

Tereza Nakamatu

Estudo da Expressão da Proteína BCL-2 em mulheres com carcinoma ductal invasivo de mama. Correlação anatomopatológica e da sobrevida.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – área de concentração Ginecologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Doutor em Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Uemura
Co-orientador: Prof. Dr. José Ricardo P. Rodrigues

Botucatu – SP
2008

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

Nakamatu, Tereza.

Estudo da expressão da proteína BCL-2 em mulheres com carcinoma ductal invasivo da mama. Correlação anatômopatológica e da sobrevida / Tereza Nakamatu. – Botucatu : [s.n.], 2008

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientador: Gilberto Uemura

Co-orientador: José Ricardo Paciência Rodrigues

Assunto CAPES: 40101150

1. Mamas - Câncer

CDD 616.99449

Palavras-chave: BCL-2; Fator prognóstico; Mama

Dedicatória

*Aos meus pais Nobu e Yayu (in memoriam),
imigrantes japoneses, brasileiros por
opção, confiantes e gratos. Saudades.*

*Aos meus irmãos, Yaken e Yassuhiro (in
memorian), Yazo, Yasso, Yatei e Hirotaka,
cunhadas Helena, Teresa e Augusta,
sobrinhos, Niuton, Marco, Enrique, Bianca
e Eric.*

Homenagens

*Ao Prof. Dr. Gilberto Uemura,
pela sempre disposição ajudando-me na
busca de novas literaturas e orientando
com presteza e competência na
conclusão deste trabalho, meu elogio e
gratidão.*

*Ao Prof. Dr. José Ricardo
Paciência Rodrigues, orientador na
tese de mestrado, incansável, dando
prossequimento ao desafio de co-
orientar-me neste projeto, sem
hesitação, meu eterno reconhecimento.*

Agradecimientos

Às pacientes pela demonstração de cidadania ao participarem desta pesquisa.

Ao Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), importante centro de pesquisa e especialização em mastologia.

Aos Professores e amigos do Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu pelas proveitosas discussões de casos junto à equipe Multidisciplinar.

Ao Prof. Dr. João Carlos Sampaio Goes, pelo incentivo às pesquisas científicas no IBCC, permitindo a realização deste trabalho.

À Prof^a Lídia Raquel de Carvalho, titular do Departamento de Bioestatística da UNESP-Botucatu, pela análise estatística.

Ao Prof. Dr. José Costa de Andrade, pelas incentivadoras palavras e amizade a mim dispensados desde o primeiro dia em que ingressara no IBCC.

Aos funcionários da Seção de Pós- Graduação e Medicina de Botucatu: Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Regina Célia Spadin, Natanael Pinheiro Salles e Lillian Cristina Nadal Bianchi Nunes pela eficiência e solicitude.

Aos patologistas do IBCC Prof. Dr. João Guidugli Neto e Prof^a. Dr^a Débora K. Zwibil, pelo estudo imunohistoquímico.

À Divisão de Biblioteca do Campus de Botucatu-UNESP, Sras Selma Maria de Jesus e Luciana Pizzani pela confecção da ficha catalográfica e revisão bibliográfica.

À Sr^a Marilda Marques Bordignon Rodrigues, atenciosa e gentil.

À Sr^a Cilmerly Suemi Urokawa, pela paciência e compreensão ao sacrificar o tempo em família.

Aos colegas amigos de convívio diário Terezinha Vendramini Mariano, Lídia Valdina P. P. Rezende, Diana Tatsuko Akikubo, Agnes Rodrigues Yau, Mário Sérgio M. S. Martins, Maria Cecília Rossi e toda equipe de mastologia sob responsabilidade de André do Monte Aguiar, pelo incentivo, solidariedade a mim dirigidos.

À minha secretária Maria das Graças de Melo, pela ajuda em todos os momentos em precisei.

À Magda Chiereguini e demais funcionários do Serviço de Prontuários do IBCE.

À Abílio e Adnice, pela disposição na digitação do trabalho, meu agradecimento.

Finalmente, a todas as pessoas que me encorajaram, solidários, para o prosseguimento deste trabalho, minha eterna gratidão e carinho.

Epigrafe

*Não penso em toda a desgraça, mas na
beleza que ainda permanece.*

Anne Frank (1929-1945)

Índice

Lista de Abreviaturas.....	17
Lista de Figuras.....	19
Lista de Gráficos.....	21
Lista de Quadros.....	23
Resumo.....	25
Abstract.....	27
1. Introdução.....	29
1.1. Aspectos gerais do câncer de mama.....	30
1.2. Fatores Anatomopatológicos.....	31
1.2.1. Tamanho do Tumor.....	31
1.2.2. Comprometimento de Linfonodos axilares.....	32
1.2.3. Graduação Histopatológica.....	33
1.3. Fator Biológico.....	35
1.3.1. Bcl-2.....	35
1.3.2. Bcl-2 e Carcinoma de Mama.....	41
2. Objetivo.....	44
3. Sujeitos e Métodos.....	46
3.1. Pacientes e Tumores.....	47
3.1.1. Tratamento cirúrgico realizado.....	47
3.1.2. Tratamento adjuvante local.....	47
3.1.3. Tratamento adjuvante Sistêmico.....	48
3.2. Tamanho do Tumor.....	49
3.3. Linfonodos Axilares.....	49
3.4. Graduação Histológica.....	49
3.5. Sobrevida.....	52
3.6. Imunohistoquímica.....	52
3.6.1. Técnica imunohistoquímica.....	52
3.6.2. Resultados Imunohistoquímicos e Escores utilizados.....	54
3.7. Metodologia Estatística.....	55
4. Resultados.....	56

5. Discussão.....	72
5.1. Discussão de metodologia.....	77
5.2. Discussão dos Resultados.....	80
5.2.1. Frequência da idade nos grupos G1, G2 e G3.....	80
5.2.2. Grupos G1, G2 e G3 X Fatores Anatomopatológicos X Sobrevida.....	80
5.2.3. Expressão da proteína Bcl-2 X Tamanho do tumor (T) X Sobrevida.....	81
5.2.4. Expressão da Proteína Bcl-2 X Grau histológico X Sobrevida.....	81
5.2.5. Expressão da proteína Bcl-2 X Comprometimento axilar X Sobrevida.....	82
5.2.6. Expressão da proteína Bcl-2 X Sobrevida.....	83
6. Conclusões.....	85
7. Referências Bibliográficas.....	87
Anexos.....	100

Lista de Abreviaturas

ABC	Avidina-Biotina-Peroxidase
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexate e Fluorouracil
CEF	Ciclofosfamida, Epirubicina e Fluorouracil
G	Graduação Histológica
GA	Grupo A
GB	Grupo B
G1	Grupo de pacientes tratadas com CMF
G2	Grupo de pacientes tratadas com CEF
G3	Grupo de pacientes tratadas com TMX
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IUAC	International Union Against Cancer
Kda	Kilodalton
L	Comprometimento de linfonodo axilar
L1	Ausência de linfonodo axilar
L2	Presença de linfonodo axilar
NSABP	National Surgical Breast Cancer
NPI	Nottingham Prognostic Índice
SOE	Sem Outras Especificações
TMX	Tamoxifeno

Lista de Figuras

Figura 1 -	Bcl-2: Translocação: t (14; 18) (q32; q21).....	35
Figura 2 -	Representação esquemática das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (modificado de REED, 2001).....	37
Figura 3 -	Estrutura protéica do gene Bcl-2 com os seus domínios (BHL-4) e sete regiões de hélice alfa (modificado de REED, 1997).....	40
Figura 4 -	Carcinoma ductal invasivo grau I, revelando formação tubular em mais de 50% do tumor, células neoplásicas com núcleos redondos, uniformes, com mínima atipia nuclear, ausência de figuras de mitoses. Coloração pela Hematoxilina – Eosina; 400x.....	50
Figura 5 -	Carcinoma ductal invasivo grau II, revelando formação tubular entre 10 a 50% do tumor, células neoplásicas revelando moderado aumento de tamanho. Coloração pela Hematoxilina – Eosina; 400x.....	51
Figura 6 -	Carcinoma ductal invasivo grau III, com ausência de formação tubular; células neoplásicas revelando intensa atipia, pleomorfismo acentuado e freqüentes figuras de mitoses. Coloração pela Hematoxilina - Eosina; 400x.....	51
Figura 7 -	Proteína BCL-2 (-).....	54
Figura 8 -	Proteína BCL-2 (+).....	54

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Percentual de pacientes segundo período de sobrevida (anos) e grupos G1, G2 e G3 (p=0,61).....	57
Gráfico 2 -	Percentual de pacientes segundo grupos e tamanho do tumor (T) (p=0,50).....	58
Gráfico 3 -	Percentual de pacientes segundo grupo e graduação histológica (G) (p=0,19).....	59
Gráfico 4 -	Percentual de pacientes com sobrevida até 5 anos segundo tamanho do tumor e expressão da proteína Bcl-2 (p=0,48).....	60
Gráfico 5 -	Percentual de pacientes com sobrevida de 5 a 10 anos, segundo tamanho do tumor e Bcl-2 (p=0,44).....	61
Gráfico 6 -	Percentual de pacientes com sobrevida acima de 10 anos, segundo tamanho do tumor e Bcl-2 (p=0,72).....	62
Gráfico 7 -	Proporção de freqüência dos grupos GA e GB considerando os períodos de sobrevida até 5 anos, segundo graduação histológica e Bcl-2. (p= 0,14).....	63
Gráfico 8 -	Percentual de pacientes com sobrevida de 5 a 10 anos, segundo graduação histológica e Bcl-2 (p=0,003).....	64
Gráfico 9 -	Percentual de pacientes com sobrevida superior a 10 anos, segundo graduação histológica e Bcl-2 (p=0,014)....	65
Gráfico 10 -	Percentual de pacientes com sobrevida até 5 anos, segundo comprometimento de linfonodos axilares e Bcl-2 (p=0,71).....	66
Gráfico 11 -	Percentual de pacientes com sobrevida de 5 a 10 anos, segundo comprometimento de linfonodos axilares e Bcl-2 (p=0,50).....	67
Gráfico 12 -	Percentual de pacientes com sobrevida acima de 10 anos, segundo comprometimento de linfonodos axilares e Bcl-2 (p=0,05).....	68
Gráfico 13 -	Sobrevida de pacientes segundo BCL-2 para o grupo CMF (p=0,85).....	69
Gráfico 14 -	Sobrevida de pacientes segundo BCL-2 para o grupo FEC (p=0,13).....	69
Gráfico 15 -	Sobrevida de pacientes segundo BCL-2 para o grupo TMX (p=0,65).....	70
Gráfico 16 -	Sobrevida de pacientes segundo período de tempo e Bcl-2 (p=0,99).....	71

Lista de Quadros

Quadro 1 -	Critérios para graduação histológica de Bloom & Richardson (1957) aplicados do câncer de mama.....	33
Quadro 2 -	Método de avaliação da graduação histológica em câncer de mama proposto por Elston & Ellis (1991).....	34
Quadro 3 -	Avaliação do índice mitótico de acordo com microscópio e área analisada, conforme preconizado por Elston & Ellis (1991).....	34

Resumo

O câncer de mama é a afecção mais freqüente entre as mulheres em todo o mundo e com elevada taxa de mortalidade. Estímulos às pesquisas em várias direções para compreensão do comportamento biológico e possibilidade de melhor tratamento desta grave doença tem sido o desafio da ciência. Neste estudo foram avaliados a expressão da proteína Bcl-2, fatores anatomopatológicos (tamanho do tumor, comprometimento de linfonodo axilar e graduação histológica) e da sobrevida. Os fatores anatomopatológicos considerados foram: tamanho do tumor, metástases linfonodais. O fator biológico estudado é a proteína Bcl-2, analisado através da técnica imunohistoquímica. Quanto a sobrevida, as pacientes foram divididas em três grupos: sobrevida até 5 anos, de 5 a 10 anos e acima de 10 anos. Foram avaliados 117 mulheres com idade média de 50 a 59 anos que foram submetidas a tratameto cirúrgico, radioterápico e um dos três esquemas de tratamento de quimioterapia sistêmica: G1: 38 pacientes tratadas com CMF (Ciclofosfamida, Metotrexato e Fluoracil). G2: 35 pacientes tratadas com CEF (Ciclofosfamida , Epirrubicina e Fluoracil). G3: 44 pacientes tratadas com Tamoxifeno, 20 mg ao dia durante 5 anos. Os três grupos G1, G2 e G3 não apresentaram diferença estatisticamente significante quanto ao tamanho do tumor, grau histológico, expressão da proteína Bcl-2 e sobrevida. Não houve diferença estatisticamente significante entre a expressão da proteína Bcl-2 e sobrevida em nenhum dos três períodos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significante entre o tamanho do tumor e proteína Bcl-2 em nenhum dos três períodos de sobrevida avaliados. Houve diferença estatisticamente significante entre grau histológico e expressão da proteína

Bcl-2 nos períodos de 5 a 10 anos e acima de 10 anos. Houve diferença estatisticamente significativa entre comprometimento axilar e expressão da proteína Bcl-2 no período acima de 10 anos.

