo, por exemplo, pode encaixar-se em qualquer das categorias diagnósticas benignas do padrão diagnóstico (tabelas 1 e 2). No presente trabalho, as lesões epiteliais ductais de interesse são a hiperplasia ductal moderada e exuberante, a hiperplasia ductal atípica o carcinoma intraductal e o carcinoma ductal infiltrante. Nesta parte introdutória serão discutidos aspectos morfológicos assim como os modelos de progressão para malignidade.

Inicialmente, vale a pena comentar sobre as chamadas alterações fibrocísticas do tecido mamário. Consideradas lesões mínimas não associadas ao desenvolvimento de câncer representam respostas teciduais exageradas a alterações hormonais (HUGHES *et al.*

1987). Tais alterações são representadas pela transformação cística ductal, associada ou não a metaplasia apócrina, e pela adenose, que corresponde à proliferação de um, vários ou todos os componentes do lóbulo mamário, isto é, células epiteliais e mio-epiteliais dos ácinos, canalículos intralobulares e tecido conectivo especializado. Nessas alterações podem-se perceber aspectos de esclerose lobular, adenose simples ou de metaplasia de células cilíndricas (ELLIS *et al.* 1998; ZAFRANI e VINCENT-SALOMON 2000). Fibrose do tecido conectivo especializado e não especializado pode ocorrer em variadas proporções.

Em relação aos estados hiperplásicos do epitélio mamário, embora a classificação da Organização Mundial da Saúde em 1981 (W.H.O., 1982), tenha aceitado nomear hiperplasia dos lóbulos e dos ductos mamários de acordo com localização da lesão em uma ou outra estrutura, mais recentemente, a literatura tem associado a denominação ao padrão de crescimento da lesão (PAGE e ANDERSON 1987; TAVASSOLI e NORRIS 1990; ROSEN 1993, 1997; JENSEN e PAGE 1998). Assim, o termo hiperplasia ductal refere-se a um aumento no número de células com padrão ductal que tende a dilatar os canais mamários. Essas lesões podem comprometer o tecido de

-
5. Carcinoma intraductal ou invasivo
 4. Neoplasia lobular/ Carcinoma lobular *in situ*
 3. Hiperplasia epitelial com atipia em lóbulos ou ductos
 - 3c. atipia severa
 - 3b. atipia moderada
 - 3c. atipia discreta
 2. Hiperplasia sem atipia em ductos ou lóbulos mamários
 1. Ausência de hiperplasia ductal ou lobular
-

Tabela 1 Padrões de proliferação do epitélio mamário segundo Bodian *et al.* Cancer 1993, 71: 3896-907.

-
- V. Papiloma intraductal (solitário ou múltiplos) e adenose (esclerosante, exuberante, microglandular ou tumoral)
 - IV. Adenose
 - Ivb. Adenose esclerosante
 - Ivc. Outros tipos de adenose
 - IIIb. Papiloma intraductal solitário ou múltiplos
 - IIIa. Papilomatose (esclerosante ou do mamilo)
 - II. Cistos (cistos macro e microscópicos ou metaplasia apócrina)
 - I. Todas as outras lesões (incluindo fibrose, ectasia ductal e metaplasia escamosa)
-

Tabela 2 Definições dos padrões de diagnóstico das lesões do epitélio mamário segundo Bodian *et al.* Cancer 1993, 71:3896-907.

forma focal ou extensa, apresentando inclusive microcalcificações. Para fins de classificação, toma-se como referência o número de camadas celulares. Desta maneira, hiperplasia ductal discreta refere-se a uma lesão proliferativa com 3 a 4 camadas de células, hiperplasia ductal moderada a uma lesão com 5 a 6 camadas de células superpostas e hiperplasia exuberante a uma lesão com mais de 6 camadas de células superpostas (PAGE e ANDERSON 1987; JENSEN e PAGE 1998). Segundo os critérios de PAGE e ANDERSON, hiperplasia ductal sem atipias é representada por células com núcleos ovóides ou alongados com cromatina finamente granulosa que se arranjam irregularmente em formações vorticulares ou concêntricas (PAGE e ANDERSON, 1987; FITZGIBBONS *et al.*, 1998). Pode haver um aspecto sincicial porque os limites citoplasmáticos são mal definidos e os núcleos tendem a se sobrepor. O crescimento celular se faz em direção à luz ductal com formação de lumens secundários em forma de fenda localizados predominantemente na periferia dos ductos envolvidos. Nas porções periféricas dos ductos envolvidos há células mio-epiteliais que expressam os antígenos proteína S-100, actina músculo-específica (HHF-35) e actina α de músculo liso (RAJU *et al.* 1990; JENSEN e PAGE 1998). Ao exame imuno-histoquímico, as

células epiteliais hiperplásicas se coram fraca, mas consistentemente, para proteína S-100 (RAJU *et al.* 1990).

A definição de hiperplasia ductal atípica é fonte de discussão e se baseia em critérios qualitativos e quantitativos. PAGE *et al.* (1985) a definem qualitativamente como uma lesão que “apresenta algumas das características das lesões reconhecidas como carcinoma *in situ*, mas não todas”. Ainda, um critério quantitativo é utilizado caso todas as características de um carcinoma *in situ* estiverem presentes na lesão. Isto é, se estas características estiverem presentes em até dois espaços ducto-lobulares separados elas ainda devem ser classificadas como hiperplasia atípica. Porém, se a lesão for mais extensa, ela deve ser classificada como carcinoma *in situ*. TAVASSOLI e NORRIS (1990) descreveram hiperplasia ductal atípica como uma lesão em que as células proliferadas apresentam atipia citológica semelhante às apresentadas pelas células de uma das formas não necrosantes de carcinoma intraductal, porém sem o padrão arquitetural observado naquelas lesões. O critério quantitativo mínimo além do qual a lesão seria considerada carcinoma *in situ* utilizado por esses autores nas lesões atípicas é um diâmetro conjugado total de 2mm. Atividade mitótica e hiper cromasia nuclear não foram incluídas na consideração dos critérios de hiperplasia epitelial ductal atípica. Necrose somente

teria importância como critério para diferenciar hiperplasia atípica ductal de carcinoma intraductal naquelas lesões com aspecto geral de carcinoma intraductal, mas com tamanho limitado. Assim, se estas lesões apresentam necrose, devem ser consideradas carcinoma intraductal (LININGER e TAVASSOLI 1997; TAVASSOLI 1998). PAGE e ROGERS (1992) publicaram critérios combinados, cito e histológicos para o diagnóstico de hiperplasia ductal atípica do epitélio mamário. Mais recentemente, os critérios sofreram alterações. PAGE *et al.* (1996), utilizaram 3mm como tamanho mínimo de carcinoma intraductal. Os critérios do “Armed Forces Institute of Pathology” (AFIP) foram atualizados, indicando que qualquer que fosse o tamanho da lesão, esta seria diagnosticada como carcinoma intraductal se apresentasse alto grau citológico (LININGER e TAVASSOLI 1997; TAVASSOLI 1998, 1999). Em resumo, hiperplasia ductal atípica do epitélio mamário é uma lesão pouco freqüente e pequena que pode coexistir com outras lesões proliferativas do epitélio mamário tais como alterações fibrocísticas, lesões esclerosantes ou papilomas (ELLIS *et al.* 1998; SHIRLEY 1999) e que apresenta características citológicas de carcinoma intraductal de baixo grau localizada em meio a uma proliferação epitelial exuberante e que tende a reter as características arquiteturais da hiperplasia epitelial ductal sem atipias, ou então uma lesão com todas as características de um carcinoma

intraductal de baixo grau, mas quantitativamente limitada em extensão (LININGER e TAVASSOLI 1997).

A imprecisão dessas definições e a baixa prevalência de hiperplasia ductal atípica, ie, 3,6% na era pré-mamográfica (PAGE *et al.* 1985) e 10% na era pós-mamográfica (RUBIN *et al.* 1988), podem ser responsáveis pelo baixo grau de concordância diagnóstica entre os patologistas em relação a esta lesão. Estudos desenhados para verificar a variabilidade interobservador em relação a tal diagnóstico demonstraram índices de concordância pouco aceitáveis, com valores de teste kappa variando entre 0,25 e 0,38 (ROSAI 1991; SLOANE *et al.* 1994, 1999; PALLI *et al.* 1996; ELSTON *et al.* 2000). Ao contrário desses estudos, nos quais não houve tentativa de padronização dos critérios, SCHNITT *et al.* (1992) estudaram a variabilidade interobservador após promover um treinamento prévio fazendo circular entre os participantes os critérios adotados (tabela 3) e um conjunto de lâminas de estudo. Os resultados foram animadores com teste kappa altamente significante ($p < 0,0001$), demonstrando que é possível atingir-se boa concordância entre patologistas no diagnóstico de hiperplasia ductal atípica ductal da mama desde que haja critérios claros e treinamento adequado. Ainda, para tentar diminuir a variabilidade interobservador no diagnóstico de hiperplasia ductal

atípica alguns autores descreveram utilidade do exame imuno-histoquímico para pesquisa de citoceratinas de alto peso molecular (clone 34 β E12). Seus resultados demonstraram forte positividade para esse marcador em virtualmente todos os casos de hiperplasia ductal exuberante sem atipias. A maioria dos casos de hiperplasia ductal atípica foram negativos ou fracamente positivos (RAJU *et al.* 1990; MOINFAR *et al.* 1999).

Carcinoma intraductal, ou carcinoma ductal *in situ*, pode ser definido como uma proliferação epitelial com características citológicas de malignidade localizada no parênquima mamário e que se diferencia do carcinoma invasivo pela ausência de invasão além dos limites da membrana basal (ELLIS *et al.* 1998; TAVASSOLI 1998). Na verdade trata-se de um conjunto heterogêneo de lesões com aspectos morfológicos e comportamentos clínicos variados, que podem ser medidos em relação ao índice de recidiva local como lesão intraductal ou como carcinoma invasivo. Requisitos mínimos para diagnóstico de carcinoma intraductal são, segundo o AFIP, comprometimento completo de pelo menos um ducto por uma proliferação celular de padrão papilífero ou cribriforme com valor agregado de no mínimo 2mm (TAVASSOLI 1998).

-
1. Hiperplasia exuberante sem atipia contém células em formações enoveladas com núcleos de distribuição forma irregular. Os espaços intercelulares estão distribuídos mais centralmente.
 2. Carcinoma ductal *in situ* (padrão não comedocarcinoma) apresenta população de células regularmente distribuídas com núcleos uniformes, caracteristicamente monoclonal, agrupadas dentro do espaço delimitado pela membrana basal.
 3. Hiperplasia ductal atípica exibe a população celular descrita acima para o carcinoma ductal *in situ* de padrão não comedocarcinoma em pelo menos parte do espaço ductal. Geralmente a segunda população de células está constituída por células polarizadas como aquelas vistas no epitélio mamário na posição luminal logo acima da membrana basal.
 4. Quando houver dúvidas entre a hiperplasia ductal atípica e o carcinoma intraductal, usar a designação mais benigna.
 5. Para qualificar-se como hiperplasia ductal atípica (para se contrapor ao diagnóstico de hiperplasia epitelial típica exuberante), a população de células alteradas geralmente tem, mas não sempre, núcleos hiperocrômicos.
 6. Para caracterizar-se hiperplasia ductal atípica (para se contrapor ao diagnóstico de hiperplasia epitelial típica exuberante), uma “ponte” celular deve estar constituída por uma população pelo menos seis ou sete células alteradas. Esta é uma indicação do menor nível diagnóstico de hiperplasia ductal atípica.
-

Tabela 3 **Crterios de Page para avaliao de leses proliferativas do epitlio ductal da mama. Schnitt et al. AJSP 1992, 16:1133-43.**

Esta lesão tem sido mais estudada na última década após a generalização da utilização da mamografia como teste de triagem populacional. Assim, houve um aumento na sua incidência de aproximadamente 1-5% de todos os tumores mamários na era pré-mamográfica para 15 a 40% na era pós-mamográfica (ELLIS *et al.* 1998; TAVASSOLI 1998; SIGAL-ZAFRANI 2000).

A heterogeneidade morfológica do carcinoma intraductal torna difícil a sua classificação (LENNINGTON *et al.* 1994). Tradicionalmente utiliza-se o padrão arquitetural da lesão para este fim. Os tipos mais comuns são o comedocarcinoma, o papilífero, o micropapilífero e o sólido. Outros padrões como o carcinoma intraductal de células claras, o de células em anel de sinete, o intracístico, o neuroendócrino e o cístico-hiperssecretor são raros (ELLIS *et al.* 1998; SIGAL-ZAFRANI 2000). O valor deste tipo de classificação tem sido posto à prova. BADVE *et al.* (1998), em um estudo caso-controle utilizando 141 pacientes com até 20 anos de seguimento após ressecção local do tumor, não encontraram relação entre padrão arquitetural da lesão e a probabilidade de recidiva local. Além disso, este tipo de classificação é pouco reprodutível. Enquanto o diagnóstico de carcinoma intraductal é relativamente imediato, com

valores de teste kappa para concordância interobservador variando entre 0,69 a 0,87 (PALLI *et al.* 1996; SLOANE *et al.* 1999; ELSTON *et al.* 2000), a subclassificação do tumor utilizando-se o padrão arquitetural como critério atinge valores de kappa tão baixos quanto 0,23 (SLOANE *et al.* 1994).

Outros critérios foram testados na busca por uma classificação que tenha valor prognóstico e que seja reprodutível. O grau nuclear, o padrão de necrose, o padrão de polarização celular, fibrose, circunscrição e tamanho foram considerados (LAGIOS 1990; OTTESEN *et al.* 1992; HOLLAND *et al.* 1994; SILVERSTEIN *et al.* 1995; LAGIOS 1995; TAVASSOLI 1999;). Alguns autores tentaram verificar ainda o significado prognóstico da associação de alguns destes critérios com a morfologia (POLLER *et al.* 1994). LAGIOS (1995) estudou pacientes tratadas com cirurgia conservadora, sem radioterapia, seguidas por 10 anos em média. Houve recorrência local em 32% das pacientes cujo tumor apresentou alto grau nuclear e em 10% daquelas cuja neoplasia era constituída por células de grau nuclear intermediário. As doentes com tumor de baixo grau nuclear não apresentaram recidiva tumoral. Outro estudo (SILVERSTEIN *et al.* 1995) dividiu as pacientes em três grupos segundo o grau nuclear e o tipo de necrose da lesão. O grupo de pacientes com lesões “não alto grau nuclear”, sem necrose,

apresentou recidiva tumoral em 3,8% dos casos; No grupo de pacientes com lesões “não alto grau” que apresentavam necrose, houve recorrência local em 11,1% dos casos. Finalmente, no grupo das pacientes com lesões de alto grau nuclear, 26,5% apresentaram recidiva local. O índice de sobrevida livre de doença em 8 anos foi de 93% para o primeiro grupo, 84% para o segundo e 61% para o terceiro grupo ($p \leq 0,05$). Estes resultados mostraram que o grau nuclear, associado ao tipo de necrose, apresenta valor preditivo para recorrência local (SHOCKER e SLOANE 1999). Fatores como arquitetura, polarização celular e comedonecrose parecem não acrescentar utilidade ao grau nuclear. O tipo de recidiva, isto é, se esta será como carcinoma *in situ* ou como carcinoma invasor, não está relacionado ao grau nuclear (BADVE *et al.* 1998).

A questão sobre o risco de desenvolvimento de câncer a partir de lesões benignas do epitélio mamário tem sido objeto de amplo debate na literatura (PAGE 1986; CARTER *et al.* 1988; BODIAN *et al.* 1993). Historicamente, dois conceitos até certo ponto opostos têm sido colocados (ROSAI 1991). O primeiro coloca uma linha divisória nítida entre as várias formas, demarcando precisamente hiperplasia e carcinoma *in situ*, sem definir lesões intermediárias (AZZOPARDI 1979). A segunda linha de pensamento aceita o conceito de hiperplasia

atípica como lesão intermediária, de gravidade fronteira entre a hiperplasia típica e o carcinoma intraductal (PAGE 1986, TAVASSOLI e NORRIS 1990).

Na reunião do “Cancer Committee of the College of American Pathologists” em 1985 (HUTTER 1986), lesões chamadas de doença fibrocística mamária foram separadas em três categorias, dependendo do aspecto morfológico e do risco relativo de desenvolvimento de neoplasia maligna em estudo caso-controle: categoria I, lesão não proliferativa do epitélio mamário, risco zero; categoria II, hiperplasia exuberante, sólida ou papilífera, risco baixo (1,5 a 2x); categoria III, hiperplasia atípica ductal ou lobular, risco moderado (5x). Mais tarde, foi adicionada uma categoria a mais (PAGE 1986), ou seja, o carcinoma *in situ* lobular ou ductal, com alto risco (8-10x). Os dados foram atualizados em 1998 (FITZGIBBONS *et al.* 1998) tendo sido acrescentados resultados de outros estudos que geralmente endossaram este tipo de categorização (quadro 1). A noção de risco histológico de desenvolvimento de câncer mamário está mais associada à hiperplasia atípica como discutido a seguir. DUPONT *et al.* (1993) verificaram um risco relativo de 4,3 nas pacientes com hiperplasia ductal atípica estudando uma coorte de 15.161 pacientes do “Breast Cancer Detection Demonstration Project” (BCDDP) com seguimento

de 5 anos e BODIAN *et al.* (1993) verificaram um risco relativo de 3,9 ($p < 0,02$) em um grupo de 1799 pacientes e seguimento de até 20 anos.

Fatores como história familiar de câncer mamário, idade e lesões teciduais associadas podem modificar o risco relativo para câncer mamário em mulheres com hiperplasia atípica ductal. Uma história familiar de câncer em parentes de primeiro grau praticamente dobra o risco (DUPONT e PAGE 1985; FITZGIBBONS *et al.* 1998). Por exemplo, uma história familiar positiva em paciente com hiperplasia atípica ductal faz com que seu risco relativo para desenvolvimento de câncer mamário seja semelhante ao de uma doente com carcinoma intraductal. Em relação à idade, um estudo prospectivo encontrou um risco relativo de 6 vezes em pacientes com hiperplasia ductal atípica e menos de 46 anos, de 3,7 em pacientes na faixa etária de 46 a 55 anos e 2,3 em pacientes com idade maior que 55 anos, quando comparadas a mulheres normais (CARTER *et al.* 1988). Outro estudo prospectivo, caso-controle, que incluiu 121 casos de pacientes com hiperplasia ductal atípica e 488 controles verificou um risco relativo de 5,9 em pacientes na pré-menopausa contra um risco relativo de 2,3 em pacientes menopausadas (LONDON *et al.* 1992). Quanto à presença de lesões histológicas associadas na mesma biopsia, JACOBS *et al.* (1999) demonstraram que a presença de cicatriz radial praticamente dobra o

risco de desenvolvimento de câncer quando é considerada qualquer lesão proliferativa do epitélio mamário, o que ainda aumenta se houver mais de uma área de cicatriz. Entre as mulheres com hiperplasia atípica, a presença de cicatriz radial aumentou o risco em 70%. Em uma série de 20 casos de papilomas intraductais com hiperplasia atípica e/ou carcinoma intraductal, os autores verificaram que 12 eram múltiplos e, destes, 5 evoluíram para neoplasia maligna invasiva ou *in situ* na mama ipsi ou contralateral e sugeriram que pode haver risco aumentado de desenvolvimento de câncer mamário nestas condições (RAJU e VERTES 1996).

