

João Carlos Arantes Júnior

**Perfis Histopatológico e Imuno-histoquímico
do câncer de mama: Comparação entre
lesões palpáveis e não-palpáveis**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu-UNESP para obtenção do
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Uemura

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Estevam Farias

Botucatu
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Arantes Junior, João Carlos.

Perfis histopatológico e imuno-histoquímico do câncer de mama:
comparação entre lesões palpáveis e não palpáveis / João Carlos Arantes
Júnior. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
de Botucatu, 2006

Orientador: Gilberto Uemura

Co-orientador: Rogério Estevam Farias

Assunto CAPES: 40101150

1. Mama - Câncer

CDD 616.99449

Palavras-chave: Câncer de mama; Histopatologia; Imuno-histoquímica;
Lesões não palpáveis; Lesões palpáveis

“Carta de Petrópolis”

**Dedico este trabalho
às “Mulheres de Petrópolis”,
que me permitiram crescer na especialidade.
Muito mais do que pacientes, Heloisas, Denises,
Therezinhas, Giseles, Helenas, Catarinas
e tantas outras que me ensinaram a superar barreiras .
Estão vivas. E felizes.**

João Carlos Arantes Júnior

Dedicatória

À minha mãe....**G**lória.....
Lucidez, simplicidade e abnegação.

Ao meu pai.....**D**r. **A**rantes.....
Dedicação, visão e obstinação.

A gradecimentos Especiais

“Nunca sabemos até onde o conhecimento pode nos levar. Mas o lugar aonde ele nos leva é muito bom.”

Márcio Flávio (Chefe do Serviço de Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais)

A o meu professor.....

A todos os meus professores, desde o pré-primário (“Tia” Larina) até meu orientador no Doutorado (Gilberto), passando pelo Colégio João XXII e pelas Faculdades de Medicina da UFJF e UFRJ, pois de cada um trouxe um pouco. São todos importantes, referências na construção da formação profissional.

Às pacientes de Juiz de Fora.....

Afetuosas e sensíveis, mais amigas do que clientes. Certamente, muito importantes em minha travessia.

A Botucatu. Por sua hospitalidade, harmonia e grandeza, representadas pela Universidade Estadual Paulista, que acolhe a todos indistintamente com elegância e dedicação.

A agradecimentos

Ao orientador **Professor Gilberto Uemura**, profissional objetivo, incansável e capaz, dono de uma simplicidade contagiante.

Ao **Professor Laurival A. De Lucca**, irreverente e audacioso, grato pela confiança e pelas palavras, poucas mas sábias, desde a chegada à Botucatu.

Ao **Professor Rogério Estevam Farias**, co-orientador, e sua funcionária **Nelida** pelos dados de Imuno-histoquímica.

Ao **Professor Vicente Rozauro Vidal**, importante desde os tempos de acadêmico e responsável pelos passos que vieram a seguir, companheiro e consultor, dono de inegáveis experiência e capacidade.

À **Dra. Marília Sena**, e sua funcionária **Thais**, pela avaliação histopatológica dos casos e contribuição bibliográfica.

Ao **Professor Alfredo Chaoubach**, matemático objetivo e didático, pelo tratamento estatístico, pela solicitude e compreensão.

À **(tia) Vitória**, pela revisão ortográfica e gramatical, além do incessante incentivo.

À **Dra. Christina**, inseparável colega e amiga, pela compreensão e colaboração em todos os momentos nestes últimos anos.

À **Dra. Ângela Maria Gollner** pelo apoio nas referências bibliográficas e consultoria nos aspectos histopatológicos.

Aos meus colegas da cadeira de Ginecologia na UFJF, **Álvaro, Angélica, Christine, Denise, Elídio, Homero**, além de todos os residentes e estagiários, compreensivos e companheiros no período de elaboração do trabalho.

Às doutoras **Leila, Lívia e Patrícia** pela ajuda na obtenção dos trabalhos bibliográficos.

Aos funcionários da **UNESP** pela dedicação e importante colaboração em todos os passos, desde a matrícula até a elaboração do trabalho.

À **Professora Paula Maldonado**, por me inspirar em todos estes anos no exercício da ciência prática e objetiva.

Aos colegas médicos, enfermeiros e funcionários do **Instituto Oncológico**.

Às minhas funcionárias **D. Glorinha, Cláudia e Maria Luiza**, pelo apoio e paciência.

Índice

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS _____	14
LISTA DE ABREVIATURAS _____	18
RESUMO _____	20
SUMMARY _____	23
1. INTRODUÇÃO _____	26
2. REFERENCIAL TEÓRICO _____	29
2.1 Fatores Prognósticos e Preditivos	30
2.2 A Histopatologia	32
2.3 A Imuno-histoquímica	34
2.4 Os Marcadores Imuno-histoquímicos	37
2.4.1 – Receptores de Estrogênio	37
2.4.2 – Receptores de Progesterona	39
2.4.3 – Ki67	39
2.4.4 – p53	39
2.4.5 – <i>Her-2/neu</i>	40
2.5 Aplicação da Imuno-histoquímica em câncer de mama	43
2.5.1 – Imuno-histoquímica / Progressão para Invasão	43
2.5.2 – Imuno-histoquímica / Prognóstico	44
2.5.3 – Imuno-histoquímica / Metástases	45
2.5.4 – Imuno-histoquímica / Resposta a Quimioterapia	46
2.5.5 – Imuno-histoquímica / Resposta a Endocrinoterapia	48
2.6 – Lesões não-palpáveis X Lesões palpáveis	49
3. OBJETIVOS _____	52
3.1 Objetivo Geral	53
3.2 Objetivo Específico	53
4. SUJEITOS E MÉTODOS _____	54
4.1 Tipo de Estudo e Casuística	55
4.2 Análise Radiológica/Obtenção do espécime	56
4.3 Metodologia da Análise Histopatológica	58
4.4 Metodologia da Análise Imuno-histoquímica	60
4.5 Metodologia Estatística	65

5 – RESULTADOS _____	66
5.1 Idade	67
5.2 Tamanho tumoral	67
5.3 Tipo Histológico	67
5.4 Relação histopatologia / Imuno-histoquímica	68
5.5 Comparação entre os 2 Grupos	74
6 – DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS _____	78
7 – CONCLUSÕES _____	86
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	88
9 – ANEXOS _____	102

Lista de Figuras, Quadros e Tabelas

Figura 1	Mitose atípica (setas) em Carcinoma Invasivo Grau III H&E . Aumento 400x ⁸⁷	59
Figura 2	Carcinoma Ductal Infiltrante. Formação Tubular 3. H&E . Aumento 100x ⁸⁷	59
Figura 3	Imunomarcção positiva para Receptor de estrogênio (RE) na maioria das células tumorais de CDI grau I. Aumento original 100x ⁸⁷	62
Figura 4	Imunomarcção positiva para Receptor de Progesterona (RP) em células tumorais de CDI Grau I. Aumento de 200x.....	62
Figura 5	Positividade para p53 em CDI grau II. 400x ⁸⁷	63
Figura 6	CDI grau III exibindo grande número de 100x ⁸⁷ · Células positivas para Ki67.....	63
Figura 7	Positividade para c-erbB-2 / CDI Grau II (400x).....	64

Quadro 1	Fatores de bom e mau prognóstico	32
Quadro 2	<i>St. Gallen 2005</i> – Tumores de mama	48
Quadro 3	Graduação Bloom & Richardson (modificada por Elston & Ellis)	58
Quadro 4	Anticorpos para imuno-histoquímica	60
Quadro 5	Sistema de interpretação Herceptest DAKO a 95°C	64

Tabela 1	Modalidade de Biópsia	57
Tabela 2	Tipo Histológico	68
Tabela 3	Grau Nuclear X Receptores de Estrogênio	69
Tabela 4	Grau Nuclear X Receptores de Progesterona	69
Tabela 5	Formação Tubular X Receptores de Estrogênio	70
Tabela 6	Formação Tubular X Receptores de Progesterona	70
Tabela 7	Índice Mitótico X Receptores de Estrogênio	70
Tabela 8	Índice Mitótico X Receptores de Progesterona	70
Tabela 9	Grau Nuclear X c-erbB-2	71
Tabela 10	Formação Tubular X c-erbB-2	71
Tabela 11	Índice Mitótico X c-erbB-2	71
Tabela 12	Grau Nuclear X c-erbB-2	72
Tabela 13	Formação Tubular X c-erbB-2	72
Tabela 14	Índice Mitótico X c-erbB-2.....	72
Tabela 15	Grau Nuclear X c-erbB-2	73
Tabela 16	Formação Tubular X c-erbB-2	73
Tabela 17	Índice Mitótico X c-erbB-2	73
Tabela 18	Grau Nuclear: Grupo 1 X Grupo 2	74
Tabela 19	Formação Tubular: Grupo 1 X Grupo 2	74
Tabela 20	Índice Mitótico: Grupo 1 X Grupo 2	74
Tabela 21	Receptores de Estrogênio: Grupo 1 X Grupo 2	75
Tabela 22	Receptores de Progesterona: Grupo 1 X Grupo 2	75
Tabela 23	Ki67: Grupo 1 X Grupo 2	76
Tabela 24	p53: Grupo 1 X Grupo 2	77
Tabela 25	c-erbB-2: Grupo 1 X Grupo 2	77
Tabela 26	Tabela completa de dados dos sujeitos	105
Tabela 27	Classificação BI-RADS: Grupo 1 X Grupo 2	107
Tabela 28	Imagem mamográfica: Grupo 1 X Grupo 2	108
Tabela 29	Estado menopausal: Grupo 1 X Grupo 2	114

Tabela 30	Rastreamento mamográfico: Grupo 1 X Grupo 2	114
Tabela 31	Queixa Principal: Grupo 1 X Grupo 2	115
Tabela 32	Receptores de Estrogênio X Estadiamento Clínico	116
Tabela 33	Receptores de Progesterona X Estadiamento Clínico.....	116
Tabela 34	c-erbB-2 X Estadiamento Clínico.....	117
Tabela 35	Ki67 X Estadiamento Clínico.....	117
Tabela 36	p53 X Estadiamento Clínico.....	117
Tabela 37	Receptores de Estrogênio X Linfonodos positivos.....	118
Tabela 38	Receptores de Progesterona X Linfonodos positivos.....	118
Tabela 39	c-erbB-2 X Linfonodos positivos.....	119
Tabela 40	Ki67 X Linfonodos positivos.....	119
Tabela 41	p53 X Linfonodos positivos.....	120
Tabela 42	Estadiamento Clínico: Grupo 1 X Grupo 2	121
Tabela 43	Linfonodos positivos: Grupo 1 X Grupo 2	121

L ista de A breviaturas

ACR:	Colégio Americano de Radiologia
BI-RADS:	Breast Imaging Reporting and Data System
CDI:	Carcinoma Ductal invasivo
CDIS:	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CLI:	Carcinoma Lobular Invasivo
CLIS:	Carcinoma Lobular <i>in situ</i>
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
FISH:	Flourescence <i>in situ</i> Hibridization
FT:	Formacao de Tubulos
GN:	Grau Nuclear
H & E:	Hematoxilina-Eosina
HT:	Hormonioterapia
IHQ:	Imuno-histoquímica
IM:	Índice Mitótico
INCa:	Instituto Nacional de Câncer
QT:	Quimioterapia
RE:	Receptores de Estrogênio
RP:	Receptores de Progesterona
RT:	Radioterapia
Screening:	Rastreamento
SEER:	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SERM:	Modulador Seletivo de Receptores de Estrogênio
T1:	Tumores até 2,0 cm (Classificação TNM)

Resumo

Introdução: O Câncer de mama acomete muitas mulheres em todo o mundo e as metástases são a principal causa de morte. Conhecimentos acerca do comportamento biológico são úteis para aprimorar a abordagem, principalmente terapêutica. Os perfis histológico e imuno-histoquímico podem nos permitir melhor compreensão dos fenômenos que determinam a evolução da doença. **Objetivo:** Comparar lesões palpáveis e não palpáveis para determinar agressividade biológica, baseado nos parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos. **Metodologia:** Foram estudados 296 (duzentos e noventa e seis) casos de câncer de mama, confirmados pela histopatologia, separados em dois grupos: Grupo 1: Lesões não palpáveis, detectadas exclusivamente por mamografia (microcalcificações, nódulo ou distorção arquitetural) ou por achado incidental e Grupo 2: Lesões palpáveis (nódulo, massa ou condensação), em estudo retrospectivo, analítico e horizontal. Foram avaliados critérios histopatológicos (Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico) e imuno-histoquímicos (Receptores de Estrogênio, Receptores de Progesterona, Ki67, p53 e c-erbB-2) de agressividade, comparando-se os dois grupos, com tratamento estatístico (índice de significância $p < 0,05$). **Resultados:** Avaliados os dois grupos indistintamente, observou-se que a maior expressão dos Receptores Hormonais (RE e RP) esteve relacionada com Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico baixos. Super-expressão de Ki67 foi prevalente nos graus histopatológicos mais elevados. c-erbB-2 e p53, embora não estatisticamente significativo,

apresentaram a mesma tendência do Ki67 em relação às variáveis histopatológicas. O Grupo 1 apresentou menor incidência de Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico elevados que o Grupo 2. O Grupo 1 apresentou maior expressão dos Receptores Hormonais ($p < 0,05$), enquanto o Grupo 2 apresentou maior expressão de Ki67 ($p < 0,05$). A expressão do c-erbB-2 tendeu a ser maior no Grupo 2 ($p = 0,055$). A expressão do p53 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos.

Conclusão: O Grupo 2 (Lesões palpáveis) apresentou maior agressividade biológica, baseado nos parâmetros histopatológicos (Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico) e imuno-histoquímicos (RE, RP, Ki67 e c-erbB-2) do que o Grupo 1 (Lesões não palpáveis)

Summary

Introduction: The breast cancer commits many women throughout the world, and the metastases are the main cause of deaths. The knowledge about the biologic aggressiveness is useful to improve the treatment and the histopathological and immunohistochemical profiles can help to understand the events that determine the outcome. **Objective:** To compare two groups of patients with breast cancer (Group 1: non-palpable lesions; Group 2: palpable lesions), based in histopathological and immunohistochemical parameters to determine the biologic aggressiveness. **Methods:** We have studied 296 (two hundred ninety six) cases of breast cancer, diagnosed by histopathology, divided in two groups: Group 1- non-palpable lesions, exclusively detected by mammography (microcalcifications, nodule or architectural distortion) or with incidental finding and Group 2- palpable lesions (Nodule or mass), in retrospective, analytical and horizontal analysis. We evaluated histopathological parameters (nuclear grade, tubularity and mitotic counts) and immunohistochemical markers(Estrogen Receptors, Progesterone Receptors, p53, Ki67 and c-erbB-2), comparing the two groups, with statistic analysis ($p < 0.05$). **Results:** The bigger the expression of estrogen and progesterone receptors the smaller the nuclear grade, tubularity and mitotic counts. On the contrary, the bigger the expression of Ki67 the higher the nuclear grade, tubularity and mitotic counts. We observed that c-erbB-2 and p53 expression showed the same tendency of the Ki67 in relation to the histopathologic parameters. Group 1 showed less incidence of elevated nuclear grade,

tubularity and mitotic counts, bigger expression of Estrogen and Progesterone Receptors($p<0.05$). Group 2 showed higher expression of Ki67 ($p<0.05$). The c-erbB-2 expression was a little bit higher in Group 2 than in Group 1($p=0.055$). The p53 expression didnot show differences between the groups.

Conclusion: Group 2 (palpable lesions) showed higher biologic aggressiveness than Group 1 (non-palpable lesions), based in the histopathological parameters (nuclear grade, tubularity and mitotic counts) and immunohistochemical markers (Estrogen Receptors, Progesterone Receptors, Ki67 and c-erbB-2).

1 – Introdução

O Câncer de Mama é a principal causa de morte por neoplasia entre as mulheres brasileiras (Ministério da Saúde, 2001)¹. Estima-se que nos Estados Unidos, 1 em cada 8 mulheres desenvolverá a moléstia (SEER-2002), enquanto no Brasil a incidência é de 1 para cada 17 (INCa-2005). A metástase é a principal causa de óbito devido à falta de um método diagnóstico eficiente para a detecção das micrometástases ocultas. Estudos genético-moleculares são cada vez mais importantes para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas preventivas e terapêuticas para identificação de genes e vias bioquímicas envolvendo a carcinogênese mamária².

A detecção de tumores malignos precoces requer melhor caracterização da real agressividade para que a proposta, seja ela terapêutica ou de seguimento, congregue clareza e objetividade. Obter tratamento eficaz e com poucos efeitos colaterais é preceito básico. A demanda por cirurgias conservadoras, com preocupações inequívocas quanto à qualidade de vida, determinou esforços para dirimir dúvidas acerca da evolução da doença. Seus aspectos heterogêneos³ têm incentivado a identificação de fatores para melhor compreensão do comportamento biológico.

Os parâmetros histopatológicos são classicamente utilizados para avaliar evolução⁹¹. O painel imuno-histoquímico permite agregar conhecimentos, não raro, projetando resposta terapêutica e/ou determinando o prognóstico. Baseado nestes aspectos, alguns autores denominaram como

Assinaturas Gênicas (ou Moleculares), o perfil molecular de cada tumor, caracterizando como de bom ou de mau prognóstico.