Abstract

Breast cancer is the most common illness in women in the world and has a high mortality rate. Stimuli towards different angles of research to understand its biological behaviour and try to improve treatment for this serious disease have challenged science. This study evaluated Bcl-2 protein expression, anatomopathological factors (tumour size, axillary lymph node compromise, and histological grade), and survival. Anatomopathological factors considered were tumour size and lymph node metastases. The biological factor studied was Bcl-2 protein, analyzed by immunohistochemistry. For survival, patients were divided into three groups: up to 5 years, 5 to 10 years, and more than 10 years survival. One hundred and seventeen women were evaluated; mean age was from 50 to 59 years, they were submitted to surgery, radiotherapy, and one of three systemic chemotherapy regimes: G1 – 38 patients treated with CMF (Cyclophosphamide, Metotrexate, and Fluoracyl). G2: 35 patients treated with CEF (Cyclophosphamide, Epirubicin, and Fluoracil). G3: 44 patients treated with 20mg/day Tamoxifen for five years. The three groups did not present significant differences for tumour size, histology grade, Bcl-2 protein expression, or survival. There was no significant difference between Bcl-2 protein expression and survival in any of the three periods evaluated. There was no significant difference between tumour size and Bcl-2 in any of the three periods evaluated. There was significant difference between histological level and Bcl-2 protein expression in the 5-10 years and over 10 years periods. There was significant difference between axillary compromise and Bcl-2 protein expression in the more than 10 years period.

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais do câncer de mama

O câncer de mama é doença considerada problema de saúde pública em toda parte do mundo por sua morbidade, mortalidade e pelo aumento da incidência nos últimos anos em países desenvolvidos e em desenvolvimento. É o câncer mais freqüente entre as mulheres sendo estimados aproximadamente 1 milhão de casos novos no mundo e mais da metade dos casos em países desenvolvidos.

Segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2008), no Brasil são esperados 49.400 casos novos de câncer de mama neste ano, com risco estimado de 51 casos a cada 100.000 mulheres. Na região Sudeste e região Sul espera-se uma incidência de 68 e 67 casos novos respectivamente em cada 100.000 mulheres.

Vários fatores de risco para câncer de mama são relacionados, sendo os mais importantes o sexo, idade, hereditariedade, estado hormonal, estilo de vida e irradiação.

Avanços tecnológicos e pesquisas tem sido direcionados para que o diagnóstico precoce e tratamento melhorem a sobrevida das mulheres (Sather, 1986;INCA, 2008).

São relacionados mais de 100 fatores como marcadores prognósticos em câncer de mama, estudados através de exames anatomopatológicos, imunohistoquímicos ou biologia molecular (Clark, 1996).

1.2. Fatores Anatomopatológicos

Os principais fatores anatomopatológicos relacionados ao câncer de mama são: Tamanho do tumor (Rosen & Groshen, 1990), comprometimento de linfonodo axilar (Elston *et al.*, 1982), graduação histológica (Hopton *et al.*, 1989) e tipo histológico (Ellis *et al.*, 1992).

1.2.1. Tamanho do Tumor

O tamanho do tumor é considerado um dos fatores prognósticos mais importantes no câncer de mama, e quanto maior o tamanho do tumor, maior a probabilidade de comprometimento de linfonodo axilar, com redução no intervalo livre de doença e sobrevida (Adair *et al.*, 1974; Roger *et al.*, 1989). É parâmetro usado no sistema TNM para o estadiamento do câncer de mama primário pelo International Union Against Cancer (IUAC).

Vários estudos demonstraram relação inversa entre tamanho do tumor e sobrevida. Tumores menores que 10 mm e tumores com 17 a 22 mm apresentavam sobrevida em 5 anos 86% e 59%, respectivamente (Rosen & Groshen, 1990 ; Elston *et al.*, 1996).

1.2.2. Comprometimento de Linfonodos axilares

A presença ou não de comprometimento de linfonodo axilar assim como o número, tamanho, localização e coalescência são importantes fatores prognósticos no câncer de mama. O comprometimento do linfonodo axilar pode ser conseqüente à agressividade do tumor primário, com tendência à metástase para outros órgãos (Fisher *et al* 1984).

Vários estudos têm demonstrado pior prognóstico quando há comprometimento dos linfonodos axilares, comparados com axilas livres de tumor (Veronesi *et al*, 1993).

O valor prognóstico de comprometimento axilar também é avaliado pelo nível em que se encontram os linfonodos metastáticos, sendo considerado mais grave o comprometimento do nível III de Berg (Canavese *et al*, 1998; Valle, 1999).

A abordagem axilar pode variar desde dissecação total da axila, pequenas amostras ou recentemente identificação de linfonodo sentinela (Danforth, 1992; Krag *et al*, 1993; Giuliano *et al*, 1994; Davidson, 1995; Veronesi *et al*, 1999).

1.2.3. Graduação Histológica

A graduação histológica dos tumores de mama é importante fator prognóstico embora não seja parâmetro utilizado no estadiamento TNM. Baseia-se nas características arquiteturais do tumor (grau histológico), do núcleo (grau nuclear), e na proliferação das células neoplásicas (índice mitótico).

Desde Greenough (1925), que demonstrou pela primeira vez a relação entre grau histológico do tumor e sobrevida, vários autores têm tentado melhorar e uniformizar os sistemas de avaliação histopatológica (Patey & Scarff, 1928; Bloom & Richardson, 1957). O sistema de Scarff-Bloom-Richardson (S B R), é o mais utilizado e define 3 graus histológicos, obtidos pela soma de 3 variantes: Formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico graduados em escores 1, 2, 3.

Quadro 1 - Critérios para graduação histológica de Bloom & Richardson (1957) aplicados do câncer de mama.

1 Formação tubular	> 50%:1	10 -50%:2	<10%:3
2 Pleomorfismo nuclear	Discreto: 1	Moderado: 2	Intenso: 3
3 Índice mitótico	1 – 10 (10cgs): 1	11 –20 (10 cga): 2	> 20 (10 cga): 3
GRAU 1: escores 3 –5; GRAU 2: escores 6 – 7; GRAU 3: escores 8 –9			

Cga: campo de grande aumento (400x).

Elston & Ellis (1991), introduziram com intuito de avaliar com maior rigor histológico o câncer de mama e propuseram outros critérios para os mesmos parâmetros obtendo também boa aceitação conforme os quadros 2 e 3.

Quadro 2 - Método de avaliação da graduação histológica em câncer de mama proposto por Elston & Ellis (1991).

FORMAÇÃO TUBULAR	ESCORE
>75%	1
10 –75%	2
< 10%	3
PLEOMORFISMO NUCLEAR	ESCORE
Células pequenas e regulares	1
Moderado aumento em tamanho	2
Variação marcante	3
CONTAGEM DE MITOSES	ESCORE
Depende do microscópio e área analisada	1 - 3

Quadro 3 - Avaliação do índice mitótico de acordo com microscópio e área analisada, conforme preconizado por Elston & Ellis (1991).

	MICROSCÓPICO		
	Leitz Ortholux	Nikon Labophot	Leitz Diaplan
Objetiva	25x	40x	40x
Diâmetro campo(mm)	0,39	0,44	0,63
Área campo(mm)	0,274	0,152	0,132
ÍNDICE MITÓTICO*			
1 Ponto	0 – 9	0 – 5	0 – 11
2 Pontos	10 – 19	6 – 10	12 – 22
3 Pontos	> 20	> 11	>23

* Avaliação do número de mitoses por 10 campos na periferia do tumor

Genestie *et al* (1998), em estudo comparativo do valor prognóstico entre a classificação de Bloom & Richardson (1957) e Elston & Ellis (1991), em uma série de 825 casos de câncer de mama não observaram nenhum benefício em relação à utilização do sistema Nottingham ao de Bloom & Richardson (1957).

1.3. Fator Biológico

1.3.1. BCL-2

O gene Bcl-2 foi isolado pela primeira vez no linfoma folicular célula B, onde é encontrado em até 90% dos casos, em decorrência da translocação que ocorre entre os genes localizados no locus 21 do braço longo do cromossomo 18 (18q21) e no locus 32 do braço longo do cromossomo 14 (14q32). A translocação resulta em aumento da expressão da proteína Bcl-2 (Tsujimoto *et al*, 1985,1986; Eissa, 1998a 1998b; Schiller *et al*, 2002). Esta proteína possui 26 Kda, 239 aminoácidos e pode ser encontrado na membrana do retículo endoplasmático, na mitocôndria e membrana nuclear.

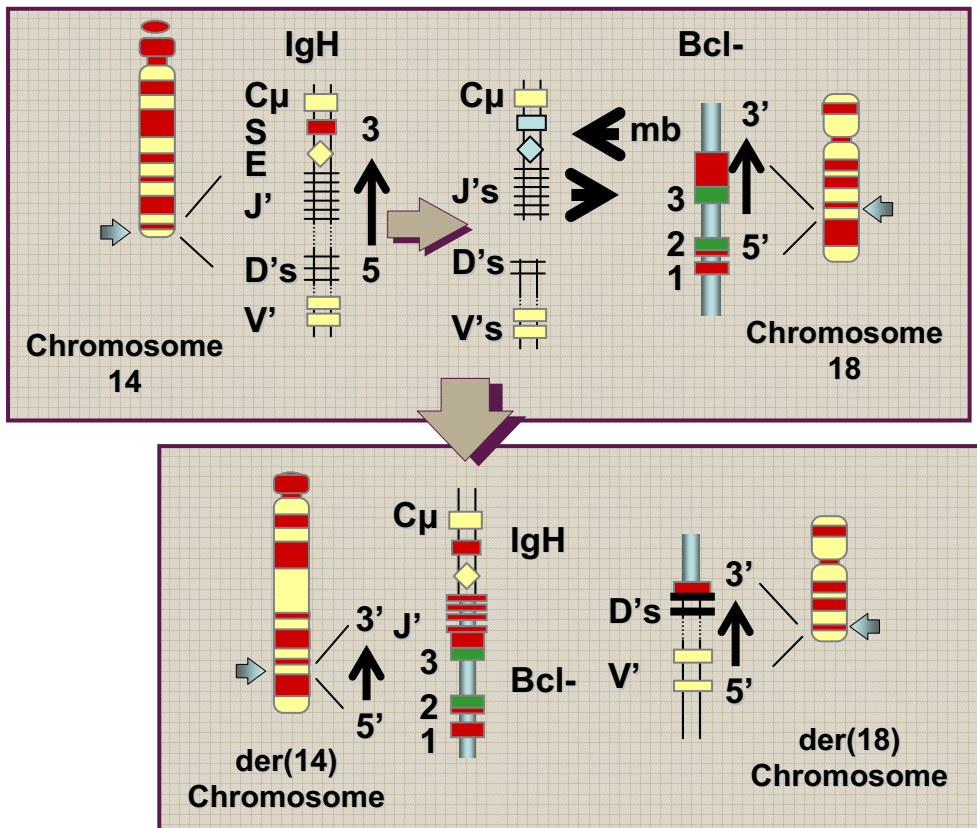


Figura 1 – Bcl-2 Translocação: t (14; 18) (q32; q21). Tsujimoto (1985); Eissa (1998)

Está relacionada ao aumento da sobrevivência celular, inibindo a apoptose, ou morte celular programada. Este processo embora não bem esclarecido, é um mecanismo controlado e fisiológico, de manutenção da homeostase tecidual (Kerr *et al*, 1972). Inicialmente, a célula em processo de apoptose, separa-se das células vizinhas, com perda de estruturas especializadas de membranas como os microvilos e desmossomos, havendo enrugamento de membranas plasmáticas, com formação de vesículas de citosol desprovidas de organelas o que possibilita reabsorção e eliminação da célula. Após a fase de condensação da cromatina nuclear e das organelas citoplasmáticas observa-se redução do volume citoplasmático. A condensação da cromatina e perda de permeabilidade da membrana nuclear resultam da fragmentação do DNA dos cromossomos em subunidades regulares.