Considerando que o risco absoluto para desenvolvimento de câncer mamário nas mulheres com hiperplasia ductal atípica do epitélio ductal é de 10 a 15%, que esse risco se aplica a ambas as mamas e que o mesmo cai 10 anos após o diagnóstico inicial, conclui-se que, do ponto de vista epidemiológico, hiperplasia ductal atípica deve ser considerada mais como um marcador de probabilidade de desenvolvimento de câncer do que uma doença precursora verdadeira. Já o carcinoma intraductal, dadas as suas características epidemiológicas, a saber: risco absoluto de 25 a 40%, risco persistente nos vinte anos subseqüentes ao diagnóstico e o desenvolvimento de

Sem Risco Aumentado
Mulheres que apresentam as seguintes lesões não apresentam risco maior de desenvolver câncer mamário em relação àquelas que nunca foram biopsiadas:
Adenose (outras que não adenose esclerosante) Ectasia ductal Fibroadenoma sem características complexas Fibrose Mastite Hiperplasia discreta sem atípias Cistos comuns (macro ou microscópicos) Metaplasia apócrina simples (sem associação a hiperplasia ou adenose) Metaplasia escamosa
Discreto aumento no risco relativo (1,5 a 2 vezes)
Mulheres que apresentam as seguintes lesões apresentam discreto aumento no risco de desenvolver câncer mamário em relação àquelas que nunca foram biopsiadas
Fibroadenoma com características complexas Hiperplasia moderada ou exuberante sem atípias Adenose esclerosante Papiloma solitário sem hiperplasia atípica associada
Moderado aumento no risco relativo (4 a 5 vezes)
Mulheres que apresentam as seguintes lesões apresentam moderado aumento no risco de desenvolver câncer mamário em relação àquelas que nunca foram biopsiadas
Hiperplasia atípica ductal Hiperplasia atípica lobular
Alto risco relativo (8 a 10 vezes)
Mulheres que apresentam as seguintes lesões apresentam acentuado aumento no risco de desenvolver câncer mamário em relação àquelas que nunca foram biopsiadas
Carcinoma intraductal Carcinoma lobular <i>in situ</i>

Quadro 1 Risco relativo para carcinoma invasivo da mama com base nos achados histopatológicos benignos do tecido mamário. Fitzgibbons *et al.* Arch Pathol Lab Med 1998, 122:1053-5.

neoplasia invasora na mama ipsilateral, pode ser considerado um precursor verdadeiro do câncer mamário (SHIRLEY 1999).

Dadas as evidências epidemiológicas e os problemas clínicos inerentes à condução de casos isolados de hiperplasia atípica e carcinoma intraductal, parte da atenção relativa a essas lesões e às neoplasias invasivas do epitélio mamário foi direcionada à elucidação da história natural da doença. Vários autores, embora aceitem a possibilidade de que pelo menos alguns exemplos de carcinoma invasor do epitélio ductal da mama se origine *de novo*, testaram a hipótese de que a carcinogênese ductal mamária segue um contínuo passando de estados hiperplásicos do epitélio à transformação neoplásica pré-invasiva e finalmente ao carcinoma invasor plenamente desenvolvido (MARIUZZI *et al.* 1994; DAWSON *et al.* 1996; GUPTA *et al.* 1997; LAKHANI 1999; RUIZ *et al.* 1999; SHIRLEY 1999). Para tal, diferentes metodologias, tais como métodos em animais de experimentação, métodos morfométricos e de biologia molecular foram utilizados (LAKHANI 1999).

DAWSON *et al.* (1996) desenvolveram uma linhagem celular da mama humana denominada MCF10AT, derivada da transfecção da linhagem celular MCF10A com o oncogene *c-Ha-ras*, que apresenta capacidade de reproduzir a provável seqüência da história natural do

câncer mamário, desde hiperplasia epitelial típica até carcinoma invasivo, em camundongos atímicos. Em outro trabalho, no qual um grupo de animais injetados com células MCF10AT foi tratado com tamoxifen, os autores verificaram que nos camundongos que desenvolveram carcinoma mamário, estes não apresentavam lesões precursoras e concluíram que pode haver uma via alternativa de desenvolvimento de câncer mamário (VISSCHER *et al.* 2001).

GUPTA *et al.* (1997) estudaram trezentos casos de carcinoma ductal infiltrante associados a carcinoma intraductal e observaram que há relação entre o grau nuclear do componente invasor e do componente *in situ*, e concluíram que, dos modelos de progressão de doença existentes, o componente intraductal determina o grau nuclear e o comportamento do componente invasor na maioria dos casos. Um estudo utilizando métodos quantitativos (RUIZ *et al.* 1999) encontrou que há relação positiva progressiva entre área nuclear média e o aumento do grau de atipia arquitetural e citológica nas lesões representadas por hiperplasia epitelial ductal típica e atípica e carcinoma intraductal bem e pouco diferenciados ($p < 0,05$). Estes autores também verificaram que a área nuclear média é semelhante na hiperplasia ductal atípica e no carcinoma intraductal bem diferenciado. Outro dado digno de nota neste trabalho foi o achado de que 15% das

hiperplasias atípicas foram aneuplóides. SKJORTEN *et al.* (1991) tinham achado conclusões semelhantes no que se refere à área nuclear média e à progressão de atipia arquitetural e citológica das lesões mamárias epiteliais. MOMMERS *et al.* (2001) verificaram, utilizando citometria digital, que as alterações nucleares na hiperplasia típica podem colocá-la como uma lesão mais grave do que tem sido considerada. Um trabalho, utilizando citogenética, estudou cinco casos de lesões hiperplásicas sem atipias do epitélio mamário e encontrou alterações cromossômicas clonais em dois deles, além de alterações cromossômicas qualitativas e quantitativas (BURBANO *et al.* 1996). Ainda, MOMMERS *et al.* (2001), quantificando por meio de citometria digital parâmetros nucleares da célula, observaram que hiperplasia atípica e carcinoma intraductal de baixo grau podem ser lesões relacionadas desde que não foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros estudados, reproduzindo os achados de MARIUZZI *et al.* (1994). Nesse mesmo trabalho, MOMMERS *et al.* (2001) verificaram que as características nucleares do carcinoma intraductal bem diferenciado são semelhantes às do carcinoma invasor bem diferenciado, assim como os valores nucleares do carcinoma intraductal pouco diferenciado se repetem no carcinoma invasor pouco diferenciado e concluíram, assim como GUPTA *et al.* (1997) e

VISSCHER *et al.* (2001), que pode haver vários espectros de evolução para carcinoma invasor da mama.

Estudos sobre perda de heterozigossidade e instabilidade de microssatélites foram realizados nas lesões hiperplásicas e pré-malignas do epitélio ductal mamário e geraram resultados controversos. Alguns estudos concluíram que a hiperplasia ductal atípica representa uma lesão neoplásica mais que hiperplásica. Um trabalho verificou perda de heterozigossidade em 5 casos para o cromossomo 16q e em 2 casos para o cromossomo 17p ao estudar 14 casos de hiperplasia ductal atípica após microdissecção (LAKHANI *et al.* 1995). Outros estudos revelaram que 40-50% das hiperplasias atípicas apresentam alterações monoclonais de microssatélites (ROSENBERG *et al.* 1996, 1997). Perda de heterozigossidade nos cromossomos 16q e 17p são encontradas no carcinoma *in situ* em até 50% dos casos (LAKHANI *et al.* 1995; FUJII *et al.* 1996, O'CONNEL *et al.* 1998). FUJII *et al.* (1996) não encontraram relação entre as alterações por perda de heterozigossidade observadas nas áreas de carcinoma intraductal e carcinoma ductal infiltrante de uma mesma lesão. TSUDA *et al.* (2001), ao estudar sete casos em que hiperplasia epitelial atípica e carcinoma ductal infiltrante foram diagnosticados na mesma mama em intervalos que variaram de 2,7 anos a 16 anos,

verificaram que, embora as lesões proliferativas atípicas apresentassem alterações clonais por perda de heterozigosidade do cromossomo 16q, estas diferiam no padrão em relação às alterações observadas nas neoplasias invasivas. Por outro lado, O'CONNEL *et al.* (1998) ao estudar tecidos com carcinoma ductal infiltrante e lesões proliferativas ou lesões pré-neoplásicas, detectaram o mesmo padrão de perda de heterozigosidade na neoplasia invasiva e na hiperplasia ductal típica em 37% dos casos, na neoplasia invasiva e na hiperplasia ductal atípica em 45% dos casos e no carcinoma invasor e em carcinomas intraductais em 77% a 80% dos casos. Ao estudar perda de heterozigosidade e instabilidade de microssatélites em 25 lesões de 8 pacientes diferentes acompanhadas por até 25 anos, KASAMI *et al.* (1997) não acharam relação entre a presença de alterações genéticas e evolução para câncer, nem relação das alterações genéticas observadas com atipias morfológicas. Outros estudos genéticos detectaram amplificação da região 20q13.2 na hiperplasia típica, na hiperplasia atípica, no carcinoma intraductal e no carcinoma invasor e postularam sua possível participação na carcinogênese (WERNER *et al.* 1999). Finalmente, autores interessados em estudar a atividade da telomerase nas lesões proliferativas do epitélio ductal da mama (YASHIMA *et al.* 1998) verificaram que houve um aumento progressivo

nos níveis médios de atividade da telomerase com o aumento progressivo na severidade das alterações histopatológicas ($p < 0,05$).

1.2. O CICLO CELULAR E AS LESÕES PROLIFERATIVAS DO EPITÉLIO DOS DUCTOS MAMÁRIOS

O ciclo celular é o “programa” de crescimento e divisão celular (proliferação). Nas células dos mamíferos é um processo complexo e consiste em uma série de reações em cascata estimuladas externamente por fatores de crescimento e mediadas por uma família de proteínas denominadas quinases dependentes de ciclinas que têm, entre outras, a propriedade de adicionar moléculas de fosfato às proteínas efetoras. Estas, por sua vez, têm por função regular a síntese da molécula de DNA. Divide-se o ciclo em quatro fases, a saber, G1 (Gap 1), S (fase de síntese de DNA), G2 (Gap 2) e M (fase de mitose), além de haver uma fase de quiescência denominada G0. É nas fases G1 e G2 que a célula tem um período de tempo para crescer e para corrigir eventuais erros na síntese de DNA. Há pelo menos três momentos para a correção de eventuais danos ocorridos na replicação do DNA, denominados pontos de checagem (“checkpoints”), isto é, momentos nos quais a célula aborta ou continua o processo de replicação (ALBERTS *et al.* 1983), localizados na parte final da fase G1, na fase S e na porção final da fase G2 (HARTWELL e WEINERT 1989; KASTAN *et al.* 1991; O’CONNOR *et al.* 1994). Uma vez

ultrapassados esses pontos de checagem, a passagem à fase seguinte é irreversível.

O ciclo celular pode ser estudado utilizando-se vários métodos. Morfologicamente, podemos lançar mão da reação imuno-histoquímica para detecção de proteínas nucleares associadas ao ciclo celular como, por exemplo, a proteína Ki-67 (CATTORETTI *et al.* 1992) e a enzima topoisomerase II α . A determinação do índice de proliferação celular utilizando-se anticorpo anti-DNA topoisomerase II α merece um parêntese. Esta enzima é o alvo molecular da doxorrubicina, um quimioterápico utilizado para o tratamento das neoplasias mamárias (LYNCH *et al.* 1997). Sua expressão se faz preferencialmente nas fases S, G2 e M do ciclo celular (WOESSNER *et al.* 1991) sendo, portanto, adequada para fornecer dados sobre o índice de proliferação celular. Além disso, LYNCH *et al.* (1997), demonstraram sua utilidade para a quantificação de células em replicação em tecido de neoplasia maligna invasora primária da mama estudando 30 espécimes de 20 pacientes por imuno-histoquímica, controlando as reações com MIB-1. Os resultados mostraram resultados comparáveis no que se refere à quantificação do índice de proliferação celular. Tais autores concluíram que a imunomarcção para DNA topoisomerase II α se presta tanto como elemento preditivo de resposta ao quimioterápico, quanto para

medir o índice de proliferação celular em carcinoma invasor primário da mama. RUDOLPH *et al.* (1999) também verificaram associação ($r=0,93$) entre os resultados obtidos na contagem do índice de proliferação celular quando determinado tanto pelo Ki-67 (clone Ki-S11) quanto pela topoisomerase II α (clone Ki-S4). Nesse estudo, o índice de proliferação celular medido pela topoisomerase II α foi fator prognóstico independente para sobrevida global e para sobrevida livre de metástases. Ao estudar 184 casos de câncer de mama invasivo, DEPOWSKI *et al.* (2000) verificaram que na análise univariada, a expressão aumentada de topoisomerase II α correlacionou-se com diminuição da sobrevida global, estadió avançado do tumor, metástases nodais e superexpressão de Ki-67. Outro estudo (ROHR e HOLDEN 1999) demonstrou, utilizando topoisomerase II α como marcador de índice de proliferação celular em casos de hiperplasia ductal, carcinoma ductal *in situ* de baixo, intermediário e alto grau, que tal índice se relaciona ao grau de atipia nuclear e, assim, à agressividade da lesão.

Há evidências mostrando que a transformação maligna celular resulta da alteração da expressão de proto-oncogenes e genes supressores de tumor, que também são responsáveis pelo ciclo celular, nas neoplasias mamárias. A correlação destas alterações com o

comportamento clínico pode indicar que elas representam eventos importantes e que podem ter um papel importante na tumorigênese e na progressão tumoral (MOMMERS *et al.* 1998).

As principais famílias de proteínas que controlam o ciclo celular são as ciclinas (A a H), quinases dependentes de ciclinas (CDKs, p.ex. CDK4/6 e CDK2), proteínas inibidoras de quinases (CDK-i, p.ex. p21^{waf1}, p27^{kip1} e p16^{ink4}) e produtos de genes supressores de tumores. (p.ex. p53 e Rb). A atividade das CDKs é regulada por mecanismos que incluem fosforilação e defosforilação da subunidade quinase (SOLOMON 1993), ativação por ciclinas (SHERR 1994; MORGAN 1995) e inibição da atividade por proteínas inibidoras (REED *et al.* 1994; SHERR e ROBERTS 1995), estas últimas com papel importante como elementos supressores de tumor. Há duas famílias de proteínas inibidoras de CDKs (REED *et al.* 1994; SHERR e ROBERTS 1995): a família KIP, constituída por p21^{waf1}, p27^{kip1} e p57^{kip2} (EL-DEIRY *et al.* 1993; GU *et al.* 1993; HARPER *et al.* 1993; POLYAK *et al.* 1994a, 1994b; TOYOSHIMA e HUNTER 1994; LEE *et al.* 1995; MATSUOKA *et al.* 1995) e a família INK4, constituída por p15^{ink4}, p16^{ink4}, p18^{ink4} e p19^{ink4} (SERRANO *et al.* 1993; HANNON e BEACH 1994; GUAN *et al.* 1994; CHAN *et al.* 1995; HIRAI *et al.* 1995).

A proteína p53 atua na manutenção do genoma (LANE 1992), impedindo a progressão do ciclo celular caso algum dano do DNA seja identificado, dando tempo de eventuais reparos (KASTAN *et al.* 1991). Caso estes não sejam possíveis, a p53 induz à apoptose (CLARKE *et al.* 1993), assegurando que tais alterações não sejam passadas às células-filhas. Esta função supressora de tumores é em parte mediada por genes ativados pela proteína p53 como é o caso do p21^{waf1} e do p27^{kip1}. A proteína p53 normal tem meia vida fugaz e é dificilmente detectada, porém a proteína derivada de um gene mutado tem sobrevida longa e se acumula no núcleo celular sendo passível de detecção por método imuno-histoquímico (BARBARESCHI 1996). Proteína p53 normal pode se acumular no interior do núcleo em casos de dano do DNA (LANE 1994) ou como resultado de formação de complexos com outras proteínas (MOMAND *et al.* 1992). Mutações no gene p53 são as mais freqüentemente observadas nas neoplasias (LAKHANI 1999) e nos carcinomas mamários atingem uma freqüência que varia de 16% a 45% (CATTORETTI *et al.* 1988; THOR *et al.* 1992; ALLRED *et al.* 1993; FRIEDRICHS *et al.* 1993). Estudos sobre a expressão de proteína p53 em lesões proliferativas e lesões pré-malignas do epitélio mamário indicam alterações nas lesões mais avançadas. UMEKITA *et al.* (1994) estudou 83 casos de carcinoma ductal invasivo, 13 carcinomas intraductais, 16 hiperplasias atípicas do

epitélio ductal e 39 hiperplasias típicas ductais. Seus achados demonstraram imuno-expressão de proteína p53 em 28,9% dos casos de carcinoma invasivo, 50% dos casos de carcinoma invasivo com componente intraductal proeminente e 7,6% dos casos de hiperplasia atípica ductal. Não foi observado imuno-expressão de proteína p53 nas lesões hiperplásicas típicas. Ainda, esses autores notaram que as lesões pré-invasivas de alto grau histológico apresentaram mais expressão de proteína p53 e que esta alteração se mantinha no componente invasor. CHITEMERERE *et al.* (1996), embora tenham encontrado acúmulo de proteína p53 em 16% amostras de carcinoma intraductal, não encontraram tal imunofenótipo em 75 hiperplasias atípicas. O'MALLEY *et al.* (1994) pesquisaram expressão da proteína p53 por imuno-histoquímica em 12 carcinomas intraductais com padrão comedocarcinoma e em 27 carcinomas intraductais de baixo grau histológico, encontrando positividade em 33% das lesões de alto grau. Nenhuma lesão de baixo grau foi positiva. Outro estudo mostrou imuno-expressão de proteína p53 em aproximadamente 25,2% em 143 casos de carcinoma intraductal, sendo a maioria de alto grau histológico (POLLER *et al.* 1993). Uma outra maneira de acessar o problema seria estudando casos em que há duas lesões proliferativas na mesma amostra tecidual. ALLRED *et al.* (1994) citaram um exemplo no qual hiperplasia epitelial ductal típica e carcinoma intraductal

sincrônicos apresentam imunofenótipo diferente. Isto é, a hiperplasia ductal típica é receptor de progesterona positivo e proteína p53 negativa e o carcinoma intraductal, receptor de progesterona negativo e proteína p53 positiva. DAVIDOFF *et al.* (1991) estudaram neoplasias com componente invasor e *in situ*, assim como as lesões metastáticas correspondentes. Dessas lesões, 17% expressaram proteína p53 alterada. A análise da seqüência do DNA dessas lesões demonstrou a mesma mutação puntual em ambos os componentes. Ainda, quando as metástases foram seqüenciadas, o padrão da mutação se manteve, sugerindo que a mutação da proteína p53 pode ser um evento precoce na carcinogênese mamária e se mantém até as fases mais avançadas.

O gene p27^{kip1}, cuja expressão é regulada por contato célula a célula e por fatores de crescimento específicos, tais como o TGF- β e progesterona (GROSHONG *et al.* 1997; LLOYD *et al.* 1999), está localizado no cromossomo 12p13. A proteína p27^{kip1} foi inicialmente identificada em células cuja progressão do ciclo celular fora inibida pelo TGF- β (POLYAK *et al.* 1994a) e atua durante a fase G1 inibindo os complexos Ciclina D1/CDK4 e Ciclina E/CDK2 (TOYOSHIMA e HUNTER 1994), funcionando provavelmente como supressor de tumor (CHEN *et al.* 1996; FERRO *et al.* 1996; KIYOKAWA *et al.* 1996; NAKAYAMA *et al.* 1996) e promotor de apoptose (KATAYOSE *et al.*

1997; LEVKAU *et al.* 1998). Os níveis de p27^{kip1} são altos em células quiescentes e diminuem após estimulação com mitógenos. Anormalidades estruturais do gene p27^{kip1} são raras e carcinomas primários da mama apresentam vários graus de perda desta proteína. Neoplasias de tecidos endócrinos, outros epitélios, tecido linfóide e tecido glial apresentam diminuição da expressão de p27^{kip1} durante sua progressão (LLOYD *et al.* 1999; KORSHUNOV e GOLANOV, 2001). Três trabalhos da literatura que avaliaram os níveis de proteína p27^{kip1} em neoplasias mamárias merecem destaque. O primeiro (TAN *et al.* 1997) avaliou tumores com diâmetro <1cm e observaram que baixos níveis de p27^{kip1} conferem um risco relativo de recidiva de 3,4 (p=0,03). O segundo (PORTER *et al.* 1997) mostrou que p27^{kip1} tem valor preditivo para baixa sobrevida geral por análise multivariada com um risco relativo de 2,7 (p=0,01) em pacientes com menos de 45 anos. Finalmente, CATZAVELOS *et al.* (1997), estudando a população geral atingida pelo câncer da mama mostrou que baixos níveis de p27 tem valor preditivo para sobrevida livre de doença, com risco relativo de 2,14 (p=0,017).