A moléstia segue três etapas: Iniciação, Promoção e Progressão. A Iniciação compreende a ativação de oncogenes através da amplificação, da mutação e dos fenômenos epigenéticos (alterações não genéticas), compreendendo 93% desta fase. Os Oncogenes existem normalmente na forma inativa, denominados proto-Oncogenes⁸. Os outros 7% da Iniciação correspondem à inativação dos genes supressores, responsáveis pela codificação da síntese de proteínas que bloqueiam a proliferação celular. Portanto, a fase de Iniciação é genética. A fase de Promoção depende do estímulo, sabidamente estrogênico. A terceira fase (Progressão) compreende a interação entre atividade bioquímica enzimática do tumor e resistência do hospedeiro. Deve-se considerar ainda a neo-angiogenese e a transferência de células anormais para a circulação.

Para incorporar o Perfil Imuno-histoquímico na rotina de avaliação do câncer de mama⁵, estuda-se sua correlação com os fatores prognósticos clássicos. Tamanho tumoral, estado linfonodal axilar, variáveis histopatológicas (tipo e subtipos histológicos, grau de diferenciação - Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico), e resposta à quimioterapia, entre outros, são parâmetros importantes que conduzem ao entendimento da história natural e da evolução do tumor.

2 – Referencial Teórico

2.1. Fatores Prognósticos e Preditivos

O *Prognóstico* pode ser definido como a “Estratificação da Doença” de acordo com o risco. *Fatores Preditivos* informam sobre a “Probabilidade de Resposta” à determinada modalidade terapêutica³.

O epitélio mamário apresenta carcinomas histologicamente diversos. Alguns estão associados com padrões de comportamento clínico, cujo reconhecimento é importante para modificações terapêuticas. Entre os tipos de prognóstico favorável, estão os carcinomas adenóide cístico, tubular, secretório juvenil e medular. Entre os menos favoráveis estão o metaplásico sarcomatóide e o inflamatório⁴.

A caracterização anatomo-clínica considera também a invasão linfonodal, porém se observa enorme heterogeneidade biológica que condiciona potencial invasivo, agressividade tumoral, cinética de progressão e susceptibilidade terapêutica. São parâmetros essenciais para definir estratégia de condução^{5,6}. Alguns pacientes com fatores de bom prognóstico apresentam recorrência; outros, com fatores de mau prognóstico, não recorrem. Tal fato determinou a necessidade de se explorar novos marcadores.

Prognóstico em pacientes com câncer^{7, 8, 9, 12, 13, 14} pode ser definido por diferentes aspectos, incluindo risco de recidiva loco - regional, sobrevida livre de metástases, sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Contudo, sobrevida livre de doença e sobrevida global são utilizadas com maior frequência por serem facilmente mensuradas e, em geral, por definirem a história natural da doença. Até o momento, sabe-se que há uma relação entre a cinética de proliferação e o efeito antineoplásico do hospedeiro, e que também se pode prever o desenvolvimento de resistência a alguns tratamentos⁶.

Os fatores prognósticos do câncer de mama⁷ podem ser agrupados em 4 gerações: Na primeira, entre os chamados “clássicos”, destacam-se o estágio clínico, o grau histológico e a idade da paciente. Na segunda geração estão os receptores de estrogênio e de progesterona, além dos marcadores de proliferação celular (Ki67). A ploidia e a morfometria ainda não apresentam valor prognóstico estabelecido. Na terceira estão os marcadores genéticos como o neu, myc e bcl2, genes mutados ou não expressos (p53, rb), proteases (Catepsina D), etc. Destes, o c-erbB-2 e o p53 são os mais estudados. A quarta geração é constituída pelos chamados preditores de metástase órgão-específicos. Alguns tumores podem expressar parato-hormônio ou apresentam micrometástases na medula óssea, configurando risco maior de doença óssea. Tais estudos ainda são muito recentes e, portanto, não validados.

2.2. Histopatologia

Os parâmetros histopatológicos são considerados prognósticos clássicos em câncer de mama. O patologista desempenha papel fundamental⁹ no diagnóstico acurado e na subsequente avaliação preditiva para nortear tratamento e decisões de conduta. Os fatores prognósticos primários baseiam-se na abordagem clínico-histopatológica: Estado linfonodal axilar, tamanho tumoral, grau histológico e subtipo histológico. Tumores malignos de Mama¹⁰ podem apresentar diferentes evoluções clínicas com características patológicas semelhantes. Tal observação suscitou investigações sobre outros parâmetros. Mommers¹¹ destacou marcantes evidências de que há diferentes progressões do carcinoma invasivo, dependentes da histologia e do grau de diferenciação.

As características histopatológicas da lesão revelam diferentes tipos de comportamento biológico⁷. A diferenciação (formação de túbulos, grau nuclear e contagem de mitoses) permite classificá-las em alto grau, de grau intermediário e de baixo grau. Deste modo, podem-se agrupar os cânceres de mama em dois grandes grupos, de acordo com os fatores de bom e mau prognóstico (Modificado por Tavassoli, 1999) (Quadro 1).

Quadro 1 – Fatores de bom e mau prognóstico

Fator	Bom Prognóstico	Mau Prognóstico
Tamanho	< 1,0 cm	> 5,0 cm
Extensão local	Ausente	Presente
Grau histológico	Baixo	Alto
Linfonodos Axilares	Negativos	Positivos

O comportamento biológico varia entre lesões do mesmo tipo, dentro do mesmo estágio. Bloom, Richardson e Harrier⁷, em 1962, demonstraram que carcinomas do mesmo tipo e do mesmo estágio apresentavam sobrevida que variava de poucos meses a algumas décadas. Desenvolveu-se o Índice Prognóstico de Nottingham para tentar prever o comportamento da lesão baseado no tamanho, no estado axilar (**1**=Negativo; **2**=Até 3 Linfonodos positivos e **3**=4 ou mais linfonodos positivos) e no grau histológico (1 a 3, baseado na formação de túbulos, aspecto nuclear e quantidade de mitoses).

Todos os carcinomas invasivos de mama, exceto o medular, devem ser graduados^{15, 91}. Recomenda-se atualmente a utilização do Grau Histológico combinado de Nottingham (Scarff, Bloom, Richardson modificado por Elston-Ellis) que inclui:

- Percentual de diferenciação tubular
- Avaliação do pleomorfismo nuclear
- Índice mitótico

O Carcinoma Ductal Infiltrante⁴ é o mais freqüente de todos os cânceres da mama e sob esta denominação há considerável número de tipos macroscópicos e histopatológicos. Os diversos termos aplicados a esta categoria corroboram a diversidade. Suas células podem ser uniformes e grandes ou amplamente pleomórficas. Podem estar arranjadas em grupos, em

nódulos de vários tamanhos ou em formações glandulares neoplásicas. Carcinomas Ductais Infiltrantes não compõem um grupo homogêneo.

O Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS) constitui importante percentual de diagnósticos da era da mamografia de alta resolução de rastreamento (“screening”). CDIS tratado com mastectomia⁸ pode chegar a 100% de sobrevida, porém, número crescente de pacientes é submetido à cirurgia conservadora. Para otimizar o tratamento do CDIS¹², torna-se necessário estratificar as pacientes de acordo com o risco de recorrência e progressão para invasão.

2.3. Imuno-histoquímica

A primeira reação imuno-histoquímica foi realizada há cerca de meio século¹⁶ quando se introduziu a técnica de marcação através de anticorpos com produtos fluorescentes. Na década de 80 verificou-se importante incremento na utilização do método para diagnóstico com a técnica da avidina-biotina-peroxidase e resgate do sítio antigênico por indução de calor. A imuno-histoquímica encerra técnica distintamente qualitativa, embora aplicações quantitativas possam ser realizadas para determinar a intensidade com que se encontra antígeno na amostra. Tem como objetivo a localização topográfica do antígeno na célula ou no tecido. Análises quantitativas de imuno-coloração em secções de tecidos podem ser representadas por produto

ou soma da intensidade de coloração e porcentagem da positividade em células e estruturas. Tais valores podem ser empregados em fórmulas matemáticas como método de análise quantitativa. O grande problema para quantificar a imuno-expressão é representado pelas imprevisíveis alterações de preservação dos espécimes.

Número potencial de problemas pode estar associado:

- Variabilidade no processamento e fixação do tecido
- Variabilidade na sensibilidade e especificidade dos anticorpos
- Diferenças nos sistemas de escore
- Variabilidade inter-observadores (interpretação de resultados)

A imuno-histoquímica utiliza⁸ equipamentos comuns em departamentos de Anatomia Patológica, além de metodologia bastante conhecida. Portanto, é técnica com a qual o patologista está habituado e com ampla experiência, porém onerosa. Testes de validação da imuno-histoquímica estão disponíveis para produzir boa concordância inter-laboratorial e inter-observadores.

Secções de parafina ou de congelação podem ser utilizadas para Imuno-histoquímica.

Outras variáveis podem influir na qualidade da avaliação imuno-histoquímica:

- Momento e natureza da fixação tissular
- Método de processamento do tecido
- Temperatura de embebição na parafina
- Duração da clivagem
- Tipo de anticorpo utilizado
- Procedimento de coloração utilizado

Marcadores tumorais como p53 e c-erbB-2^{8, 11, 20} são estudados para elucidação dos mecanismos moleculares que envolvem genes relacionados à progressão e à metástase. Achados como ausência de expressão dos genes de Receptores de Estrogênio e de Progesterona⁶, parecem estar associados e/ou serem indicativos de doença mais grave. Portanto, é importante avaliar o potencial destes genes em conjunto, como marcadores moleculares prognósticos e/ou preditivos em câncer de mama.

Embora os marcadores imuno-histoquímicos sejam importantes na decisão de condutas do Câncer de Mama, sua utilidade ainda é contestada por alguns autores^{5, 20}. Algumas evidências¹⁷ sugerem que a correlação dos marcadores imuno-histoquímicos com aspectos histopatológicos pode falhar em prover avaliação da agressividade tumoral em tipos menos comuns como o carcinoma micropapilar infiltrante.

A Sociedade Brasileira de Mastologia⁸⁶, em Reunião de Consenso (Gramado 2001), ao se referir ao diagnóstico e ao tratamento do câncer de mama, recomenda que solicitem para todos os casos marcadores prognósticos e preditivos avaliados por imuno-histoquímica. Procede-se à pesquisa dos receptores de estrogênio e de progesterona em todas as pacientes. Casos com metástases axilares ou à distância indicam pesquisa do produto do oncogene c-erbB-2.

2.4. Os Marcadores Imuno-histoquímicos

2.4.1 Receptor de Estrogênio

Discute-se o papel genotóxico do Estrogênio na iniciação do câncer de mama. Estudos preliminares indicam que isso não ocorre, porém exposição ao hormônio²¹ é um dos principais fatores de risco para progressão. A expressão de receptores de estrogênio é mais freqüente em pacientes com câncer e relacionada com risco aumentado na pós-menopausa. A super-expressão espelha maior sensibilidade do epitélio ao estrogênio, incrementando o risco^{21, 23}.

Desde as observações iniciais de Knight em 1977, a avaliação dos receptores de estrogênio é indispensável na condução de pacientes com câncer primário de mama^{24, 25}. Expressão dos receptores hormonais no momento do diagnóstico é marcador, tanto de prognóstico como preditivo de dependência endócrina para orientar terapia adjuvante²⁶, assim como

probabilidade de recorrência. Observa-se tendência de tumores diagnosticados na pós-menopausa apresentar maior positividade para RE.

Algumas evidências apontam que progressão e proliferação celulares dependem da expressão dos receptores de estrogênio. Quanto maior o tempo de exposição, maior a ação.

O Estrogênio é um importante controlador do crescimento das células tumorais e seus receptores controlam este efeito, sendo marcadores de melhor prognóstico²⁶. Técnicas de DNA recombinante podem determinar a sequência de genes para a síntese de receptores.

Há 2 tipos de receptores:

Alfa: No cromossomo 6

Beta: No cromossomo 14

6 subtipos (ou Isoformas)

A célula epitelial mamária normal apresenta predomínio de receptores beta sobre alfa. Na célula cancerosa, a proporção se inverte. Os receptores alfa promovem proliferação celular, enquanto os tipos beta estimulam apoptose.

2.4.2 Receptor de Progesterona

Presença de receptores de progesterona está associada com melhor resposta à terapia hormonal^{25, 26}. Contudo, há relatos de que a expressão dos receptores de progesterona seja indicador de mau prognóstico. Os receptores de progesterona são induzidos pelo estrogênio, sendo importantes marcadores prognósticos e preditivos.

2.4.3 – Ki67

As informações sobre a cinética de proliferação⁶, advindas da citometria de fluxo e dos métodos imuno-histoquímicos, revelaram a presença de uma proteína nuclear denominada Ki67, cuja concentração está ligada à atividade de divisão celular. Sua expressão está limitada às fases G1 e S do ciclo celular²⁶. O Ki67 pertence à família dos receptores de fatores de crescimento de membrana, relacionado ao receptor para fator de crescimento epidermal. Elevada proliferação celular, refletida pela super-expressão do Ki67, indica pior prognóstico^{26, 83}.

2.4.4 – p53

Localizado no braço curto do cromossomo 17 (p13), o *p53* é um Gene supressor de tumor, que normalmente inibe seu crescimento. Bloqueia a multiplicação de células que sofreram danos no DNA, permitindo o reparo das mesmas^{3, 74}. Alterado, leva à produção de proteína mutante, que se acumula no núcleo das células tumorais, podendo ocorrer em diversos tipos de Neoplasias^{26, 27, 28}. Relaciona-se a defeito genético em 14 a 26% dos cânceres

humanos. Sua expressão em células alteradas, geralmente reflete mutações que estabilizam a proteína. Associa-se a aspectos genéticos, histológicos e imuno-histoquímicos tais como:

- Alto grau histopatológico
- Super-expressão do c-erbB-2
- Aneuploidia
- Receptores Hormonais negativos

A super-expressão é sinal de mau prognóstico⁷⁴. Comparando-se padrões de mutação em diferentes cânceres, pode-se revelar marcadores da história natural da doença. Nos últimos 10 anos, muitos estudos sobre as mutações do *TP53* foram desenvolvidos, sendo a maioria pela International Agency for Research on Câncer⁸⁷. ([www.iarc.fr/P53/.](http://www.iarc.fr/P53/))

Mutações destes genes interferem na Apoptose⁷⁴. Muitos fatores podem influenciar na detecção e avaliação de sua expressão, incluindo a seleção de amostras, desenho do estudo, método de escolha e controle de qualidade.

2.4.5 *Her-2/neu*

Human Epidermal Growth Factor Receptor – 2 (HER2)

Proto-oncogen mapeado no cromossoma 17q21⁸, freqüentemente referido como *HER2/neu* ou c-erbB-2, especificando tanto o gen, como a proteína ou o receptor.

Proteína c-erbB-2 mostra super-expressão sobre a superfície da célula *HER2* quando se encontra 10 à 100 vezes maior do que no tecido epitelial mamário normal. Positividade do *HER2*³⁰ é referida em inúmeros cânceres humanos: Mama, Ovário, Pulmão, Pâncreas e Estômago. Contudo, a super-expressão/amplificação foi melhor investigada em mama, onde é evento precoce. Amplificação gênica do *HER2* ocorre em 92% dos espécimes de câncer de mama que mostram super-expressão da proteína. Portanto, amplificação gênica do c-erbB-2 parece ser pré-requisito para super-expressão da proteína c-erbB-2 na maioria dos cânceres. A alteração que ocorre nestas células é a super-expressão de um produto gênico normal; nenhuma alteração mutacional no produto gênico c-erbB-2 tem sido observada em cânceres humanos. Conseqüentemente, a estrutura da proteína c-erbB-2 amplificada é a mesma daquela encontrada em células saudáveis e normais. O modo como a amplificação e subseqüente super-expressão do c-erbB-2 levam à oncogênese, ainda não foi elucidado.

A c-erbB-2 amplificação/ super-expressão afeta acima de 60% dos Carcinoma Ductais *in situ* (CDIS) e aproximadamente 20% dos Cânceres invasivos (variação de 10 a 40%). Positividade do c-erbB-2 está fortemente associada com os tipos mal diferenciados de CDIS, e raramente com aqueles bem diferenciados, sendo evento precoce no desenvolvimento da doença.

A expressão do c-erbB-2^{26, 29, 30} é um dos mais importantes fatores prognósticos e preditivos de conduta no câncer de mama. Há duas técnicas importantes de avaliação do c-erbB-2: Imuno-histoquímica para a expressão protéica e o FISH (Fluorescence *in situ* Hibridization)^{29, 30} para amplificação do gene c-erbB-2.

Pacientes *HER2*-positivas têm pior prognóstico^{3, 8, 26, 28, 37, 42}. c-erbB-2 positivo está relacionado à agressividade de comportamento clínico, incluindo diminuição da sobrevida. Evidências cumulativas suportam que o c-erbB-2 é um importante fator preditivo para terapia-alvo com trastuzumab. Câncer de Mama c-erbB-2 positivo pode ser resistente à terapia hormonal, embora dados conclusivos ainda não estejam disponíveis. Evidências apontam que positividade para c-erbB-2 é um marcador confiável de sensibilidade às antraciclinas. Envolvimento linfonodal e metástases à distância também estão associados à expressão do marcador.