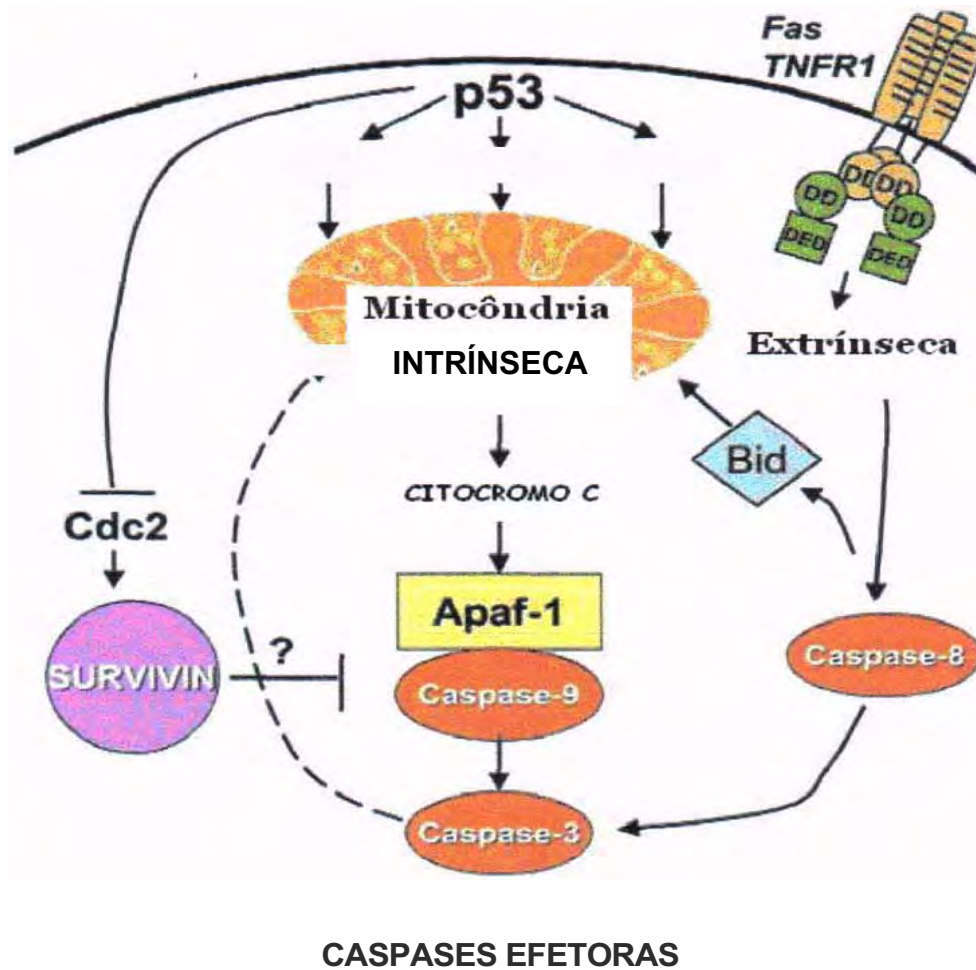


Figura 2 - Representação esquemática das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (modificado de REED, 2001)

A desintegração da célula forma os corpos apoptóticos, com conteúdo intracelular preservado, envolto por um halo claro sendo fagocitados pelos macrófagos e digeridos pelos lisossomos (Kerr *et al*, 1972; Wyllie & Currie, 1997). Esta ação de morte celular programada que ocorre em células humanas é realizada por um grupo de cisteino proteases intracelulares chamados caspases (protease específica de aspartato contendo cisteína), que são produzidas por células normais porém inativas na forma pró-caspase ou

zimogênio (Wyllie & Currie, 1997). A remoção de parte de um polipeptídeo por clivagem enzimática do zimogênio daria origem a uma caspase ativa, umas como iniciadora e outras como executoras da ação apoptótica. As caspases iniciadoras seriam clivadas em resposta a sinais de ativação a partir de outras categorias de proteínas, estas por sua vez clivariam uma das caspases executoras desencadeando a cascata de eventos de clivagem com conseqüente morte celular programada (Griffiths *et al*, 2000). Este evento está relacionado ao meio ambiente de contato intracelular e a fatores solúveis extracelulares hormonais, interleucinas, fatores de crescimento, neurotransmissores e citocinas (Louro *et al*, 2002). Existem vários receptores de membrana com via intracelular de sensibilização da célula pela apoptose, que podem ser inibidos ou ativados pelas substâncias do meio extracelular sendo os mais relevantes a família dos fatores TNF (tumor necrosis factors), os receptores TNFR-1 e TNFR-2, que apresentam diferentes domínios intracelulares com conseqüente resposta antagônica quando ativados. A ativação dos receptores FAS ou TNFR-1 desencadeia uma seqüência de eventos que leva à ativação da caspase-8 desencadeando a cascata das caspases, seguindo-se a morte celular programada, enquanto a ativação dos receptores CD30, CD40 e TNFR-2 promovem sinais de sobrevivência celular (Louro *et al*, 2002; Alberts *et al*, 2002).

São denominados domínio de morte a seqüência de aminoácidos presentes na porção C-terminal caudal citoplasmático dos receptores FAS e TNFR-1. Três proteínas são responsáveis pela promoção da apoptose, RIP, TRAD e FADD. Os outros membros da família TNFR enviam

sinais que elevam o limiar apoptótico da célula, como os TNFR-2, CD30 e CD40, que interagem com as proteínas intracelulares, e com os fatores de receptores TNF ou de sobrevivência, denominados TRAF1, 2 e 3, inibindo o processo apoptótico (Reed, 2001; Louro *et al*, 2002).

Uma via intrínseca, de morte celular programada pode ocorrer por estímulo dentro das mitocôndrias que são induzidas a liberar o citocromo c, uma das proteínas mitocondriais que participa da respiração que por sua vez se liga a uma proteína adaptadora chamada Apaf-1 (fator apoptótico de ativação de protease), que ativaria a caspase-9, que por sua vez ativaria a caspase-3 determinando a apoptose (Reed, 2001; Alberts *et al*, 2002).

Por outro lado o mecanismo de morte celular programada pode sofrer interferência da família da proteína Bcl-2, onde dois grupos de oncogenes são considerados. O grupo de oncogene que promove apoptose são Bad, Bax e Bak, enquanto outro grupo constituído por Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 e A1/Bcl-1, atua como proteínas inibidoras de apoptose, bloqueando a liberação de citocromo c, sendo o mais importante a proteína Bcl-2 (Griffiths *et al* 2000; Alberts *et al*, 2002).

A expressão da proteína Bcl-2 pode manifestar-se em vários tecidos normais embrionários, fetais e adultos ou em tecidos malignos como mama, pulmão (Fontanini *et al*, 1995), colorretal (Sinicrope *et al*, 1995), estômago (Krajewska *et al*, 1996), e pâncreas (Hockenbery *et al*, 1991), não tendo sido demonstrado em outros tecidos como muscular e hepático (Hockenbery *et al*, 1991).

A estrutura da proteína Bcl-2 apresenta quatro diferentes

domínios (BH1 a BH4) e sete regiões de hélices alfa (alfa1 a 7). Entre os domínios BH-4 e BH-3, apresenta uma região flexível, provavelmente ligada à fosforilação proteica, regulando a sua função. A região que compreende os domínios 1 2 e 3 corresponde a região de dimerização. Entre os domínios BH1 e BH2 encontra-se a região correspondente a alfa5 e alfa6, local diretamente relacionado à formação de canais de ions ou proteínas nas membranas em que esta oncoproteína se encontra. O domínio BH-4, encontrado próximo à região amino terminal da proteína, apresenta a primeira alfa hélice que está relacionada com a ligação a proteína Raf-1 e a proteína calcineurim (proteína fosfatase dependente) presentes em todas as proteínas inibidoras de apoptose da família Bcl-2 e não identificadas nas proteínas estimuladoras de apoptose (Reed, 1997;Ruvolo, 2001).

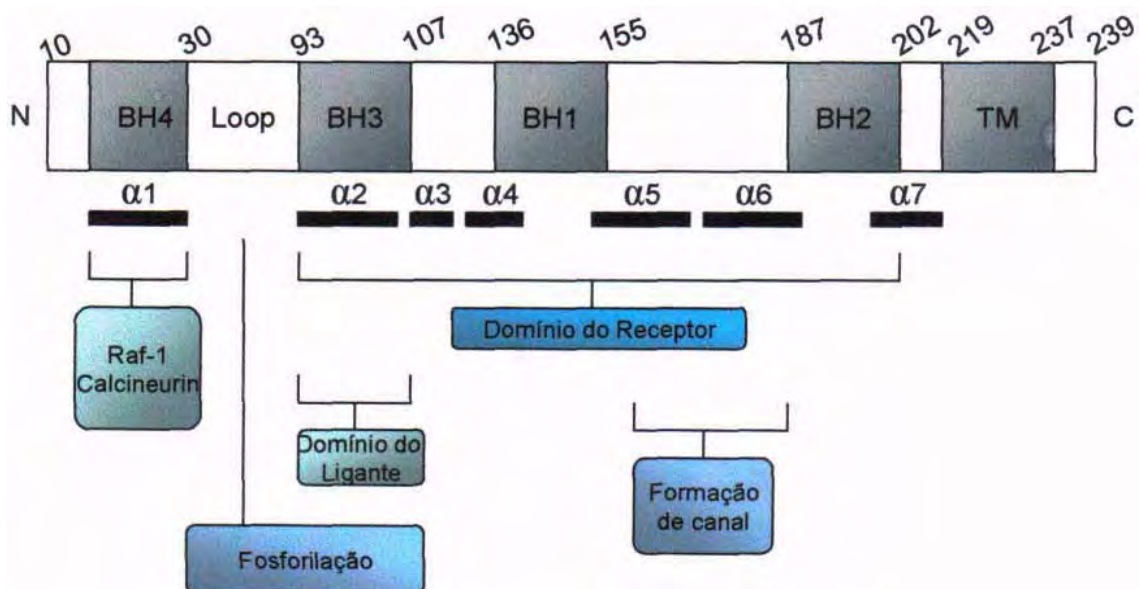


Figura 3 – Estrutura proteica do gene Bcl-2 com os seus domínios (BH1-4) e sete regiões de hélice alfa (modificado de REED, 1997).

O mecanismo de ação da proteína inibidora Bcl-2 parece estar

ligado à formação de canais de íons e proteínas, nas membranas em que estas proteínas se encontram, inibindo a permeabilidade da membrana como da mitocôndria. A proteína Bcl-2 teria controle da apoptose pela capacidade de interagir com outras proteínas como proteína quinase Raf-1, calcineurim fosfatase, (Reed, 1997). Os estudos de Reed (1999) sugerem duas formas possíveis de inibição da apoptose: bloqueando liberação de citocromo c pela mitocôndria, impedindo ativação da caspase-9. após interagir com proteína citoplasmática Apaf-1 (fator apoptótico de ativação de protease). Outra forma de inibição seria a proteína Bcl-2 ligando-se diretamente à proteína citoplasmática fator apoptótico de ativação de protease (Apaf-1) com consequente bloqueio de clivagem das caspases executoras como caspase-9.

1.3.2. BCL-2 e Carcinoma de Mama

No tecido mamário, a proteína Bcl-2 pode estar expressa em epitélio ductal normal, na hiperplasia atípica, nos carcinomas intraductal e invasivo. Em carcinoma ductal invasivo a expressão da proteína Bcl-2 está presente em 100%, 90% e 33%, respectivamente, em tumores bem, moderadamente ou pouco diferenciados. Em tumores mamários intraductais, os tipos papilar e cribriforme apresentam maior expressão de proteína Bcl-2 comparados com o tipo comedo (Siziopikou *et al*, 1996). Kobayashi *et al*, (1997). Zhang *et al*, (1998), observaram que a expressão da proteína Bcl-2 está presente na maioria das células epiteliais ductais e diminui conforme a progressão para carcinoma intraductal e invasivo.

Pela diversidade de resultados obtidos por diversos autores em relação ao estudo da expressão da proteína Bcl-2 embora tivesse associação favorável com outros fatores como diploidia, baixo índice mitótico, baixo nível de proliferação, a sua real importância como marcador individual e fator prognóstico ou até preditivo é controversa.

Vários estudos na literatura tem demonstrado associações favoráveis entre a expressão da proteína Bcl-2 e receptores de estrogênio e progesterona (Lee *et al*, 1996; Kymionis *et al*, 2001; Yang *et al*, 2003) direcionando portanto para a possibilidade de tratamento hormonal favorável.

Alguns autores relacionaram a expressão da proteína com menor tamanho do tumor (Silvestrini *et al*, 1994; Kobayashi, 1997; Yang *et al*, 2003), enquanto Berardo *et al*, (1998) e Park *et al*(2002) não demonstraram esta relação.

Kobayashi *et al*, (1997, Kymionis *et al* (2001), Yang *et al* (2003), Hlupic *et al* (2004) demonstraram diferença estatisticamente significativa a presença de expressão da proteína Bcl-2 em tumores bem diferenciados, baixo grau histológico e ausência de comprometimento de linfonodo axilar.

Chang *et al*, (2003) demonstram que a ausência de proteína Bcl-2 relacionava com significativa pior sobrevida. Sierra *et al*, (2000) encontraram associação estatisticamente significativa entre alta expressão da proteína Bcl-2 e comprometimento axilar. No entanto Alsabeh *et al*, (1996) Linjawi *et al*, (2004) não demonstraram esta associação.

Yang *et al* (2003) demonstraram respostas favoráveis à

quimioterapia e hormônioterapia na presença da proteína Bcl-2 assim como melhora na sobrevida em paciente com câncer de mama sem comprometimento axilar, enquanto Gasparini *et al* (1995) estudando 180 pacientes com câncer de mama invasivo com comprometimento axilar observaram que tanto os tratados com quimioterapia como hormonioterapia adjuvantes, a sobrevida livre de doença em 5 anos foram positivamente melhores na presença de proteína Bcl-2 se comparados com ausência de expressão da proteína Bcl-2 assim como em relação à sobrevida.