1.3. APOPTOSE E AS LESÕES PROLIFERATIVAS DO EPITÉLIO DOS DUCTOS MAMÁRIOS

O termo apoptose ou morte celular programada foi cunhado por KERR e WILLIE (KERR *et al.* 1972; WYLLIE *et al.*, 1980) na década de 1970 para designar um tipo especial de morte celular caracterizada por ser um processo bioquimicamente ativo, dependente de energia e geneticamente controlado, responsável na manutenção do equilíbrio quantitativo dos tecidos adultos e da morfogênese nos tecidos embrionários. Os aspectos ultra-estruturais característicos são diminuição do volume citoplasmático, marginação da cromatina, formação de bolhas nas membranas, condensação e fragmentação celular, com formação dos corpos apoptóticos que serão posteriormente fagocitados (WYLLIE *et al.* 1980; MAJNO e JORIS 1995). Embora o método padrão para o estudo da apoptose seja a identificação de células morfológicamente alteradas e sua quantificação (PARTON *et al.* 2001), essas alterações morfológicas são de difícil detecção à microscopia óptica convencional (JONES e GORES 1997), sendo mais facilmente identificadas com o auxílio de colorações mais ou menos específicas (GAVRIELI *et al.* 1992; ANSARI *et al.* 1993), tais como colorações para a identificação de núcleos condensados

utilizando-se corantes fluorescentes e a detecção de DNA fragmentado pela marcação das extremidades dos segmentos da molécula com dUTP-biotina mediada pela transferase terminal (TdT) (ALISON 1999; RENEHAN *et al.* 2001; PARTON *et al.* 2001)

Do ponto de vista bioquímico, o mecanismo de apoptose é levado a cabo por um conjunto de interações moleculares que são denominadas *eventos efetores terminais* (WYLLIE 1997) regulados por uma teia bioquímica altamente preservada durante a evolução, semelhante à cascata da coagulação sangüínea ou à ativação do complemento (JONES e GORES 1997), requerendo uma série de fatores estimulatórios e inibitórios.

Os eventos efetores terminais (WYLLIE 1997) são, em última análise, guiados por proteases que têm em comum um sítio ativo que contém cisteína e quebra peptídeos no extremo carboxi-terminal um resíduo aspártico ácido e são chamadas coletivamente de *caspases* (“cysteine-containing asp-ases”). Um dos fatores estimulatórios iniciais mais bem conhecidos é a proteína de membrana CD95/apo-1/Fas, membro da família dos receptores de TNF que estimula o mecanismo de apoptose de modo não transcricional. Mecanismos transcricionais de ativação de caspases incluem a ativação pelo proto-

oncogene *c-myc* (EVAN *et al.* 1992; EVAN 1997) e a mediada pela proteína p53 (LYONS e CLARKE 1997; AGARWAL *et al.* 1998).

A base genética da apoptose foi estabelecida a partir de estudos realizados no nematodo *Caenorhabditis elegans* (HENGARTNER e HORVITZ 1994) Este verme contém três genes que regulam a morte celular, denominados *ced-3*, *ced-4* e *ced-9* (PETER *et al.* 1994). Os dois primeiros induzem a apoptose e o último, relacionado à proteína *bcl-2*, inibe o fenômeno. O gene *ced-3* codifica uma caspase, cuja função foi acima descrita, e o gene *ced-4* codifica uma proteína promotora de apoptose, que funciona como uma ponte entre os genes *ced-3* e *ced-9*.

A família de proteínas *bcl-2* (BROWN 1997; REED 1997) é representada por 14 peptídeos que ou inibem a apoptose (*Bcl-Xl*, *Mcl-1*, *A1/Bfl-1*, etc.), ou a estimulam (*Bax*, *Bcl-Xs*, *Bad*, etc.). O mecanismo de apoptose pode ser dividido em três fases, ou seja, iniciação, indução e execução, sendo que a ação do proto-oncogene *bcl-2*, bloqueando ou permitindo a morte celular, deve-se dar em algum ponto na segunda fase (REED 1997). O gene *bcl-2* codifica uma proteína que bloqueia a apoptose e foi originalmente descrito na translocação cromossomal t(14;18) que ocorre em linfomas foliculares (BROWN 1997; REED 1997). Sua expressão foi observada em uma alta

quantidade de tumores mamários e é associada com bom prognóstico (ZHANG *et al.* 1998; SJÖNSTRÖN e BERGH 2001), além de ser inversamente proporcional à expressão da proteína p53 (ZHANG *et al.* 1997). No entanto, parece não haver relação genética entre esses marcadores, desde que a análise das mutações do gene p53 nos exons 5-9 não se correlaciona com os níveis de expressão da proteína bcl-2 (DUEÑAS-GONZÁLEZ *et al.* 1997).

No estudo das lesões mamárias, no que diz respeito à progressão para neoplasia, o assunto apoptose tem tido diferentes tipos de abordagem na literatura especializada. Alguns trabalhos tentam quantificar o número de células morfológicamente apoptóticas e comparam os resultados obtidos entre as várias lesões e com outros parâmetros quantitativos obtidos (ALLAN *et al.* 1992; LIPPONEN *et al.* 1994; MOMMERS *et al.* 1999). Outros autores descrevem os achados qualitativos resultantes do estudo das proteínas relacionadas aos mecanismos de apoptose no tecido mamário (ZHANG *et al.* 1997; PAPADIMITRIOU *et al.* 1997; MOMMERS *et al.* 1998). Finalmente, há estudos que tentam relacionar os achados quantitativos com os achados qualitativos referentes à apoptose (HARN *et al.* 1997; MUSTONEN *et al.* 1997; GANDHI *et al.* 1998; ROCHAIX *et al.* 1999; VAKKALA *et al.* 1999a, 1999b).

Ao estudar a relação entre o número de células apoptóticas com índices de proliferação celular, ALLAN *et al.* (1992), demonstraram que há um número relativo menor de células epiteliais apoptóticas no tecido associado a alterações fibrocísticas e no carcinoma mamário ($p < 0,001$) e assim é possível considerar-se que apoptose pode estar associado tanto ao desenvolvimento da mastopatia fibrocística quanto do câncer mamário. O índice de apoptose em uma série de 288 carcinomas invasores do tecido mamário correlacionou-se com alto grau histológico do tumor ($p < 0,0001$), aneuploidia celular ($p = 0,049$) e alta taxa mitótica ($p < 0,0001$) (LIPPONEN *et al.* 1994). MOMMERS *et al.* (1999) mostraram diferenças entre os índices de atividade mitótica/apoptótica no carcinoma invasor e nas lesões pré-invasivas. Também, baseados nesses achados, propuseram que tais índices são semelhantes nas lesões de mesmo grau nuclear. Além disso, em lesões de baixo grau nuclear, o acúmulo de células parece ser consequência da alta taxa de proliferação celular, enquanto que nas lesões de alto grau nuclear, a diminuição relativa do índice de apoptose parece ter importância.

ZHANG *et al.* (1997) estudaram a expressão das proteínas bcl-2 e p53 em tecido mamário normal, no carcinoma intraductal e no carcinoma invasivo da mama. Eles encontraram que a expressão de

proteína bcl-2 é mais freqüente no tecido normal que nas lesões neoplásicas ($P < 0,0001$) e também mais freqüente no carcinoma intraductal que no carcinoma invasivo ($p < 0,05$). Além disso, houve uma relação inversa entre a expressão de proteína p53 e a de proteína bcl-2. Assim, a expressão de proteína bcl-2 diminui durante a carcinogênese e a de proteína p53 torna-se mais freqüente nas lesões de grau histológico mais avançado. Ainda, entre os carcinomas invasivos, a expressão de proteína bcl-2 é mais freqüente nas lesões multifocais e nos carcinomas de tipo lobular (PAPADIMITRIOU *et al.* 1997). MOMMERS *et al.* (1998) estudaram a expressão das proteínas p21, p27, p53 e bcl-2 na hiperplasia ductal sem atipias e encontraram alterações em alguns casos, o que os levou a concluir pela possibilidade de, em pelo menos alguns casos, essas lesões hiperplásicas fazerem parte do espectro de progressão do carcinoma mamário.

HARN *et al.* (1997) encontraram correlação positiva entre expressão anômala de proteína p53 e apoptose no carcinoma ductal *in situ*, mas não no carcinoma invasor ou em metástases e chegaram à conclusão de que, para adquirir o fenótipo invasor e metastatizante, a célula do carcinoma *in situ* deveria perder a capacidade de apoptose e que tal característica deve estar associada ou regulada pelo gene p53.

MUSTONEN *et al.* (1997) correlacionaram a expressão de proteína bcl-2 com a quantificação de figuras de apoptose no tecido, considerando lesões mamárias benignas, pré-malignas e malignas. O índice de apoptose foi baixo em lesões benignas como hiperplasia ductal típica e adenose esclerosante (0,15% e 0,07%), moderado na hiperplasia atípica e no carcinoma *in situ* (0,20 e 0,40%) e alto no carcinoma invasor (0,75%). A expressão de proteína bcl-2 foi medida utilizando-se um sistema semiquantitativo que considerou tanto a intensidade da imunocoloração quanto o número de células positivas. Os resultados mostraram em todos os casos uma relação inversa ($p < 0,0004$), indicando assim o papel antiapoptótico da proteína bcl-2. No carcinoma intraductal, há diferença estatística tanto no índice de apoptose, quanto na expressão de proteína bcl-2 nas lesões de alto e baixo grau nuclear. Nestas últimas o índice de apoptose é alto e a expressão de proteína bcl-2, menos freqüente (GANDHI *et al.* 1998). No carcinoma invasor, o índice de apoptose cresce com o grau histológico (MUSTONEN *et al.* 1997; ROCHAIX *et al.* 1999). Nesses tumores um alto índice de apoptose correlaciona-se com um alto grau nuclear, superexpressão de proteína p53, expressão da proteína pró-apoptótica Bak e baixa expressão de proteína bcl-2 (ROCHAIX *et al.* 1999). No que se refere ao prognóstico da lesão maligna invasiva, o índice de apoptose é maior nas lesões recorrentes quando comparadas

com lesões primárias. Nestas, a sobrevida das pacientes cuja lesão apresenta um índice de apoptose $>0,50\%$ foi significativamente menor ($p=0,015$), no estudo de VAKKALA *et al.* (1999a). Finalmente, é importante citar o estudo de VAKKALA *et al.* (1999b), no qual foi estudada a expressão das caspases 3, 6 e 8 por método imunohistoquímico e sua associação com o índice de apoptose nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da mama. Seus resultados demonstraram que a intensidade da imunocoloração para caspases e o índice de apoptose aumentam com o grau histológico da lesão, refletindo a importância dessas moléculas para o mecanismo de apoptose.

1.4. A ONCOPROTEÍNA C-ERBB-2 (PRODUTO DO ONCOGENE HER2/NEU) E AS LESÕES PROLIFERATIVAS DO EPITÉLIO DUCTAL DA MAMA

O gene HER2/neu (c-erbB-2) é um membro da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico e se localiza no cromossomo 17q. Codifica uma proteína transmembranosa de 185kd (oncoproteína c-erbB-2) que tem atividade tirosino-quinase intrínseca. Não há substâncias conhecidas que se ligam diretamente a este receptor. A ativação da proteína c-erbB-2 pode ser conseqüente a uma mutação pontual no seu domínio transmembranoso ou a uma superexpressão do gene e caracteriza-se por um estado permanente de atividade tirosino-quinase e, portanto, mitogênica. Esta via de ativação parece estar relacionada à transformação neoplásica e crescimento tumoral (HUNG e LAU 1999; VINCENT-SALOMON *et al.* 2000).

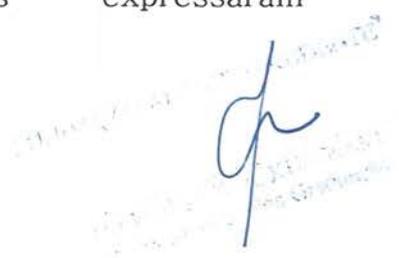
Está demonstrado que há correlação entre a superexpressão do gene HER2/neu no carcinoma mamário e a sua agressividade biológica (MARX *et al.* 1990; SCHIMMELPENNING *et al.* 1992; SCHMITT *et al.* 1995; STÅL *et al.* 1997; HUNG e LAU 1999). A expressão da proteína

c-erbB-2 correlaciona-se com a sobrevida, especialmente em pacientes com metástases (TSUDA *et al.* 1989, 1990; TANDON *et al.* 1989; PAVELIC *et al.* 1992; DE POTTER e SCHELFHOUT 1995).

Há vários métodos para o estudo da expressão do gene HER-2/neu em células neoplásicas. Métodos utilizados para identificação da amplificação do gene são o Southern blot ou a Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A técnica mais utilizada para a determinação do status do c-erbB-2, no entanto, é a pesquisa da proteína por reação imuno-histoquímica. Esta tem vantagens pela possibilidade de ser realizada em material fixado e processado rotineiramente (RAVDIN 1999). Estudos identificaram alto índice de correlação entre os resultados obtidos na pesquisa de amplificação do gene c-erbB-2 por FISH e por imuno-histoquímica (JIMENEZ *et al.* 2000; RIDOLFI *et al.* 2000). Um estudo que utilizou 750 casos consecutivos de carcinoma mamário invasor mostrou que houve concordância entre os dois métodos em 98,7% dos casos quando considerados os casos positivos e negativos e em 95% dos casos quando considerados somente os casos positivos (RIDOLFI *et al.* 2000). Outro trabalho que utilizou 100 casos de carcinoma mamário ductal verificou concordância completa entre os dois métodos em 98% dos casos (COUTURIER *et al.* 2000). Ainda, RIDOLFI *et al.* (2000) encontraram que nos tumores em que

houve positividade forte para c-erbB-2 na imuno-histoquímica o FISH também mostrou amplificação gênica. Esses trabalhos também recomendam que nos casos duvidosos na imuno-histoquímica, seja sempre realizado FISH.

Vários trabalhos pesquisaram a importância da expressão do oncogene c-erbB-2 na carcinogênese mamária. Um estudo experimental utilizou um modelo que consistia em introduzir o oncogene em células de camundongo alterando-as geneticamente. Estas células eram implantadas em animais, reconstituindo a árvore epitelial *in vivo*. Os resultados mostraram vários padrões de crescimento anormal do epitélio que lembravam lesões proliferativas encontradas no tecido mamário humano, tais como adenose esclerosante, hiperplasia típica e atípica e carcinoma invasor. Em todas as áreas anormais, os autores encontraram imunoexpressão da oncoproteína neu/erbB-2 (BRADBURRY *et al.* 1993). MACK *et al.* (1997) encontraram correlação entre a expressão imuno-histoquímica de proteína p53, produto de oncogene c-erbB-2 (Her2/neu) e Ki-67 (como índice de proliferação celular) e carcinoma *in situ* de alto grau histológico. LODATO *et al.* (1990) mostraram que há diferença na expressão de oncoproteína c-erbB-2 em padrões diferentes de carcinoma intraductal. Comedocarcinomas expressaram

A handwritten signature in blue ink is located in the bottom right corner of the page. To the left of the signature is a faint, circular blue stamp, likely an official seal or library mark, though its text is illegible.

consistentemente a proteína, enquanto somente um de 14 casos de carcinomas intraductais de padrão papilífero ou cribriforme foi positiva para c-erbB-2. Nesse trabalho, 10% das hiperplasias atípicas foram positivas para a oncoproteína. Outros autores estudaram a relação entre ploidia de DNA e expressão de c-erbB-2. Dois achados foram importantes. O primeiro, que os tumores com conteúdo anormal de DNA expressaram c-erbB-2 mais freqüentemente e, o segundo, que tanto o carcinoma intraductal quanto o carcinoma invasor pouco diferenciado expressam mais intensa e freqüentemente o c-erbB-2 (VISSCHER *et al.* 1991). MAGUIRE *et al.* (1992) demonstraram que há tendência do carcinoma invasor reter o imunofenótipo do componente *in situ*, quando este está presente, no que se refere à oncoproteína c-erbB-2. Mais recentemente, JIMENEZ *et al.* (2000) verificaram que superexpressão da proteína c-erbB-2 sem amplificação gênica é mais freqüente no carcinoma intraductal e postularam um possível papel diferente desse gene na biologia dessas lesões.

1.5. O PAPEL DO EQUILÍBRIO APOPTOSE/PROLIFERAÇÃO CELULAR E O CICLO CELULAR NA CARCINOGENESE MAMÁRIA

Nas seções precedentes, pudemos verificar que os modelos de tumorigênese mamária são, em sua maioria, derivados dos conceitos baseados em evidências epidemiológicas e experimentais. Tais modelos aceitam que a carcinogênese mamária se faz em etapas múltiplas e seqüenciais. Eventos reconhecíveis morfológicamente, porém não bem compreendidos, que culminam no câncer. Isto é, progressão da lesão desde a hiperplasia típica ductal, passando pela hiperplasia atípica e carcinoma intraductal até o carcinoma invasor.

Mecanismos de transformação neoplásica compreendem ativação de proto-oncogenes, perda de moléculas supressoras de tumores ou alterações de moléculas associadas ao reparo de DNA (EVAN 1997; STAHL 2000). No entanto, o crescimento da neoplasia, assim como a velocidade do crescimento tumoral, está ligada ao conceito de cinética celular tumoral. Estudos sobre fatores que influenciam o crescimento da neoplasia indicam que este depende do grau de desvio do balanço entre o número de células que entram no ciclo celular, aquelas que

morrem, queira por necrose ou apoptose, e aquelas que permanecem quiescentes (COTRAN *et al.* 1994; EVAN 1997).

Nos tecidos normais, a homeostasia tecidual reflete um equilíbrio delicado entre proliferação e morte celular (McDONNELL 1993). Classicamente, o desenvolvimento de câncer tem sido encarado como conseqüência de estados hiperproliferativos do epitélio. Porém, mais recentemente, com o reconhecimento da apoptose como processo de morte celular programada, assim como o de seus mecanismos básicos, ficou mais claro que a transformação neoplásica pode ocorrer em células que perderam o potencial de entrar em apoptose. Assim, qualquer alteração no equilíbrio proliferação celular/apoptose, pode potencialmente ter um papel no desenvolvimento de neoplasias.

Em trabalho já citado previamente, MOMMERS *et al.* (1999) determinaram o índice de apoptose e o índice mitótico nas lesões carcinomatosas e pré-invasivas da mama. A razão entre os dois parâmetros deu uma idéia do comportamento da lesão em relação à cinética celular. Interessantemente, os autores verificaram que o crescimento tumoral nas lesões bem diferenciadas se dá principalmente em função da taxa de proliferação celular enquanto que nas lesões pouco diferenciadas, o crescimento celular se dá às custas tanto do aumento da taxa de proliferação celular quanto da diminuição

do índice de apoptose. Por outro lado, HARN *et al* (1997) demonstraram que no carcinoma intraductal o índice de apoptose é maior e o índice de proliferação celular, menor em relação ao carcinoma invasor. Ainda, ALLAN *et al.* (1992) encontraram índices de proliferação celular e de apoptose mais altos no tecido carcinomatoso do que no epitélio normal.

Questões pendentes na literatura referentes à carcinogênese mamária estão relacionadas à pergunta sobre como cada fase da progressão tumoral no modelo mais aceito se comporta do ponto de vista de cinética celular, assim como dos mecanismos a ela associados. Qual a importância dos fenômenos apoptose e proliferação celular em cada fase da carcinogênese? Qual o fenômeno associado à transformação neoplásica que mais influencia o equilíbrio cinético? E em relação às proteínas reguladoras do ciclo celular, qual o peso de cada uma neste equilíbrio?

O presente estudo foi desenhado para tentar responder, pelo menos em parte, a estas questões.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o índice de apoptose pela quantificação de núcleos celulares marcados pelo método TUNEL, o índice de proliferação celular através da quantificação de células marcadas por reação imuno-histoquímica para DNA topoisomerase II α e a expressão de proteínas associadas ao ciclo celular (p27^{kip1}, p53, bcl-2 e c-erbB-2) em lesões proliferativas pré-malignas e malignas do epitélio ductal mamário (hiperplasia típica, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo) em material de arquivo a fim de estudar a cinética celular tumoral em um modelo de progressão de doença neoplásica da mama.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASOS E CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS

Foram separadas e revistas as lâminas de 2046 exames anátomo-patológicos de tecido mamário referentes ao período compreendido entre maio/1997 e dezembro/2000 pertencentes ao arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Câncer Hospital A.C. Camargo. Desses, foram escolhidos 60 blocos de parafina representativos de tecido com hiperplasia ductal típica, carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal infiltrante (20 casos de cada categoria). Foram separados 15 casos (13 provenientes do material de arquivo do Hospital do Câncer e 2 de laboratórios de patologia privados) de hiperplasia epitelial atípica que se encaixam nos critérios descritos por PAGE *et al.* (1985). A amostra foi completada com 20 blocos de tecido mamário com alterações mínimas que serviram para controle, escolhidos dentre peças cirúrgicas provenientes de mastoplastias redutoras ou biopsias devido a espessamento do tecido mamário, oriundos dos dois laboratórios de patologia privados acima citados.