Ross e Fletcher³¹ analisaram retrospectivamente 47 estudos envolvendo mais de 15000 pacientes com câncer de mama. Na maioria dos estudos (60%) e entre as pacientes (67%), expressão do c-erbB-2 foi um preditor independente de prognóstico em análise multivariada. Slamon (1987) afirmou que amplificação gênica do c-erbB-2 foi preditor independente de Sobrevida Global e Intervalo livre de doença em paciente com câncer de mama axila positiva. Corroboram estes dados Borg et al,1990, Gusterson et al 1992, McCann et al, 1991, Paik et al 1990, Rilke et al, 1991, Seshadri et al 1993, Slamon et al 1987, 1989, Thor et al, 2000 e Toikkanen et al, 1992.

2.5 Aplicação da imuno-histoquímica em câncer de mama

2.5.1 Imuno-histoquímica X Progressão para invasão

O carcinoma ductal *in situ* é a entidade precursora da maioria dos cânceres de mama³². Há diferentes modos de progressão para invasão, dependentes da histologia e do grau de diferenciação¹¹. Alterações na expressão das proteínas envolvendo proliferação e apoptose podem determinar a evolução. Muitas lesões infiltrantes são acompanhadas por uma variedade de componentes não invasivos³⁴. Para compreender a importância destes componentes é fundamental o conhecimento da biologia molecular. As hiperplasias ductais apresentam Ki67 elevado (intensa proliferação) e superexpressão de p53 e c-erbB-2. Ao comparar lesão *in situ* com lesão invasiva de mesma diferenciação histológica¹¹ observa-se índice de proliferação mais elevado na primeira, enquanto alterações na expressão das demais proteínas estariam discretamente aumentadas nas lesões invasivas. As principais alterações na expressão, tanto de proliferação como de apoptose, ocorrem na transição de hiperplasia para CDIS. A transição de CDIS para carcinoma invasor com mesmo grau de diferenciação parece determinar alterações menos intensas.

Idvall³³ comparou a expressão imuno-histoquímica dos CDIS, da era pré-rastreamento mamográfico e com aqueles da era pós-rastreamento. Não houve diferenças significativas na expressão dos RE, RP, Ki67, p53 e c-erbB-2, além de outros parâmetros, concluindo que os CDIS nos 2 períodos não apresentam comportamento diferente quanto ao potencial de invasão.

2.5.2 – Imuno-histoquímica X Prognóstico

Sobrevida Global

Intervalo Livre de Doença

Diferentes evoluções clínicas entre os cânceres de mama com características patológicas semelhantes¹⁰ suscitaram investigações acerca de outros parâmetros de significado prognóstico. A análise do comportamento biológico dos subtipos histopatológicos de carcinomas *in situ* da mama revela que a taxa de recorrência está relacionada com o tamanho nuclear da lesão primária. Mais de 80% destas lesões apresentam aneuploidia, com distribuição de DNA semelhante àquela observada nos tumores invasivos. Outros aspectos importantes são comedo-necrose, elevada atividade proliferativa, baixa concentração de receptores esteróides e super-expressão de c-erbB-2 e p53, que indicam comportamento agressivo. Carcinomas *in situ* com núcleos menores, tanto CLIS quanto CDIS, mais freqüentemente são diplóides, apresentam baixa proliferação e super-expressão de c-erbB-2 e p53.

A análise isolada de alguns marcadores^{36, 37, 38, 40, 76, 81} é importante para avaliação da sobrevida e recidiva da doença. Tamanho tumoral à macroscopia e expressão de RE e RP são as variáveis que afetam a sobrevida de pacientes com câncer de mama invasivo³⁵. Avaliação de RE pré e pós-tratamento⁵⁰ pode prever sobrevida livre de doença. Expressão do p53 está significativamente associada com redução da sobrevida e menor intervalo livre de doença. Contudo, há relatos de que expressão de p53 não é importante para avaliar sobrevida global³⁹.

A avaliação do c-erbB-2 apresenta três áreas de interesse no contexto do câncer de mama⁸: 1 – Valor prognóstico; 2 – Valor preditivo potencial quanto à resposta a determinadas terapêuticas antineoplásicas (Químio/Hormônio-terapias); 3 – Pré-requisito para tratamento com Herceptin (trastuzumab).

A expressão nuclear elevada do Ki67 relaciona-se com predição de recorrência da doença, porém, sem diferença na sobrevida global^{10, 39}. Ki67 no tumor residual foi o melhor fator preditivo para sobrevida livre de recidiva^{50, 52}.

Observam-se algumas dificuldades de avaliação prognóstica do câncer de mama como a ocorrência em mulheres com menos de 35 anos⁴¹. Em outras situações como tipos menos frequentes (Ex:carcinoma de Paget),^{43, 44}, o perfil imuno-histoquímico não se mostrou útil.

2.5.3 Imuno-histoquímica X Metástases

Marcadores imuno-histoquímicos não apresentam elevado valor preditivo para metástase linfonodal⁷⁹.

A expressão do p53 está relacionada com a agressividade do tumor primário³⁹ baseada no padrão específico das metástases para tecidos moles, comparado a ossos e vísceras. Elevada expressão do Ki67 no tumor primário não se associa com tipo de metástase. Observa-se importante correlação entre expressão do c-erbB-2 no tumor primário e metástase à distância.

2.5.4 Imuno-Histoquímica X Resposta à QT

O interesse sobre o comportamento biológico dos cânceres de mama e seus precursores concentra especial atenção na resposta aos quimioterápicos, principalmente na quimio-prevenção⁴⁵. A necessidade de estudar os biomarcadores e suas expressões se faz presente para de validar fatores preditivos e prognósticos, além de selecionar pacientes para quimio-prevenção e monitoramento das lesões de alto risco.

Os marcadores como preditivos de resposta à QT adjuvante e neo-adjuvante

Os marcadores moleculares^{46, 47, 75, 80, 82} podem prever resposta à quimioterapia em câncer de mama. A relação entre a expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular e a evolução de pacientes em quimioterapia neo-adjuvante⁴⁸ reflete modelo de interação entre tratamento citotóxico e parâmetros clínico-biológicos. A apoptose induzida pelo tratamento antineoplásico é um destes mecanismos. Por outro lado, a super-expressão de genes que inibem apoptose pode prever resistência às drogas⁶.

A heterogeneidade dos cânceres de mama torna necessário avaliar os diversos marcadores moleculares preditivos para se individualizar o tratamento⁴⁹. Receptores de Estrogênio e de Progesterona, p53, Ki67, c-erbB-2 são fatores preditivos de resposta às terapêuticas endócrina, biológica e citotóxica^{50, 77}.

A super-expressão do c-erbB-2 é fator preditivo independente de resposta à QT neo-adjuvante^{6, 8, 53}. Paciente c-erbB-2 positivo apresenta probabilidade de resposta patológica completa, chegando a 4,54 vezes daquele negativo. c-erbB-2, RE e RP geralmente mantêm-se estáveis durante todo o tratamento. A relação entre expressão de c-erbB-2 e susceptibilidade a medicamentos/radiação demonstra que a amplificação do marcador é um critério de susceptibilidade aos antracíclicos. Em cânceres precoces, somente o c-erbB-2 apresenta-se como fator preditivo de resposta às quimio-endocrinoterapias neo-adjuvantes. ER, PR, Ki67 e p53 falharam em prever resposta nestes casos.

Quimioterapia parece afetar a célula do câncer de mama em seu ciclo, mas pouco altera a agressividade biológica. A resposta destas células depende de sua capacidade de caminhar para a apoptose. Os dois principais inibidores de apoptose, o bcl-2 e o p53, podem modular resposta do câncer de mama à quimioterapia primária^{6, 47, 48}. p53 é importante fator preditivo independente de baixa resposta à Epirrubicina, mas marcador de susceptibilidade ao tratamento com 5-Fluoruracil, Doxorubicina e Etoposide^{6, 19}.

Elevada expressão do Ki67 associada aos RE/RP negativos constitui fator preditivo para resposta patológica completa à QT^{50, 51 52}.

2.5.5 – Imuno-Histoquímica X Resposta à HT

Receptores de Estrogênio e de Progesterona permanecem como únicos marcadores preditivos e bem estabelecidos para resposta à terapia endócrina^{49, 54, 78}, embora o c-erbB-2 seja citado com frequência.

Na nona edição do Congresso de St. Gallen/2005²², a proposta de divisão dos cânceres de mama em três categorias, de acordo com a resposta à terapia endócrina com Tamoxifen, confirmou estes dados e incluiu o Ki67 (Quadro 2).

Quadro 2 - St. Gallen 2005- Tumores de Mama

Endócrino Responsivo	Não responsivo à ter. endócrina	Resposta incerta
Elevados RE e RP e Baixo HER-2 ou nulo e Baixo Ki67	RE e RP negativos	RE/RP baixos (menos de 10%) ou RP negativo ou HER 2 elevado ou Ki67 elevado

Algumas alterações moleculares ocorrem quando há resistência ao tamoxifen em cânceres de mama⁵⁵. Baixa resposta à terapia antiestrogênica pode ser justificada em casos de Positividade dos Receptores de Estrogênio e de Progesterona com elevada expressão de c-erbB-2 (RE e RP positivos e c-erbB-2 positivo)^{55, 56, 57}. Mulheres pré-menopausa RE positivo, mesmo com c-erbB-2 positivo, respondem bem ao tratamento antiestrogênico.

Nos casos de Carcinoma Ductal *in situ*^{54, 57}, somente pacientes RE + se beneficiam do uso de tamoxifen. Quanto maior o grau tumoral, menores as expressões de RE e RP.

2.6 Lesões Palpáveis X Lesões Não Palpáveis

Até o surgimento do primeiro mamógrafo dedicado em 1966, a detecção de lesões não palpáveis era acontecimento raro, geralmente achado incidental, em espécimes de biópsia mamária. Salomon em 1951⁵⁸, publicou artigo sobre as microcalcificações em tecido tumoral visíveis na mamografia, ainda realizada de forma precária. A partir do desenvolvimento da Radiografia da Mama, algumas lesões puderam ser demonstradas sem correspondência com o exame clínico. Com o advento de mamógrafos de alta resolução nos anos 80, diagnosticou-se, por imagem, grande parte dos cânceres. Há cerca de duas décadas, Carcinoma Ductal *in situ* correspondia a menos de 1% das patologias malignas, chegando hoje a 15-25%⁵⁹. Inúmeras biópsias evidenciando lesões menores que 1,0 cm e, não raro, *in situ*, são realidade nos grandes Serviços. A mamografia⁵⁸ é considerada o mais sensível teste de rastreio para o carcinoma de mama clinicamente oculto, porém pouco específico. American Cancer Society e American College of Radiology relataram que quase metade das mulheres adultas norte-americanas se

submetem ao rastreio mamográfico anual e que destas, 0,5 a 2,0% são levadas à biópsia, baseado em achados radiológicos não palpáveis, resultando em um milhão de cirurgias.

Detecção de pequenas lesões mamárias^{8, 60} tem se tornado freqüente com os programas de rastreamento. Apresentam, invariavelmente, estado linfonodal axilar negativo. Embora pacientes com axila negativa apresentem melhor prognóstico, cerca de 30% desenvolverão metástases a distância. Neste grupo, é importante identificar mulheres de elevado risco. Carcinoma Ductal *in situ*, cuja imagem mamográfica mais comum é grupamento de microcalcificações, deve ser considerado como de prognóstico reservado. A classificação, o diagnóstico e o tratamento cirúrgico⁶¹ de lesões mamárias de risco de transformação neoplásica representam alguns dos mais importantes objetivos da pesquisa em Mastologia.

A classificação radiológica das imagens mamográficas obedece à proposta do Colégio Americano de Radiologia (ACR), o BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System)⁶². Pacientes com imagens categorizadas em 4 e 5 representam o grupo com indicação formal para investigação (citológica ou histológica). Pacientes com laudo mamográfico categoria 3, eventualmente podem ser submetidas a investigação anátomo-patológica.

A localização das lesões mamárias não palpáveis é realizada^{59, 60, 63, 64}, por marcação estereotáxica com colocação de fio metálico, permitindo biópsia para obtenção do espécime. Adotada desde 1973 por Threatt, a localização percutânea com agulha visa marcar radiograficamente a região contendo a lesão, provendo menor quantidade de tecido excisado, com acuracidade e tolerabilidade⁵⁸. A Ultra-sonografia e a Ressonância Magnética também podem ser utilizadas para este fim.

O método diagnóstico, seja para lesões palpáveis ou não palpáveis, deve coadunar precisão e planejamento de conduta⁶⁵, provendo segurança ao se avaliar imagem mamográfica anormal e/ou massa mamária palpável suspeita.

Lesões palpáveis podem ser submetidas à punção por agulha fina, biópsias incisional/excisional, com ou sem corte de congelção^{61, 65}.

3 – Objetivos

3.1 – Objetivo Geral

Comparar o comportamento biológico, baseado nos perfis histopatológico e imuno-histoquímico, de 2 grupos de câncer de mama: Grupo 1: Lesões não palpáveis e Grupo 2: Lesões palpáveis.

3.2 – Objetivo Específico

Comparar os parâmetros histopatológicos (grau nuclear, formação tubular e índice mitótico) com os imuno-histoquímicos (receptores de estrogênio, receptores de progesterona, Ki67, p53 e c-erbB-2).

4 – Sujeitos e Método

4.1 Tipo de estudo e Casuística

Foram analisados prontuários de 295 pacientes (296 casos) com câncer de mama (invasivos e *in situ*), confirmados pela Anatomia Patológica, em estudo retrospectivo, analítico e horizontal, do Instituto Oncológico de Juiz de Fora, no período de dezembro de 1999 a setembro de 2005, divididos em dois grupos.

Grupo 1: Lesões não palpáveis. Cânceres de mama detectados exclusivamente por mamografia, compreendendo as seguintes lesões: microcalcificações suspeitas, nódulo(s) ou distorção(s) arquitetural(s), encerrando 118 casos (117 pacientes). Foi incluído um caso de câncer de mama em achado incidental de mamoplastia redutora.

Grupo 2: Lesões palpáveis. Tumores de mama detectados ao exame clínico como nódulo(s), massa(s) ou condensação(s), com ou sem estudo imaginológico (mamografia, ultra-sonografia ou ressonância magnética), compreendendo 178 casos (178 pacientes).

4.2 Análise Radiológica

Obtenção do espécime

O diagnóstico no Grupo 1 ocorreu a partir de achado em mamografia de alta resolução utilizada para rastreamento, com exame clínico normal. Em um caso a lesão foi detectada em análise de material obtido de mamoplastia redutora (achado incidental). A classificação radiológica adotada foi a do ACR (Colégio Americano de Radiologia), o BI-RADS (vide item 9-Anexos, sub-item 9.3). A indicação de biópsia ocorreu para todos os casos com Categorias 4 (Suspeita) e 5 (Altamente Suspeita). Algumas pacientes com Categoria 3 também foram submetidas a biópsia por dificuldades de seguimento clínico-radiológico. Método estereotáxico com aparelho DMR *General Electric*, contendo unidade específica, seja para marcação com fio metálico (agulha de Kopans), seja para biópsia percutânea foi utilizado em todos os casos do Grupo 1, exceto no achado incidental. As Biópsias percutâneas foram realizadas com agulha de 14 gauge (“Core-biopsy”). Confirmação radiológica e histológica de remoção da área suspeita foi realizada de rotina. Anestesia geral foi empregada em todos os casos de excisão cirúrgica e local para as biópsias percutâneas. Material foi, a seguir, imerso em formol tamponado 10% e enviado ao laboratório de Anatomia Patológica. Neste grupo nenhuma lesão foi submetida ao corte de congelação.

Pacientes do Grupo 2 foram submetidas a biópsias excisional ou incisional, com ou sem congelação, e também através de punção percutânea com agulha de 14 gauge (“Core-biopsy”). Todo material submetido à biópsia de congelação foi posteriormente avaliado em corte de parafina. À biópsia incisional ou excisional, seguiu-se o procedimento definitivo quando indicado (Segmentectomias, Mastectomias e Linfadenectomias), de acordo com o mesmo protocolo para análise em laboratório de Anatomia Patológica descrito para o grupo 1.

Tabela 1 – Modalidade de Biópsia

Grupo 1		Grupo 2	
Modalidade de Biópsia	Frequência	Modalidade de Biópsia	Frequência
Estereotaxia	95,1% (105/110)	Congelação	57,4% (93/162)
Percutânea	3,6% (4/110)	Parafina	42,6% (69/162)
Achado Incidental	0,9% (1/110)		Excisional 66,7% (46/69)
			Incisional 30,4% (21/69)
			Percutânea 2,9% (2/69)

4.3 Metodologia de Análise Histopatológica

Estudo histopatológico: As amostras, blocos de parafina, foram submetidas a cortes histológicos de 4 micra de espessura e montadas em lâminas para coloração de rotina em H&E (Hematoxilina e Eosina). As lâminas foram revisadas e graduadas de acordo com os critérios de Bloom & Richardson (modificado por Elston & Ellis)¹⁵ (Quadro 3). Considerou-se:

- Percentual de diferenciação tubular
- Avaliação do pleomorfismo nuclear
- Índice mitótico

Quadro 3 - Graduação Bloom & Richardson (modificada por Elston & Ellis)

1 Formação tubular	Escore
Maioria do tumor (>75%)	1
Grau moderado (10-75%)	2
Pouca formação (<10%)	3
2 Pleomorfismo Nuclear	
Núcleos pequenos, regulares e uniformes	1
Aumento moderado de tamanho e variabilidade	2
Marcada variação e pleomorfismo	3
3 Contagem mitótica *	
0-5 mitoses	1
6-10 mitoses	2
>10 mitoses	3

* Pode haver variações de acordo com o Microscópio utilizado⁹¹. A avaliação dos pontos para contagens mitóticas, de acordo com a área do campo de maior aumento, encontra-se em Anexos (Item-9, sub-item 9.4) Formação Tubular, Grau Nuclear e Índice Mitótico foram considerados para a determinação de agressividade. Quanto mais elevados, mais agressivo o tumor.