Derossi *et al*, (2003) demonstraram relação inversa entre expressão da proteína Bcl-2 e baixo grau histológico, estudando 118 casos de carcinoma ductal invasivo através da punção aspirativa com agulha fina, correlacionando-o com bom prognóstico.

Grace *et al*, (2006) estudando 13 marcadores, entre eles a proteína Bcl-2, em 930 casos de carcinoma invasivo de mama demonstraram que a expressão da proteína Bcl-2 é importante fator prognóstico independente e de sobrevida com a possibilidade de utilidade junto ao Índice Prognóstico de Nottingham (NPI).

2. Objetiva

carcinoma ductal invasivo de mama. Correlacionar com fatores anatomopatológicos e sobrevida.

3. Sujeitos e Métodos

3.1. Pacientes e Tumores

Trata-se de estudo retrospectivo, analítico e observacional. A aprovação no Comitê de Ética no anexo 1.

Foram avaliadas retrospectivamente 1050 laudos de carcinoma ductal invasivo de mama proveniente do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), de 1986 a 1998 sendo período de seguimento até 2003 e destes foram selecionados 117 casos que obedeceram os seguintes critérios de inclusão: Todos os tumores representavam carcinoma ductal invasivo sem outras especificações (SOE), com disponibilidade de informações referente ao tipo de tratamento realizado (cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia), tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos axilares, grau histológico e sobrevida.

3.1.1. Tratamentos cirúrgicos realizados.

Todas as pacientes foram submetidas a um dos seguintes tratamentos cirúrgicos: Mastectomia (Halsted, Patey ou Madden), Quadrantectomia ou Setorectomia com margens comprovadamente livres do tumor e esvaziamento axilar.

3.1.2. Tratamento adjuvante local

Todas as pacientes após a cirurgia receberam radioterapia em doses que variaram de 5000 a 6000 CGY.

3.1.3. Tratamento Adjuvante Sistêmico

Todas as pacientes, após tratamento cirúrgico e radioterapia, receberam tratamento sistêmico e foram divididas em três grupos :

G1 - 38 pacientes receberam tratamento quimioterápico com CMF (ciclofosfamida + Metotrexato + Fluoracil) de acordo com esquema :

600 mg/m² EV (ciclofosfamida)

40 mg/m² EV (Metotrexato)

intervalos de 21/21 dias.
duração de 6 – 8 ciclos

600mg/m² EV (Fluoracil)

G2 – 35 pacientes receberam tratamento quimioterápico com FEC (Fluoracil + Epirrubicina + ciclofosfamida) de acordo com esquema:

500mg/m² EV (Fluoracil)

100mg/m² EV (Epirrubicina)

intervalo de 21/21 dias
duração de 6 Ciclos

500mg/m² EV (Ciclofosfamida)

G3 – 44 pacientes receberam tratamento hormonal com tamoxifeno na dosagem de 20 mg por dia por um período de 5 anos.

3.2. Tamanho do tumor

As medidas dos tumores foram fornecidas a partir dos laudos anatomopatológicos e obedecendo à classificação TNM (T: tumor, N: comprometimento de linfonodos axilares, M: metástase), proposta pela International Union Against Cancer (IUAC). O tamanho dos tumores foi dividido em três subgrupos de acordo com o maior diâmetro:

T1: < 2cm
T2: 2 – 5cm
T3 : > 5cm

3.3. Linfonodos Axilares

Dois subgrupos foram considerados com relação ao comprometimento metastático dos linfonodos axilares: L1 = ausência de comprometimento axilar e L2 = presença de comprometimento axilar.

3.4. Graduação Histológica

A graduação histológica foi realizada de acordo com o método proposto por Bloom & Richardson (1957). Foi utilizado microscópio Olympus e a contagem foi realizada com aumento de 400x (40 x da objetiva e 10 x da ocular).

De acordo com essa análise a graduação histológica foi dividida em três subgrupos:

GI : ESCORES 3 –5

GII : ESCORES 6 –7

GIII: ESCORES 8- 9

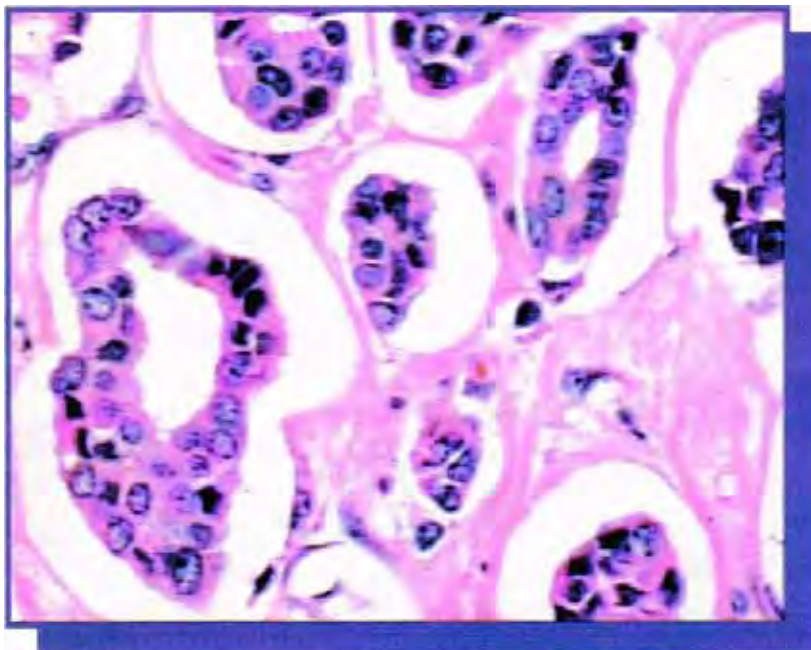


Figura 4 - Carcinoma ductal invasivo grau I, revelando formação tubular em mais de 50% do tumor, células neoplásicas com núcleos redondos, uniformes, com mínima atipia nuclear, ausência de figuras de mitoses. Coloração pela Hematoxilina – Eosina; 400x.

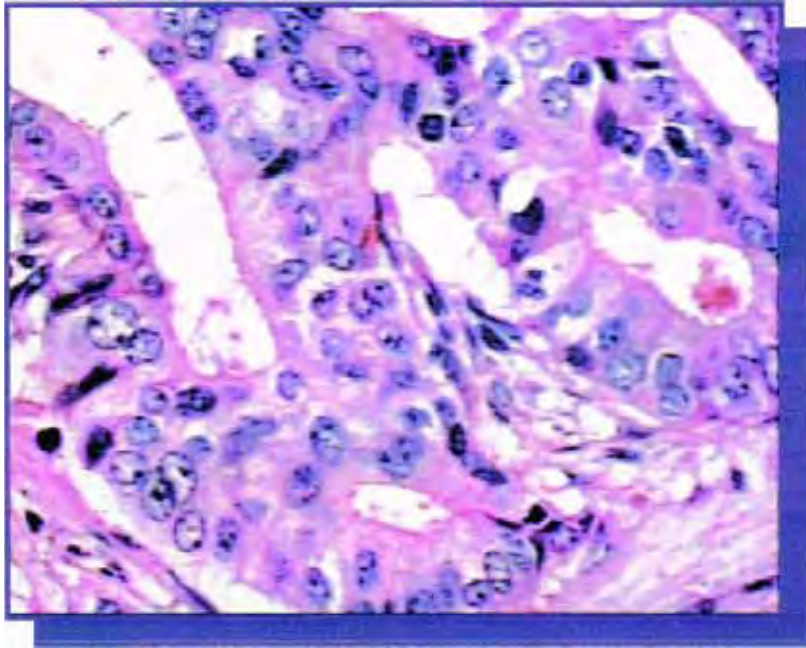


Figura 5 - Carcinoma ductal invasivo grau II, revelando formação tubular entre 10 a 50% do tumor, células neoplásicas revelando moderado aumento de tamanho. Coloração pela Hematoxilina – Eosina; 400x

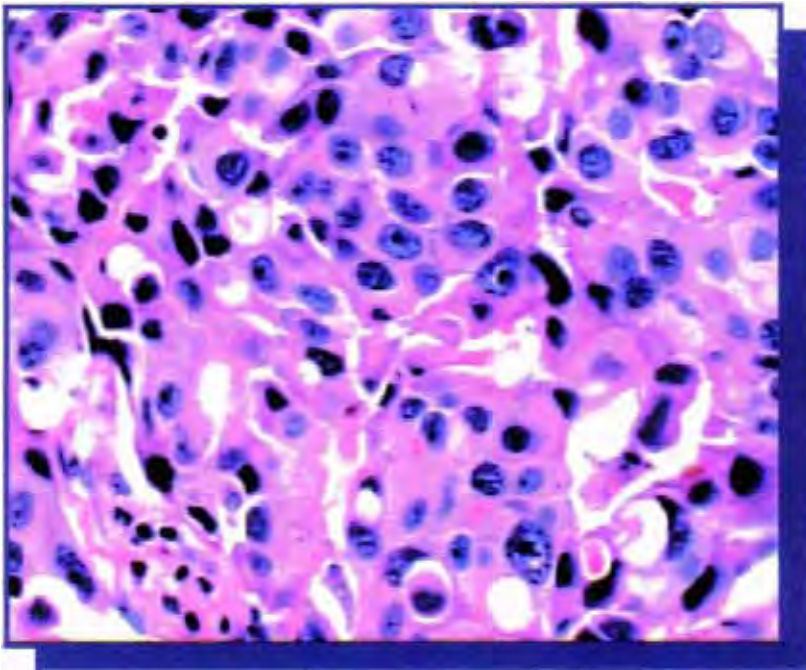


Figura 6 - Carcinoma ductal invasivo grau III, com ausência de formação tubular; células neoplásicas revelando intensa atipia, pleomorfismo acentuado e freqüentes figuras de mitoses. Coloração pela Hematoxilina - Eosina; 400x.

3.5. Sobrevida

De acordo com a sobrevida, as pacientes foram divididas em :

- Sobrevida global até 5 anos
- Sobrevida global de 5 a 10 anos
- Sobrevida global superior a 10 anos

3.6. Imunohistoquímica

A proteína Bcl-2 foi pesquisada utilizando-se técnica de imunohistoquímica.

3.6.1. Técnica Imunohistoquímica

Utilizamos o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com modificações (HSU *et al.*, 1981), com auxílio de recuperação antigênica pelo forno de microondas, com o descrito a seguir:

Os tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina foram cortados com 3 micra de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo poli-D Lisina (Sigma chemical corporation, 127889, Saint Louis/MO, EUA) para evitar o descolamento dos cortes durante a imunocoloração . Em seguida, os cortes foram desparafinados em Xilol por 5 minutos (3 banhos), hidratados em álcool etílico absoluto (4 banhos) e lavados com solução salina tamponada (SST) em pH 7,4 por 5

minutos. Posteriormente, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, diluído em SST por 5 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Utilizamos o método de recuperação de epítomos pelo calor (SST de citrato com pH 6,4 por 15 minutos em forno de microondas caseiro SHARP, modelo Interactive Touch On, a 900W) para pesquisa da proteína Bcl-2. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti – Bcl-2 na diluição 1:300 em média por 16 horas, incluindo o período no forno. No dia seguinte, após lavagem com SST, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado anti-camundongo, na diluição de 1:160 (Vector Corporation, Burlingame/CA, EUA). A seguir, realizou-se incubação por 45 minutos com complexo ABC na proporção de uma gota do reagente A (avidina) e uma gota do reagente B (biotina ligada à peroxidase) na diluição de 5ml de solução de TRIS. Para visualização da reação, os cortes foram tratados com solução de DAB(3-3) - tetra – hidrocloreto de diaminabenzidina na concentração de 1mg/ml de solução tampão de TRIS e solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 5 minutos. Os cortes foram, então, contra cortados com verde de metila por 5 minutos com posterior desidratação em banho de álcool etílico absoluto (5 banhos) e Xilol (3 banhos).

Todos os passos da reação imunohistoquímica foram realizados à temperatura ambiente, com exceção da incubação no forno de microondas. Entre cada passo da reação, as lâminas foram lavadas várias vezes com SST (pH = 7,4).

3.6.2. Resultados Imunohistoquímicos e Escores utilizados.

Segundo os resultados imunohistoquímicos as pacientes foram subdivididas em dois grupos:

Grupo A (GA): < de 50% de imunorreatividade em padrão citoplasmático nas células neoplásicas .