Alterações como adenose simples, metaplasia apócrina e algum grau de dilatação ductal foram aceitas no grupo denominado como tecido mamário com alterações mínimas. Foram excluídos casos com qualquer grau de proliferação epitelial com tendência a superposição das células em mais de duas camadas. Os 20 casos de hiperplasia típica incluíram lesões que ocupavam mais de dois ductos e se caracterizavam por proliferação epitelial obliterativa total ou parcial com formação de luzes secundárias. Os núcleos apresentavam discreto pleomorfismo, mas não havia alteração da relação núcleo-citoplasmática. Outras lesões proliferativas benignas associadas no tecido, como papiloma intraductal, não foram critérios de exclusão. Dos quinze casos de hiperplasia atípica que foram selecionados para estudo, a maioria (13) estava associada com hiperplasia típica. Dois casos estavam associados a neoplasias no mesmo corte. Um a carcinoma intraductal e o outro estava localizado na periferia de um carcinoma ductal infiltrante. Dos 20 carcinomas intraductais selecionados, 2 correspondiam a carcinoma ductal de baixo grau, 8 de grau intermediário e 10 de alto grau, segundo os graus histológicos do sistema de LAGIOS (1990, 1995), baseado no grau nuclear, índice mitótico e presença de comedonecrose (quadro 2). Os 20 casos de carcinoma ductal infiltrante selecionados representavam carcinoma

ductal infiltrante grau II do sistema proposto por RICHARDSON E BLOOM (1957).

Alto grau Histológico. Núcleos grandes (com diâmetro maior que duas hemácias) com cromatina vesiculosa, um ou mais nucléolos e um alto índice mitótico (>2mitoses/10 CGA). Presença de necrose do tipo comedocarcinoma.

Grau histológico Intermediário. Núcleos de tamanho intermediário (aproximadamente o diâmetro de 1 a 2 hemácias), com cromatina grosseira e raros nucléolos. Índice mitótico de 1 a 2 mitoses/10 CGA. Necrose puntual pode estar presente.

Baixo grau histológico. Núcleos pequenos (com diâmetro do tamanho igual ou 1,5 vez maior que o de uma hemácia), com cromatina difusa, sem nucléolos evidentes. Índice mitótico menor que 1/10 CGA. Ausência de necrose.

Quadro 2 Sistema de Lagios para graduação histológica do carcinoma ductal *in situ*.

3.2. REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A reação imuno-histoquímica para pesquisa de proteína bcl-2, proteína p53, produto de oncogene c-erbB-2, p27^{kip1} e DNA topoisomerase II α foi realizada utilizando-se anticorpos da marca DAKO por técnica descrita previamente, com pequenas modificações (GORCZYCA *et al.* 1995). Brevemente, cortes histológicos de tecido mamário (5 μ) fixado em formol a 10% e embocado em parafina foram montados em lâminas previamente silanizadas (3-aminopropiltriétoxissilano, marca Sigma). Após desparafinização e rehidratação, foram imunocorados utilizando-se o método do complexo streptavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB+, DAKO). O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3% e a recuperação antigênica por calor úmido em forno de micro-ondas, por dois ciclos de 9 minutos em tampão citrato 10mM, pH 6,0 na potência máxima (1400W). Os anticorpos primários utilizados foram anti-receptor de proteína p53 (clone DO7, monoclonal, DAKO) diluído a 1/300, anti-proteína p27^{kip1} (monoclonal, DAKO) diluído a 1/100, anti-oncoproteína c-erbB-2 (policlonal, DAKO) diluído a 1/200 e anti-topoisomerase II α (clone Ki-S1, monoclonal, DAKO) diluído a 1/50. Cortes histológicos de amígdalas palatinas serviram de controles

positivos para topoisomerase II α e proteína bcl-2. Carcinomas mamários com positividade conhecida para proteína p53, oncoproteína c-erbB-2 e p27^{kip1} foram utilizados como controles positivos para essas reações. Os controles negativos foram obtidos substituindo-se o anticorpo primário por solução salina tamponada.

3.3. DETECÇÃO DE APOPTOSE *IN SITU*

A detecção de apoptose *in situ* através da marcação de pontos de quebra de DNA por DUTP-biotina mediada por deoxinucleotidil terminal-transferase (TUNEL) foi realizada utilizando-se o kit Apop-Tag Plus Peroxidase (Intergen Company), através de técnica descrita previamente, com pequenas modificações (GAVRIELI *et al.* 1992; ANSARI *et al.* 1993). Brevemente, os cortes histológicos de tecido mamário (5 μ) fixado em formol a 10% e emblocado em parafina foram montados em lâminas previamente silanizadas (3-aminopropiltriétoxisilano, marca Sigma). Após desparafinização e rehidratação, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,2. Os cortes histológicos foram então submetidos a digestão em solução de tripsina (Sigma) a 0,25mg% em estufa a 37°C por 2 minutos e então lavados em água deionizada. O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3%. Após a aplicação de um tampão de equilíbrio (fornecido pelo fabricante), as lâminas foram incubadas com solução contendo a enzima deoxinucleotidil terminal-transferase (TdT) e nucleotídeos conjugados à digoxigenina por 1h a 37°C. A reação foi interrompida incubando-se as lâminas em um “tampão de interrupção” fornecido pelo fabricante por 10 minutos à

temperatura ambiente. Após lavar as lâminas em PBS, passamos à identificação dos nucleotídeos incorporados. Para tal, incubamos os cortes com anticorpo antidigoxigenina conjugado a peroxidase e revelamos a reação com diaminobenzidina (DAB). A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris. O controle positivo utilizado foi tecido endometrial em fase pré-menstrual. O controle negativo foi obtido substituindo-se a solução de enzima TdT e nucleotídeos conjugados à digoxigenina por tampão fosfato. O resultado do controle positivo da reação pode ser observado na figura 1.

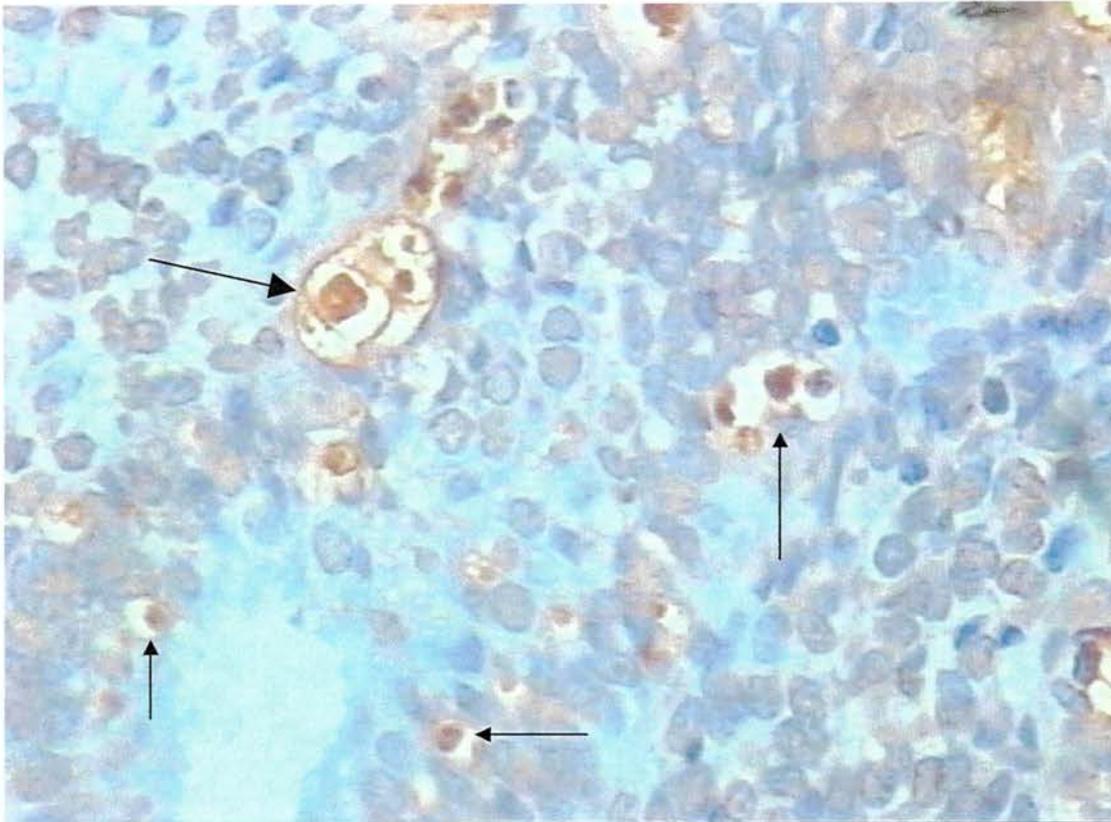


Figura 1 Fotomicrografia representativa do tecido controle utilizado para a reação pelo método TUNEL (kit ApoptagPlus, marca Intergen). As setas indicam alguns exemplos de elementos celulares apoptóticos. Endométrio, 400x

3.4. MENSURAÇÃO DOS RESULTADOS

A análise dos resultados para os marcadores nucleares (p53, p27^{Kip1} e DNA topoisomerase II α) e para apoptose foi realizada por quantificação direta. Brevemente, captou-se a imagem de campos microscópicos através de câmara (marca Sony) acoplada a microscópio trinocular com auxílio de microcomputador utilizando-se o programa *Citoviewer 2.0*. A seguir procuramos as áreas com maior número de células ou núcleos marcados e, com o auxílio de uma tela gradeada de contagem, contamos pelo menos 1000 células de cada corte. Para avaliação de apoptose, também foram considerados elementos apoptóticos não corados, mas que se enquadravam nos critérios morfológicos previamente descritos. Nos casos de hiperplasia típica, onde pudemos identificar com maior facilidade a arquitetura da lesão, foi dada preferência à contagem de cortes seqüenciais da mesma área para marcadores diferentes. Os resultados foram expressos como índices de positividade (quociente entre o número de núcleos marcados e o número total de núcleos contados). O índice de positividade para DNA topoisomerase II α foi denominado índice de proliferação celular (IP). O índice de positividade para células apoptóticas foi denominado índice de apoptose (IA). O quociente IP/IA

também foi calculado para cada caso. Para considerarmos positiva uma reação para proteína p53, pelo menos 30% dos núcleos das células epiteliais deveriam estar fortemente corados no tecido. Positividade para bcl-2 foi analisada com base no sistema de pontuação proposto por VAKKALA *et al.* (1999a) segundo a intensidade e o número de células marcadas. A intensidade de coloração citoplasmática separou os casos em 4 grupos: 1=intensidade fraca, 2=intensidade moderada; 3=intensidade forte e 4=intensidade muito forte. A quantidade de células marcadas podia obter as seguintes notas: 0=ausência de coloração; 1=<25% de células marcadas; 2=25-50% de células marcadas; 3=50-75% de células marcadas e 4=>75% de células marcadas. A soma das duas categorias indicava a nota final: 0=ausência de imunorreatividade, 2-4: imunorreatividade fraca; 5-8: forte imunorreatividade. A avaliação dos resultados para oncoproteína c-erbB-2 também seguiu um sistema de pontuações (“scores”). Assim, 0: nenhuma célula positiva ou positividade em menos de 10% das células; (1+): imunorreatividade de membrana, fraca e irregular em pelo menos 10% das células; (2+): imunorreatividade de membrana, de intensidade fraca a moderada, porém regular em mais de 10% das células. (3+): imunorreatividade de membrana, com forte intensidade, em pelo menos 10% das células. Foram considerados positivos casos

com nota 2+ e 3+. Os outros foram considerados negativos. Exemplos de cada “score” podem ser visualizados na figura 2.

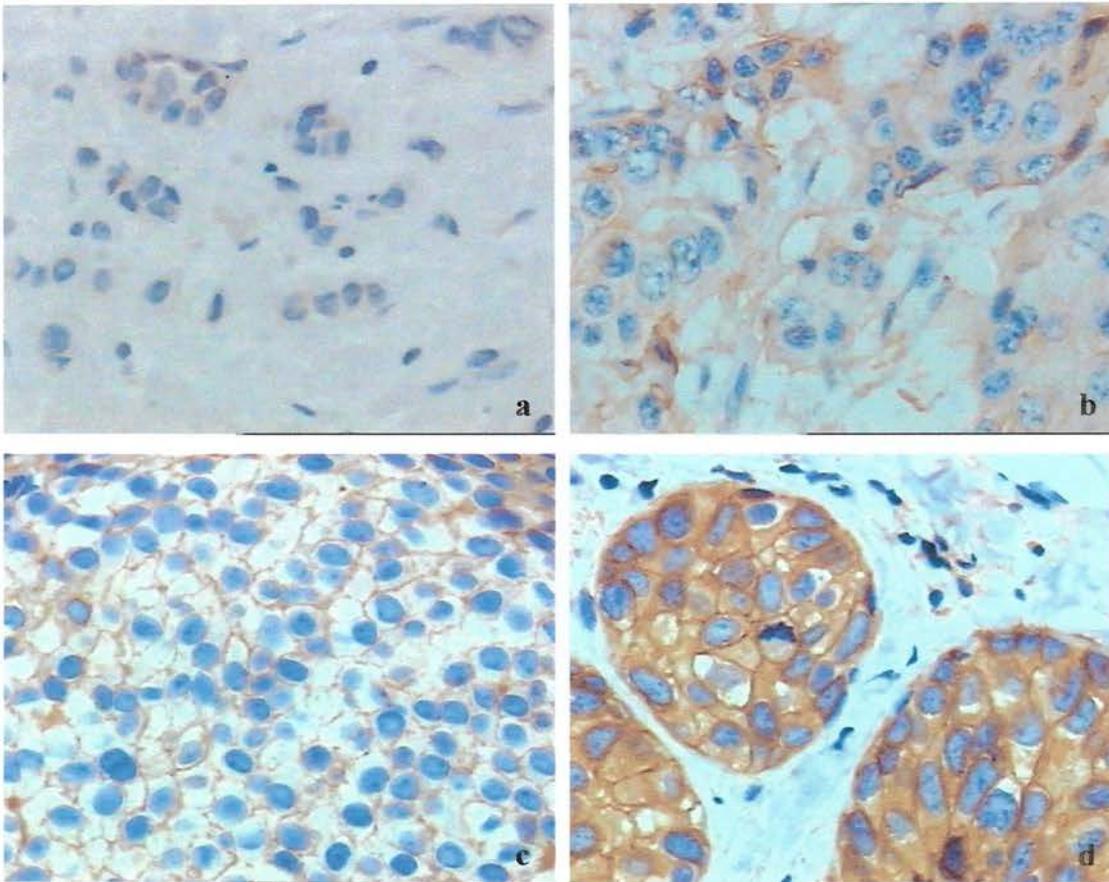


Figura 2 Fotomicrografia mostrando resultado negativo para reação imunohistoquímica para oncoproteína c-erbB-2 (a), reação com positividade 1+ (b), positividade 2+ (c) e positividade 3+ (d).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o pacote estatístico BIOESTAT 2.0 (AYRES *et al.* 2000). Os dados obtidos foram submetidos a análise não-paramétrica pelo teste de soma de postos de Kruskal-Wallis para avaliarmos as diferenças entre o IP e IA, assim como o quociente IP/IA, nos diferentes grupos. Para se determinar qual grupo é diferente dos outros, segundo os dados analisados, todos os pares foram comparados de acordo com o procedimento de comparações múltiplas de Dunn, baseado nos resultados do método de Kruskal-Wallis.

Para testar correlação entre os IA e IP e destes com os vários marcadores pesquisados, nos cinco grupos, procedemos ao cálculo de correlação pelo teste de Spearman.

As relações de dependência ou independência entre as proteínas associadas ao ciclo celular nos grupos foram estudadas utilizando-se o teste exato de Fisher.

As influências das variações das proteínas associadas ao ciclo celular estudadas sobre os IA e IP foram investigadas utilizando-se o teste de regressão linear simples ou múltipla.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE

Em relação à coloração com anticorpo anti-DNA Topoisomerase II α para determinação do índice de proliferação celular, notamos células positivas irregularmente distribuídas sem predileção por localização nos carcinomas invasivos e intraductais da mama. Nos casos de hiperplasia ductal típica e atípica, as células em proliferação estavam preferencialmente distribuídas na porção basal do epitélio. Não houve grande variação na intensidade da coloração de célula para célula quando individualizados os casos e não identificamos positividade em células com morfologia que lembrasse apoptose.

A coloração pelo método TUNEL foi heterogênea e tanto o número quanto o aspecto dos núcleos marcados variava de corte histológico para corte histológico. Somente foram contadas figuras que se encaixavam na descrição morfológica clássica de apoptose, isto é, núcleos condensados, fragmentados, com vitrificação citoplasmática ou halo pericelular caracterizando corpos apoptóticos. Figuras com tal aspecto, porém não marcadas, também foram contadas. Não houve dificuldades em se diferenciar células apoptóticas das necróticas.

As médias dos índices de apoptose e proliferação celular são melhor observados na tabela 4. Verificamos que ambos apresentam tendência a aumentar com a progressão da lesão epitelial ($p < 0,00001$). Este aumento é mais patente quando estudamos o índice de proliferação celular ($p < 0,00001$). Observamos, no entanto, no pós-teste pelo método de comparações múltiplas de Dunn que não há diferença estatisticamente significativa no índice de proliferação celular entre o tecido normal e a hiperplasia típica ($p = 0,093$) e entre as lesões pré-malignas e malignas (hiperplasia atípica e carcinoma *in situ*; $p = 0,26$ e carcinoma *in situ* e carcinoma ductal infiltrante, $p = 0,68$).

As diferenças estatísticas do índice de apoptose nos cinco grupos também foram altamente significativas ($p < 0,00001$), inclusive quando observamos os resultados no pós-teste pelo método de comparações múltiplas de Dunn. Não houve diferença estatística significativa entre hiperplasia típica e atípica ($p = 0,21$) e hiperplasia atípica e carcinoma intraductal ($p = 0,35$), embora haja diferença estatisticamente significativa entre carcinoma intraductal e hiperplasia típica ($p = 0,0002$). Os resultados dos índices de apoptose e de proliferação celular podem ser melhor observados nos gráficos 1 e 2.

4.2. RAZÃO IP/IA

Para se ter uma noção de como a cinética celular influencia no potencial de crescimento da lesão, a razão entre o índice de proliferação celular e o índice de apoptose foi calculada para cada caso individualmente. Casos com contagem nula de apoptose não foram considerados para cálculo do quociente IP/IA. Os resultados das médias e medianas estão representados na tabela 5. A comparação dos quocientes IP/IA pelo método de Kruskal-Wallis, foi obtido diferença altamente significativa entre os grupos ($p < 0,00001$). O pós-teste pelo método de comparações múltiplas de Dunn evidenciou que não há diferença estatística entre as lesões benignas ($p = 0,65$). Em relação às lesões pré-malignas e malignas, notamos que não há diferença estatisticamente significativa entre hiperplasia atípica e carcinoma intraductal, ($p = 0,17$), mas há diferença entre a hiperplasia atípica e a hiperplasia típica ($p = 0,0254$). Finalmente, houve diferença estatística entre o carcinoma intraductal e o carcinoma invasor ($p = 0,023$), com caracterização de queda deste índice no último grupo. Os resultados das médias do índice de proliferação celular, índice de apoptose e o quociente IP/IA são mostrados no gráfico 3 para melhor visualização.

Diagnóstico	n	IP±σ (mediana)	IA±σ (mediana)
Alterações mínimas	20	0,18±0,17 (0,1)	0,09±0,18 (0)
Hiperplasia típica	20	0,56±0,42 (0,43)	0,35±0,23 (0,33)
Hiperplasia atípica	15	18,44±53,42 (3,1)	0,15±0,04 (0,14)
Ca <i>in situ</i>	20	21,65±15,36 (20,5)	0,41±0,57 (0,21)
Ca invasor	20	26,1±18,87 (20)	2,01±1,44 (1,55)

Tabela 4 Valores médios e desvio padrão dos índices de proliferação celular e de apoptose segundo a lesão mamária (valores expressos em %). Os valores entre parênteses indicam a mediana. Ca *in situ*: Carcinoma ductal *in situ*; Ca invasor: Carcinoma ductal invasor; σ: desvio padrão.

Diagnóstico	n	Índice IP/IA±σ (mediana)
Alterações mínimas	20	2,14±3,43 (0,37)
Hiperplasia típica	20	2,91±3,72 (1,54)
Hiperplasia atípica	15	13,02±6,50 (13,75)
Ca <i>in situ</i>	20	63,06±55,52 (52,31)
Ca invasor	20	19,15±20,39 (10,84)

Tabela 5 Valores médios e desvio padrão dos quocientes IP/IA segundo a lesão mamária. Os valores entre parênteses indicam a mediana. Ca *in situ*: Carcinoma ductal *in situ*; Ca invasor: Carcinoma ductal invasor; σ: desvio padrão.