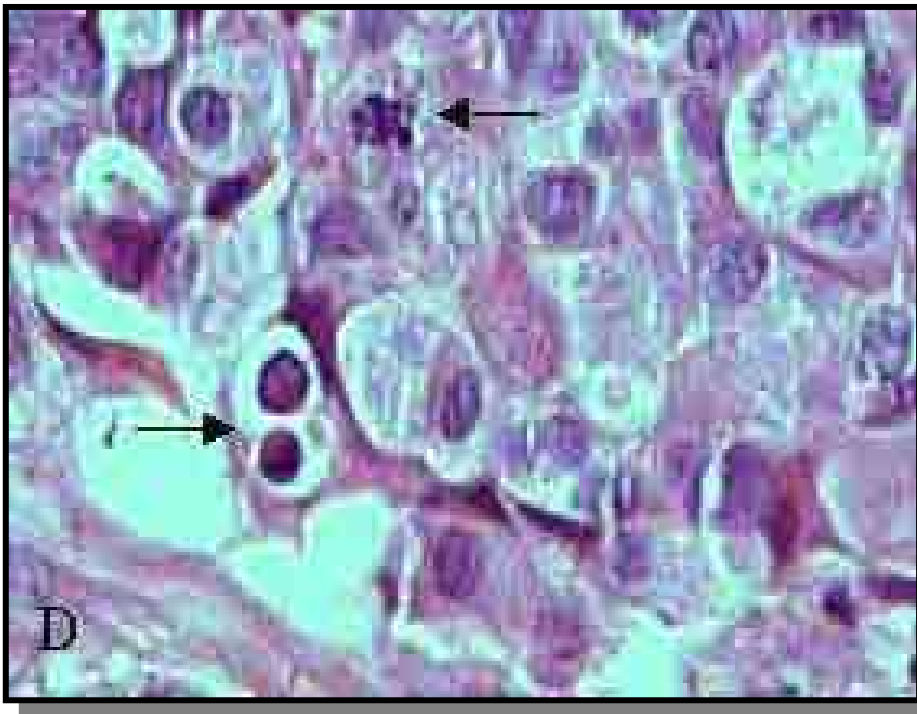


Figura 1 - Mitose atípica (setas) em Carcinoma Invasivo Grau III **H&E**. Aumento 400x⁸⁷.

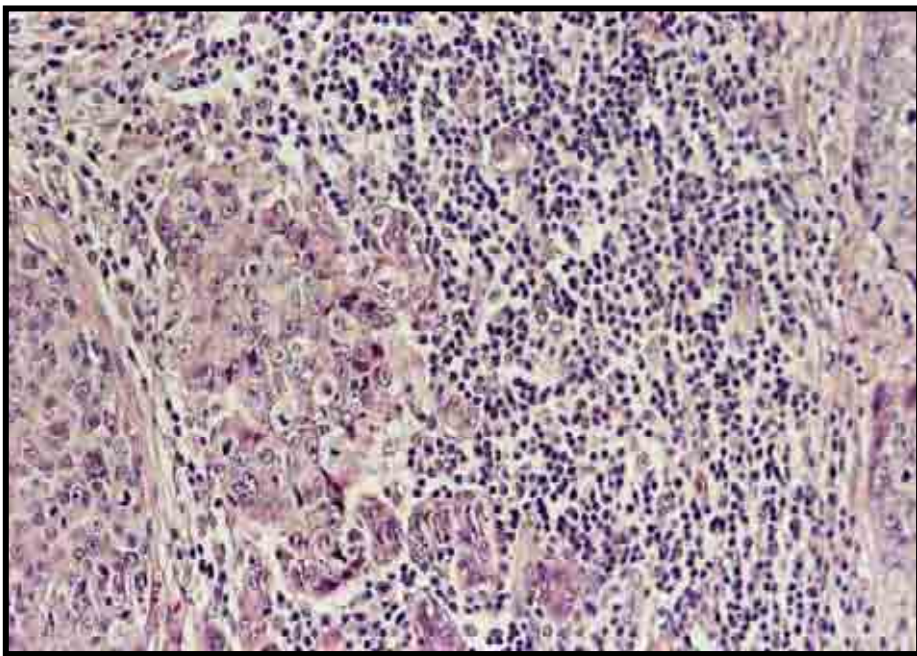


Figura 2 - Carcinoma Ductal Infiltrante. Formação Tubular 3. **H&E**. Aumento 100x⁸⁷.

4.4 Metodologia de avaliação Imuno-Histoquímica

Avaliação imuno-histoquímica para diagnóstico utilizou o método de avidina-biotina-peroxidase e resgate do sítio antigênico por indução de calor. (vide item 9-Anexos, sub-item 9.5)

O nível de expressão²⁶ considerou o percentual de células com coloração específica. Mil células foram contadas em cada campo aleatório. A coloração para receptores de estrogênio e de progesterona apresenta padrão predominantemente nuclear. O p53 é detectado exclusivamente dentro do núcleo, assim como Ki67. Para c-erbB-2, há forte coloração de membrana, embora ocasionalmente possa corar citoplasma.

Quadro 4 - Anticorpos para imuno-histoquímica

Anticorpo	Antígeno	Clone
α -p53	Proteína p53 tipo selvagem e mutante	DO7
α -Ki67	Proteína Ki67	MIB-1
α -RE	Receptor de estrogênio	6F11+1D5
α -RP	Receptor de progesterona	312
α -erbB-2	Oncoproteína c-erbB-2	Policlonal

A análise imuno-histoquímica da expressão da proteína Ki67 e p53 foram consideradas positivas quando um padrão nuclear distinto foi observado. A percentagem de células positivas foi analisada em 10 campos de maior aumento do microscópio (400x) em áreas aleatórias e adequadas à interpretação.. Os “cut-offs” utilizados para quantificar o número de células

positivas foram: 0(Negativo):<10% de células coradas, 10-25%, 26-50%, 51-75% e >75% de células positivas (pode ser substituído por escore). Foi considerado negativo valor menor que 10%. Para análise, considerou-se 0 à 25%, 26 à 50%, 51 à 75% e > 75%.

Crítérios de Interpretação (Receptores Hormonais)

Negativo: Ausência de células coradas

+ (uma cruz) : Presença de células ocasionalmente coradas

++ (duas cruces): 1/3 das células coradas em moderada intensidade

+++ (três cruces): até 2/3 de células coradas em moderada ou forte intensidade

++++ (quatro cruces): mais de 2/3 de células coradas em moderada ou forte intensidade

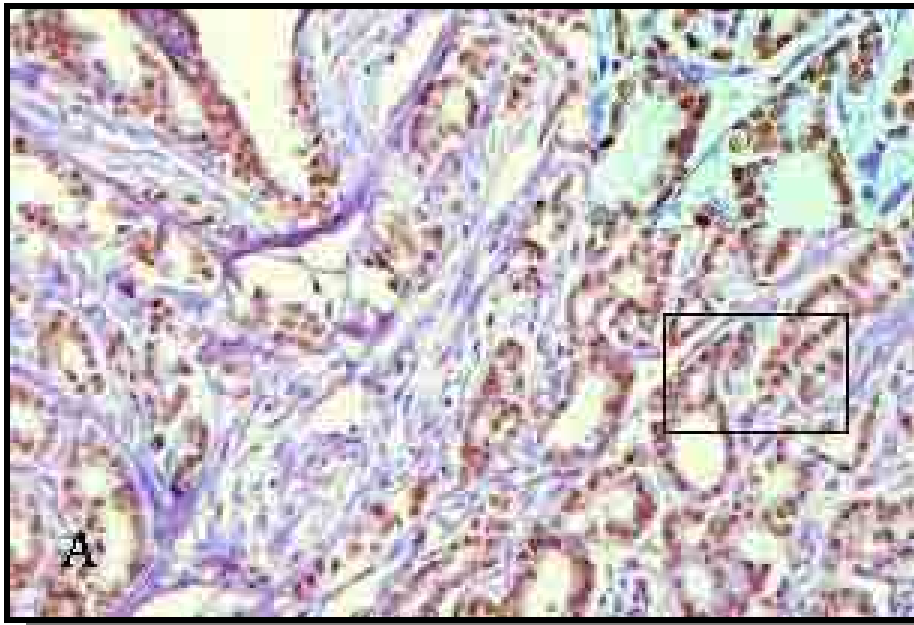


Figura 3 – Imunomarcção positiva para Receptor de estrogênio (RE) na maioria das células tumorais de CDI grau I. Aumento original 100x⁸⁷.

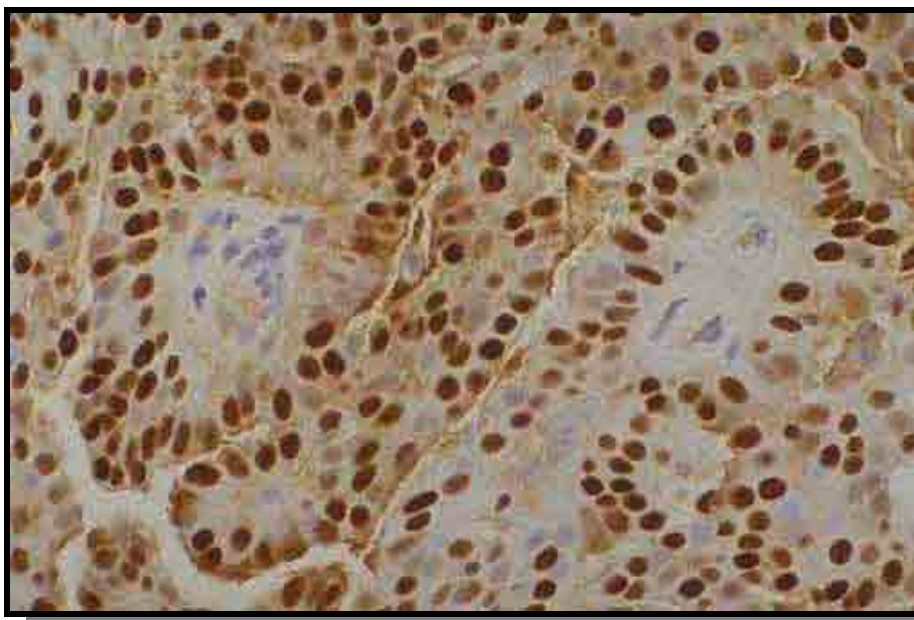


Figura 4 - Imunomarcção positiva para Receptor de Progesterona(RP) em células tumorais de CDI Grau I. Aumento de 200x.

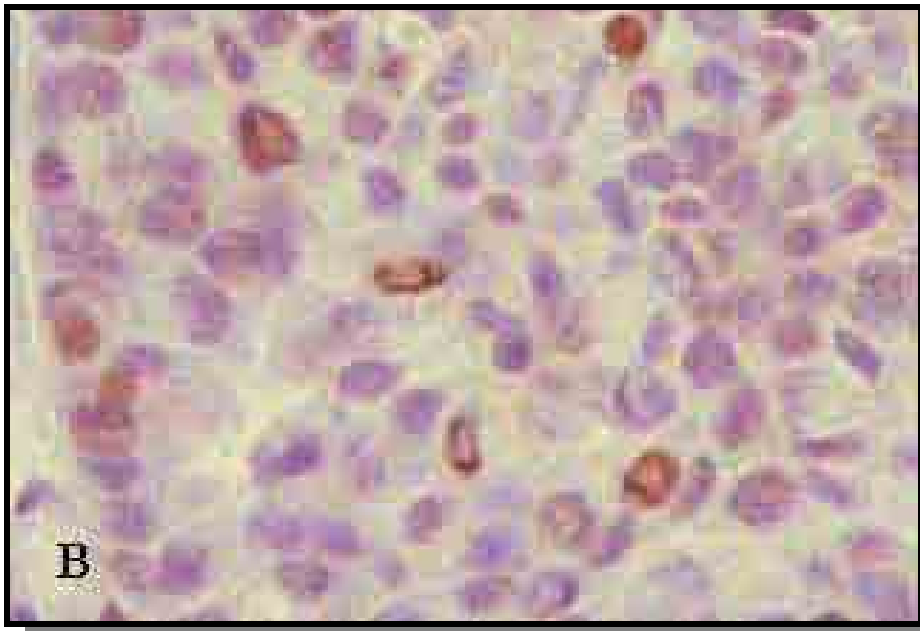


Figura 5 - Positividade para p53 em CDI grau II. 400x⁸⁷.

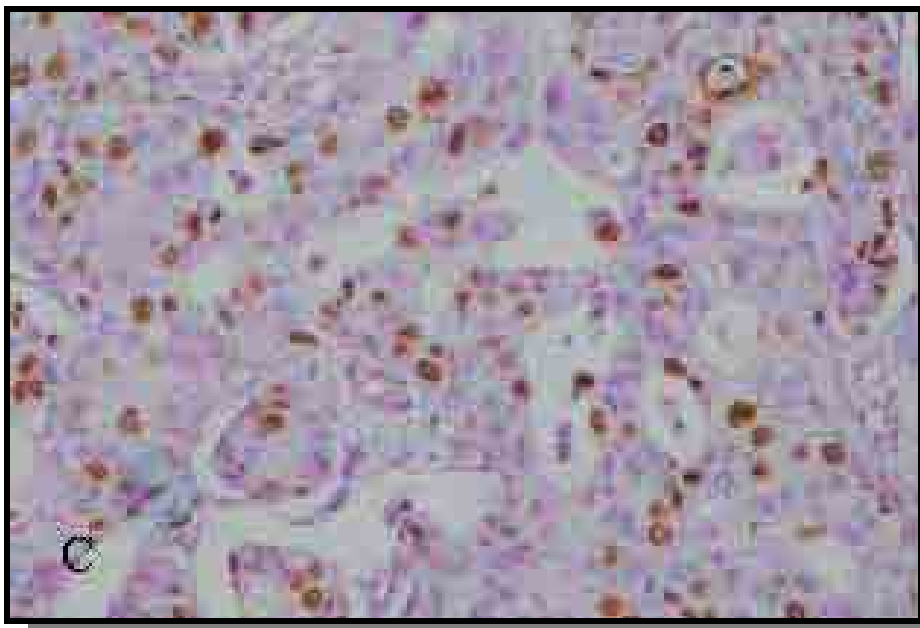


Figura 6 - CDI grau III exibindo grande número de 100x⁸⁷ · Células positivas para Ki67.

Para análise do c-erbB-2 utilizou-se o sistema de interpretação do Hercept system da DAKO Co. EUA (Quadro 5).

Quadro 5 - Sistema de interpretação Herceptest DAKO a 95°C

Padrão de imunomarcção	Pontuação	Conclusão (presença de superexpressão da oncoproteína HER2-neu/c-erbB-2)
Ausência ou menos de 10% de imunopositividade na membrana das células tumorais	0	Negativo
Imunopositividade fraca em parte da membrana em mais de 10% das células tumorais	1+	Negativo
Imunopositividade fraca a moderada em toda a membrana em mais de 10% das células tumorais	2+	Fracamente positivo
Imunopositividade intensa em toda a membrana em mais de 10% das células tumorais	3+	Fortemente positivo

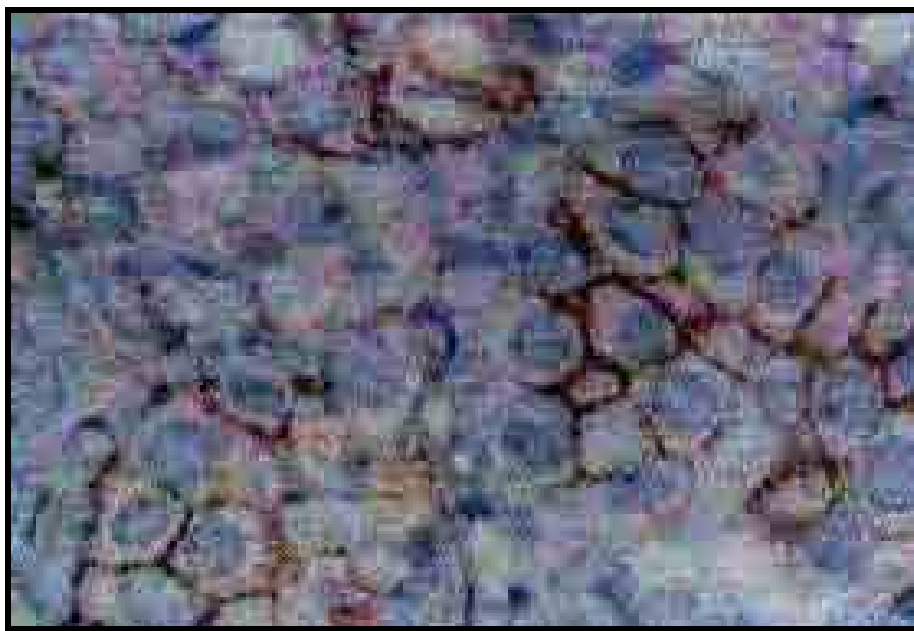


Figura 7 - Positividade para c-erbB-2 / CDI Grau II (400x)

O controle positivo e negativo da reação foi realizado utilizando-se cortes histológicos de carcinoma mamário. As medidas quantitativas foram expressas em porcentagem de células apoptóticas contadas em objetivas de maior aumento (400x). Áreas tumorais necróticas ou com intenso infiltrado inflamatório foram evitadas. Áreas periféricas respeitando os limites tumorais foram priorizadas na análise.