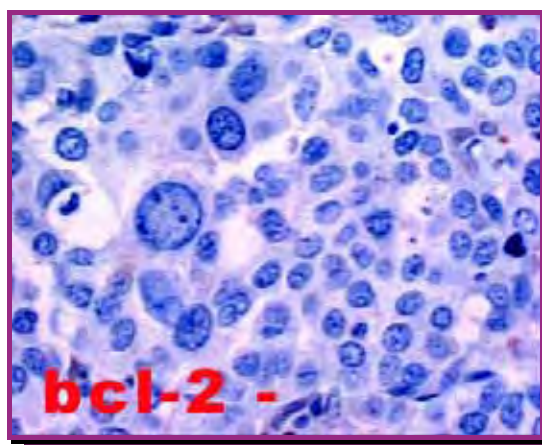


Figura 7 - BCL-2 (-)

Grupo B (GB): > ou = 50% de imunorreatividade em padrão citoplasmático nas células neoplásicas.

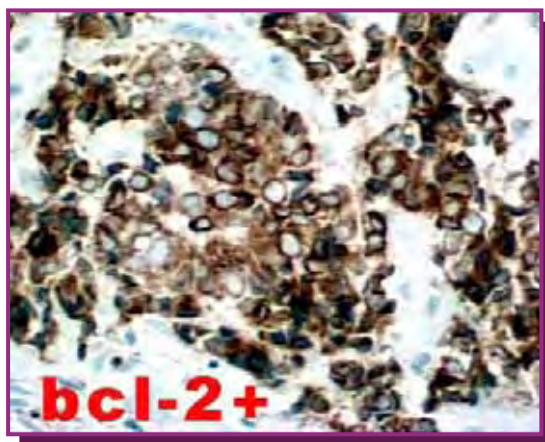


Figura 8 - BCL-2 (+)

3.7. Metodologia Estatística

Para estudo da associação entre as variáveis foi utilizado o teste do qui quadrado e para estudo da sobrevida foi utilizado o estimador de Kaplan-Meier, sendo que o nível de significância utilizado foi de 5%. Os resultados foram apresentados em forma de tabelas e gráficos (Fisher *et al*, 1993).

4. Resultados

Proporção de freqüência da idade nos grupos G1, G2 e G3.

- A idade média nos grupos G1 : 50,8 anos
- A idade média nos grupos G2 : 50 anos
- A idade média nos grupos G3 : 59,4 anos

Proporção de freqüência dos grupos G1, G2 e G3 considerando os períodos de sobrevida até 5 anos, de 5 a dos 10 anos e acima de 10 anos.

Os três grupos G1, G2 e G3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação aos períodos de sobrevida considerados.

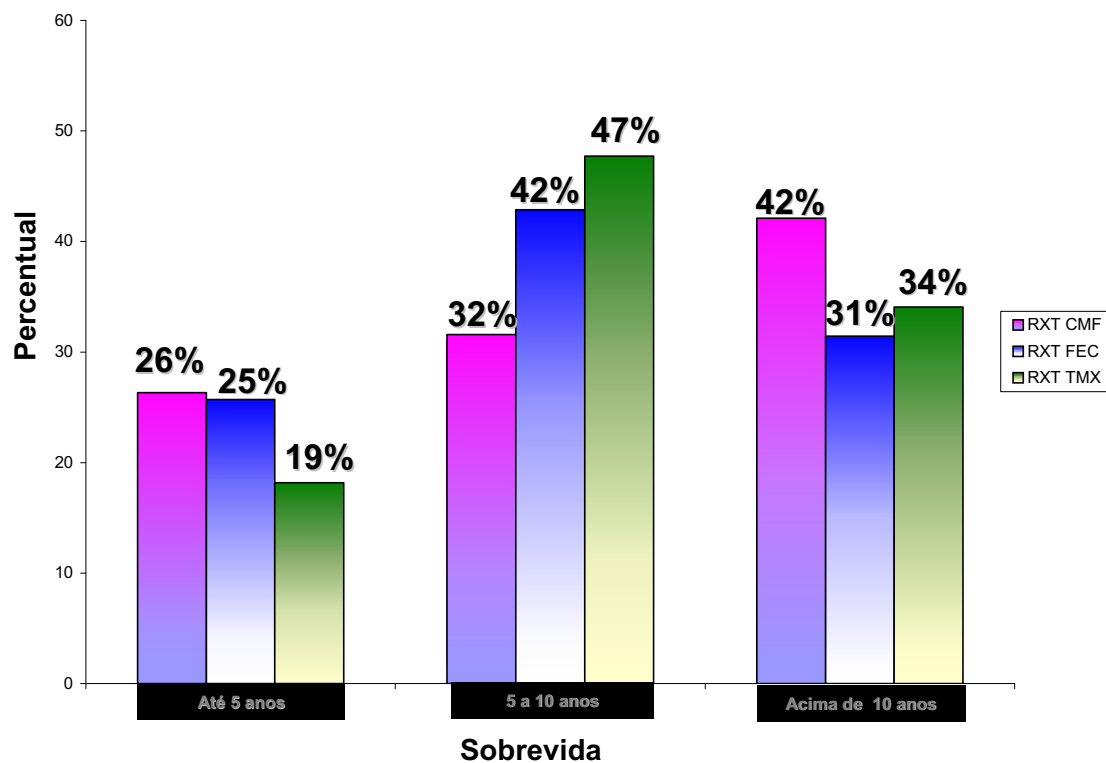


Gráfico 1 - Percentual de pacientes segundo período de sobrevida (anos) e grupos G1, G2 e G3 (p=0,61)

Proporção de frequência do tamanho do tumor (T) nos grupos G1, G2 e G3

A maioria dos tumores nos três grupos foi T2 seguidos por T1 e T3, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao tamanho do tumor.

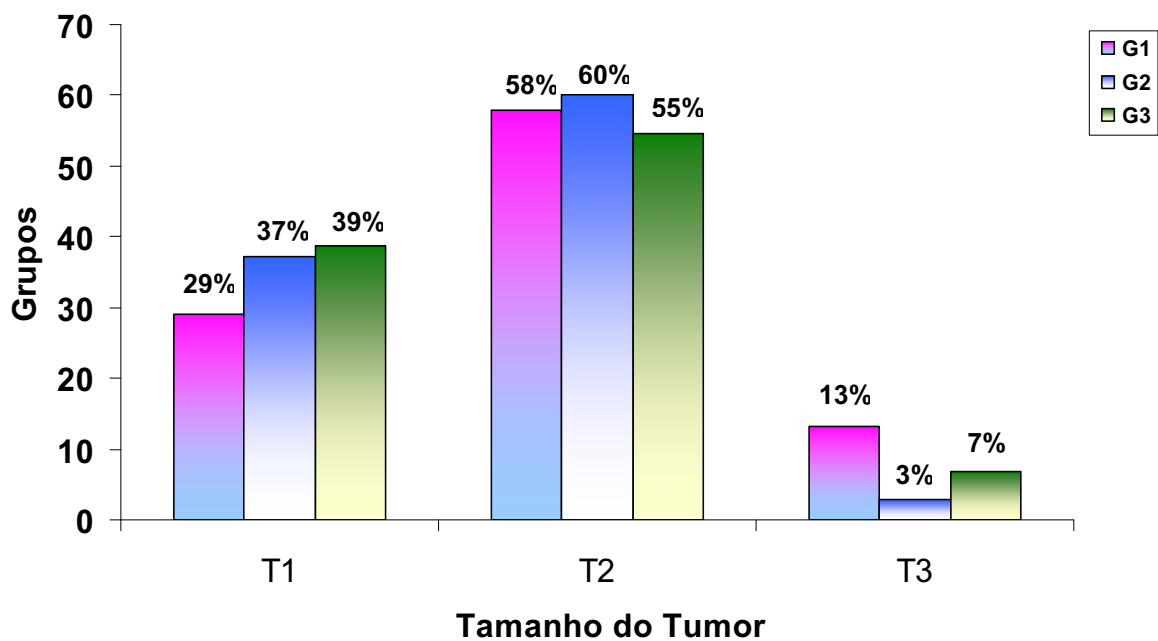


Gráfico 2 - Percentual de pacientes segundo grupos e tamanho do tumor (T) ($p=0,50$)

Proporção de frequência da graduação histológica (G) nos grupos G1, G2 e G3.

A maioria dos tumores nos três grupos foi GII seguidos por GIII e GI, porém não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto à graduação histológica.

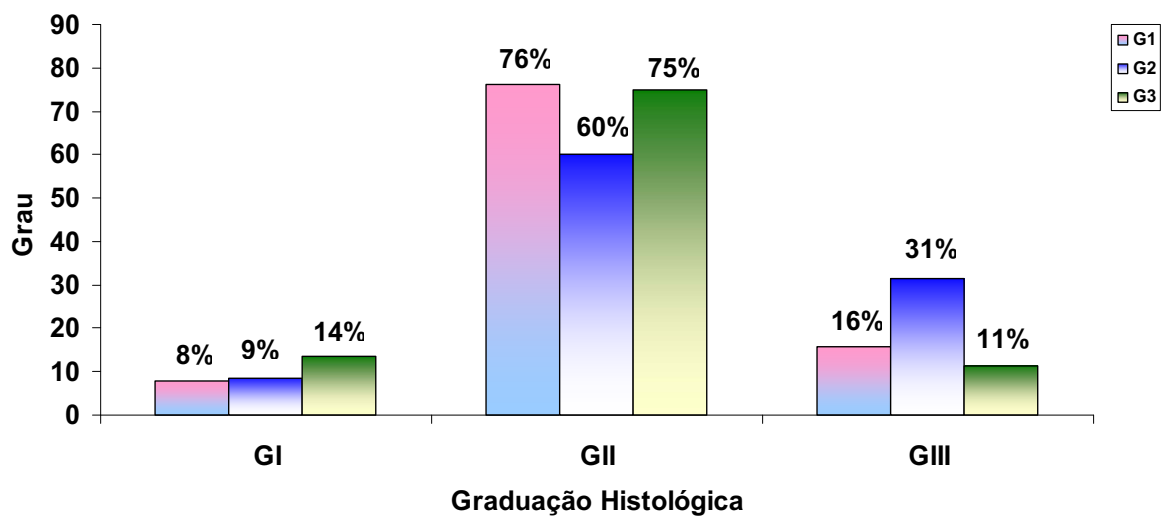


Gráfico 3 - Percentual de pacientes segundo grupo e graduação histológica (G) ($p=0,19$)

Proporção de frequência do tamanho do tumor (T), nos grupos GA e GB considerando o período de sobrevida até 5 anos.

Nos GA e GB prevaleceram tumores T2, seguidos de T3. Não verificamos tumores T1 em GA e só 2 tumores em GB. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GA e GB.

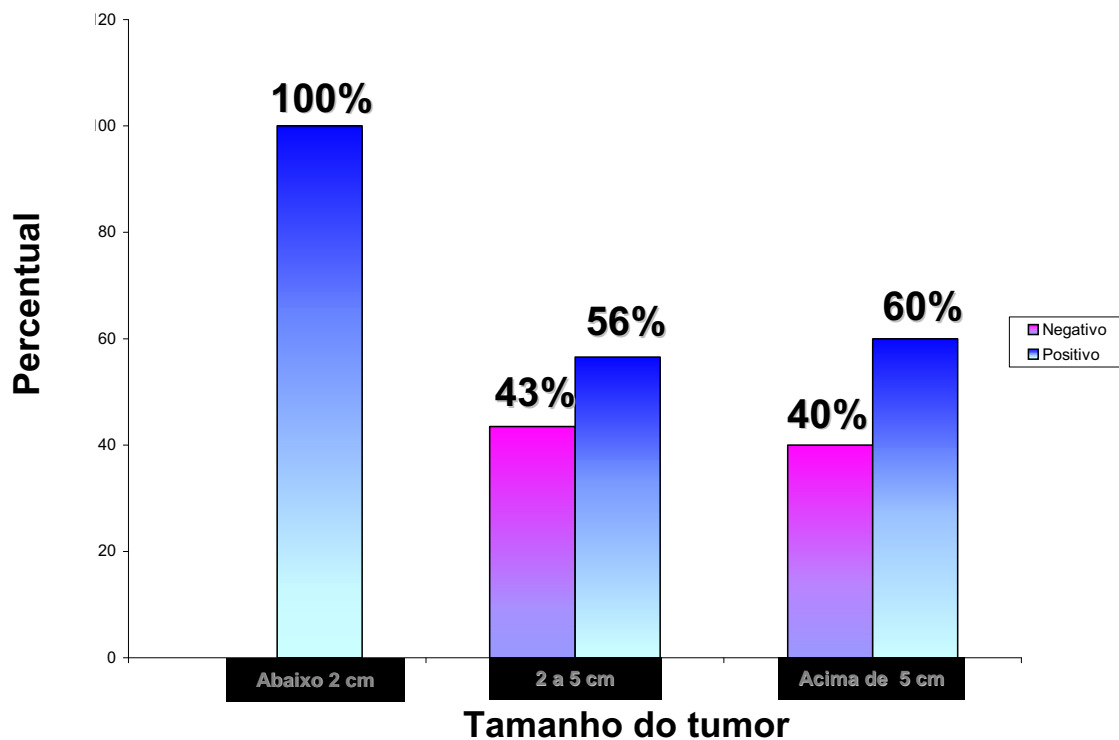


Gráfico 4 - Percentual de pacientes com sobrevida até 5 anos segundo tamanho do tumor e expressão da proteína Bcl-2 ($p=0,48$).