Gráfico 1 **Boxplot mostrando mediana e quartis dos índices de proliferação celular para cada grupo.**

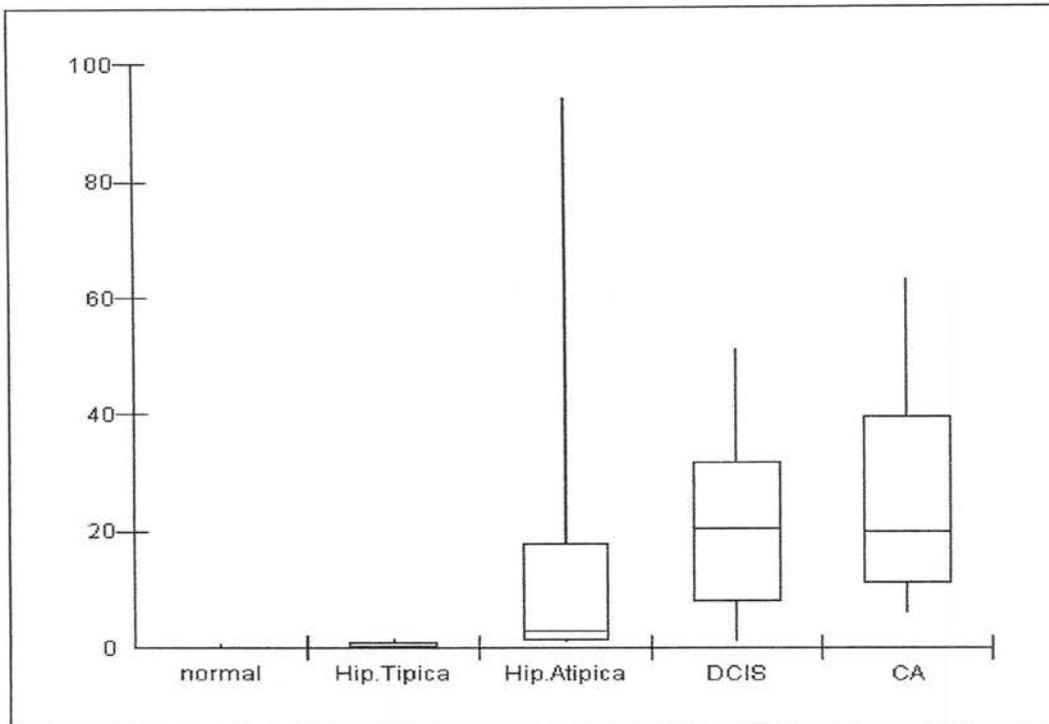


Gráfico 2 **Boxplot mostrando mediana e quartis dos índices de apoptose para cada grupo.**

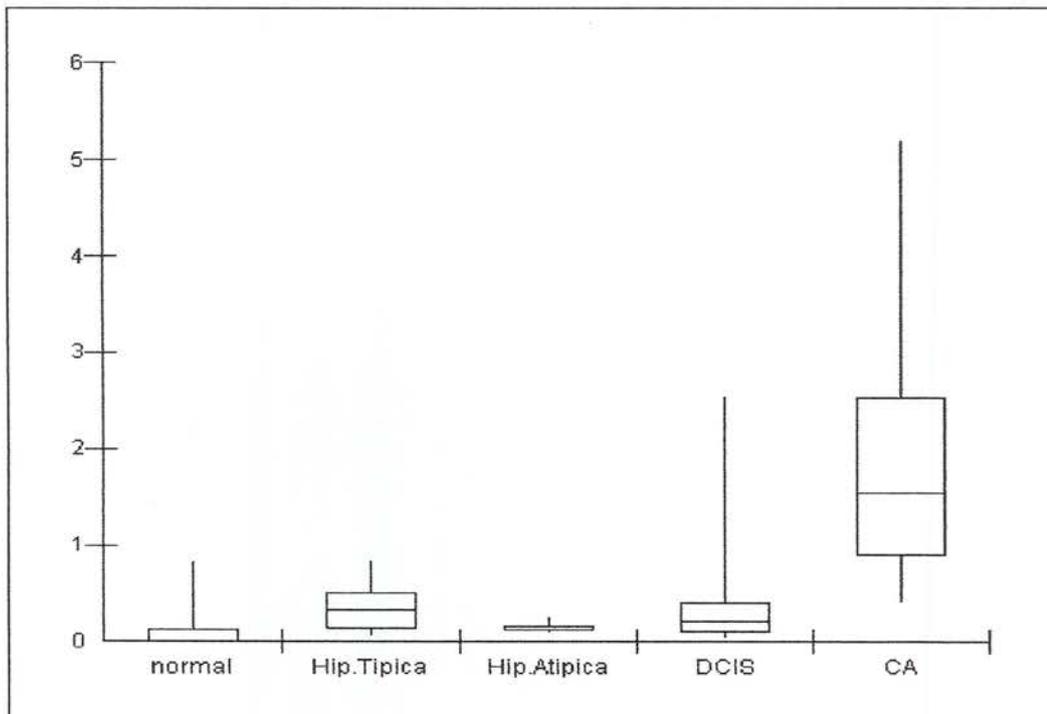


Gráfico 3

Gráfico mostrando as médias dos índices de proliferação celular e de apoptose segundo a progressão histológica para o carcinoma invasor da mama.

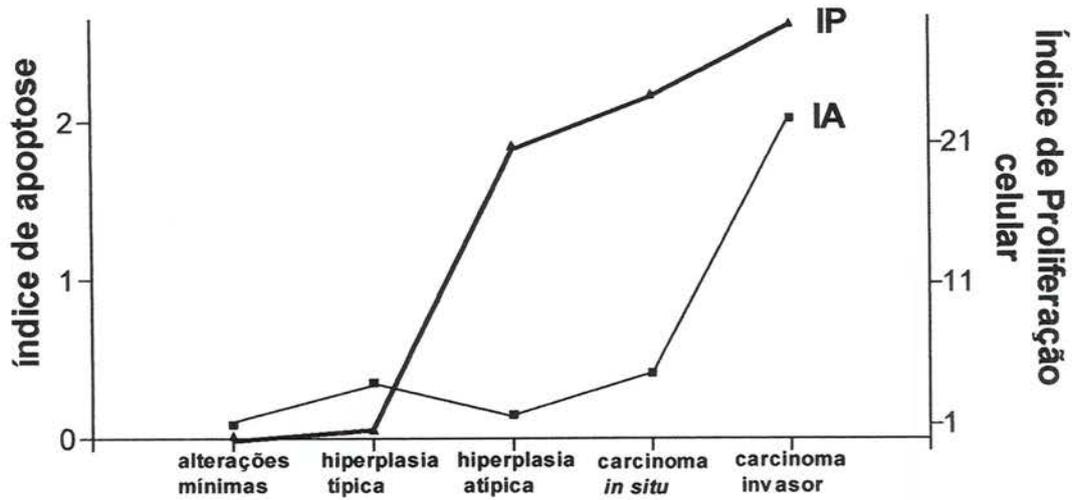
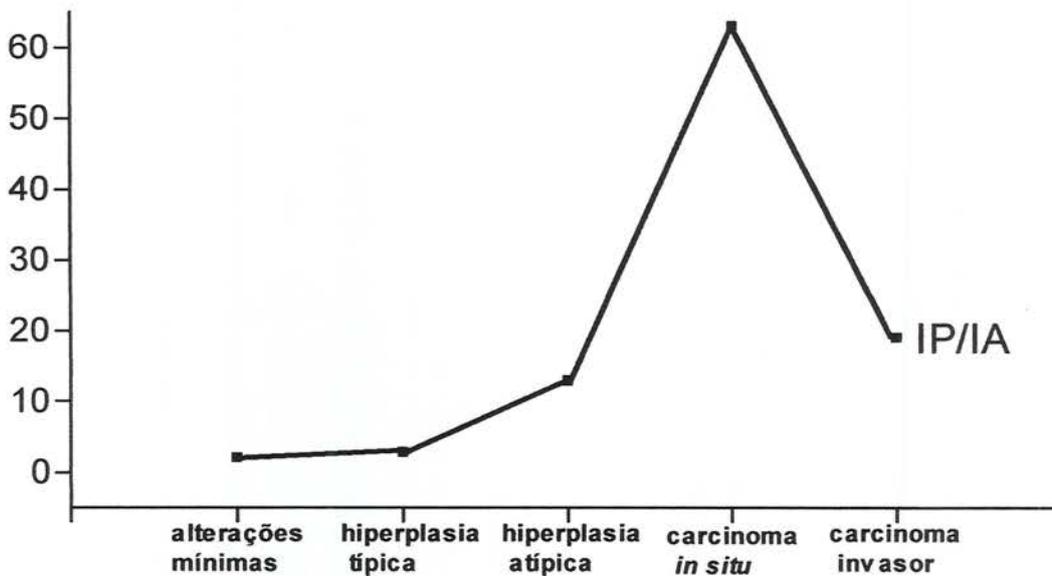


Gráfico 4

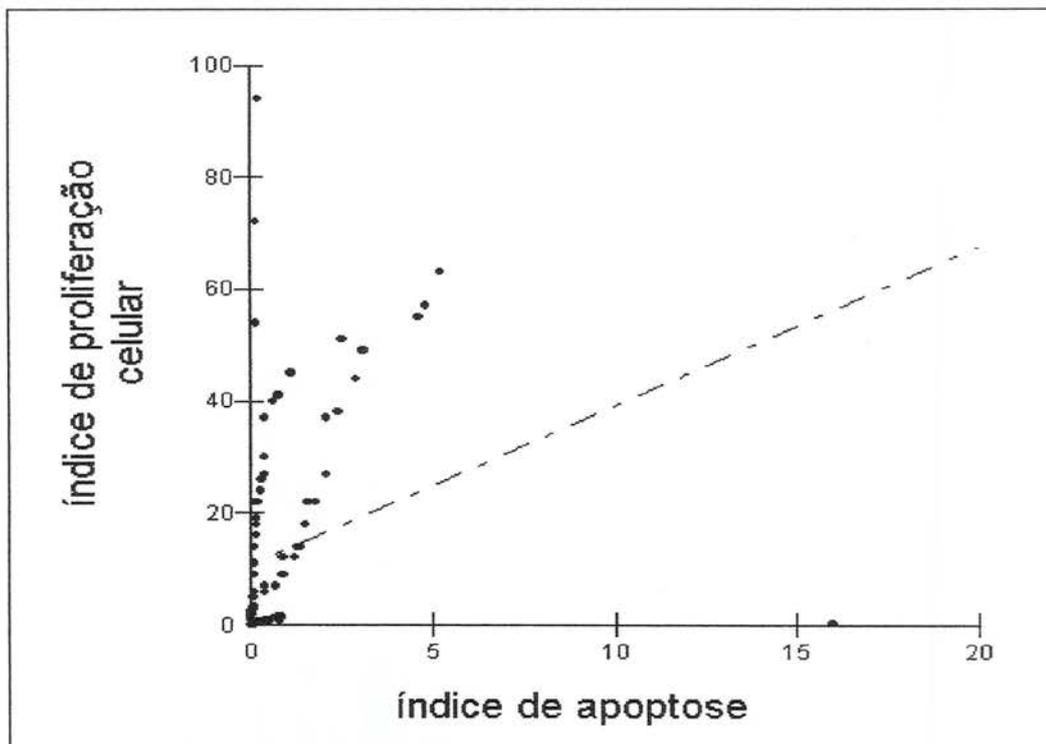
Gráfico mostrando o quociente índice de proliferação celular/índice de apoptose (IP/IA) segundo a progressão histológica para o carcinoma invasor da mama.



4.3. CORRELAÇÃO ENTRE OS ÍNDICES DE APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Uma correlação positiva pelo teste de Spearman entre os índices de apoptose de proliferação celular ($r=0.64$, $p<0,00001$) foi obtida quando todos os casos foram levados em consideração (Gráfico 5).

Gráfico 5 Diagrama de dispersão mostrando correlação entre índice de apoptose e índice de proliferação celular ($r=0,64$, $p<0,00001$).



4.4. PROTEÍNA P27^{KIP1}, PROTEÍNA P53, PROTEÍNA BCL-2 E ONCOPROTEÍNA C-ERBB-2

A coloração imuno-histoquímica para proteína p27^{Kip1} e proteína p53 demonstrou positividade nuclear para ambos os antígenos. Nas lesões hiperplásicas do epitélio ductal notamos uma tendência à positividade para p27^{Kip1} nas células apicais. Não houve variação significativa na coloração em um caso individual. Houve claramente positividade para proteína p53 em um número reduzido de casos e, dentro de um caso individual, número reduzido de células, no tecido mamário com alterações mínimas. Não notamos tais características tão marcantes nos outros grupos. Os resultados para proteína bcl-2 mostraram homogeneidade com forte positividade nas lesões benignas e na hiperplasia atípica. No carcinoma intraductal e no carcinoma invasor a coloração foi heterogênea com vários graus de positividade (Carcinoma *in situ* - média: 3,2; desvio padrão: 2,76 e carcinoma invasor - média: 1,3; desvio padrão: 1,59). Chamou a atenção o fato de que quando observamos somente os carcinomas intraductais de grau intermediário e baixo, estes tendem a reproduzir o padrão observado nas lesões benignas e na hiperplasia atípica (resultados não mostrados). Em relação à expressão de oncoproteína c-erbB-2

observamos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,00001$) quando separamos as lesões em dois grupos, ie, lesões de baixo grau histológico (tecido mamário com lesões mínimas, hiperplasia ductal típica e hiperplasia ductal atípica) e lesões neoplásicas (carcinoma in situ e carcinoma invasor). Pelo método exato de Fisher, quando os índices de expressão das proteínas associadas ao ciclo celular (p27^{kip1}, p53, oncoproteína bcl-2 e produto de oncogene c-erbB-2) foram comparados aos pares, não obtivemos resultados estatísticos significativos. Estes dados estão mostrados na tabela 6.

Diagnóstico	n	IP±σ (mediana)	IA±σ (mediana)	p27±σ (mediana)	p53±σ (mediana)	bcl-2±σ (mediana)	c-erbB-2
Alterações mínimas	20	0,18±0,17 (0,1)	0,09±0,18 (0)	42,35±18,60 (40,5)	5,4±10,21 (0)	8±0 (8)	0
Hiperplasia típica	20	0,56±0,42 (0,43)	0,35±0,23 (0,33)	38,9±16,95 (35)	16,75±31,21 (0)	8±0 (8)	0
Hiperplasia atípica	15	18,44±53,42 (3,1)	0,15±0,04 (0,14)	49,92±34,70 (44)	19,61±32,15 (0)	8±0 (8)	0
Ca <i>in situ</i>	20	21,65±15,36 (20,5)	0,41±0,57 (0,21)	40,8±19,07 (41,5)	17,75±27,06 (0)	3,2±2,76 (3)	2,5
Ca invasor	20	26,1±18,87 (20)	2,01±1,44 (1,55)	40,05±15,95 (39,5)	32,95±38,78 (18,5)	1,3±1,59 (0,5)	2

Tabela 6 Valores médios e desvio padrão dos índices de proliferação celular, de apoptose e das proteínas associadas ao ciclo celular (p27, p53 e bcl-2) segundo a lesão mamária (valores expressos em %). Os valores entre parênteses indicam a mediana. Os valores relativos à quantificação da proteína c-erbB-2 (variável discreta) indicam a mediana.

4.5. CORRELAÇÃO ENTRE ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO CICLO CELULAR

Uma correlação positiva pelo teste de Spearman entre o índice de proliferação celular e a positividade para oncoproteína c-erbB-2 ($r=0.63$, $p<0,00001$) e uma correlação negativa entre o índice de proliferação celular e a positividade para proteína bcl-2 ($r=-0.64$, $p<0,00001$) foram obtidas quando todos os casos foram levados em consideração. Ao colocarmos estas variáveis num teste de regressão linear múltipla, verificamos que a variação no índice de proliferação celular é mais influenciada pela variação na positividade da oncoproteína c-erbB-2 ($p=0,0002$). O modelo linear para a predição de Y (variação no índice de proliferação celular) é representado pela equação

$$Y = -0,0170 + 0,0827X ; \quad \text{onde X é a variação na}$$

positividade de oncoproteína c-
erbB-2.

4.6. CORRELAÇÃO ENTRE ÍNDICE DE APOPTOSE E PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO CICLO CELULAR

Uma correlação negativa pelo teste de Spearman entre o índice de apoptose e a imunexpressão de proteína bcl-2 ($r=-0,42$, $p<0,00001$) foi obtida quando todos os casos foram levados em consideração. Ao colocarmos estas variáveis num teste de regressão linear simples, verificamos que a variação no índice de proliferação celular é influenciada pela variação na imunexpressão da proteína bcl-2 ($p=0,0005$). O modelo linear para a predição de Y(variação no índice de apoptose) é representado pela equação

$$Y = 0,0129 - 0,0012X ; \quad \text{onde } X \text{ é a variação na}$$

imunexpressão de proteína
bcl-2

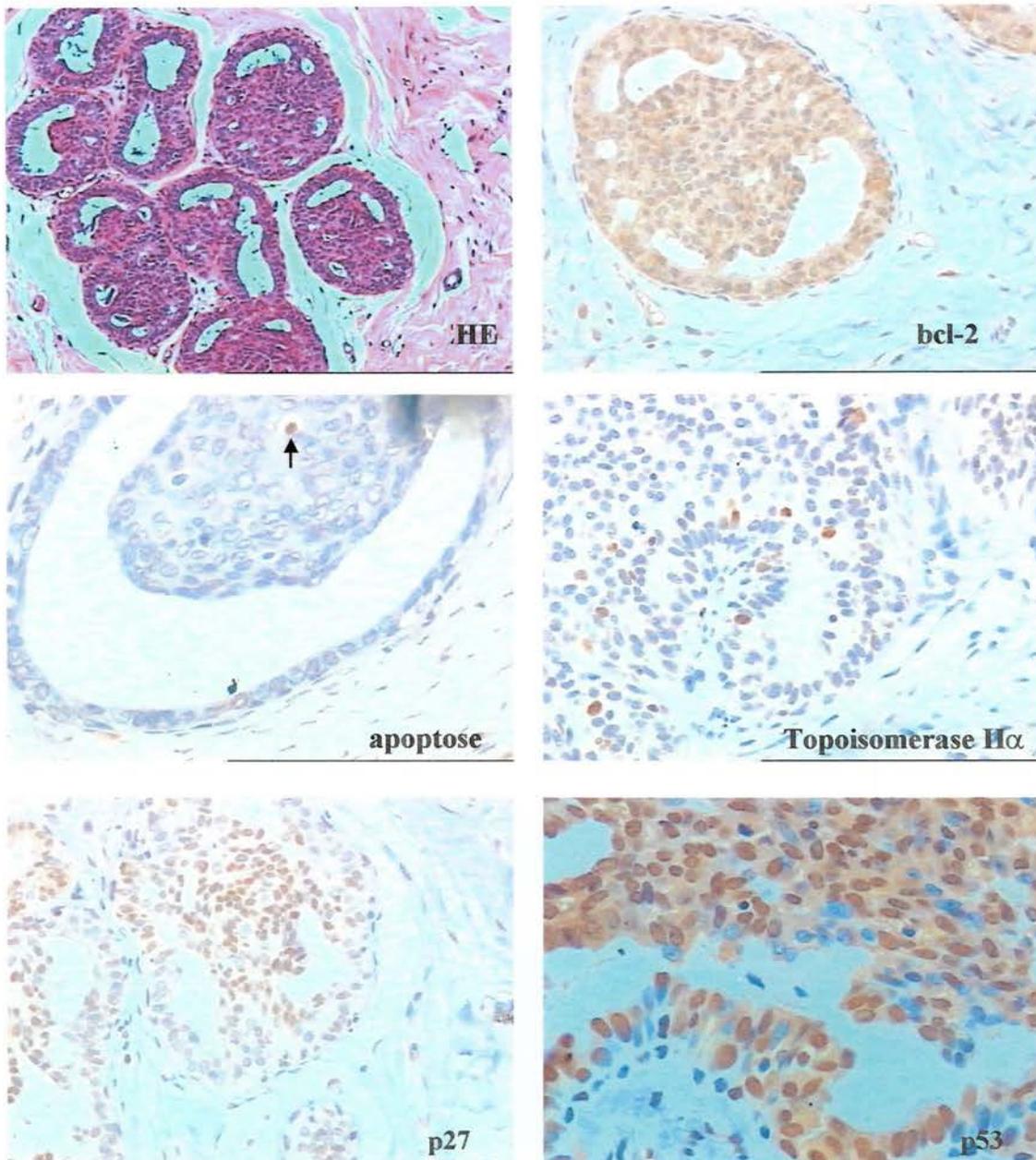


Figura 3 Fotomicrografias mostrando exemplos de reações positivas na hiperplasia ductal típica. A seta na figura de apoptose indica um corpo apoptótico.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
 ANA K. M. S. A. KUNINARI
 Coordenadora de Pós-Graduação