4.5 Metodologia Estatística

As variáveis categóricas (RP, RE, GN, GH, GM, etc) foram descritas por frequências relativas (percentagens) e as numéricas (idade e linfonodos dissecados) por médias e desvios-padrão. Para comparações entre os grupos foram utilizados os testes **t student** para idade e número de linfonodos dissecados e **qui-quadrado ou exato de Fisher** para os demais. O nível de significância adotado foi de **p<0,05**.

Análise estatística foi efetuada para os parâmetros Histopatológicos (Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico) e Imuno-histoquímicos (Receptor de Estrogênio, Receptor de Progesterona, Ki67, p53 e c-erbB-2) em cada grupo, procedendo-se também ao cruzamento destas variáveis (histopatológicas e imuno-histoquímicas) entre si e, a seguir, dentro de cada grupo para avaliar a agressividade biológica. Significância estatística foi analisada para cada parâmetro.

5 – Resultados

5.1 Idade

A média de idade no Grupo 1 foi de 56,9 anos, variando de 35 a 90, enquanto no Grupo 2 a média foi de 55,2 anos, variando de 26 à 87, não havendo diferença estatisticamente significativa.

5.2 Tamanho tumoral

No Grupo 1, os tumores variaram de 0,3 à 4,2 cm, com média de 1,1 cm. No Grupo 2, variaram de 1,4 à 12,6 cm, com média de 3,8 cm. ($p < 0,001$)

5.3 Tipo Histológico

Carcinoma Ductal *in situ* correspondeu a 30,7% (35/114) dos casos no Grupo 1, e 2,4% (4/168) no Grupo 2. Neste grupo, Carcinoma Ductal Invasor correspondeu a 81,5% (137/168 casos) enquanto no Grupo 1 a 53,5% (61/114 casos). Outros tipos histológicos correspondiam a menos de 20% em ambos os grupos. (Tabela 2).

Tabela 2 – Tipo Histológico

Tipo Histológico	Grupo 1	Grupo 2
Carc. Ductal Invasor	53,5% (61/114)	81,5% (137/168)
Carc. Ductal in situ	30,7% (35/114)	2,4% (4/168)
Carc. Lobular Invasor	8,8% (10/114)	8,3% (14/168)
Carc. Lobular in situ	1,7% (2/114)	-
Carc. Tubular	3,5% (4/114)	-
Carc. Mucinoso	-	3,0% (5/168)
Outros	1,7% (2/114)	4,8% (6/168)

p<0,001

5.4 Relação Histopatologia / Imuno-Histoquímica

Análise Geral e comparativa das variáveis histopatológicas e Imuno-histoquímicas

Considerados os dois grupos indistintamente, comparou-se a incidência das variáveis histológicas (Grau Nuclear, Proliferação Tubular e Índice Mitótico) com a dos marcadores imuno-histoquímicos (Receptor de Estrogênio, Receptor de Progesterona, Ki67, p53 e c-erbB-2).

A - Receptores Hormonais e Variáveis Histopatológicas

Grau Nuclear

Receptores Hormonais X Formação Tubular

Índice Mitótico

A expressão dos Receptores de Estrogênio apresentou incidência inversamente proporcional a Grau Nuclear e Formação Tubular ($p=0,001$). Quando a expressão de RE era nula, a incidência de Grau Nuclear 3 e Formação Tubular 3 foram acima de 50%. Por outro lado, quando a expressão de RE era de 4+/4, houve maior incidência de Formação Tubular 1. Encontrou-se Grau Nuclear e Formação Tubular menores nos casos de maior expressão dos Receptores Hormonais.

A relação dos Receptores Hormonais com o Índice Mitótico apresentou diferenças não tão marcantes. Ainda assim, observou-se tendência de cânceres de mama com baixa expressão de RE e RP apresentarem menor incidência de Índice Mitótico 1, assim como aqueles com elevada expressão de RE e RP apresentarem menor incidência de Índice Mitótico 3. ($p<0,05$).

Tabela 3 – Grau Nuclear X Receptores de Estrogênio

GN	RE				
	0	1+	2+	3+	4+
1	9,2% (6/65)	29,4% (5/17)	45,5% (10/22)	28,6% (18/63)	30,0% (12/40)
2	33,8% (22/65)	47,1% (8/17)	36,4% (8/22)	46,0% (29/63)	35,0% (14/40)
3	56,9% (37/59)	23,5% (4/17)	18,2% (4/22)	25,4% (16/63)	35,0% (14/40)

$p=0,001$

Tabela 4 – Grau Nuclear X Receptores de Progesterona

GN	RP				
	0	1+	2+	3+	4+
1	14,3% (10/70)	15,4% (4/26)	30,2% (13/43)	22,0% (9/41)	57,7% (15/26)
2	30,0% (21/70)	42,3% (11/26)	44,2% (19/43)	53,7% (22/41)	26,9% (7/26)
3	55,7% (39/70)	42,3% (11/26)	25,6% (11/43)	24,4% (10/41)	15,4% (4/26)

$p<0,001$

Tabela 5 – Formação Tubular X Receptores de Estrogênio

FT	RE	0	1+	2+	3+	4+
	1		9,4% (6/64)	23,5% (4/17)	40,9% (9/22)	23,8% (15/63)
2		29,7% (19/64)	17,6% (3/17)	36,4% (8/22)	42,9% (27/63)	41,0% (16/39)
3		60,9% (39/64)	58,8% (10/17)	22,7% (5/22)	33,3% (21/63)	33,3% (13/39)

p=0,004

Tabela 6 – Formação Tubular X Receptores de Progesterona

FT	RP	0	1+	2+	3+	4+
	1		11,6% (8/69)	11,5% (3/26)	37,2% (16/43)	17,1% (7/41)
2		29,0% (20/69)	26,9% (7/26)	37,2% (16/43)	43,9% (18/41)	48,0% (12/25)
3		59,4% (41/69)	61,5% (16/26)	25,6% (11/43)	39,0% (16/41)	12,0% (3/25)

p<0,001

Tabela 7 – Índice Mitótico X Receptores de Estrogênio

IM	RE	0	1+	2+	3+	4+
	1		45,3% (29/64)	64,7% (11/17)	77,3% (17/22)	68,3% (43/63)
2		37,5% (24/64)	29,4% (5/17)	18,2% (4/22)	27,0% (17/63)	17,9% (7/39)
3		17,2% (11/64)	5,9% (1/17)	4,5% (1/22)	4,8% (3/63)	-

p=0,005

Tabela 8 – Índice Mitótico X Receptores de Progesterona

IM	RP	0	1+	2+	3+	4+
	1		43,5% (30/69)	69,2% (18/26)	74,4% (32/43)	68,3% (28/41)
2		40,6% (28/69)	19,2% (5/26)	23,3% (10/43)	31,7% (13/41)	4,0% (1/25)
3		15,9% (11/69)	11,5% (3/26)	2,3% (1/43)	-	-

p<0,001

B – c-erbB-2 e Variáveis Histopatológicas

A relação entre o marcador c-erbB-2 e as variáveis histopatológicas não apresentou diferença estatisticamente significativa, embora pudesse ser observado que a super-expressão de c-erbB-2 estivesse relacionada com Grau Nuclear, Formação Tubular e, principalmente, Índice Mitótico elevados (*p* variando de 0,113 a 0,451).

Tabela 9 – Grau Nuclear X c-erbB-2

GN	c-erbB-2			
	0	1	2	3
1	27,6% (34/123)	18,2% (4/22)	23,5% (4/17)	21,4% (9/42)
2	39,8% (49/123)	54,5% (12/22)	35,3% (6/17)	30,9% (13/42)
3	32,5% (40/123)	27,3% (6/22)	41,2% (7/17)	47,6% (20/42)

p=0,451

Tabela 10 – Formação Tubular X c-erbB-2

FT	c-erbB-2			
	0	1	2	3
1	19,7% (24/122)	31,8% (7/22)	11,8% (2/17)	26,8% (11/41)
2	41,0% (50/122)	22,7% (5/22)	41,2% (7/17)	24,4% (10/41)
3	39,3% (48/122)	45,5% (10/22)	47,1% (8/17)	48,8% (20/41)

p=0,113

Tabela 11 – Índice Mitótico X c-erbB-2

IM	c-erbB-2			
	0	1	2	3
1	70,5% (86/122)	50,0% (11/22)	58,8% (10/17)	61,0% (25/41)
2	23,8% (29/122)	40,9% (9/22)	35,3% (6/17)	26,8% (11/41)
3	5,7% (7/122)	9,1% (2/22)	5,9% (1/17)	12,2% (5/41)

p=0,422

C – Ki67 e Variáveis Histopatológicas

O marcador Ki67 apresentou diferenças na relação com as variáveis histopatológicas. Expressão de Ki67 aumentada esteve relacionada com maior incidência de Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico elevados. ($p<0,05$)

Tabela 12 – Grau Nuclear X Ki67

GN	Ki67			
	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
1	31,3% (45/144)	10,5% (4/38)	16,7% (2/12)	-
2	42,4% (61/144)	34,2% (13/38)	33,3% (4/12)	30,0% (3/10)
3	26,4% (38/144)	55,3% (21/38)	50,0% (6/12)	70,0% (7/10)

$p=0,002$

Tabela 13 – Formação Tubular X Ki67

FT	Ki67			
	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
1	28,7% (41/143)	5,3% (2/38)	-	10,0% (1/10)
2	32,2% (46/143)	44,7% (17/38)	58,3% (7/12)	30,0% (3/10)
3	39,2% (56/143)	50,0% (19/38)	41,7% (5/12)	60,0% (6/10)

$p=0,014$

Tabela 14 – Índice Mitótico X Ki67

IM	Ki67			
	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
1	75,5% (108/143)	55,3% (21/38)	16,7% (2/12)	10,0% (1/10)
2	18,9% (27/143)	39,5% (15/38)	66,7% (8/12)	60,0% (6/10)
3	5,6% (8/143)	5,3% (2/38)	16,7% (2/12)	30,0% (3/10)

$p<0,001$

D – p53 e Variáveis Histopatológicas

Exceto com o Índice Mitótico, a expressão de p53 não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando relacionada com os parâmetros histopatológicos. A baixa ou nula expressão de p53 (0 a 25%) esteve relacionada com Grau Mitótico 1 em 70,5% dos casos (98/139).

Tabela 15 – Grau Nuclear X p53

GN	P53			
	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
1	30,2% (42/139)	14,3% (3/21)	13,0% (93/23)	15,0% (3/20)
2	38,1% (53/139)	61,9% (13/21)	34,8% (8/23)	35,0% (7/20)
3	31,7% (44/139)	23,8% (5/21)	52,2% (12/23)	50,0% (10/20)

p=0,064

Tabela 16 – Formação Tubular X p53

FT	P53			
	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
1	25,2% (35/139)	19,0% (4/21)	9,1% (2/22)	15,0% (3/20)
2	37,4% (52/139)	47,6% (10/21)	22,7% (5/22)	25,0% (5/20)
3	37,4% (52/139)	33,3% (7/21)	68,2% (15/22)	60,0% (12/20)

p=0,072

Tabela 17 – Índice Mitótico X p53

IM	P53			
	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
1	70,5% (98/139)	61,9% (13/21)	54,5% (12/22)	45,0% (9/20)
2	23,0% (32/139)	33,3% (7/21)	22,7% (5/22)	55,0% (11/20)
3	6,5% (9/139)	4,8% (1/21)	22,7% (5/22)	-

p=0,006

5.5 Comparação entre os 2 Grupos

A – Parâmetros histopatológicos

Parâmetros histopatológicos apresentaram características diferentes nos dois grupos. Pacientes no Grupo 1 apresentaram Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico mais baixos que no Grupo 2.

Tabela 18 – Grau Nuclear

Grau Nuclear	Grupo 1	Grupo 2
1	41,7% (25/60)	22,7% (25/110)
2	41,7% (25/60)	40,9% (45/110)
3	16,7% (10/60)	36,4% (40/110)

p=0,007

Tabela 19 – Formação Tubular

Formação Tubular	Grupo 1	Grupo 2
1	44,1% (26/59)	12,0% (13/108)
2	20,3% (12/59)	35,2% (38/108)
3	35,6% (21/59)	52,8% (57/108)

p=0,001

Tabela 20 – Índice Mitótico

Índice Mitótico	Grupo 1	Grupo 2
1	89,7% (52/58)	56,5% (61/108)
2	5,2% (3/58)	34,2% (37/108)
3	5,2% (3/58)	9,3% (10/108)

p=0,001

B – Parâmetros imuno-histoquímicos

B.1 – Receptores Hormonais

Os Receptores Hormonais apresentaram expressão diferente nos dois grupos. O Grupo 2 apresentou maior incidência de expressão nula de RE (35,3% X 21,4%) e RP (39,1% X 21,4%). Por outro lado, no Grupo 1 houve maior expressão dos Receptores Hormonais em relação ao Grupo 2. ($p < 0,05$)

Tabela 21 – Receptores de Estrogênio: Grupo 1 X Grupo 2

RE	Grupo 1	Grupo 2
0	21,4% (18/84)	35,3% (14/116)
1+	10,7% (9/84)	2,6% (3/116)
2+	14,3% (12/84)	12,9% (15/116)
3+	31,0% (26/84)	31,0% (36/116)
4+	22,6% (19/84)	18,1% (21/116)

$p=0,016$

Tabela 22 – Receptores de Progesterona: Grupo 1 X Grupo 2

RP	Grupo 1	Grupo 2
0	21,4% (18/84)	39,1% (45/115)
1+	19,0% (16/84)	6,1% (7/115)
2+	28,6% (24/84)	20,9% (24/115)
3+	19,0% (16/84)	19,1% (22/115)
4+	11,9% (10/84)	13,9% (16/115)

$p=0,023$

B.2 – Ki67

Expressão baixa ou nula de Ki67 ocorreu em 80,4% (78/97) dos casos no Grupo 1 e em 63,8%(90/141) no Grupo 2. O Grupo 2 apresentou maior expressão de Ki67 em relação ao Grupo 1 nas demais estratificações. Pacientes do Grupo 2 apresentaram maior expressão do Ki67. ($p=0,045$) (Tabela 24).

Tabela 23 - Ki67: Grupo 1 X Grupo 2

Ki67	Grupo 1	Grupo 2
0-25%	80,4% (78/97)	63,8% (90/141)
26-50%	12,4% (12/97)	23,4% (33/141)
51-75%	5,2% (5/97)	7,1% (10/141)
>75%	2,1% (2/97)	5,7% (8/141)

$p=0,045$

B.3 – p53

Expressão baixa ou nula de p53 foi de 76,0% (73/96) no Grupo 1 e de 65,2%(92/141) no Grupo 2. Apesar de não ser estatisticamente significativo, observou discreto predomínio da maior expressão de p53 no Grupo 2. (Tabela 25)

Tabela 24 – p53: Grupo 1 X Grupo 2

P53	Grupo 1	Grupo 2
0-25%	76,0% (73/96)	65,2% (92/141)
26-50%	9,4% (9/96)	10,6% (15/141)
51-75%	8,3% (8/96)	11,3% (16/141)
>75%	6,3% (6/96)	12,8% (18/141)

p=0,267

B.4 – c-erbB-2

A expressão do marcador c-erbB-2 apresentou tendência ($p=0,055$) em diferir nos 2 grupos. Expressão nula ou 1 + ocorreu em 70,2% (59/84) entre as pacientes do Grupo 1 e em 69,3%(79/114) no Grupo 2. Observou-se maior incidência de super-expressão do marcador no Grupo 2.

Tabela 25 - c-erbB-2: Grupo 1 X Grupo 2

c-erbB2	Grupo 1	Grupo 2
0	60,7% (51/84)	57,0% (65/114)
1+	9,5% (8/84)	12,3% (14/114)
2+	6,0% (5/84)	8,8% (10/114)
3+	23,9% (20/84)	21,9% (25/114)

p=0,055

6 – Discussão e Comentários

O diagnóstico de um Osteossarcoma ou de um Glioblastoma, invariavelmente encerrará a investigação acerca do tumor. O anúncio de um câncer de mama ensejará a demanda imediata por informações adicionais. Prontamente cirurgiões, oncologistas e clínicos solicitarão avaliação complementar dos aspectos histopatológicos e do painel imuno-histoquímico para incorporá-los aos parâmetros já conhecidos (idade, volume tumoral, status axilar e metástases) de valores prognóstico e preditivo.

Observações Gerais

Idade

Não houve diferença entre os dois grupos. A Média de idade foi equivalente, embora o estado menopausal apresentasse tendência em predominar no Grupo 1. Nesta fase as mulheres são submetidas , com maior frequência, ao rastreamento do câncer de mama com mamografia^{88, 89, 90}.