Proporção de freqüência do tamanho do tumor (T) nos grupos GA e GB considerando a sobrevida de 5 a 10 anos.

Tanto no grupo A como no grupo B prevaleceram os tumores T2 seguidos de T1 e T3. Tumores do grupo B estão em maior quantidade, que no grupo A porém sem diferença estatística significativa.

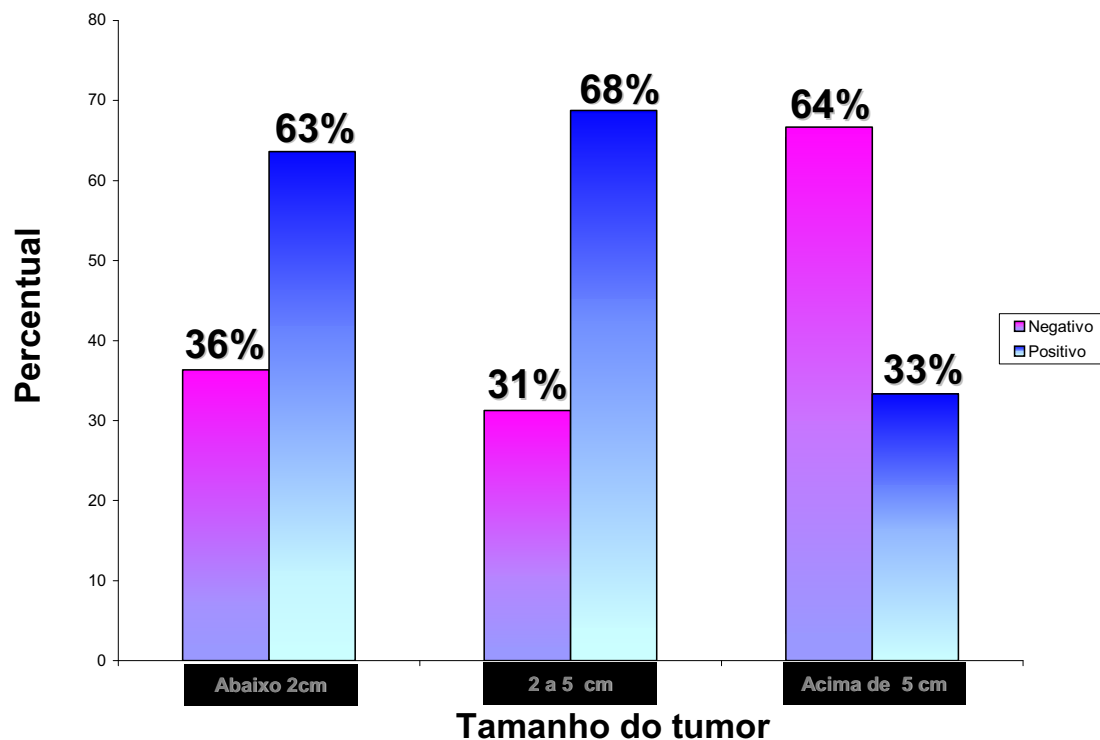


Gráfico 5 - Percentual de pacientes com sobrevida de 5 a 10 anos, segundo tamanho do tumor e Bcl-2 ($p=0,44$)

Proporção de freqüência do tamanho do tumor (T) nos grupos GA e GB considerando o período de sobrevida acima de 10 anos

No grupo A não houve tumor T3 e no grupo B, foi representado por apenas um caso. Tanto no grupo A como no grupo B a proporção entre T1 e T2 não foram diferentes. Portanto não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos.

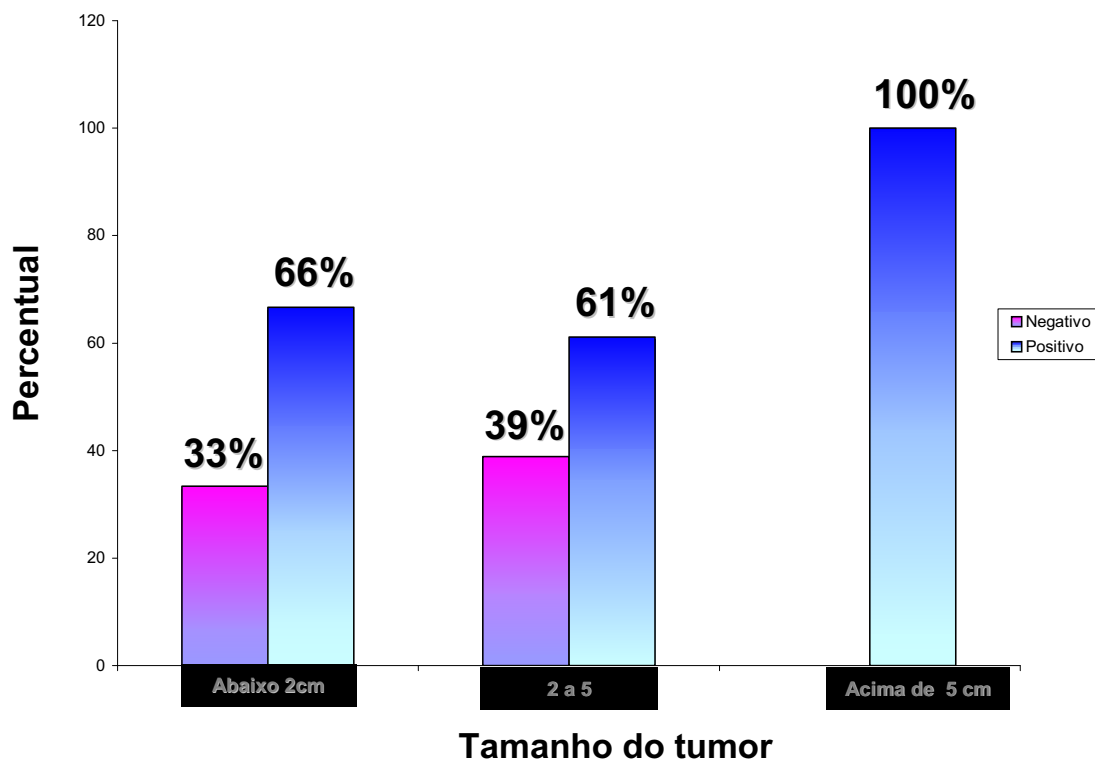


Gráfico 6 - Percentual de pacientes com sobrevida acima de 10 anos, segundo tamanho do tumor e Bcl-2 ($p=0,72$).

Proporção de frequência do grau histológico (G) nos grupos GA e GB considerando o período de sobrevida até 5 anos.

Tanto no grupo A como no grupo B não houve tumores GI. Tumores GII prevaleceram em ambos os grupos A e B. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos.

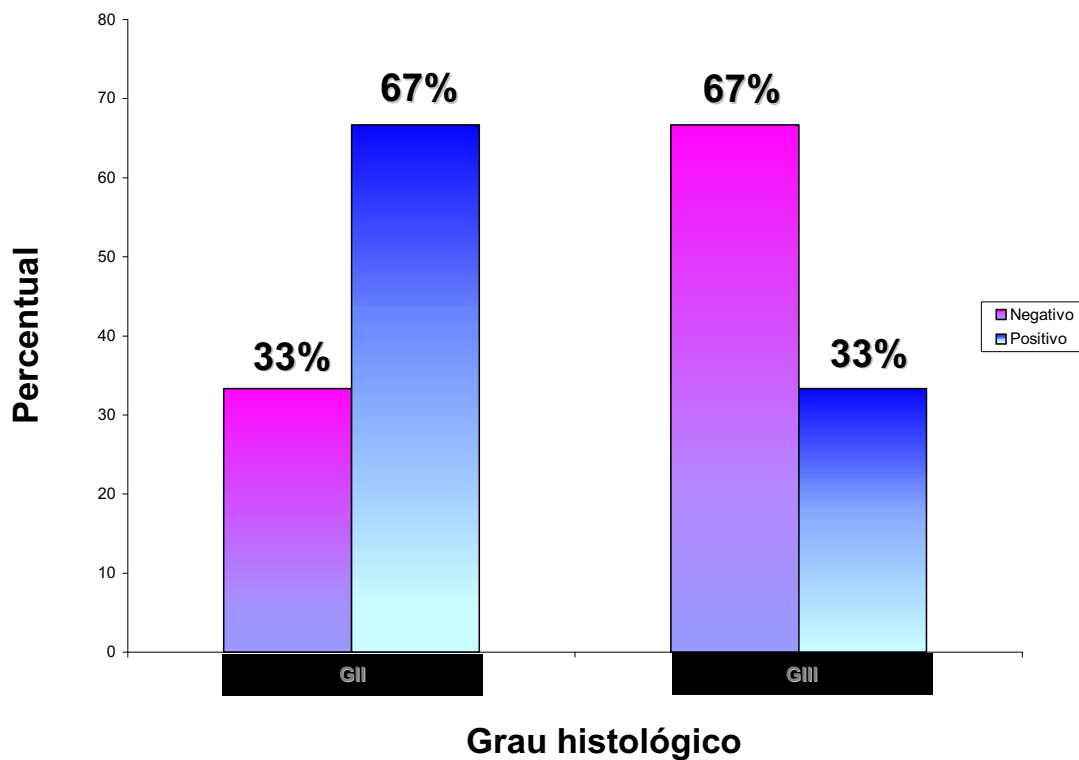


Gráfico 7 - Proporção de frequência dos grupos GA e GB considerando os períodos de sobrevida até 5 anos, segundo graduação histológica e Bcl-2. ($p=0,14$).

Proporção de frequência do grau histológico (G) nos grupos GA e GB considerando o período de sobrevida de 5 a 10 anos.

No grupo A prevaleceram tumores GII, seguidos por GIII e GI. No grupo B prevaleceram os tumores GII, seguidos de GI e GIII. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

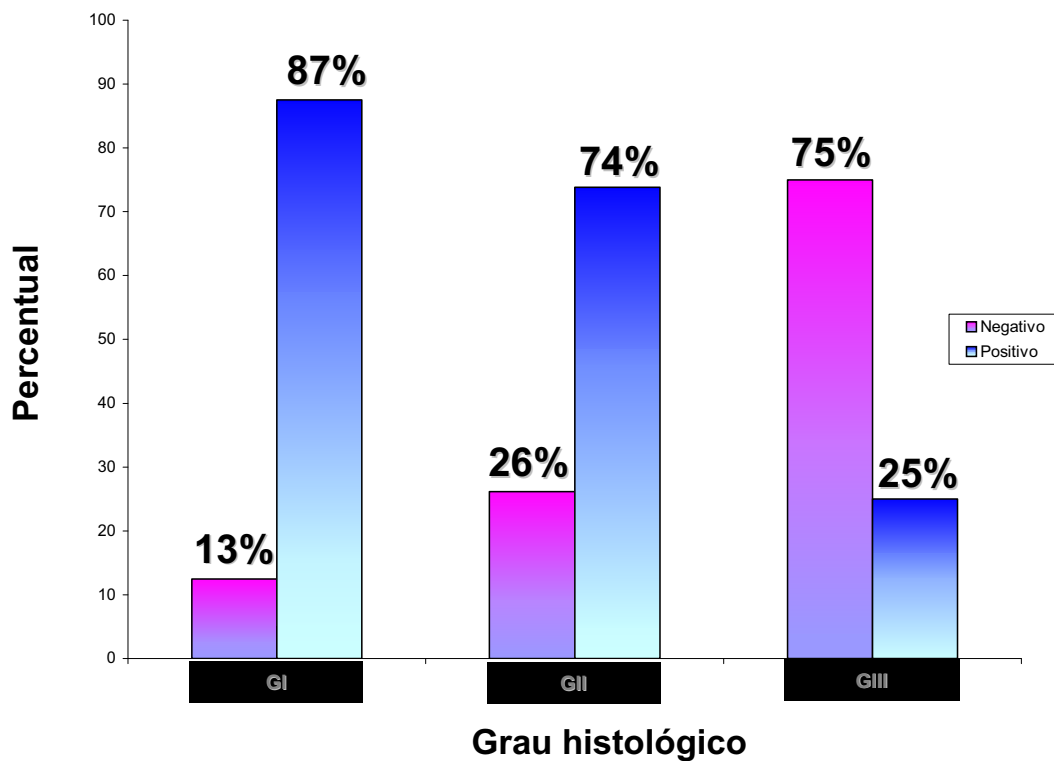


Gráfico 8 - Percentual de pacientes com sobrevida de 5 a 10 anos, segundo graduação histológica e Bcl-2 ($p=0,003$)

Proporção de frequência do grau histológico (G) nos grupos GA e GB considerando o período de sobrevida acima de 10 anos.

No grupo A houve igual número de tumores GII e GIII. No grupo B prevaleceram tumores GII, seguidos de GI, com ausência de tumores GIII. Houve diferença significativa entre os grupos.