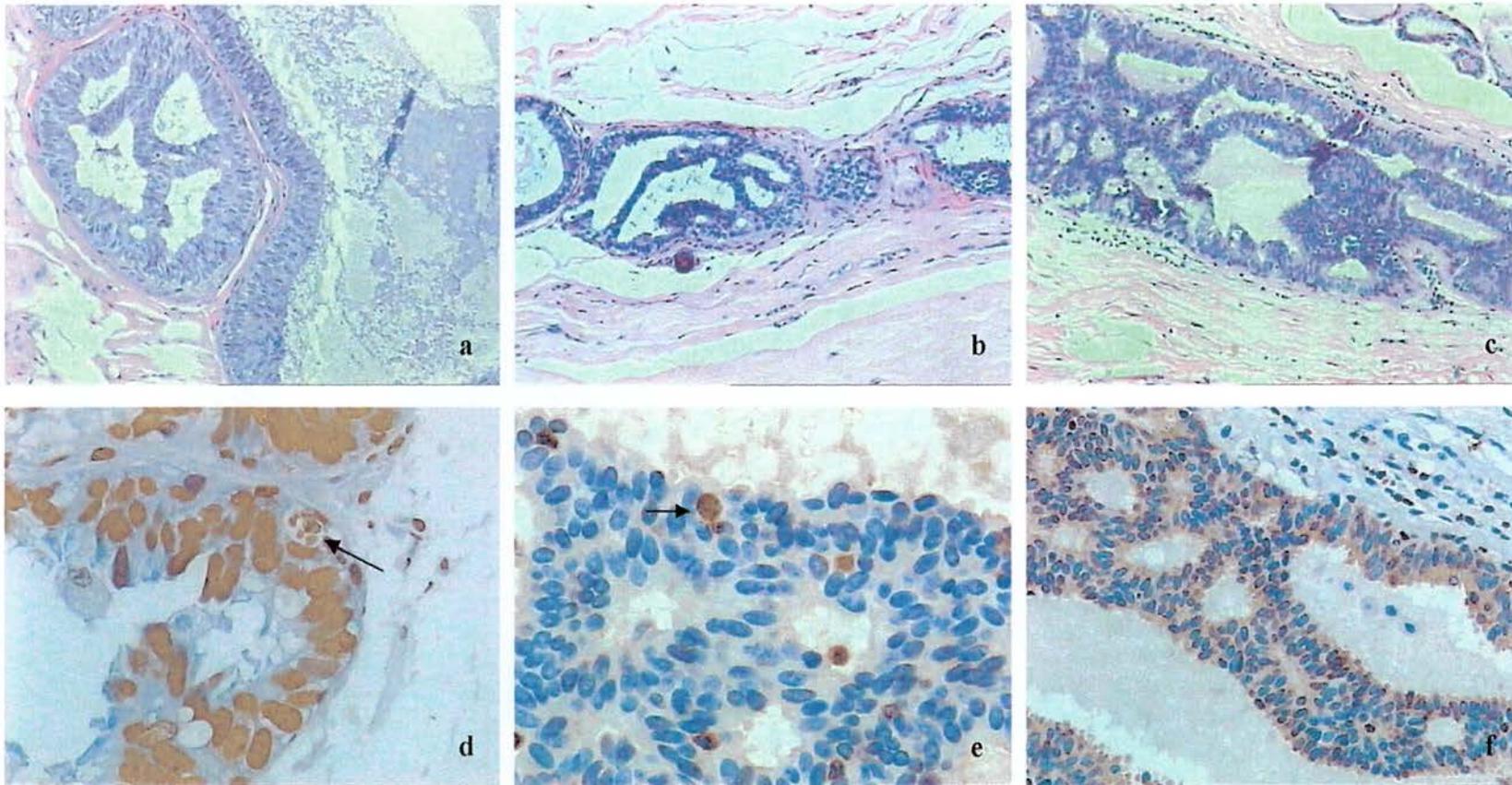


Figura 4 Fotomicrografias que mostram exemplos de cortes histológicos casos classificados como hiperplasia ductal atípica. As figuras (a), (b) e (c) mostram lâminas de três casos diferentes coradas por HE (200x). As lâminas (d), (e) e (f) referem-se ao caso (c) e mostram, respectivamente, corpo apoptótico (seta) em região periférica do ducto (ApoptagPlus, Intergen), núcleo marcado com anticorpo anti-DNA topoisomerase II α em situação apical (seta) e reação positiva para proteína bcl-2.

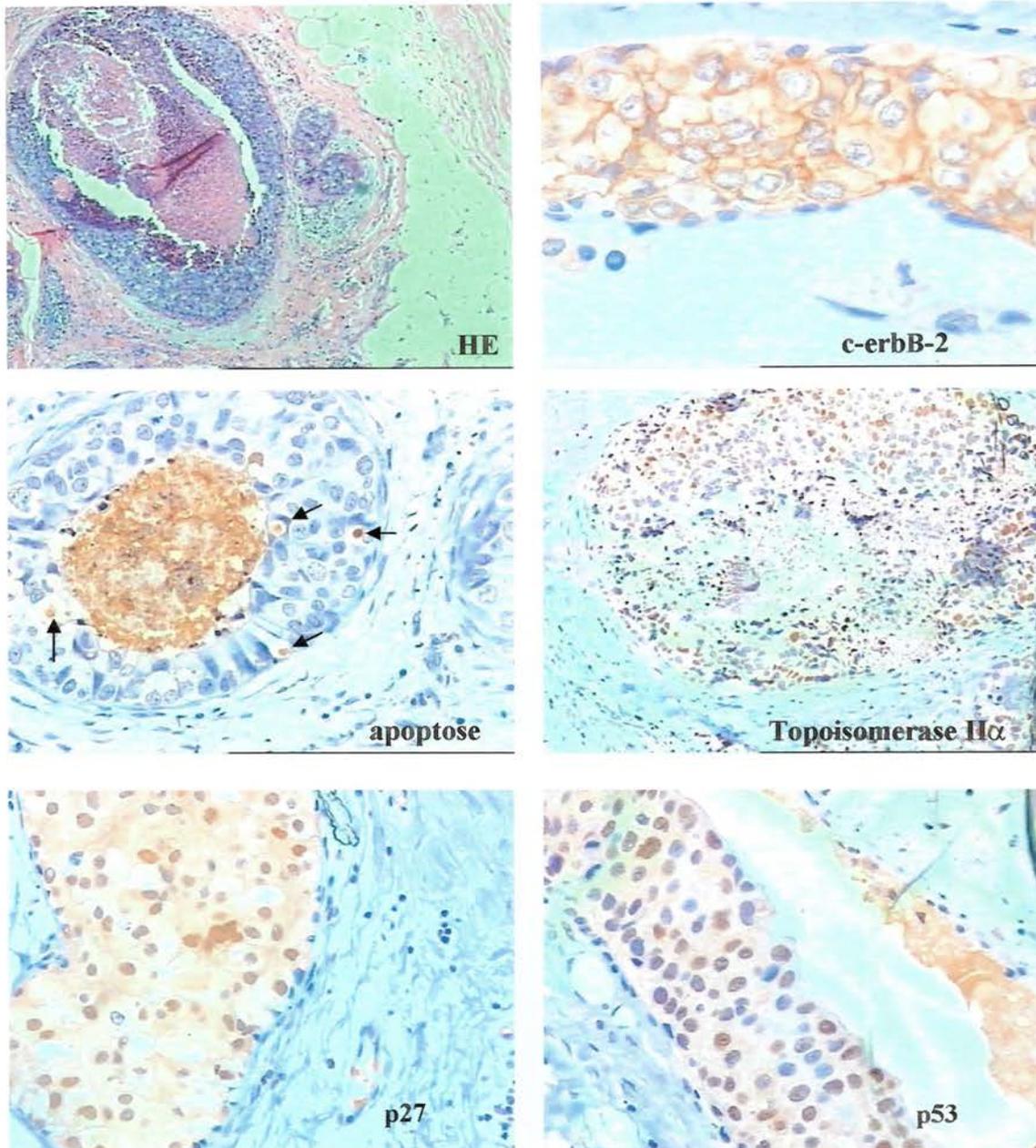


Figura 5 Fotomicrografias mostrando exemplos de reações positivas no carcinoma intraductal. As setas no quadro de apoptose indicam corpos apoptóticos.

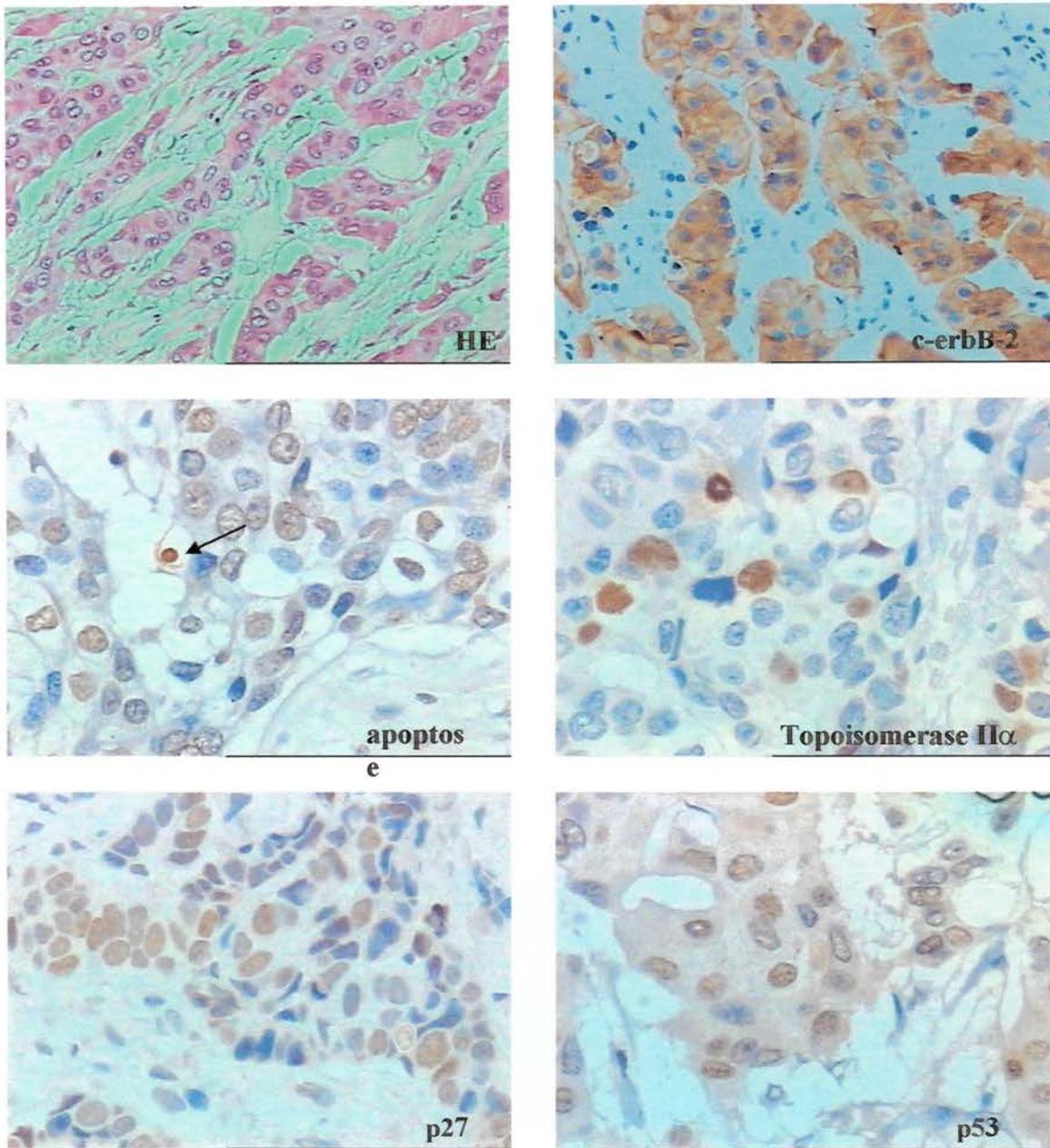


Figura 6 Fotomicrografias mostrando exemplos de reações positivas no carcinoma ductal invasivo, SOE. A seta na figura de apoptose indica um corpo apoptótico.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O equilíbrio entre proliferação celular e apoptose tem um papel fundamental na homeostasia tecidual. Alterações não fisiológicas nesse equilíbrio, geralmente secundárias a alterações nos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, tendem a resultar em acúmulo de células no tecido, queira por aumento no número de células em proliferação, queira por diminuição no número de células que entram em apoptose possibilitando a transformação neoplásica celular, assim como o crescimento tumoral. Ainda, é sabido que o fenômeno da invasão estromal pela neoplasia relaciona-se diretamente ao aumento no número de células tumorais (COTRAN *et al.* 1994).

A literatura recente aceita, baseada em evidências epidemiológicas, que o carcinoma invasor da mama pode ser resultado de um fenômeno de múltiplas etapas iniciando-se em estados hiperplásicos do epitélio, passando pelo carcinoma *in situ* (DUPONT *et al.* 1993; TAVASSOLI 1998, 1999). Assim, alguns modelos de progressão de doença foram propostos baseados na morfologia das lesões (DAWSON *et al.* 1996; GUPTA *et al.* 1997). O presente trabalho teve como objetivo tentar validar a hipótese de evolução seqüencial do

carcinoma mamário estudando os índices de proliferação celular e de apoptose através do espectro de lesões pré-invasivas do epitélio ductal e em carcinomas ductais mamários. Também estudamos a expressão de proteínas associadas ao ciclo celular, tentando verificar a influência de cada uma delas nos fenômenos de proliferação e morte celular.

Tecnicamente, para termos acesso ao índice de apoptose, utilizamos um método de marcação de pontos de quebra da molécula de DNA (TUNEL), desde que a fragmentação do DNA nuclear é um dos fenômenos terminais da apoptose e passíveis de identificação morfológica (GAVRIELI *et al.*, 1992; GORCZYCA *et al.*, 1992; ALISON 1999). É importante notar que, embora este método contribua em aumentar a sensibilidade do observador em relação à identificação de células em apoptose, a simples coloração positiva não é suficiente para caracterizar o fenômeno. Isto se deve ao fato de que o processamento (principalmente fixação em formol) e o corte histológico, pode levar à fragmentação da molécula de DNA, o que será reconhecido pelo método de detecção. Assim, é importante que o observador tenha consciência do fato e considere as células marcadas que apresentam características morfológicas compatíveis com apoptose, ou seja, núcleos condensados, fragmentados, com vitrificação citoplasmática ou

halo pericelular caracterizando corpos apoptóticos (SLOOP *et al.* 1999).

Em relação à determinação do índice de proliferação celular, preferimos utilizar a expressão da proteína DNA topoisomerase II α por duas razões. É uma proteína que participa da replicação da molécula de DNA e, portanto, essencial para a divisão celular (ROCA e WANG, 1994). Também não está envolvida na resposta celular ao dano do DNA (SLOOP *et al.*, 1999). Além disso, trabalhos na literatura demonstram que a pesquisa da enzima por método imuno-histoquímico é confiável e reprodutível para determinação do índice de proliferação celular tanto no tecido mamário (LYNCH *et al.*, 1997; DEPOWSKI *et al.*, 2000), quanto em outros tecidos (HOLDEN *et al.*, 1995; ITO *et al.*, 1997; TURLEY *et al.*, 1997; KORSHUNOV e GOLANOV, 2001).

Outros marcadores de proliferação celular bastante utilizados são a proteína Ki-67 e o PCNA. Alguns autores descreveram que tanto um como outro podem ser observados em células apoptóticas (BAI *et al.* 2001), o que seria um viés potencial para o nosso estudo. Outros não observaram este fenômeno, o que poderia, em parte, sugerir que o mesmo é tecido-específico (COATES *et al.* 1996).

Algumas condições inerentes ao tecido estudado fugiram do escopo deste projeto, principalmente pelo fato de termos escolhido realizar um estudo retrospectivo em material retirado em procedimentos cirúrgicos e, portanto, sem a possibilidade de controle mais rígido. Por exemplo, sabemos que as alterações morfológicas do processo de apoptose duram aproximadamente 3 horas e que o *status* pré-apoptótico menos ainda (SLOOP *et al.* 1999). Assim, o índice de apoptose é tão somente uma expressão relativa do número células em apoptose e não um número absoluto. O mesmo ocorre com o índice de proliferação celular em menor extensão. Além disso, no caso de haver, em um caso individual, aumento da duração do fenômeno, isto pode se refletir em um aumento da contagem de células. Finalmente, em tecidos que respondem à influência de hormônios, como o endométrio e a mama, os índices de proliferação celular e de apoptose dependem tanto da fase do ciclo menstrual, quanto do *status* hormonal da paciente, se pré ou pós-menopausa (IQBAL *et al.* 2001). Isto também pode influenciar a expressão das proteínas associadas ao ciclo celular.

Os nossos resultados indicam que tanto o índice de proliferação celular, quanto o índice de apoptose aumentam em relação à progressão da lesão do epitélio ductal. Estudos sobre atividade apoptótica e proliferação celular realizados em outros tecidos

mostraram resultados semelhantes. Em lesões displásicas e carcinoma invasor do epitélio brônquico e da mucosa oral a atividade apoptótica aumenta com a progressão da lesão (TORMANEN *et al.* 1999; MACLUSKEY *et al.* 2000). HAO *et al.* (1998) também encontraram aumento no índice de proliferação celular na progressão de adenoma para carcinoma invasor da mucosa colo-retal. O índice de apoptose apresentou tendência a aumentar, mas não alcançou níveis de significância estatística. BIRCHALL *et al.* (1996) demonstraram que, na mucosa oral e na mucosa orofaríngea, o índice mitótico tende a aumentar enquanto que o índice de apoptose permanece o mesmo na progressão desde o epitélio normal ao carcinoma invasor, passando pelas lesões displásicas. No nosso material, o aumento do quociente IP/IA ao longo do espectro das lesões pré-invasivas reflete indiretamente o aumento da renovação de células com desvio em direção ao acúmulo de células na unidade de área. Poderíamos especular que tal acúmulo celular no tecido aumentaria a probabilidade de eventos mutagênicos que levariam aos processos de transformação neoplásica, invasão e metástase.

A queda do quociente IP/IA observada no grupo dos carcinomas invasores em relação ao grupo dos carcinomas *in situ* é consequência do grande aumento no índice de apoptose daquele grupo em relação a

este (gráfico 3). O índice de proliferação celular aumentou aproximadamente em 20% do carcinoma *in situ* para o carcinoma invasor, enquanto que o índice de apoptose sofreu um aumento de quase 5 vezes. Em relação a estes resultados a literatura é algo controversa. Enquanto MUSTONEN *et al.* (1997) chegaram a resultados semelhantes aos nossos, mostrando que o carcinoma invasor apresenta um índice de apoptose aproximadamente 2 a 4 vezes maior que o carcinoma intraductal, HARN *et al.* (1997), utilizando métodos similares, verificaram, em seu material, que apoptose é mais freqüente no carcinoma intraductal. Os primeiros autores identificaram que o baixo índice de expressão da proteína bcl-2 pode estar relacionado ao aumento do índice de apoptose, enquanto HARN *et al.* (1997) implicam a diferença de expressão de proteína p53 no carcinoma intraductal e no carcinoma invasor como responsável para as diferenças entre os índices de apoptose entre as lesões. Ainda, ROCHAIX *et al.* (1999) demonstraram que há diferença entre os índices de apoptose de carcinoma ductal invasor da mama de diferentes graus histológicos. Outras hipóteses para explicar os mecanismos patogénéticos envolvidos na diferença observada neste trabalho entre os IA no carcinoma intraductal e no carcinoma ductal infiltrante da mama, fato aparentemente contraditório, incluem a heterogeneidade

das neoplasias infiltrativas do epitélio ductal da mama, além da interação das células neoplásicas com a matriz extracelular.