A – Incidências

Parâmetros histopatológicos X imuno-histoquímicos

Tumores com Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico mais elevados estiveram relacionados com baixa expressão dos Receptores hormonais e com super-expressão/amplificação dos demais marcadores (p53, Ki67 e c-erbB2), como constatou Ringberg⁶⁶.

Incidência de Receptores Hormonais

Somente 29,5% (59/200) das pacientes eram RE negativo e 31,4%(63/199) eram RP negativo, enquanto Fátima⁶⁷ relata que 55% dos cânceres de mama não apresentam expressão dos Receptores Hormonais. Possivelmente, tais dados signifiquem diferenças entre os fenótipos dos tumores entre mulheres orientais e ocidentais, como demonstrado no trabalho de Barnes⁵⁴ que encontrou 73% de positividade para Receptores de Estrogênio e 61,1% para Receptores de Progesterona nos casos de DCIS. Em geral, a incidência de positividade dos Receptores Hormonais ultrapassa os 50%⁶⁸, porém algumas estatísticas não corroboram estas informações⁶⁹.

Incidência de p53

A maior parte das pacientes (69,6%) não expressava ou expressava pobremente o p53. Entre os diversos autores, a incidência de positividade do marcador variou de 36,2% a 56%^{20, 36, 69, 70}.

Incidência de c-erbB-2

O c-erbB-2^{8, 69} é marcador de mau prognóstico e de risco elevado de metástase e menor sobrevida, podendo estar associado à super-expressão do p53 e Receptores Hormonais baixos.

O c-erbB-2 não foi expresso em 58,6% dos casos, índice semelhante ao de Gallegos (57%)⁶⁹. Erbem⁷⁰, porém, cita positividade de 31,9% e Yamashita²⁰ ainda menos (20,1%). Bathavdekar³⁶ encontrou a maior incidência de positividade, chegando a 68%.

Incidência de Ki67

A incidência de expressão baixa ou nula (0 a 25%) de Ki67 foi de 76,4%, divergindo bastante dos diversos autores, como Yamashita²⁰ que encontrou 53,6% de positividade para o mesmo marcador. Bathavdekar³⁶ encontrou 78% de positividade para Ki67 em cânceres primários de mama.

B – Imuno-histoquímica e Histopatologia

Carcinomas invasivos com acometimento linfonodal, em geral, apresentam prognóstico sombrio¹⁷, como descreveu Zekliogu. O linfotropismo e a pior evolução são marcas desta entidade. Novos fatores que determinem prognóstico e diretrizes de terapêutica podem ser úteis.

Receptores de Estrogênio e Histopatologia

A expressão dos Receptores de Estrogênio aumentou proporcionalmente à diminuição da incidência de Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico elevados, como observado no estudo de Fátima⁶⁷. Lal⁷¹, Barnes⁵⁴ e Gallegos⁶⁹ também encontraram tendência de diminuição da expressão dos Receptores Hormonais proporcional ao aumento da Formação Tubular.

Ki67 e Histopatologia

A expressão do Ki67 foi maior à medida que aumentava o Grau Nuclear, o Índice Mitótico e Formação Tubular($p=0,014$), sendo este último item corroborado por Erdem⁷⁰.

p53 e Histopatologia

O p53 apresentou diferença importante somente quando relacionado ao Índice Mitótico, quando houve maior a expressão do marcador imuno-histoquímico proporcional à elevação do Índice Mitótico. Não ocorreu diferença em relação às diversas incidências de Grau Nuclear e Formação Tubular, como observado por Erdem⁷⁰. Rajan²⁷, que descreveu diferença estatisticamente significativa tanto no Grau Nuclear como no Índice Mitótico, não considera o p53 importante para avaliar risco de recorrência.

c-erbB-2 e Histopatologia

Não ocorreu diferença entre a expressão de c-erbB-2 e as diversos graus de Formação Tubular, como citado por Erdem⁷⁰. Lal⁷¹ encontrou dados estatisticamente significativos ao afirmar que c-erbB-2 amplificado esteve essencialmente limitado aos graus intermediário e alto, assim como Brower³⁴ que evidenciou que cânceres do tipo comedo diferiram dos não-comedo quanto à expressão de Receptores Hormonais (maior expressão no grupo não comedo) e Ki67 / c-erbB-2 super-expressos no grupo

comedo. Observamos que o c-erbB-2 parece ser um marcador independente de agressividade biológica; primeiro por não apresentar significância estatística quando relacionado aos diferentes níveis de Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico; não obstante, houve tendência ($p=0,055$) em se expressar discretamente diferente nos grupos de lesões palpáveis e não palpáveis.

C - Grupo 1 x Grupo 2

Variáveis Histopatológicas

Croisier²⁶ mencionou comportamento diverso entre cânceres de intervalo e aqueles detectados por rastreamento mamográfico. Cânceres de intervalo apresentam maior volume e grau histológico mais elevado. Observamos que Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico apresentaram diferenças importantes, manifestando em níveis mais elevados no grupo de lesões palpáveis.

Variáveis Imuno-Histoquímicas

Cânceres de intervalo (aqueles que não são detectados pelo método de rastreamento) apresentam pior prognóstico por mostrarem super-expressão de c-erbB-2, p53 e Ki67, Grau Histológico mais elevado²⁶, além de negativamente relacionados com expressão de RE e RP. Observamos que houve maior expressão dos receptores hormonais no Grupo 1 (Lesões não palpáveis) e de Ki67 e c-erbB2 no Grupo 2 (Lesões palpáveis), evidenciando comportamento biológico diferente.

Bathavdekar³⁶ refere diferença de expressão dos biomarcadores imuno-histoquímicos de acordo com o estágio do câncer de mama. Refere maior expressão de marcadores de agressividade biológica em Estágio III, quando comparado com o Estágio II, demonstrando que tumores mais avançados apresentam pior prognóstico, não só pelo momento do diagnóstico, mas também pelas características imuno-histoquímicas. Corroboramos os achados de Bathavdekar quando consideramos diferenças de expressão dos parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos nos dois grupos, considerado tamanho tumoral. Para Bathavdekar, expressão de p53 em tumores primários foi um fator prognóstico independente que influenciou sobrevida livre de doença. O p53⁷³ pode induzir a regulação de diversos tipos de proteínas e, portanto, justificar a heterogeneidade de expressão e a pouca especificidade; na comparação dos dois grupos, nossos dados confirmam que este marcador não apresentou diferença. Também encontramos menor expressão de Receptores Hormonais e super-expressão de Ki67 e c-erbB-2 no grupo 2.

Observamos resultados bastante divergentes de Skinner⁷². Ao comparar lesões T1 não palpáveis com palpáveis, o autor afirmou não haver diferença na expressão de RE, RP e c-erbB-2, porém concluiu que cânceres de mama palpáveis apresentam mais anormalidades nucleares e pior prognóstico, baseado em avaliação prospectiva. Nossos dados diferem no que tange aos dados referentes à expressão dos marcadores imuno-histoquímicos. Porém,

convergem para a mesma conclusão na comparação do comportamento biológico entre os dois grupos.

O c-erbB2 parece apresentar papel independente de todas as outras variáveis histopatológicas e imuno-histoquímicas, como nas observações de Ross e Fletcher³¹. Como marcador de mau prognóstico⁸, a super-expressão do c-erbB-2 não se correlacionou com Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico, mas tendeu em apresentar diferença ($p=0,055$) entre lesões palpáveis e não palpáveis.

Yamashita²⁰ observou a importância dos marcadores p53 e c-erbB-2 como fatores prognósticos, porém evidenciou tal fato a partir de observação prospectiva de Sobrevida Global e Intervalo Livre de Doença. A observação vertical de nossa amostra de 296 pacientes poderá apresentar diferenças referentes a estes dois parâmetros nos grupos de lesões palpáveis e não palpáveis.

7 – Conclusões

- 1) O Grupo 2 (Lesões palpáveis) apresentou maior incidência de Grau Nuclear, Formação Tubular e Índice Mitótico elevados, denotando maior agressividade biológica.

 - 2) O Grupo 2 (Lesões palpáveis) apresentou menor expressão dos receptores hormonais e maior expressão de Ki67 e c-erbB2, denotando maior agressividade biológica.

 - 3) Considerados os dois grupos indistintamente, quanto maior a expressão dos Receptores Hormonais, mais baixos o Grau Nuclear, a Formação Tubular e o Índice Mitótico. Quanto maior a expressão de Ki67, mais elevados o Grau Nuclear, a Formação Tubular e o Índice Mitótico.
-

8 – Referências Bibliográficas

- 1 Brasil Ministério da Saúde. INCA/PRO-ONCO. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. INCA; 2002 [Disponível em: <http://www.inca.org.br>]. Rio de Janeiro:
- 2 Polyak, K. On the birth of breast cancer. Review. Biochim Biophys Acta. 2001; 1552;1; 1-13.
- 3 Uemura G. Um estudo da expressão de marcadores imuno-histoquímicos (Receptor de Estrogênio, p53 e HER-2) e fatores anátomo-clínicos em pacientes com câncer de mama axila-negativa. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina , UNESP; 2002.
- 4 Gallager HS. Pathologic types of breast cancer: their prognosis. Cancer. 1984; 53:623-9.
- 5 Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol.1998 Feb;11(2):155-68.
- 6 Pouillart P, Dieras V. Critères tissulaires du pronostic dans lês cancers du sein. Bull Câncer 1996; 83:1029-1030.
- 7 Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med. 2000; 124(7):966-78.
- 8 Baselga J, Van de Vijver M. HER 2 Monography, 2nd ed. Roche .(www.her2status.com).

* National Library of Medicine. List of journals in Index Medicus. Washington; 2003. 306p. Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. J Pediatr 1997; 73:213-24.

-
- 9 Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B, Mallon E, Walker R. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how ? *Eur J Cancer*. 2000; 36: 170-6.
 - 10 Midulla C, De Iorio P, Nagar C, Pisani T, Cenci M, Valli C, Nofroni I, Vecchione A. Immunohistochemical expression of p53, nm23-H1, Ki67 and DNA ploidy: correlation with lymph node status and other clinical pathologic parameters in breast cancer. *Anticancer Res*. 1999 Sep-Oct;19(5B):4033-7.
 - 11 Mommers EC, Leonhart AM, Falix F, Michalides R, Meijer CJ, Baak JP, Diest PJ. Similarity in expression of cell cycle proteins between in situ and invasive ductal breast lesions of same differentiation grade. *J Pathol*. 2001; 194(3):327-33.
 - 12 Lininger RA, Fujii H, Man YG, Gabrielson E, Tavassoli FA. Comparison of loss heterozygosity in primary and recurrent ductal carcinoma in situ of the breast. *Mod Pathol*. 1998; 11;(12):1151-9.
 - 13 Clark GM, McGuire WL. - Prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1983;3:Suppl:S69-72.
 - 14 Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2005; 6(2):147-59.
 - 15 Anan K, Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Tsukahara Y, Kojima M, et al. Assessment of c-erbB2 and vascular endothelial growth factor mRNA expression in Fine-needle aspirates from early breast carcinomas: pre-operative determination of malignant potential. (Avaliação de c-erbB2 e Expressão mRNA de fator e crescimento endotelial vascuçar em aspirados de agulha fina a partir de carcinoma de mama inicial: Determinação pré-operatória de potencial de malignidade). *Eur J Surg Oncol* 1998; 24:28-33.
-

- 16 Alves MTS, Roman LCM. Study of the effect of different fixation times in formalin and methods of antigen retrieval in immunohistochemistry J. Bras. Patol. Med. Lab. vol.41 no.1 Rio de Janeiro Feb. 2005.
 - 17 Zekioglu O, Erhan Y, Ciris M, Bayramoglu H, Ozdemir N. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. *Histopathology*.2004;44(1):18-23.
 - 18 Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ. Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(1):16-20.
 - 19 Kroger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, Schmoor C, Schumacher M, Zander AR, Loning T. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 1;12(1):159-68.
 - 20 Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, et al. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004;6(1):R24-30. Epub 2003 Nov 07.
 - 21 Khan AA, Rogers MAM, Khurana KK, Meuid MM, Numann PJ. Estrogen Receptor expression in benign breast epithelium and breast câncer risk. *J Nat Cancer Inst*. 1998. 90, (1) 37-42.
 - 22 Taguchi T. Trend to adjuvant systemic treatment regimens for patients with early breast cancer--meeting highlights of St. Gallen Conference 2005
-

- 23 Shekhar PV, Werdell J, Basrur VS. Environmental estrogen stimulation of growth and estrogen receptor function in preneoplastic and cancerous human breast cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Dec 3;89(23):1743-4.
- 24 McGuire WL, Tandon AK, Allred DC, Chamness GC, Clarck GM. How to use prognostic factors in axillary node-negative Breast Cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(12):1006-15.
- 25 Pujol P, Daures JP, Thezenas S, Guilleux F, Rouanet P, Grenier J. Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer* 1998; 83 (4): 698-711.
- 26 Crosier M, Scott D, Wilson RG, Clive DM, Griffiths, Felicity E. B. May and Bruce R. Westley. Differences in Ki67 and c-erbB2 Expression between screen-detected and true interval breast cancers.
- 27 Prabha B. Rajan. p53 protein expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 1997: 42(3):283-90.
- 28 Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of Polymerase Chain Reaction Technology in detection of solid tumors. *Cancer* 1998; 82(8):1419-42.
- 29 Mrozkowiak A, Olszewski WP, Piascik A, Olszewski WT. HER2 status in breast cancer determined by IHC and FISH: comparison of the results. *Pol J Pathol.* 2004;55(4):165-71.
- 30 Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol.* 2005; 36(3):250-61.
-

- 31 Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*. 1998; 16:413-28.
- 32 Tan PH, Chuah KL, Chiang G, Wong CY, Dong F, Bay BH. Correlation of p53 and cerbB2 expression and hormonal receptor status with clinicopathologic parameters in ductal carcinoma in situ of the breast. *Oncol Rep*. 2002; 9(5):1081-6.
- 33 Idvall I, Andersson C, Fallenius G, Ingvar C, Ringberg A, Strand C, et al. Histopathological and cell biological factors of ductal carcinoma in situ before and after the introduction of mammographic screening. *Acta Oncol*. 2001;40(5):653-9.
- 34 Brower ST, Ahmed S, Tartter PI, Bleiweiss I and Amberson JB. Prognostic variables in invasive breast cancer: contribution of comedo versus noncomedo in situ component. *Ann Surg Oncol*. 1995; 2 (5): 440-4.
- 35 Patla A, Rudnicka-Sosin L, Pawlega J, Stachura J. Prognostic significance of selected immunohistochemical parameters in patients with invasive breast carcinoma concomitant with ductal carcinoma in situ. *Pol J Pathol*. 2002;53(1):25-7.
- 36 Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, Vora HH, Suthar TP, Chikhlikar PR, et al. Prognostic significance of immunohistochemically localized biomarkers in stage II and stage III breast cancer: a multivariate analysis. *Ann Surg Oncol*. 2000; 7(4):305-11.
- 37 Wang-Rodriguez J, Cross K, Gallagher S, Djahanban M, Armstrong JM, Wiedner N, et al. Male breast carcinoma: correlation of ER, PR, Ki-67,
-

- Her2-Neu, and p53 with treatment and survival, a study of 65 cases. *Mod Pathol.* 2002;15(8):853-61.
- 38 Al-Moundhri M, Nirmala V, Al-Mawaly K, Ganguly S, Burney I, Rizvi A, et al. Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu Protein Expression in Omani Arab Females with Breast Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2003;9(4):226-31.
- 39 Paradiso A, Tommasi S, Barletta A, Leone B, Lacava J, Vellejo C, et al. Metastatic site and p53 primary tumor expression in previously untreated stage IV breast cancer patients. *Anticancer Res.* 1999; 19(5C):4523-8.
- 40 Hensel M, Schneeweiss A, Sinn HP, Egerer G, Solomayer E, Haas R, et al. P53 is the strongest predictor of survival in high-risk primary breast cancer patients undergoing high-dose chemotherapy with autologous blood stem cell support. *Int J Cancer.* 2002;100(3):290-6.
- 41 Guerra I, Algorta J, Diaz de Otazu R, Pelayo A, Farina J. Immunohistochemical prognostic index for breast cancer in young women. *Mol Pathol.* 2003; 56(6): 323-7.
- 42 Pinto AE, Andre S, Laranjeira C, Soares J. Correlations of cell cycle regulators (p53, p21, pRb and mdm2) and c-erbB-2 with biological markers of proliferation and overall survival in breast cancer. *Pathology.* 2005;37(1):45-50.
- 43 Zekioglu O, Erhan Y, Ciris M, Bayramoglu H, Ozdemir N. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. *Histopathology.* 2004;44(1):18-23.
-

- 44 Ellis PE, Fong LF, Rolfe KJ, Crow JC, Reid WM, Davidson T, et al. The role of p53 and Ki67 in Paget's disease of the vulva and the breast. *Gynecol Oncol.* 2002; 86(2):150-6.
- 45 Krishnamurthy S, Sneige N. Molecular and biologic markers of premalignant lesions of human breast. *Adv Anat Pathol.* 2002; 9(3):185-97.
- 46 Schneider J, Lucas R, Sanchez J, Ruibal A, Tejerina A, Martin M. Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer: correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP. *Anticancer Res.* 2000;20(6B):4373-7.
- 47 Gudrun Pohl. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 78(1):97-103.
- 48 Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Brunelli A, Gorzegno G, et al. p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(7):2751-8.
- 49 Ring AE, Ellis PA. Predictors of response to systemic therapy in breast cancer. *Forum (Genova).* 2002;12(1):19-32.
- 50 Penault-Llorca F, Cayre A, Mishellany B F, Amat S, Feillel V, Le Bouedec G, et al. Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. *Int J Oncol.* 2003; 22(6):1319-25.
-