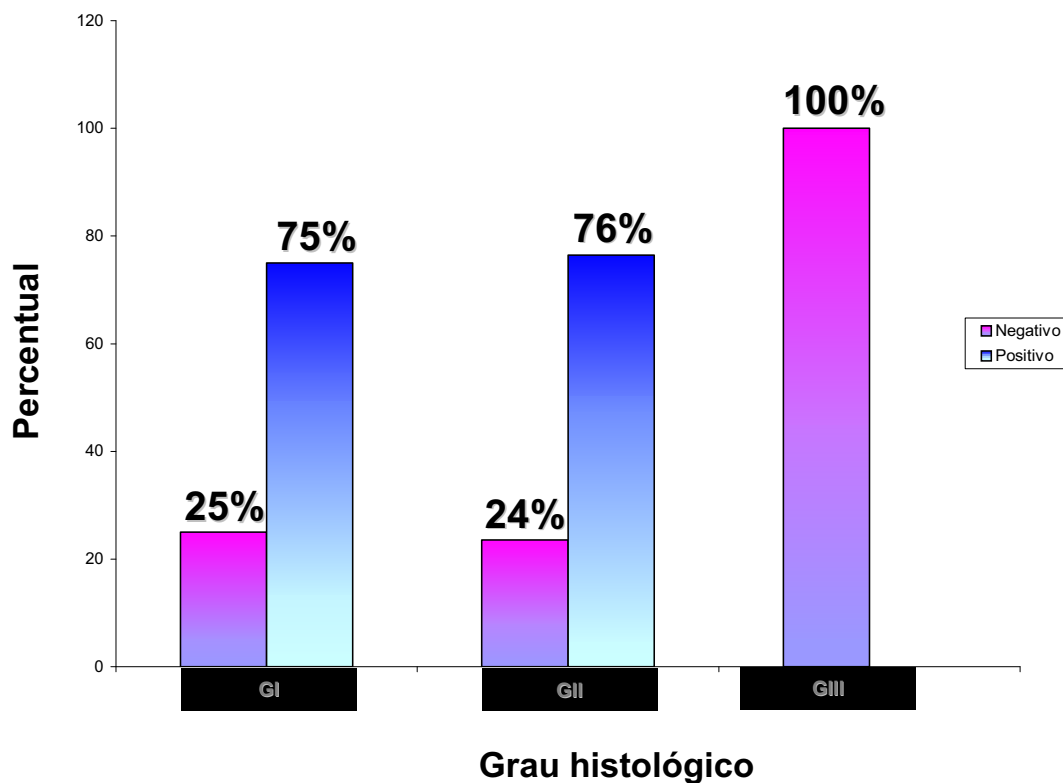


Gráfico 9 - Percentual de pacientes com sobrevida superior a 10 anos, segundo graduação histológica e Bcl-2 ($p=0,014$).

Proporção de freqüência do comprometimento axilar (L) nos grupos GA e GB considerando o período de sobrevida até 5 anos.

Tanto no grupo A como no grupo B prevaleceram tumores com comprometimento axilar.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

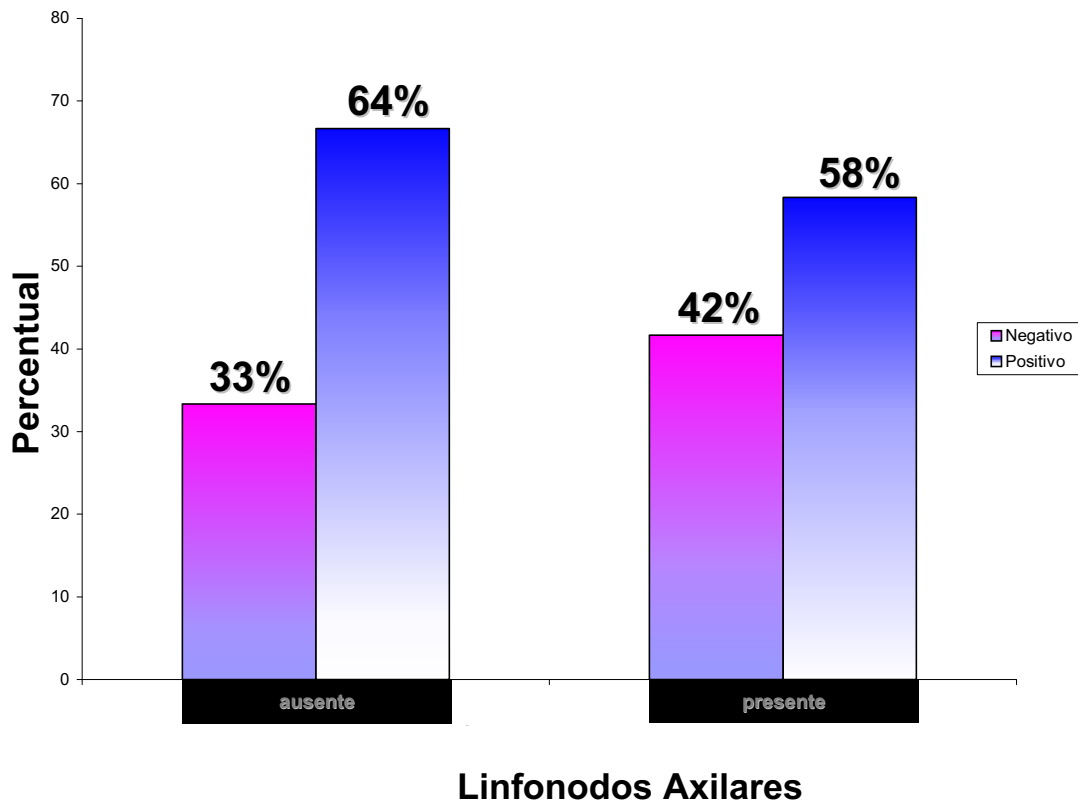


Gráfico 10 - Percentual de pacientes com sobrevida até 5 anos, segundo comprometimento de linfonodos axilares e Bcl-2 (p=0,71)

Proporção de freqüência do comprometimento axilar (L) nos grupos GA e GB considerando o período de sobrevida de 5 a 10 anos.

Tanto no grupo A como no grupo B houve maior número de L2, porém, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,50$)

Distribuição de freqüências dos tumores L1 e L2 nos grupos GA e GB – Sobrevida de 5 a 10 anos.

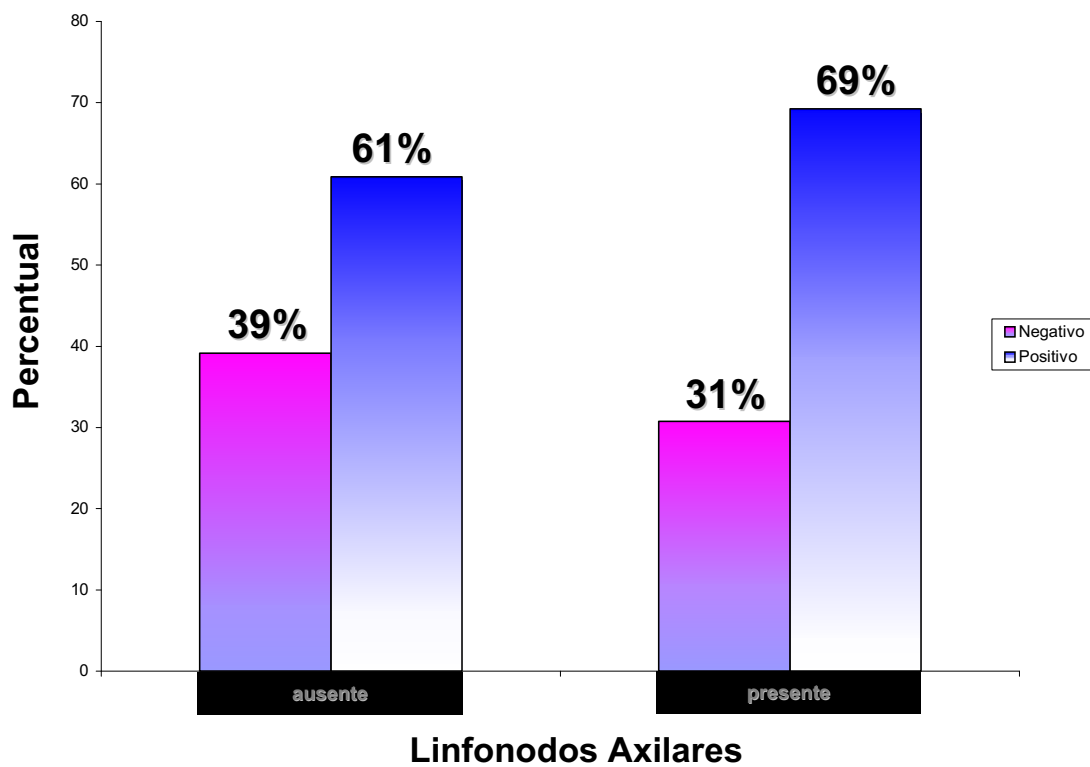


Gráfico 11 - Percentual de pacientes com sobrevida de 5 a 10 anos, segundo comprometimento de linfonodos axilares e Bcl-2 ($p=0,50$)

Proporção de freqüência do comprometimento axilar (L) nos grupos GA e GB considerando o período de sobrevida acima de 10 anos.

No grupo A houve 7 casos L1 e 2 casos L2 enquanto no grupo B houve 6 e 10 casos, L1 e L2 respectivamente, havendo diferença estatística significativa ($p=0,05$).

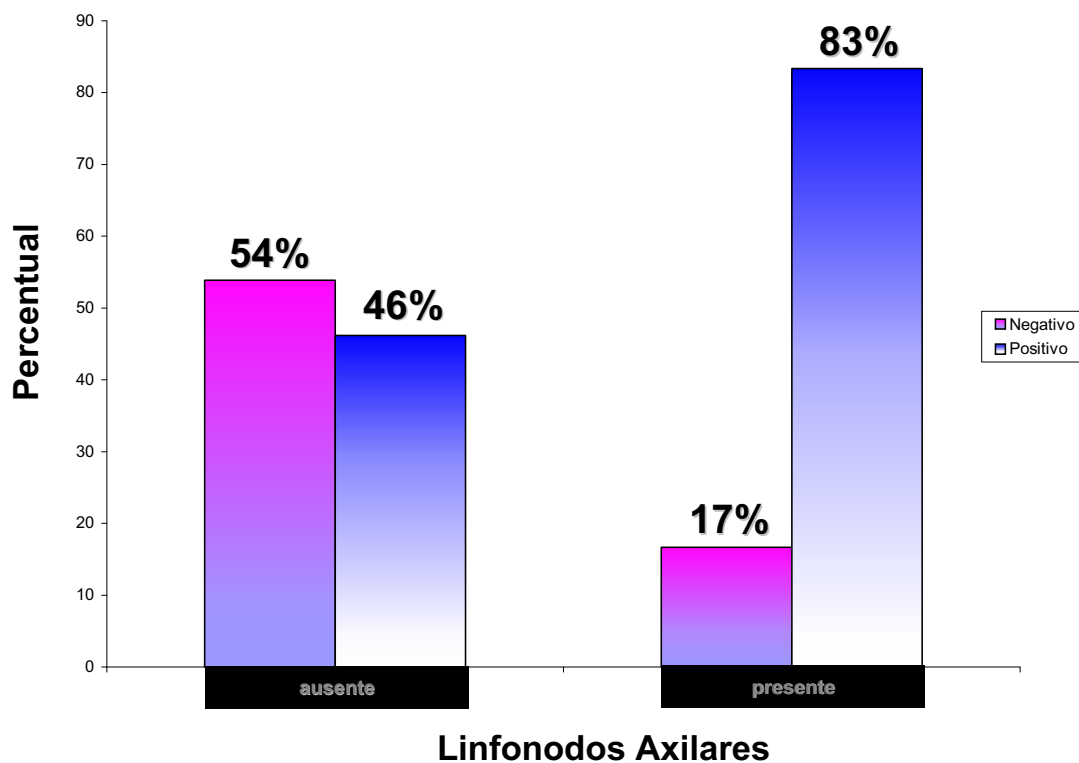


Gráfico 12 - Percentual de pacientes com sobrevida acima de 10 anos, segundo comprometimento de linfonodos axilares e Bcl-2 ($p=0,05$)