O carcinoma mamário compreende uma variedade de lesões diferentes na apresentação histológica com diferentes graus de atipia celular, formação tubular e até na resposta do estroma à invasão do tecido. É natural pensar que esta heterogeneidade também se reflita no índice de renovação celular do parênquima neoplásico. No presente estudo, nós preferimos selecionar amostras de carcinoma ductal infiltrante grau histológico II (RICHARDSON e BLOOM, 1957) na tentativa de homogeneizar os resultados. MOMMERS et al. (1999) estudaram o balanço entre o índice mitótico e o índice de morte celular em lesões pré-invasivas e no carcinoma mamário, separando as lesões bem diferenciadas das pouco diferenciadas e encontraram padrões diferentes no quociente entre esses índices nos grupos estudados. KAJIWARA et al. (1999) verificaram que tanto o índice de apoptose, quanto o índice de proliferação celular são mais elevados no carcinoma medular da mama do que no carcinoma ductal infiltrante, padrão não medular. BAI et al. (2001) também estudaram o balanço entre apoptose e proliferação celular na progressão para o carcinoma mamário e encontraram que o índice de proliferação celular tende a crescer em maior grau do que o índice de apoptose ao longo da progressão

histológica das lesões. Embora os trabalhos citados tenham abordado diferentemente o problema, todos chegaram a resultados que indicam uma tendência ao acúmulo de células e alto índice de renovação celular em direção ao carcinoma mamário. No nosso estudo, apesar de isoladamente o carcinoma mamário apresentar índice de renovação celular na direção do acúmulo de células neoplásicas, em relação ao carcinoma *in situ*, há uma queda no índice de renovação celular, às custas do grande aumento no índice de apoptose verificado.

A caracterização da hiperplasia atípica ductal quanto ao índice de proliferação celular e de apoptose não é tarefa fácil. No presente estudo, é uma lesão cujo índice de apoptose se assemelha tanto ao observado para o carcinoma intraductal, quanto para a hiperplasia atípica, enquanto que, quanto ao índice de proliferação celular está mais próxima ao carcinoma intraductal. No entanto, o quociente IP/IA sugere um índice de renovação celular semelhante ao do carcinoma intraductal, indicando que do ponto de vista de cinética celular a hiperplasia atípica pode estar mais relacionada ao carcinoma ductal *in situ* do que às lesões benignas do epitélio ductal. BAI *et al.* (2001) encontraram utilizando métodos semelhantes aos utilizados neste trabalho que os índices de apoptose e de proliferação celular são estatisticamente semelhantes na hiperplasia atípica e no carcinoma

intraductal e também sugeriram que ambas as lesões podem estar relacionadas do ponto de vista de cinética celular. Alguns estudos moleculares e genéticos detectaram monoclonalidade nas hiperplasias atípicas, sugerindo que na verdade, elas são proliferações neoplásicas, podendo representar pequenos carcinomas intraductais (LAKHANI *et al.* 1995; ROSENBERG *et al.* 1996, 1997).

Proliferação celular e apoptose são fenômenos provavelmente relacionados do ponto de vista molecular. Embora os dois fenômenos pareçam antagônicos, há evidências moleculares até certo ponto contraditórias que podem indicar sua correlação. Estudos demonstraram ativação de proteínas dependentes de ciclinas em células apoptóticas (GAZIT e ERDOS 1994; MEIRKANZ *et al.* 1994) e sugeriram que para uma célula entrar em apoptose, teria que inicialmente entrar no ciclo celular, denotando uma via comum de ativação para os dois processos. A demonstração, pelo menos em alguns tecidos, de que células em apoptose expressam marcadores de proliferação celular parece uma evidência a mais neste sentido (SHI *et al.* 1994; EVAN 1997; BAI *et al.* 2001). COATES *et al.* (1996), no entanto, ao estudar diferentes marcadores de proliferação celular em neutrófilos em cultura, não chegaram a tais resultados. Pelo contrário, seus resultados parecem indicar que a entrada no ciclo celular não é

uma condição *sine qua non* para que a célula progrida para apoptose. Neste trabalho, identificamos correlação positiva entre as atividades proliferativas e apoptóticas das lesões em relação ao grau de progressão histológica. Outros autores haviam identificado tal correlação tanto no tecido mamário (PILLAI *et al.* 1998), quanto em outros tecidos (BARETTON *et al.* 1996; DIEBOLD *et al.* 1996; HAO *et al.* 1998).

A questão da modulação dos processos de proliferação celular e apoptose na progressão do câncer de mama foi abordada no presente estudo. Nossos resultados mostraram que há uma correlação positiva linear entre o aumento do índice de proliferação celular e a expressão de proteína c-erbB-2 e uma correlação linear negativa entre o aumento do índice de apoptose e a expressão de proteína bcl-2 ao longo do espectro das lesões pré-invasivas e carcinoma mamário. Embora não tenhamos conhecimento de algum estudo que tenha abordado este aspecto utilizando a carcinogênese mamária como modelo, encontramos na literatura um trabalho que identificou resultados semelhantes abordando tumores invasivos da mama em relação ao índice de apoptose e à expressão de proteína bcl-2 (PILLAI *et al.* 1998). Dos estudos que utilizaram a progressão para o câncer colo-retal como modelo, um verificou correlação negativa entre o

índice de apoptose e a expressão da proteína bcl-2 nos carcinomas (BARETTON *et al.* 1996) e o outro nos adenomas, mas não nos carcinomas (HAO *et al.* 1998).

A literatura contém trabalhos que demonstram papel modulador das proteínas p53 tanto no processo de apoptose, quanto na proliferação celular (LANE, 1992; LYONS e CLARKE, 1997; AGARWAL *et al.* 1998). Um estudo mostrou correlação inversa da expressão desta proteína com a expressão de proteína bcl-2 tanto nos adenomas quanto no carcinoma do epitélio colo-retal (HAO *et al.* 1998), mas BARETTON *et al.* (1996) não encontraram tal correlação. No nosso caso, não observamos papel modulador potencial da proteína p53 no que se refere à progressão ao carcinoma mamário invasor. Em relação à proteína p27^{kip1}, é conhecido o seu papel regulador do ciclo celular (TOYOSHIMA e HUNTER 1994). Até onde sabemos, não há relatos na literatura que tentaram estudar o seu papel na progressão para o câncer de mama. Os nossos resultados não encontraram nenhuma relação matemática entre a expressão dessa proteína e o índice de proliferação celular ou o índice de apoptose.

Em resumo, nossos resultados permitem concluir que há um aumento progressivo dos índices de proliferação celular à medida que a lesão ductal mamária evolui em direção ao câncer. É possível dizer

que o mesmo acontece com o índice de renovação celular (quociente IP/IA), pelo menos na progressão histológica até o carcinoma *in situ*, havendo um desvio em direção ao acúmulo de células no tecido. A hiperplasia atípica ductal relaciona-se ao carcinoma intraductal do ponto de vista de cinética celular. O índice de proliferação celular correlaciona-se positivamente com a expressão do produto de oncogene Her2/neu (proteína c-erbB-2) enquanto que o índice de apoptose correlaciona-se inversamente à expressão da proteína bcl-2 ao longo da progressão histológica desde a hiperplasia típica ductal até o carcinoma ductal invasor.

Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas no estudo da carcinogênese mamária lançando novas questões a respeito da cinética celular tumoral. O papel modulador das moléculas reguladoras do ciclo celular necessita ser melhor estudado, talvez com aumento da casuística nos diferentes grupos e métodos de biologia molecular com microdissecção das lesões. Finalmente, as implicações das alterações da cinética celular no carcinoma *in situ* e no carcinoma invasor de alto e baixo grau histológico também devem ser estudadas e correlacionadas com as alterações das proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e da apoptose a fim de se estabelecer um modelo mais preciso da carcinogênese mamária.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Há um aumento progressivo dos índices de proliferação celular à medida que a lesão ductal mamária evolui em direção ao câncer.
2. O índice de renovação celular (quociente IP/IA) aumenta, pelo menos na progressão histológica até o carcinoma *in situ*, havendo um desvio em direção ao acúmulo de células no tecido.
3. A hiperplasia atípica ductal relaciona-se ao carcinoma intraductal do ponto de vista de cinética celular.
4. O índice de proliferação celular correlaciona-se positivamente com a expressão do produto de oncogene Her2/neu (proteína c-erbB-2) enquanto que o índice de apoptose correlaciona-se inversamente à expressão da proteína bcl-2 ao longo da progressão histológica desde a hiperplasia típica ductal até o carcinoma ductal invasor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J Biol Chem* 1998, 273:1-4.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. New York: Garland Pub.; 1983. The cell-division cycle: p.863-910.

Alison MR. Identifying and quantifying apoptosis: a growth industry in the face of death. *J Pathol* 1999; 188:117-8.

Allan DJ, Howell A, Roberts SA, *et al*. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. *J Pathol* 1992, 167:25-32.

Allred DC, Clark GM, Elledge R, *et al*. Association of p53 protein expression with tumour cell proliferation rate and clinical outcome in node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:200-6.

Allred DC, O'Connell P, Fuqua SAW, Osborne CK. Immunohistochemical studies of early breast cancer evolution. *Breast Cancer Res Treat* 1994, 32:13-8.

Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD. *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993; 170:1-8.

Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL, Santos AS. *Bioestat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá; 2000.

Azzopardi J. *Problems in breast pathology*. Philadelphia: W. B. Saunders; 1979. (Major Problems in Pathology, 11).

Badve S, A'Hern RP, Ward AM, *et al*. A long-term comparative study of the ability of 5 classifications of ductal carcinoma *in situ* of breast to predict local recurrence after surgical excision. *Hum Pathol* 1998; 29:915-23.

Bai M, Agnantis NJ, Kamina S, *et al*. *In vivo* cell kinetics in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2001; 3:276-83.

Barbareschi M. Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas: a review of the literature involving over 9,000 patients. *Appl Immunohist* 1996; 4:106-16.

Baretton G, Diebold J, Christoforis G, *et al.* Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinoma. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996; 77:255-64.

Birchall M, Winterford C, Tripconi L, Gobé G, Harmon B. Apoptosis and mitosis in oral and oropharyngeal epithelia: evidence for a topographical switch in premalignant lesions. *Cell Prolif* 1996; 29:447-56.

Bloom HJG, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer: a study of 1709 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 2:353-77.

Bodian CA, Perzin KH, Lattes R, Hoffmann P, Abernathy TG. Prognostic significance of benign proliferative breast disease. *Cancer* 1993; 71:3896-907.

Bradburry JM, Arno J, Edwards PA. Induction of epithelial abnormalities that resemble human breast lesions by the expression of the neu/erbB-2 oncogene in reconstituted mouse mammary gland. *Oncogene* 1993; 8:1551-8.

Brown R. The Bcl-2 family of proteins. *Br Med Bull* 1997; 53:466-77.

Burbano RR, Barbieri Neto J, Philbert PMP, Casartelli C. Mammary epithelial hyperplasias: alterations related solely to proliferation? *Breast Cancer Res Treat* 1996; 41:95-101.

Carter CL, Corle DK, Micozzi *et al.* A prospective study of the development of breast cancer in 16,692 women with benign breast disease. *Am J Epidemiol* 1988; 128:467-77.

Cattoretti G, Gilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41:178-83.

Cattoretti G, Becker MHG, Key G. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MiB-1 and MiB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168:357-63.

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, *et al.* Decreased levels of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997; 3:227–30.

Chitemerere M, Andersen TI, Holm R, Karlsen F, Borresen AL, Nesland JM. TP53 alterations in atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 41:103–9.

Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, *et al.* Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362:849–52.

Chan K-MF, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN, Winoto A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16-INK4. *Mol Cell Biol* 1995; 15:2682–8.

Chen J, Willingham T, Shuford M, Nisen PD. Tumour suppression and inhibition of aneuploid cell accumulation in human brain tumour cells by ectopic overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *J Clin Invest* 1996;97:1983–8.

Coates PJ, Hales SA, Hall PA. The association between cell proliferation and apoptosis: studies using the cell cycle-associated proteins KI67 and DNA polymerase alpha. *J Pathol* 1996; 178:71-7.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins pathologic basis of disease*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994. Neoplasia: p.241-303.

Couturier J, Vincent-Salomon A, Kicolas A, *et al.* Strong correlation between results of fluorescent *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the erbB (HER2/neu) gene status in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2000; 13:1238-43.

Davidoff AM, Kerns VJM, Iglehart JD, Marks JR. Maintenance of p53 alterations throughout breast cancer progression. *Cancer Res* 1991; 51:2605-10.

Dawson PJ, Wolman SR, Tait L, Heppner GH, Miller FR. MCF10AT: A model for the evolution of cancer from proliferative breast disease. *Am J Pathol* 1996; 148:313-9.

De Potter CR, Schelfhout AM. The neu protein and breast cancer. *Virchows Arch* 1995; 426:107-15.

Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase II α expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol* 2000; 13:542-7.

Diebold J, Baretton G, Felchner M, *et al.* Bcl-2 expression, p53 accumulation and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1996; 105:341-9.

Dueñas-González A, Abad-Hernández MDM, Cruz-Hernández JJ, González-Sarmiento R. Analysis of bcl-2 in sporadic breast carcinoma. *Cancer* 1997; 80:2100-8.

Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985; 312:146-51.

Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, *et al.* Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 1993; 71:1258-65.

Ellis IO, Elston CW, Poller DN. Ductal carcinoma *in situ*. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The breast*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1998. p.249-81. (Systemic pathology, 13)

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75:817-25.

Elston CW, Sloane FP, Amendoeira I, *et al.* Causes of inconsistency in diagnosing and classifying intraductal proliferations of the breast. *Eur J Cancer* 2000; 36:1769-72.

Evan G. Cancer: a matter of life and cell death. *Int J Cancer* 1997; 71:709-11.

Evan G, Wyllie A, Gilbert C, *et al.* Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell* 1992; 63:119-25.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, *et al.* A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumour genesis and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell* 1996; 85:733-44.

Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RVP. Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:1053-5.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
ANA MARIA R. A. KUNINARI
Coordenadora de Pós-Graduação

Friedrichs K, Gluba S, Didtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993; 72:3641-7.

Fujii J, Marsh C, Cairns P, Sidransky D, Gabrielson E. Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56:1493-7.

Gandhi A, Holland PA, Knox WF, Potten CS, Bundred NJ. Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer* 1998; 78:788-94.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson AS. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501.

Gazit Y, Erdos FW. Fluctuations and ultrastructural localization of oncoproteins and cell cycle regulatory proteins during growth and apoptosis of synchronized AGF cells. *Cancer Res* 1994; 54:950-6.

Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ, Gong J, Darzynkiewicz Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early *in situ* detection by terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation

assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol* 1992; 1:639-48.

Gorczyca W, Markiewski M, Kram Al. Immunohistochemical analysis of bcl-2 and p53 expression in breast carcinomas: their correlation with Ki-67 growth fraction. *Virchows Arch* 1995; 426:229-33.

Groshong SD, Owen GI, Grimison B, *et al.* Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27^{Kip1}. *Mol Endocrinol* 1997; 11:1593-607.

Gu Y, Turck CW, Morgan DO. Inhibition of Cdk2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993; 366:707-10.

Guan K-L, Jenkins CW, Li Y, *et al.* Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1 and a p14INK4/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994; 8:2939-52.

Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, Morgan JM, Mansel RE. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma *in situ*). *Cancer* 1997; 80:1740-5.

Hannon GJ, Baeach D. p15INK4B is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371:257-61.

Hao X, Du M, Bishop AE, Talbot IC. Imbalance between proliferation and apoptosis in the development of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 1998; 433:523-7.

Harn H-J, Shen KL, Yueh KC, *et al.* Apoptosis occurs more frequently in intraductal carcinoma than in infiltrating duct carcinoma of human breast cancer and correlates with altered p53 expression: detected by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC nick end labeling (TUNEL). *Histopathology* 1997; 31:534-9.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Ellledhe SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependant kinases. *Cell* 1993; 75:805-16.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; 246:629-34.

Hengartner MO, Horvitz HR. The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 345:243-8.

Hirai H, Roussel MF, Kato J-Y, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995; 15:2672-81.

Holden JA, Perkins SL, Snow GW, Kjeldsberg CR. Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1995; 104:54-9.

Holland R, Peterse JL, Millis RR, *et al.* Ductal carcinoma *in situ*: a proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol* 1994; 11:167-80.

Hughes LE, Mansel RE, Webster DJ. Aberrations of normal development and involution (ANDI): a new perspective on pathogenesis and nomenclature of benign breast disorders. *Lancet* 1987; 2:1316-9.

Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol* 1999; 26 (4 Suppl 12):51-9.

Hutter RVP. Consensus meeting: Is "fibrocystic disease" of the breast precancerous? *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110:171-3.

Iqbal M, Davies MPA, Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Sloane JP. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. *J Pathol* 2001; 193:333-8.

Ito K, Sasano H, Yabuki N, et al. Immunohistochemical study of Ki-67 and DNA topoisomerase II in human endometrium. *Mod Pathol*. 1997; 10:289-94.

Jacobs TW, Byrne C, Colditz G, Connolly JL, Schnitt SJ. Radial scars in benign breast-biopsy specimens and the risk of breast cancer. *N Eng J Med* 1999; 340:430-6.

Jensen R, Page DL. Epithelial hyperplasia. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The breast*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1998. p.65-89. (Systemic pathology, 13).

Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, Visscher DW. Determination of Her2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent *in situ* hybridization. *Mod Pathol* 2000; 13:37-45.

Jones BA, Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* 1997; 273:G1174-G88.

Kajiwara M, Toyoshima S, Yao T, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Apoptosis and cell proliferation in medullary carcinoma of the breast: a comparative study between medullary and non-medullary carcinoma using the TUNEL method and immunohistochemistry. *J Surg Oncol* 1999; 70:209-16.

Kasami M, Vnencak-Jone CL, Manning S, Dupont WD, Page DL. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in breast hyperplasia: no obligate correlation for these genetic alterations with subsequent malignancy. *Am J Pathol* 1997; 150:1925-32.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein G, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51:6304-11.

Katayose Y, Kim M, Rakkar ANS, Li Z, Cowan KH, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997; 57:5441-5.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.

Kiyokawa H, Kinerman FD, Manova-Todorova KO, *et al.* Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell* 1996; 85:721-32.

Korshunov A, Golanov A. The prognostic significance of DNA Topoisomerase II-alpha, p21/Cip-1, and p27/Kip-1 protein immunoexpression in oligodendrogliomas: an analysis of 91 cases. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125:892-8.

Lagios MD. Duct carcinoma *in situ*: pathology and treatment. *Surg Clin North Am* 1990; 70:853-71.

Lagios MD. Heterogeneity of duct carcinoma *in situ* (DCIS): relationship of grade and subtype analysis to local recurrence and risk of invasive transformation. *Cancer Lett* 1995; 90:97-102.

Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol* 1999; 187:272-8.

Lakhani SR, Collins N, Stratton MR, Sloane JP. Atypical ductal hyperplasia of the breast: clonal proliferation with loss of heterozygosity on chromosomes 16q and 17p. *J Clin Pathol* 1995; 48:611-5.

Lane DP. p53: guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-6.

Lane DP. The regulation of p53 function: Steiner award lecture. *Int J Cancer* 1994; 57:623-7.

Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with a unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995; 9:639-49.

Lenington WJ, Jensen RA, Dalton LW, Page DL. Ductal carcinoma *in situ* of the breast: heterogeneity of individual lesions. *Cancer* 1994; 73:118-24.

Levkau B, Koyama H, Raines EW, *et al.* Cleavage of p21^{cip/waf1} and p27^{Kip1} mediates apoptosis in endothelial cells through activation of cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1998; 1:553-63.

Lininger RA, Tavassoli FA. Atypical intraductal hyperplasia of the breast. In: Silverstein ML, editor. Ductal carcinoma *in situ* of the breast. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997. p.195-222.

Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Srijänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994; 14:2068-73.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, *et al.* P27KIP1: A multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999; 154:313-23.

Lodato RF, Maguire Jr. HC, Greene MI, Weiner FB, LiVolsi VA. Immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 oncogene expression in ductal carcinoma *in situ* and atypical ductal hyperplasia of the breast. *Mod Pathol* 1990; 3:449-54.

London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA* 1992; 267:941-4.

Lynch BJ, Guinee DG, Holden JA. Human DNA topoisomerase II α : a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1997; 28:1180-8.

Lyons SK, Clarke AR. Apoptosis and carcinogenesis. *Br Med Bull* 1997; 52:554-69.