- 51 Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S, et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Câncer*. 2001; 19;85(8):1106-12.
- 52 Herchenhorn D, Rezende LM, Thuler LC, Maia RC, Medina M, Costa MAD. Quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama localmente avançado: análise imunohistoquímica é preditiva da resposta à quimioterapia. *Rev Bras Mastol* 1999; 9:92-100.
- 53 Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Osborne CK, Trott PA, Fernando IN, et al. Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(4):593-600.
- 54 Barnes NL, Boland GP, Davenport A, Knox WF, Bundred NJ. Relationship between hormone receptor status and tumour size, grade and comedo necrosis in ductal carcinoma in situ. *Br J Surg*. 2005; 92(4):429-34.
- 55 Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol*. 2005; 23(11):2469-76.
- 56 Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, Paridaens R, Wildiers H, Van Limbergen E, et al. Association between HER-2/neu and the progesterone receptor in oestrogen-dependent breast cancer is age-related. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 91(1):81-7.
-

- 57 Collins LC, Schnitt SJ. HER2 protein overexpression in estrogen receptor-positive ductal carcinoma in situ of the breast: frequency and implications for tamoxifen therapy. *Mod Pathol*. 2005; 18(5):615-20.
- 58 Arantes Jr, JC. Microcalcificações mamárias: correlação entre imagem radiográfica (Número relativo, forma e densidade) e carcinoma. [Tese] Rio de Janeiro: UFRJ; 1998.
- 59 Sakorafas GH, Farley DR. Optimal management of ductal carcinoma in situ of the breast. *Surg Oncol*. 2003; 12(4):221-40.
- 60 Pijnappel RM, Peeters PH, van den Donk M, Holland R, Hendriks JH, Deurloo EE, et al. Diagnostic strategies in non-palpable breast lesions. *Eur J Cancer*. 2002; 38(4):550-5.
- 61 Bove F, Bilancio G, De Falco M, Parmeggiani D, Sperlongano P, Barbarisi A, et al. Cancer risk in breast lesions: diagnostic and therapeutic strategy. *Minerva Chir*. 2003; 58(3):375-83.
- 62 Le Bret T, Van Den Akker M, Buffet M, Bolner B, Salet-Lizee D, Kujas A, et al. Clinical management of non palpable breast lesions: experience about a series of 176 consecutive cases *Gynecol Obstet Fertil*. 2003; 31(10):813-9.
- 63 Pina L, Apesteguia L, de Luis E, Saenz Banuelos J, Zornoza G, Dominguez Cunchillos F. Biopsy techniques for the diagnosis of non-palpable mammary lesions. *An Sist Sanit Navar*. 2004; 27(3):345-58.
- 64 Florentine BD, Kirsch D, Carroll-Johnson RM, Senofsky G. Conservative excision of wire-bracketed breast carcinomas: a community hospital's experience. *Breast J*. 2004; 10(5):398-404.
-

- 65 Kerlikowske K, Smith-Bindman R, Ljung BM, Grady D. Evaluation of abnormal mammography results and palpable breast abnormalities. *Ann Intern Med.* 2003; 139(4):274-84.
- 66 Ringberg A, Anagnostaki L, Anderson H, Idvall I, Ferno M; South Sweden Breast Cancer Group. Cell biological factors in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast-relationship to ipsilateral local recurrence and histopathological characteristics. *Eur J Cancer* 2001; 37(12):1514-22.
- 67 Fatima S, Faridi N, Gill S. Breast cancer: steroid receptors and other prognostic indicators. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2005; 15(4):230-3.
- 68 Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123(1):21-7.
- 69 Gallegos M, Gonzalez S, Leon A, Claire R, Goni I, Andrade L, Duarte I. Immunohistochemical tumor markers in infiltrating ductal breast carcinoma. *Rev Med Chil.* 1998; 126(10):1216-23.
- 70 Erdem O, Dursun A, Coskun U, Gunel N. The prognostic value of p53 and c-erbB-2 expression, proliferative activity and angiogenesis in node-negative breast carcinoma. *Tumori.* 2005; 91(1):46-52.
- 71 Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123(4):541-6.
-

- 72 Kristin A. Skinner MD, Silberman H, Sposto MDR, PhD and Melvin J. Silverstein, MD. Palpable Breast Cancers Are Inherently Different From Nonpalpable Breast Cancers. *Ann Surg Oncol*. 2001; 8:705-10.
- 73 Mathoulin-Portier MP, Viens P, Cowen D, Bertucci F, Houvenaeghel G, Geneix J, et al. Prognostic value of simultaneous expression of p21 and mdm2 in breast carcinomas treated by adjuvant chemotherapy with antracyclin. *Oncol Rep*. 2000; 7(3):675-80.
- 74 Gonzalez-Campora R, Galera Ruiz MR, Vazquez Ramirez F, Rios Martin JJ, Fernandez Santos JM, Ramos Martos MM, et al. Apoptosis in breast carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2000; 196(3):167-74.
- 75 Nizzoli R, Bozzetti C, Naldi N, Guazzi A, Gabrielli M, Michiara M, et al. Comparison of the results of immunocytochemical assays for biologic variables on preoperative fine-needle aspirates and on surgical specimens of primary breast carcinomas. *Cancer*. 2000; 90(1) : 61-6.
- 76 Schneider J, Pollan M, Ruibal A, Jimenez E, Lucas AR, Nunez MI, et al. Histologic grade and CD44 are independent predictors of axillary lymph node invasion in early (T1) breast cancer. *Tumour Biol*. 1999; 20(6):319-30.
- 77 Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollan M, Lucas R, Tejerina A, Martin M, et al. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Câncer Res*. 2001; 3(3):183-91.
- 78 Perry RR, Y Kang and B. Greaves Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and -independent human breast cancer cells. *Ann Surg Oncol*. 1995; 2(3):238-45.
-

- 79 V. Velanovich and W. Szymanski. Lymph node metastasis in breast cancer: common prognostic markers lack predictive value. *Ann Surg Oncol.* 1998; 5(7): 613-9.
- 80 Jager JJ. Clinical relevance of apoptotic markers in breast cancer not yet clear. *Apoptosis.* 2002; 7(4):361-5.
- 81 Konstantinidou AE. Apoptotic markers for tumor recurrence: a minireview. *Apoptosis.* 2002; 7(5):461-470.
- 82 Chang J, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Clark GM, Makris A, et al. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17(10):3058-63.
- 83 Vassilios J P, Souvatzoglou MA, Varvara J V, Androniki N L, Ambela C, Koutsikos J, et al. Relationship of cell proliferation (Ki-67) to ^{99m}Tc-(V)DMSA uptake in breast cancer *Breast Cancer Res.* 2004; 6:R56-R62.
- 84 Climent MA, Seguí MA, Peiro G, Molina R, Lerma E, Ojeda B, et al. Prognostic value of HER-2/neu and p53 expression in node-positive breast cancer. HER-2/neu effect on adjuvant tamoxifen treatment. *Breast.* 2001; 10(1):67-77.
- 85 Antunes A, Silva T. Valor prognóstico da expressão por Imuno-Histoquímica do C-Erb-2. Em doentes sob terapêutica adjuvante com tamoxifeno por carcinoma primário da mama- *Acta Méd Port.* 2004; 17:271-6
- 86 8ª Reunião Nacional de Consenso SBM, Gramado 2001.
-

- 87 Farias, RE. Avaliação da Apoptose e Produção de TNF- α no Câncer de Mama: correlação com fatores prognósticos. Tese apresentada à UFF para obtenção do título de Doutor em patologia. Niterói, 2004.
- 88 Suzuki T, Toi M, Saji S, Horiguchi K, Aruga T, Suzuki E, Horiguchi S, Funata N, Karasawa K, Kamata N. Early breast cancer. *Int J Clin Oncol.* Apr;11(2):108-19, 2006.
- 89 Foti E, Mancuso S. Early breast cancer detection. *Minerva Ginecol.* Jun;57(3):269-92, 2005 .
- 90 Kopans DB. Informed decision making: age of 50 is arbitrary and has no demonstrated influence on breast cancer screening in women. *AJR Am J Roentgenol.* Jul;185(1):176-7, 2005.
- 91 Bacchi C.E., Cardoso de Almeida P.C., Franco M. Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos. Terceira Edição revista e ampliada. São Paulo: reichmann & Autores Editores, 2005. ISBN 85-87148-83-4.
-

9 – A nexos

9.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
16016900 - JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer 156/2005

Protocolo CEP-UFJF: 591.110.2005 **FR:** 059962 **CAAE:** 0097.0.232.180-05

Projeto de Pesquisa: "Perfil imuno-histoquímico do câncer de mama: comparação entre lesões palpáveis e não palpáveis"

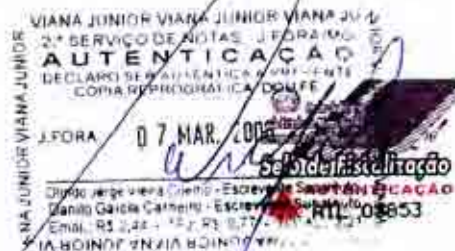
Pesquisador responsável: João Carlos Arantes Junior

Instituição: Instituto Oncológico

Sumário/comentários

O CEP analisou o Protocolo 591.110.2005, Grupo III e considerou que:

- 1) A Justificativa da pesquisa é de que o Câncer de Mama constitui-se num dos grandes problemas de Saúde Pública em países desenvolvidos e cidades industrializadas e os conhecimentos acerca de suas características, cada vez mais detalhados, tornam-se arma importante no seu tratamento e na sua condução. A adoção das chamadas "Terapias-Alvo", grande avanço tecnológico, torna a mortalidade cada vez menor, demonstrando iminente necessidade de direcionamento dos protocolos, com cada vez maior especificidade.
- 2) O objetivo geral do estudo é aprofundar os conhecimentos acerca do comportamento do câncer de mama, para elaboração de estratégias de prevenção e controle da doença.
- 3) A metodologia a ser empregada para o estudo, por meio de investigação horizontal e retrospectiva, através da revisão dos prontuários do Instituto Oncológico de Juiz de Fora, é adequada para alcançar os objetivos propostos.
- 4) A Revisão da literatura sustenta os objetivos do estudo e as referências bibliográficas são adequadas e atuais, sendo pertinentes aos objetivos do projeto de pesquisa proposto.
- 5) Características da população a ser investigada: casos de câncer de mama feminina, confirmados pelo estudo Histo-patológico em Hematoxilina-Eosina; tamanho da amostra é de 200 participantes no total.
- 6) Critérios de participação: não há critérios de exclusão e está descrito que a seleção das pacientes estará condicionada à obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido e a confirmação do caso de câncer de mama obtida pelo estudo Histo-patológico em Hematoxilina-Eosina.
- 7) No orçamento detalhado do estudo está informado que os gastos financeiros com a realização da pesquisa e distribuição dos questionários serão de total responsabilidade do pesquisador.
- 8) O instrumento que será empregado para a coleta dos dados é uma ficha para obtenção de informações que levarão a análise do perfil imuno-histoquímico de cada lesão que possibilitará inferência de agressividade tumoral e comportamento biológico, a qual está adequada e abrangente o suficiente para alcançar os objetivos propostos.
- 9) O cronograma de atividades indica que a coleta dos dados ocorrerá de agosto a setembro de 2005, ou seja, após a obtenção da aprovação por este comitê.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
16036906- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

- 10) O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - está em linguagem clara e adequada para a compreensão das pacientes, apresenta descrição suficiente dos procedimentos, explicitação de riscos e desconfortos esperados, ressarcimento de despesas, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, contém os números telefônicos para contato com o pesquisador e com este comitê e ainda informa de que o TCLE é elaborado em duas vias. Além disso, apenas os dados das pacientes, cujo TCLE foi assinado por elas ou por seus responsáveis legais, serão incluídos na pesquisa. Por todas as informações descritas acima o TCLE está de acordo com a Res. 196/96 CNS.
- 11) A qualificação do pesquisador e do orientador, assim como suas experiências e produção científica são pertinentes ao tema de estudo proposto.
- 12) Salientamos que a pesquisadora deverá encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 22 de setembro de 2005

DM
Prof. Dra. Sonia Maria Dias
Coordenadora – CEP/UFJF

VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR VIANA JUNIOR

2.º SERVIÇO DE NOTAS - JUIZ DE FORA/MG

AUTENTICAÇÃO

DECLARO SER AUTÊNTICA A PRESENTE COPIA REPROGRÁFICA DO UFE

J.FORA, 07 MAR. 2006 MG

Cláudio Jorge Vieira Coelho
Danilo Garcia Carneiro
Emol.: R\$ 2,44 - TFE

Selo de Autenticação
AUTENTICAÇÃO
AIL 05952

RECEBI	
DATA:	___ / ___ / 2005
ASS:	_____

9.2 Tabela completa de dados dos sujeitos

Estes dados encontram-se na planilha excell, arquivos grupo 1 e grupo 2. xls, fornecida no cd anexo a tese.

9.3 Imagem mamográfica / Categoria BI-RADS

O Sistema de classificação mamográfica BI-RADS, adotado pelo Colégio Americano de Radiologia e pela Sociedade Brasileira de Radiologia, preconiza que seja realizado exame de base entre 35 e 40 anos, e anual a partir dos 40, apresenta os seguintes parâmetros e respectivas propostas de conduta:

- Categoria **1 (N)**: Achado **N**ormal (Negativo)
Conduta: Rastreio usual (Mamografia anual)
- Categoria **2 (B)**: Achado **B**enigno
Conduta: Rastreio usual (mamografia anual)
- Categoria **3 (PB)**: Achado **P**rovavelmente **B**enignos
Conduta: Repetir mamografia de 06/06 meses
- Categoria **4 (S)**: Achados **S**uspeito
Conduta: Investigação cito/histopatológica
- Categoria **5 (AS)**: Achado **A**ltamente **S**uspeito
Conduta: Investigação cito/histopatológica

A Categoria IV segundo o BI-RADS, correspondeu a 82,9% (68/82) dos casos no Grupo 1, enquanto no Grupo 2, alcançou 30,0% (33/110). No Grupo 2, a maioria das mamografias era Categoria V, chegando a 49,1% (54/110 casos) (Tabela 27).

Tabela 27 – Classificação BI-RADS: Grupo 1 X Grupo 2

Categoria BI-RADS^R	Grupo 1	Grupo 2
I	1,2% (1/82)	8,2% (9/110)
II	-	9,1% (10/110)
III	2,4% (2/82)	3,6% (4/110)
IV	82,9% (68/82)	30,0% (33/110)
V	13,4% (11/82)	49,1% (54/110)

p<0,001

Entre as imagens mamográficas, Nódulo e Grupamento de microcalcificações foram prevalentes no Grupo 1 com 45,5%(46/101) e 43,6% (44/101) respectivamente. Outros aspectos corresponderam a 10,9%(11/101). No Grupo 2, entre as pacientes que dispunham de mamografia, nódulo suspeito ocorreu em 69,4% (77/111), que correspondiam à imagem clínica. Quase 20% das pacientes neste grupo não apresentavam imagem mamográfica suspeita e 10,8% (12/111 casos) apresentavam outras alterações radiológicas como microcalcificações ou distorção arquitetural. (Tabela 28).

Tabela 28 – Imagem mamográfica: Grupo 1 X Grupo 2

Grupo1	Nódulo	45,5% (46/101)
	Microcalcificações	43,6% (44/101)
	Dist. Arquitetural	7,9% (8/101)
	Neo-densidade	2,0% (2/101)
	Normal	1,0% (1/101)
	Total	101
Grupo 2	Nódulo	69,4% (77/111)
	Microcalcificações	5,4% (6/111)
	Dist. Arquitetural	5,4% (6/111)
	Normal	19,8% (22/111)
	Total	111

p<0,001

9.4 Descrição dos microscópios utilizados para avaliação do Índice Mitótico de variação do escore

Escore 1: Nikon-Labophot – 0 a 5 mitoses

Leitz-Ortholux – 0 a 9 mitoses

Leitz Diaplan - 0 a 11 mitoses

Escore 2: Nikon-Labophot – 6 a 10 mitoses

Leitz-Ortholux – 10 a 19 mitoses

Leitz Diaplan - - 12 a 22 mitoses

Escore 3: Nikon-Labophot – 11 ou mais mitoses

Leitz-Ortholux – 20 ou mais mitoses

Leitz Diaplan – 23 ou mais mitoses

9.5 Descrição das técnicas de reação imuno-histoquímica

Cortes de 4 μ m de espessura são aplicados em lâminas silanizadas (3-aminopropiltriétoxi-silane; Sigma Chemical, Co; EUA), desparafinados em estufa a 60°C, hidratadas em passagens de xilol, álcool absoluto, álcool 70% e água destilada. Os cortes são submetidos à recuperação antigênica com imersão dos fragmentos em tampão citrato 0,001M, pH 6,0, bloqueio da peroxidase com água oxigenada a 3% e posteriormente incubados em anticorpos primários (tab) por 1 hora, anticorpos secundários biotinilados 30min e aplicados ao complexo avidina-biotina por mais 30min. A coloração adiciona substrato cromógeno diaminobenzidina por cerca de 1 min. Finaliza-se o procedimento com contra-coloração utilizando a Hematoxilina de Harris (Merck). Em cada caso, cortes são utilizados para controle de coloração, pela omissão do anticorpo primário ou do secundário.