Mack L, Kerkvliet N, Doig G, O'Malley F. Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma *in situ* of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erbB-2, bcl-2 and Ki-67. *Hum Pathol* 1997; 28:974-9.

Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, *et al.* Apoptosis, proliferation and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. *J Pathol* 2000; 191: 368-75.

Maguire Jr. HC, Hellman ME, Breene MI, Yeh I. Expression of c-erbB-2 in *in situ* and in adjacent invasive ductal adenocarcinomas of the female breast. *Pathobiology* 1992; 60:117-21.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis, an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:3-15.

Mariuzzi GM, Mariuzzi L, Mombello A, *et al.* Quantitative study of ductal breast cancer progression: morphometric evaluation of phenotypical changes occurring in benign and preinvasive epithelial lesions. *Pathol Res Pract* 1994; 190:1056-65.

Marx D, Schauer A, Reiche C, *et al.* c-erbB-2 expression in correlation to other biological parameters of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990; 116:15-20.

Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, *et al.* P57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995; 9:650-62.

Merikanz W, Gissibrecht S, Tam SW, Schiegel R. Activation of cyclin a dependent protein kinases during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3754-8.

McDonnel TJ. Cell division versus cell death: a functional model of multistep neoplasia. *Mol Carcinog* 1993; 8:209-13.

Moinfar F, Man YG, Lininger RA, Bodian C, Tavassoli FA. Use of keratin 34 β E12 as an adjunct in the diagnosis of mammary

intraepithelial neoplasia-ductal type – benign and malignant intraductal proliferations. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:1048-58.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69:1237-42.

Mommers ECM, van Diest PJ, Leonhart AM, Meijier CJ, Baak JP. Expression of proliferation and apoptosis-related proteins in usual ductal hyperplasia of the breast. *Hum Pathol* 1998; 29:1539-45.

Mommers ECM, van Diest PJ, Leonhart AM, Meijier CJ, Baak JP. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 58:163-9.

Mommers ECM, Poulin N, Sangulin J, Meijer CJLM, Baak JPA, van Diest PJ. Nuclear cytometric changes in breast carcinogenesis. *J Pathol* 2001; 193:33-9.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374:131-4.

Mustonen M, Raunio H, Pääkkö P, Soini Y. The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology* 1997; 31:347-54.

Nakayama K, Ishida N, Shirane M, *et al.* Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumours. *Cell* 1996; 85:707-20.

O'Connell PO, Pekkel V, Fuqua SAW, Osborne DK, Clark GM, Allred DC. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:697-703.

O'Connor PM, Ferris DK, Hoffmann I, Jackman J, Draetta G, Kohn KW. Role of the cdc25C phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9480-4.

O'Malley FP, Vnencak-Jones CL, Dupont WD, Parl F, Manning S, Page DL. p53 mutations are confined to the comedo type ductal carcinoma *in situ* of the breast: immunohistochemical and sequencing data. *Lab Invest* 1994; 71:67-72.

Ottesen GL, Graversen HP, Blicher-Toft M, Zedeler K, Andersen JA. Ductal carcinoma *in situ* of the female breast: short-term results of a prospective nationwide study. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:1183-96.

Page DL. Cancer risk assessment in benign breast biopsies. *Hum Pathol* 1986; 17:871-4.

Page DL, Anderson T. *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1987.

Page DL, Rogers LW. Combined histologic and cytologic criteria for the diagnosis of mammary atypical ductal hyperplasia. *Hum Pathol* 1992; 23:1095-7.

Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados M. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 1985; 55:2698-708.

Page DL, Salhany KE, Jensen RA, Dupont WD. Subsequent breast carcinoma risk after biopsy with atypia in a breast papilloma. *Cancer* 1996; 78:258-66.

Palli D, Galli M, Bianchi S, *et al.* Reproducibility of histological diagnosis of breast lesions: results of a panel in Italy. *Eur J Cancer* 1996; 32A:603-7.

Papadimitriou CS, Costopoulos JS, Christoforidou BP, *et al.* Expression of bcl-2 protein in human primary breast carcinomas and its correlation with multifocality, histopathological types and prognosis. *Eur J Cancer* 1997; 33:1275-80.

Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *Br Med J* 2001; 322:1528-32.

Pavelic ZP, Pavelic L, Lower EE, *et al.* *c-myc*, *c-erbB-2*, and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52:2597-602.

Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 94:12736-7.

Pillai MR, Kesari AL, Chellam VG, Madhavan J, Nair P, Nair MK. Spontaneous programmed cell death in infiltrating duct carcinoma: association with p53, bcl-2, hormone receptors and tumor proliferation. *Pathol Res Pract* 1998; 194:549-57.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
ANA MARIA PINARI
Coordenadora de Pós-graduação

Poller DN, Roberts EC, Bell JA, Elston CW, Blawey RW, Ellis AIO. p53 protein expression in human ductal carcinoma in situ: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. *Hum Pathol* 1993; 24:463-8.

Poller DN, Silverstein MJ, Galea M, *et al.* Ductal carcinoma *in situ* of the breast: a proposal for a new simplified histological classification: association between cellular proliferation and c-erbB-2 protein expression. *Mod Pathol* 1994; 7:257-62.

Polyak K, Kato JY, Solomon MH, *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994a; 8:9-22.

Polyak C, Lee MH, Edjument-Romage H, *et al.* Cloning of p27-Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994b; 78:59-66.

Porter PL, Maolne KE, Heagerty PJ, *et al.* Expression of cell cycle regulators p27kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 1997; 3:222-5.

Raju U, Crissman JD, Zarbo RJ, Gottlieb C. Epitheliosis of the breast: an immunohistochemical characterization and comparison to malignant intraductal proliferations of the breast. *Am J Surg Pathol* 1990; 14:939-47.

Raju U, Vertes, D. Breast papillomas with atypical ductal hyperplasia: a clinicopathologic study. *Hum Pathol* 1996; 27:1231-8.

Ravdin PM. Should HER2 status be routinely measured for all breast cancer patients? *Semin Oncol* 1999; 26 (4 Suppl 12):117-23.

Reed SI, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, Slingerland J. G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl* 1994; 18:69-73

Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignances. *Semin Hematol* 1997; 34 Suppl 5:9-19.

Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis and why is it important? *Br Med J* 2001; 322:1536-8.

Ridolfi RL, Jamhdor MR, Arber JM. HER2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization approach. *Mod Pathol* 2000; 13:866-73.

Roca J, Wang JC. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* 1994; 77:609-16.

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

Rohr R, Holden JA. DNA topoisomerase II α expression in duct hyperplasia and *in situ* duct carcinoma of the breast: correlation with histologic classification of *in situ* carcinoma. *App Immunohist Mol Morf* 1999; 7:14-20.

Rosai J. Borderline epithelial lesions of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991; 15:209-21.

Rosen PP. *Rosen's breast pathology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.

Rosen PP, Oberman HA. *Tumors of the mammary gland*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1993. (Atlas of Tumor Pathology, Third series, fascicle 7)

Rosenberg CL, de las Morenas A, Huang K, Cupples A, Faller DV. Detection of monoclonal microsatellite alterations in atypical breast hyperplasia. *J Clin Invest* 1996; 98:1095-100.

Rosenberg CL, Larson PS, Romo JD, de las Morenas A, Paller DV. Microsatellite alterations indicating monoclonality in atypical hyperplasias associated with breast cancer. *Hum Pathol* 1997; 28:214-9.

Rubin E, Alexander RW, Visscher DW, Urist MM, Maddox WA. Proliferative disease and atypia in biopsies performed for nonpalpable lesions mammographically detected. *Cancer* 1988; 61:2077-82.

Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, *et al*. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase II alpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 55:61-71.

Ruiz A, Almenar S, Callaghan RC, Llombart-Bosch A. Benign, preinvasive and invasive ductal breast lesions: a comparative study with quantitative techniques: morphometry, image- and flow cytometry. *Pathol Res Pract* 1999; 195:741-6.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclinD/Cdk4. *Nature* 1993; 366:704-7.

Schmitt FC, Figueiredo P, Lacerda M. c-erbB-2 protein expression and DNA ploidy in breast carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119:815-20.

Schimmelpenning H, Eriksson ET, Falkmer UF, *et al.* Prognostic significance of immunohistochemical c-erbB-2 proto-oncogene expression and nuclear DNA content in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 1992; 18:530-7.

Schnitt SJ, Connolly JL, Tavassoli FA, *et al.* Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:1133-43.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79:551-4.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9:1149-63.

Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenber AH. Premature p34^{cdc2} activation required for apoptosis. *Science* 1994; 263:1143-5.

Shirley SE. Beyond fibrocystic disease: the evolving concept of pre-malignant breast disease. *West Indian Med J* 1999; 48:173-8.

Shocker BS, Sloane JP. DCIS grading schemes and clinical implications. *Histopathology* 1999; 35:393-400.

Sigal-Zafrani B. Carcinomes canauxiaux *in situ*: evolution des connaissances histopathologiques. Difficultés et limites. *Bull Division Française AIP* 2000; (32):11-6.

Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, *et al*. Prognostic classification of breast ductal carcinoma *in situ*. *Lancet* 1995; 345:1154-7.

Sjönström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *Br Med J* 2001; 322:1538-9.

Skjorten F, Kaaresen R, Jacobsen U, Skaane P, Amlie E. Nuclear morphometry of benign and malignant breast lesions. *Eur J Surg Oncol* 1991; 17:350-3.

Sloane FP, Ellman R, Anderson TJ, *et al.* Consistency of histopathological reporting of breast lesions detected by screening: findings of the UK National EQA Scheme. *Eur J Cancer* 1994; 30A:1414-9.

Sloane JP, Amendoeira I, Apostolikas N, *et al.* Consistency achieved by 23 european pathologists from 12 countries in diagnosing breast disease and reporting prognostic features of carcinoma. *Virchows Arch* 1999; 434:3-10.

Sloop GD, Roa JC, Delgado AG, Balart JT, Hines III MO, Hill JM. Histologic sectioning produces TUNEL reactivity: a potential cause of false-positive staining. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:529-32.

Solomon MJ. Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:180-6.

Stahl J. Mismatch repair proteins and microsatellites hit clinical practice. *Adv Anat Pathol* 2000; 7:85-93.

Stål O, Klintenberg C, Sullivan S. The Southeast Sweden Breast Cancer Group: overexpression of c-erbB-2 protein and locoregional recurrence in node-positive breast cancer. *Breast* 1997; 6:354-60.

Tan P, Cady B, Wanner M, *et al.* The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57:1259-63.

Tandon AK, Clark GM, Chemness GTC, Ullrich A, McGuire WL. Her2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7:1120-8.

Tavassoli FA. Ductal carcinoma *in situ*: introduction of the concept of ductal intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 1998; 11:140-54.

Tavassoli FA. *Pathology of the breast*. 2nd ed. Norwalk: Connecticut Appleton Lange; 1999.

Tavassoli FA, Norris HJ. A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer* 1990; 65:518-29.

Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, *et al.* Accumulation of p53 tumour suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:845-55.

Tormanen U, Nuorva K, Soini Y, Paakko P. Apoptotic activity is increased in parallel with metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the bronchial epithelium. *Br J Cancer* 1999; 79:996-1002.

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78:67-74.

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/int-2 and c-erbB-2/ear-1. *Cancer Res* 1989; 49:3104-8.

Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, *et al.* Immunohistochemical study on overexpression of c-erbB-2 protein in human breast cancer: its correlation with gene amplification and long-term survival of patients. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81:327-32.

Tsuda H, Takarabe T, Akashi-Tanaka S, Fukutomi T, Hirohashi S. Pattern of chromosome 16q loss differs between an atypical

proliferative lesion and an intraductal or invasive carcinoma occurring subsequently in the same area of the breast. *Mod Pathol* 2001; 15:382-8.

Turley H, Comley M, Houlbrook S *et al.* The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer* 1997; 75:1340-6.

Umekita Y, Takasaki T, Yoshida H. Expression of p53 protein in benign epithelial hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, non-invasive and invasive mammary carcinoma: an immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1994; 424:491-4.

Vakkala M, Lähteenmäki K, Raunio H. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 1999a; 5:319-24.

Vakkala M, Pääkkö P, Soini Y. Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *Br J Cancer* 1999b; 81:592-9.

Vincent-Salomon A, Couturier V, Sastre-Garau X. Evaluation du statut de HER/neu dans les cancers du sein: indications et aspects méthodologiques. *Bull Division Française AIP* 2000; 32:30-7.

Visscher DW, Sarkar FH, Crissman JD. Correlation of DNA ploidy with c-erbB-2 expression in preinvasive and invasive breast tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 1991; 13:418-24.

Visscher DW, Nanjia-Makker P, Heppner G, Shekhar PVM. Tamoxifen suppresses histologic progression to atypia and DCIS in MCF10AT xenografts, a model of early human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 65:41-7.

Werner M, Mattis A, Aubele M, *et al.* 20q13.2 amplification in intraductal hyperplasia adjacent to *in situ* and invasive ductal carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 1999; 435:469-72.

[W.H.O.]. World Health Organization. Histological typing of breast tumors. Second edition. Geneva, 1981. *Ann Pathol* 1982; 2:91-105.

Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in the expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II α in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ* 1991; 2:209-14.

Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53:451-65.

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-306.

Yashima K, Milchgrub S, Gollahon LS, *et al.* Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4:229-34.

Zafrani B, Vincent-Salomon A. Benign lesions and tumors of the breast. *Ann Pathol* 2000; 20:570-87.

Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, *et al.* Correlation between the expression of apoptosis-related bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997; 3:2329-35.

Zhang GJ, Kimijima I, Tsuchiya A, Abe R. The role of bcl-2 expression in breast carcinomas. *Oncol Rep* 1998; 5:1211-6.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1 Resultados obtidos para os tecidos controle (tecido mamário com alterações mínimas):

Caso	p53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
C-1	negativo	0,77	negativo	0,001	0,082	8
C-2	negativo	0,28	negativo	0,007	0,0014	8
C-3	negativo	0,26	negativo	0,001	0,0016	8
C-4	negativo	0,43	negativo	0	0,0012	8
C-5	negativo	0,60	negativo	0	0,0210	8
C-6	negativo	0,18	negativo	0	0,0010	8
C-7	0,22	0,63	negativo	0.003	0,0011	8
C-8	0,17	0,32	negativo	0	0,0011	8
C-9	negativo	0,58	negativo	0	0,0012	8
C-10	negativo	0,27	negativo	0	0	8
C-11	negativo	0,36	negativo	0.002	0	8
C-12	negativo	0,39	negativo	0.006	0	8

Caso	p53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
C-13	negativo	0,17	negativo	0.003	0	8
C-14	0,14	0,42	negativo	0	0	8
C-15	negativo	0,67	negativo	0	0	8
C-16	negativo	0,65	negativo	0	0	8
C-17	negativo	0,58	negativo	0	0	8
C-18	0,21	0,28	negativo	0	0	8
C-19	0,34	0,16	negativo	0	0	8
C-20	negativo	0,47	negativo	0	0	8

Anexo 2 Resultados obtidos para os casos de hiperplasia ductal usual.

Caso	p53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
HT-1	negativo	0,49	negativo	0,0086	0,0049	8
HT-2	0,98	0,71	negativo	0,0042	0,0006	8
HT-3	0,22	0,24	negativo	0,0030	0,0030	8
HT-4	0,87	0,70	negativo	0,0025	0,0120	8
HT-5	negativo	0,56	negativo	0,0086	0,0057	8
HT-6	0,48	0,26	negativo	0,0013	0,0054	8
HT-7	negativo	0,21	negativo	0,0016	0,0016	8
HT-8	0,62	0,23	negativo	0,0027	0,0044	8
HT-9	negativo	0,34	negativo	0,0147	0,0010	8
HT-10	negativo	0,42	negativo	0,0008	0,0084	8
HT-11	negativo	0,21	negativo	0,0072	0,007	8
HT-12	negativo	0,52	negativo	0,0031	0,0014	8
HT-13	0,18	0,23	negativo	0,0120	0,0041	8
HT-14	negativo	0,31	negativo	0,0017	0,0013	8

Caso	p53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
HT-15	negativo	0,27	negativo	0,0044	0,0077	8
HT-16	negativo	0,56	negativo	0,0140	0,0028	8
HT-17	negativo	0,31	negativo	0,0027	0,0017	8
HT-18	negativo	0,34	negativo	0,0082	0,0062	8
HT-19	negativo	0,48	negativo	0,0065	0,0041	8
HT-20	negativo	0,22	negativo	0,0051	0,0036	8

Anexo 3 Resultados obtidos para os casos de hiperplasia ductal atípica.

Caso	P53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
HA -1	negativo	0,44	negativo	0,031	0,014	8
HA -2	0,60	0,68	+	0,72	0	8
HA -3	negativo	0,39	negativo	0,01	0,0012	8
HA -4	negativo	0,92	negativo	0,024	0	8
HA -5	negativo	0,47	negativo	0,016	0	8
HA -6	0,012	0,37	negativo	0,22	0	8
HA -7	negativo	0,52	negativo	0,01	0	8
HA -8	negativo	0,98	negativo	0,14	0	8
HA -9	0,77	0,012	+	0,032	0,0018	8
HA -10	0,92	0,42	negativo	0,94	0,0013	8
HA -11	0,22	0,99	+	0,54	0	8
HA -12	negativo	0,39	+	0,022	0,0016	8
HA -13	0,42	0,47	negativo	0,017	0,0011	8

Caso	P53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
HA -14	negativo	0,016	negativo	0,013	0,0024	8
HA -15	negativo	0,42	negativo	0,032	0,001	8

Anexo 4 Resultados obtidos para os casos de Carcinoma intraductal.

Caso	P53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
CIS-1	0,39	0,34	3+	0,30	0,0062	0
CIS-2	0,36	0,43	3+	0,22	0,0011	0
CIS-3	negativo	0,37	3+	0,51	0,0253	1
CIS-4	negativo	0,29	negativo	0,01	0,0004	6
CIS-5	negativo	0,27	negativo	0,02	0,0008	5
CIS-6	negativo	0,38	negativo	0,05	0,0005	7
CIS-7	0,56	0,18	2+	0,06	0,0010	8
CIS-8	negativo	0,54	2+	0,016	0,0039	0
CIS-9	0,48	0,36	3+	0,24	0,0013	6
CIS-10	negativo	0,51	negativo	0,18	0,0018	6
CIS-11	negativo	0,42	+	0,09	0,0016	5
CIS-12	negativo	0,43	negativo	0,03	0,0031	2
CIS-13	negativo	0,04	negativo	0,37	0,0041	0
CIS-14	negativo	0,41	negativo	0,11	0,0019	6

Caso	P53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
CIS-15	0,30	0,48	2+	0,09	0,0009	0
CIS-16	0,22	0,60	3+	0,03	0,0023	4
CIS-17	1,00	0,98	3+	0,40	0,0042	1
CIS-18	0,24	0	3+	0,11	0,0078	1
CIS-19	0	0,18	3+	0,045	0,0112	2
CIS-20	0	0	2+	0,07	0,0030	4

UNIVERSIDADE ANTONIO PRUDENTE
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA



Anexo 5 Resultados obtidos para os casos de Carcinoma ductal infiltrante da mama.

Caso	p53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
CDI-1	0,15	0,28	3+	0,14	0,048	4
CDI-2	0	0,07	3+	0,12	0,018	0
CDI-3	0,92	0,55	3+	0,37	0,046	3
CDI-4	0,66	0,38	negativo	0,09	0,012	0
CDI-5	0	0,21	negativo	0,07	0,015	0
CDI-6	0	negativo	negativo	0,14	0,013	0
CDI-7	0,22	0,78	2+	0,12	0,009	1
CDI-8	0	0,38	2+	0,07	0,016	0
CDI-9	0,24	0,41	3+	0,06	0,021	1
CDI-10	0,33	0,34	0	0,09	0,014	3
CDI-11	0,92	0,41	1+	0,22	0,007	0
CDI-12	0	0,28	negativo	0,49	0,052	0
CDI-13	0	0,42	negativo	0,18	0,004	4

Caso	P53	P27	c-erbB-2	Proliferação celular	Índice de apoptose	Bcl-2
CDI-14	0	0,17	negativo	0,44	0,029	3
CDI-15	0,94	0,57	2+	0,27	0,004	4
CDI-16	0	0,03	3+	0,57	0,021	1
CDI-17	0	0,52	3+	0,38	0,031	0
CDI-18	0,97	0,32	3+	0,22	0,009	2
CDI-19	0,92	0,14	3+	0,55	0,024	0
CDI-20	0,42	0,21	2+	0,63	0,009	0