Método da Streptavidina-Biotina / HRP

- 1) Desparafinar e Hidratar
 - 2) Inibir a peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% durante 15 minutos
 - 3) Lavar com água destilada
 - 4) Recuperação antigênica através de micro-ondas, em tampão de citrato de sódio pH 6, durante 14 minutos
 - 5) Deixar o tampão arrefecer durante 10 minutos
-

- 6) Lavar em TBS
 - 7) Incubar em soro normal de cabra (Ultra V Block – Labvision) durante 10 minutos
 - 8) Lavar em TBS
 - 9) Incubar em soro primário policlonal C-erb-B2 (DAKO A485) durante 30 minutos com diluição de 1/200
 - 10) Lavar em TBS
 - 11) Incubar no secundário biotilado (cabra antipolivalente-Labvision) durante 10 minutos
 - 12) Lavar em TBS
 - 13) Incubar em streptavidina com peroxidase (Labvision) durante 10 minutos
 - 14) Lavar em TBS
 - 15) Revelar a marcação Ag/Ac com DAB durante 10 minutos
 - 16) Lavar em água corrente
 - 17) Contrastar com Hematoxilina de Gill durante 2 minutos
 - 18) Azular em água corrente durante 5 minutos
 - 19) Desidratar e montar em meio sintético
-

9.6 Tabelas e Comentários dos dados clínico-epidemiológicos e outras relações com os parâmetros Imuno-histoquímicos

A – Tabela Geral de Dados

Não estiveram disponíveis todos os dados de todas as pacientes mas, por se tratar de análise univariada, não houve viés da amostra.

Comparação dos 2 Grupos: Testes t-student

	Grupo 1				Grupo 2			
	Válidos	Perdidos	Média	D.P.	Válidos	Perdidos	Média	D.P.
Idade	118	0	56,86	11,202	177	1	55,22	13,642
GN	95	23	1,93	0,802	144	34	2,22	0,714
GH	95	23	1,96	0,849	142	36	2,39	0,683
GM	95	23	1,17	0,453	142	36	1,54	0,670
Linf Diss	100	18	9,15	10,101	147	31	15,43	8,508
Linf+	101	17	0,73	2,825	147	31	3,15	5,210
Est Clin	102	16	1,01	0,895	137	41	2,23	0,877
RE	98	20	1,21	1,445	146	32	1,87	1,568
RP	98	20	1,79	1,318	145	33	1,79	2,779
Ki67	97	21	19,67	19,117	141	37	26,89	23,526
p53	96	22	20,26	26,871	141	37	28,83	31,581
c-erbB2	96	22	0,92	1,343	144	34	0,93	1,227

No Grupo 1, foram obtidos dados referentes ao Grau Nuclear, Grau Histológico e Grau Mitótico em 95 pacientes (80,5%), Número de Linfonodos Dissecados em 100 pacientes (84,7%), Linfonodo(s) positivo(s) em 101 (85,6%), Estádio Clínico em 102 (86,4%), Receptores de Estrogênio e Progesterona em 98 (83%), Ki67 em 97(82,2%) e p53 e c-erbB-2 em 96 (81,4%). No Grupo 2, de 177 casos, foram obtidos dados referentes a Grau Nuclear em 144 (81,4%), Graus Histológico e Mitótico em 142 (80,2%), número de Linfonodos dissecados e Linfonodos positivos em 147(83%),

Estádio Clínico em 137(77,4%), Receptor de Estrogênio em 146(82,5%), Receptor de Progesterona em 145(81,9%), Ki67 e p53 em 141(79,7%) e c-erbB-2 em 144(81,4%). O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (vide item 9-Anexos, subitem 9.1).

B – Status Menopausa/Rastreo Mamográfico/Queixa Principal

No Grupo de pacientes com lesões não palpáveis, 20,7% das pacientes (18/87) encontravam-se na pré-menopausa, enquanto no Grupo 2, esta incidência foi de 38,6% (51/132). No Grupo 1, houve mais pacientes menopausadas do que no Grupo 2. (Tabela 29). Estado Menopausal apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Pacientes com lesões não palpáveis encontravam-se, com maior incidência, na pós-menopausa do que pacientes com lesão palpável, o que possivelmente se relacione ao fato de o rastreo mamográfico ser mais freqüente na pós-menopausa e que as lesões palpáveis podem atingir com maior freqüência pacientes mais jovens, invariavelmente, não submetidas a rastreamento.

Tabela 29 – Estado menopausal: Grupo 1 X Grupo 2

Grupo1	Pré-Menopausa	20,7% (18/87)
	Pós-Menopausa	79,3% (69/87)
	Total	87
Grupo 2	Pré-Menopausa	38,6% (51/132)
	Pós-Menopausa	61,4% (81/132)
	Total	132

p=0,023

Enquanto no Grupo 1 todos os diagnósticos decorreram da detecção radiográfica, exceto em um caso de achado incidental, no Grupo 2 a maior parte não realizava mamografia de rotina. Porém, neste Grupo, 23,2% (26/112) eram submetidas ao rastreamento radiológico e ainda assim não havia imagem suspeita (Tabela 30).

Tabela 30 – Rastreamento mamográfico: Grupo 1 X Grupo 2

Grupo1	Sem Rastreio	0 (0/118)
	Com rastreio	100% (118/118)
	Total	118
Grupo 2	Sem Rastreio	76,8% (86/112)
	Com Rastreio	23,2% (26/112)
	Total	112

p<0,001

“Fazer Preventivo” foi o motivo da consulta em 86,3% (63/73) das pacientes do Grupo 1 ao procurar Serviço Médico, enquanto 85,1% (97/114) das mulheres do Grupo 2 foram ao Ginecologista/Mastologista por detectar, no auto-exame, massa ou nódulo mamário. Somente 7% (9/114) das pacientes do Grupo 2 procuraram o médico para realizar exame de Papanicolaou (Tabela 31).

Tabela 31 – Queixa Principal: Grupo 1 X Grupo 2

Grupo1	Preventivo	86,3% (63/73)
	Dor	2,7% (2/73)
	Menopausa	2,7% (2/73)
	Inflamação	1,4% (1/73)
	“Íngua” Axila	1,4% (1/73)
	Exame de Mama	1,4% (1/73)
	Azia	1,4% (1/73)
	Caroço Mama D	1,4% (1/73)
	Descarga	1,4% (1/73)
	TOTAL	73
Grupo 2	Caroço	85,1% (97/114)
	Preventivo	7,0% (8/114)
	Coceira	2,6% (3/114)
	Alteração CAP	0,9% (1/114)
	Dor Barriga	0,9% (1/114)
	Fogacho	0,9% (1/114)
	Dor na Coluna	0,9% (1/114)
	Dispepsia	0,9% (1/114)
	Inflamação	0,9% (1/114)
	TOTAL	114

C – Marcadores Imuno-histoquímicos e Estádio Clínico

A relação entre o Pannel Imuno-histoquímico e as variáveis “Estádio Clínico” e “Linfonodos Positivos” não apresentou diferenças estatisticamente significativas, denotando que os marcadores não interferem na época em que é detectado o tumor, possivelmente se mantendo estáveis no decorrer da evolução. Conseqüentemente, não se pode contextualizar a agressividade biológica manifestada pelo Perfil Imuno-histoquímico de acordo com parâmetros “Estádio Clínico” e “Linfonodos Positivos”.

Tabela 32 – Receptores de Estrogênio X Estádio Clínico

EC \ RE	0	1+	2+	3+	4+
0	12,1% (7/58)	35,3% (6/17)	12,9% (4/31)	9,4% (6/64)	18,4% (7/38)
I	13,8% (31/58)	17,6% (3/17)	32,3% (10/31)	35,9% (23/64)	31,6% (12/38)
II	53,4% (31/58)	35,3% (6/17)	35,5% (11/31)	39,1% (25/64)	26,3% (10/38)
III	13,8% (8/58)	-	16,1% (5/31)	9,4% (6/64)	10,5% (4/38)
IV	6,9% (4/58)	11,8% (2/17)	3,2% (1/31)	6,3% (4/64)	13,2% (5/38)

p=0,079

Tabela 33 – Receptores de Progesterona X Estádio Clínico

EC \ RP	0	1+	2+	3+	4+
0	11,3% (7/62)	27,6% (8/29)	21,6% (11/51)	2,5% (1/40)	12,5% (3/24)
I	12,9% (8/62)	20,7% (6/29)	37,3% (19/51)	35,0% (18/40)	37,5% (9/24)
II	50,0% (31/62)	37,9% (11/29)	29,4% (15/51)	45,0% (18/40)	33,3% (8/24)
III	16,1% (10/62)	6,9% (2/29)	7,8% (4/51)	10,0% (4/40)	8,3% (2/24)
IV	9,7% (6/62)	6,9% (2/29)	3,9% (2/51)	7,5% (3/40)	8,3% (2/24)

p=0,009

Tabela 34 – c-erbB2 X Estádio Clínico

EC \ c-erbB2	0	1+	2+	3+
0	12,4% (15/121)	11,5% (3/26)	16,7% (3/18)	22,5% (9/40)
I	27,3% (33/121)	30,8% (8/26)	27,8% (5/18)	25,0% (10/40)
II	41,3% (50/121)	38,5% (10/26)	50,0% (9/18)	35,0% (14/40)
III	12,4% (15/121)	19,2% (5/26)	-	2,5% (1/40)
IV	6,6% (8/121)	-	5,6% (1/18)	15,0% (6/40)

p=0,114

Tabela 35 – Ki67 X Estádio Clínico

EC \ Ki67	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
0	17,1% (25/146)	11,1% (4/36)	8,3% (1/12)	-
I	31,5% (46/146)	19,4% (7/36)	8,3% (1/12)	20,0% (2/10)
II	34,9% (51/146)	50,0% (18/36)	58,3% (7/12)	60,0% (6/10)
III	8,9% (13/146)	13,9% (5/36)	16,7% (2/12)	10,0% (1/10)
IV	7,5% (11/146)	5,6% (2/36)	8,3% (1/12)	10,0% (1/10)

p=0,485

Tabela 36 – p53 X Estádio Clínico

EC \ p53	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
0	17,7% (26/147)	-	10,0% (2/20)	14,3% (2/14)
I	27,9% (41/147)	45,5% (10/22)	20,0% (4/20)	7,1% (1/14)
II	38,8% (57/147)	40,9% (9/22)	50,0% (10/20)	42,9% (6/14)
III	7,5% (11/147)	13,6% (3/22)	15,0% (3/20)	21,4% (3/14)
IV	8,2% (12/147)	-	5,0% (1/20)	14,3% (2/14)

p=0,171

D – Marcadores Imuno-histoquímicos e Linfonodos Positivos

Receptores Hormonais/Linfonodos Positivos

Não houve diferença significativa entre as expressões dos Receptores Hormonais e a incidência de Linfonodos positivos, ainda que se pudesse observar maior incidência de Linfonodos negativos quando a expressão de Receptores de Progesterona era de 4+/4(70,4%). ($p=0,137$)

Tabela 37 – Receptores de Estrogênio X Linfonodos Positivos

RE \ Linf +	0	1+	2+	3+	4+
0	47,5% (28/59)	68,8% (11/16)	60,0% (18/30)	63,6% (42/66)	62,8% (27/43)
1 a 3	27,1% (16/59)	12,5% (2/16)	33,3% (10/30)	22,7% (15/66)	20,9% (9/43)
4 ou +	25,4% (15/59)	18,8% (3/16)	6,7% (2/30)	13,6% (9/66)	16,3% (7/43)

$p=0,325$

Não se observou diferença estatisticamente significativa ($p=0,325$) na relação entre expressão de RE e metástase linfonodal, corroborando o trabalho de Fátima⁶⁷.

Tabela 38 – Receptores de Progesterona X Linfonodos Positivos

RP \ Linf +	0	1+	2+	3+	4+
0	46,8% (29/62)	55,2% (16/29)	72,5% (37/51)	55,8% (24/43)	70,4% (19/27)
1 a 3	30,6% (19/62)	24,1% (7/29)	17,6% (9/51)	27,9% (12/43)	18,5% (5/27)
4 ou +	22,6% (14/62)	20,7% (6/29)	9,8% (5/51)	16,3% (7/43)	11,1% (3/27)

$p=0,137$

c-erbB2 e Linf +**Ki67 e Linf +**

Não houve diferença entre as diversas incidências de expressão do c-erbB-2 e Ki67 e o número de linfonodos axilares positivos. Climent⁸⁴ porém afirma que a super-expressão do c-erbB-2 correlaciona-se positivamente com metástases linfonodais axilares

Tabela 39 – c-erbB-2 X Linfonodos Positivos

c-erbB2 Linf +	0	1+	2+	3+
0	60,3% (76/126)	51,9% (14/27)	63,2% (12/19)	57,9% (22/38)
1 a 3	23,8% (30/126)	29,6% (8/27)	31,6% (6/19)	21,0% (8/38)
4 ou +	15,9% (20/126)	18,5% (5/27)	5,3% (1/19)	21,0% (8/38)

p=0,577

Alguns autores^{20, 36, 37} referem relação do c-erbB-2 com metástase linfonodal, apresentando diferença de expressão do marcador em cânceres de mama axila negativa e positiva.

Tabela 40 – Ki67 X Linfonodos Positivos

Ki67 Linf +	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
0	63,9% (94/147)	46,2% (18/39)	42,9% (6/14)	55,6% (5/9)
1 a 3	23,1% (34/147)	30,8% (12/39)	21,4% (3/14)	33,3% (3/9)
4 ou +	12,9% (19/147)	23,1% (9/39)	35,7% (5/14)	11,1% (1/9)

p=0,178

p53 e Linf +

Apesar de $p=0,133$, observou-se maior incidência linfonodos positivos proporcional à expressão de p53. A maior incidência de grande comprometimento axilar (4 linfonodos ou mais) ocorreu quando p53 estava amplificado (acima de 75%), enquanto na expressão baixa ou nula (0 a 25%), a incidência de Axila negativa foi de 60,9%, fato que corrobora os achados de Yamashita²⁰.

Tabela 41 – p53 X Linfonodos Positivos

Linf + \ p53	0-25%	26-50%	51-75%	>75%
0	60,9% (92/151)	52,4% (11/21)	57,9% (11/19)	52,9% (9/17)
1 a 3	27,2% (41/151)	19,0% (4/21)	26,3% (5/19)	11,8% (2/17)
4 ou +	11,9% (18/151)	28,6% (6/21)	15,8% (3/19)	35,3% (6/17)

$p=0,133$

9.7 - Status Linfonodal / Estádio Clínico (Grupo 1 x Grupo 2)

No Grupo 1, Axila Negativa ocorreu em 83,2% (84/101 casos). No Grupo 2, 41,5% (61/147) das pacientes não apresentavam comprometimento axilar, correspondendo à metade da incidência do Grupo 1. Axila positiva entre 1 e 3 linfonodos ocorreu em 12,9% (13/101) no Grupo 1 contra 33,3% (49/147) no Grupo 2. Axila bastante comprometida (4 ou mais linfonodos) ocorreu em 4,0% (4/101) no Grupo 1 e em 25,2% (37/147) no Grupo 2 (*Tabela 42*).

Tabela 42 – Estádio Clínico: Grupo 1 X Grupo 2

Linfonodos	Grupo 1	Grupo 2
0	83,2% (84/101)	41,5% (61/147)
1 a 3	12,9% (13/101)	33,3% (49/147)
4 ou +	4,0% (4/101)	25,2% (37/147)

p=0,001

Tumores não palpáveis foram detectados em estádios mais baixos, denotando melhor prognóstico para as lesões do Grupo 1. Carcinoma *in situ* (Estádio 0) ocorreu em 34,9% (29/83) das pacientes do Grupo 1, enquanto no Grupo 2 só ocorreu em 1,9% (2/106). No Estádio I, esta diferença também ficou bastante evidente, com 45,8%(38/83) no Grupo 1 contra 13,2%(14/106) no Grupo 2. Já nos estádios mais avançados (III e IV), observou-se uma inversão, com 2,4% (2/83) das pacientes do Grupo 1 em estádios avançados, enquanto no Grupo 2 foi de 27,4%(29/106). (p<0,001)

Tabela 43 - Linfonodos positivos: Grupo 1 X Grupo 2

Estadiamento Clínico	Grupo 1	Grupo 2
0	34,9% (29/83)	1,9% (2/106)
I	45,8% (38/83)	13,2 (14/106)
II	16,9% (14/83)	57,5% (61/106)
III	1,2% (1/83)	18,9% (20/106)
IV	1,2% (1/83)	8,5% (9/106)

p<0,001

Constatou-se que pacientes com lesões palpáveis apresentaram doença mais avançada, confirmado pelos dados relativos a Estádio Clínico e número de linfonodos positivos. Pacientes do Grupo 2 (Lesões palpáveis) apresentaram Estádio Clínico mais avançado e maior incidência de Axila positiva ($p < 0,05$).