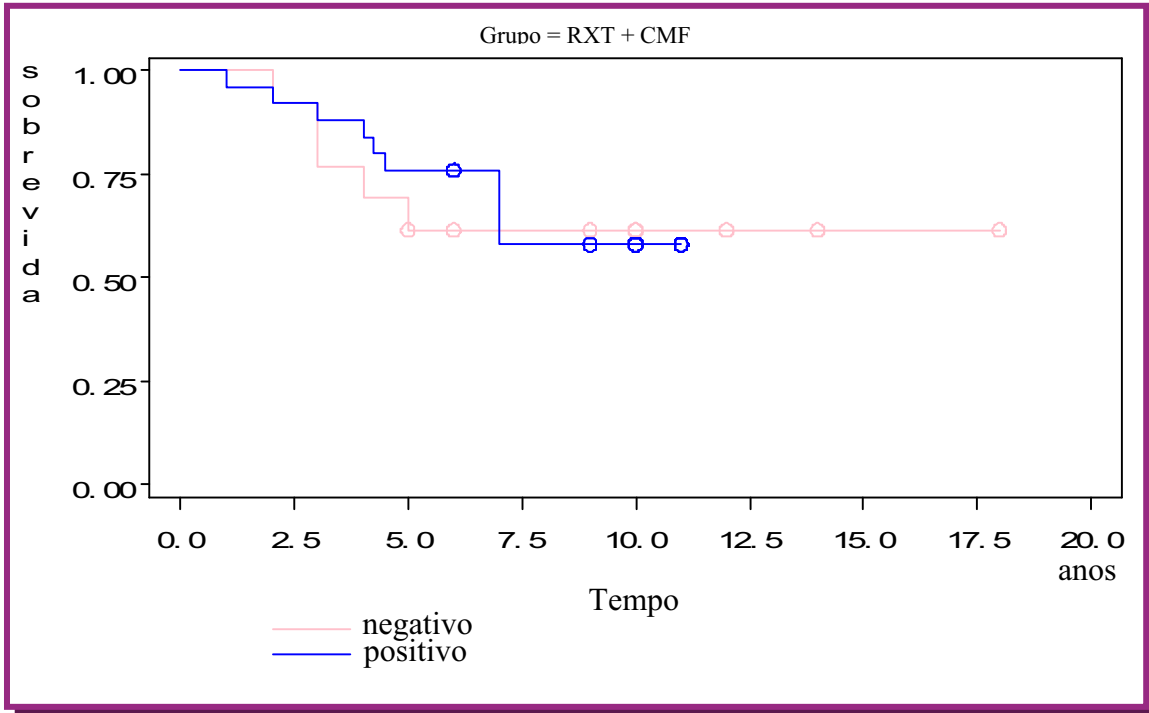


Gráfico 13 - Sobrevida de pacientes segundo BCL-2 para o grupo CMF ($p=0,85$).

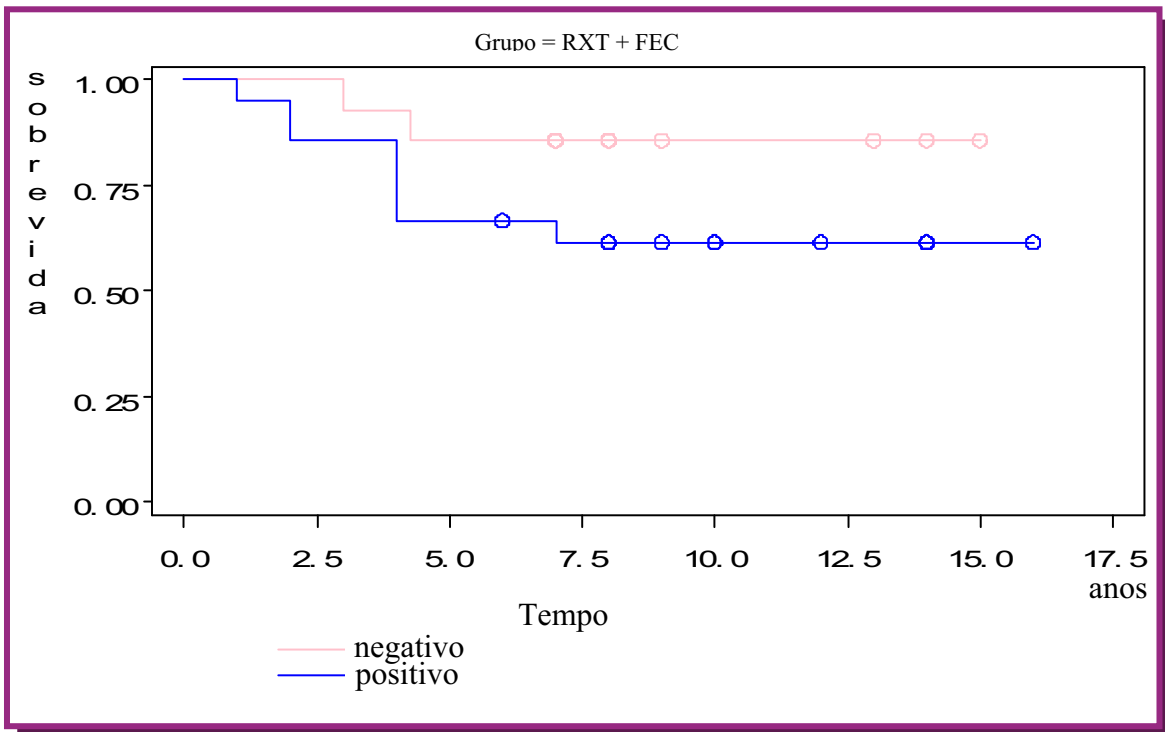


Gráfico 14 - Sobrevida de pacientes segundo BCL-2 para o grupo FEC ($p=0,13$).

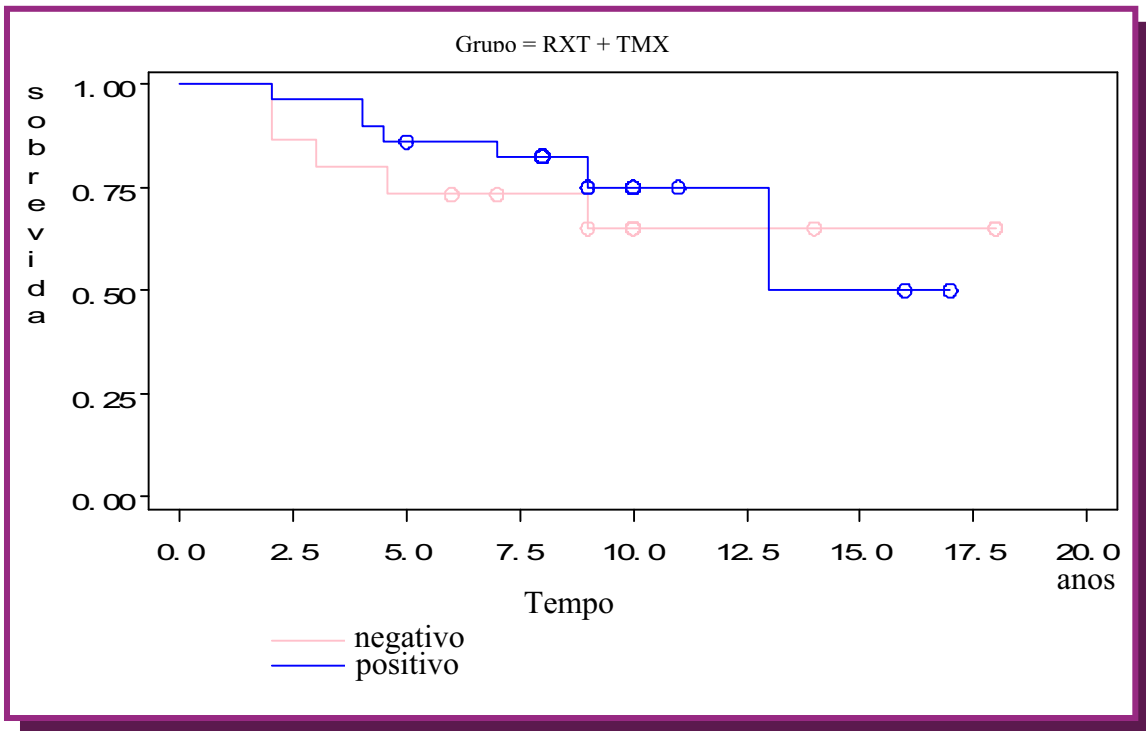


Gráfico 15 - Sobrevida de pacientes segundo BCL-2 para o grupo TMX (p=0,65).

Proporção de frequência dos grupos GA e GB considerando os períodos de sobrevivida até 5 anos, de 5 a 10 anos e acima de 10 anos.

Os grupos GA e GB não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos três períodos de sobrevivida considerados.

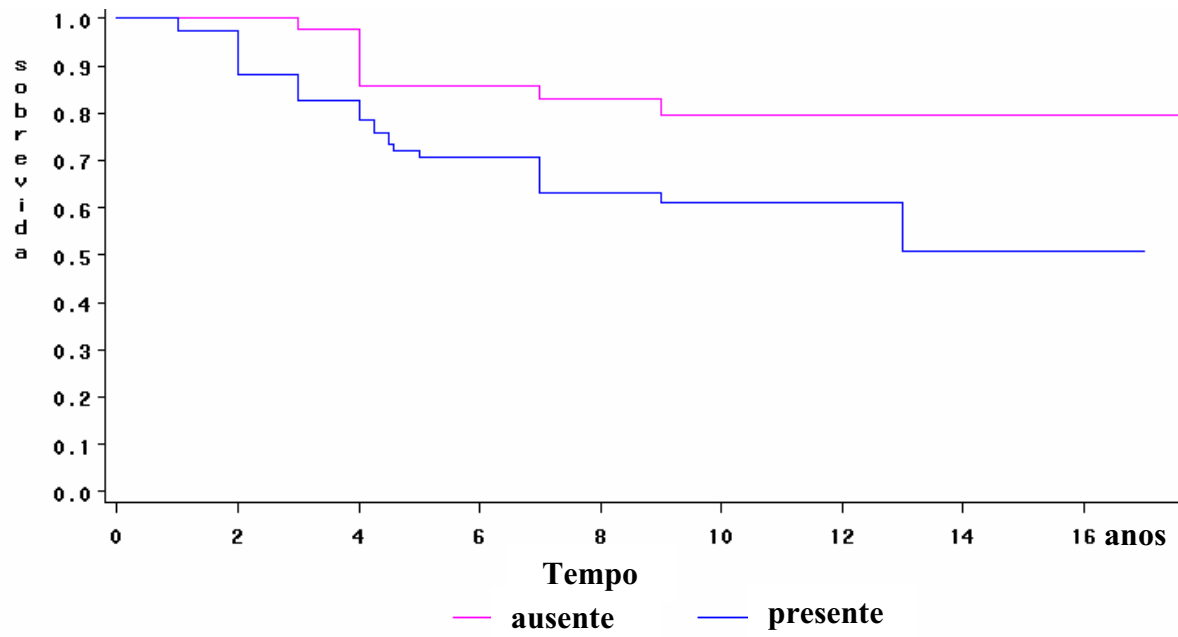


Gráfico 16 - Sobrevida de pacientes segundo período de tempo e Bcl-2 (p=0,99)

5. Discussão

O câncer de mama representa um desafio para a medicina atual em decorrência da incidência crescente e perspectiva de cura ainda em níveis indesejáveis embora possa apresentar prognóstico favorável se diagnosticados e tratados nos estádios iniciais. É considerado o 2º câncer mais freqüente entre mulheres brasileiras, perdendo apenas para câncer de pele não melanoma, segundo estimativas do INCA referente ao censo de 2008.

O desafio dos pesquisadores tem sido o estudo do mecanismo pelo qual algumas células neoplásicas do mesmo tumor tem comportamento mais agressivo com capacidade de induzir metástase à distância, resistência à quimioterapia e ou hormonioterapia. Uma resposta a este comportamento foi sugerido por Teixeira *et al* (1996), e Heim *et al* (2001), chamando atenção para existência da policlonalidade do carcinoma de mama já na sua origem. Se por um lado houve avanço em relação à abordagem cirúrgica, com a possibilidade de cirurgia conservadora e se preservarem os linfonodos axilares pela identificação do linfonodo sentinela reduzindo a morbidade, por outro, alguns tumores de estágio inicial, portanto, presumivelmente de melhor prognóstico e sobrevida podem levar a paciente rapidamente para a morte. Algumas pacientes com prognóstico reservado, no entanto podem apresentar um período livre de doença relativamente longo (Berardo *et al*,1998).

Vários marcadores de tumores estão sendo estudados na literatura com a finalidade de se avaliar o prognóstico de câncer de mama e ainda individualizar o tratamento, tentando assim aumentar a sobrevida das pacientes. São bem conhecidos os receptores de estrogênio e progesterona, o c-erbB-2, P53 e índice de proliferação celular (Ki-67).

Os receptores de estrogênio e progesterona, quando presentes, estão relacionados com melhor prognóstico da doença, ao contrário, a positividade para c-erbB-2, P 53 e Ki-67 se associam a um prognóstico mais reservado. Os receptores de estrogênio e progesterona, o c-erbB-2 são considerados fatores preditivos para câncer de mama. Assim, quando os receptores de estrogênio e progesterona são positivos nos permitem o uso terapêutico de drogas antiestrogenicas, como o Tamoxifeno (Bezwođa *et al*, 1991) e mais recentemente vem sendo preconizado o uso de inibidores de aromatase, o anastrozol com resultados importantes (The ATAC Trialists Group. 2002). Desde final de 2000, na reunião de consenso em Salvador (BA), no Brasil, a Sociedade Brasileira de Mastologia deu reconhecimento oficial ao exame de linfonodo sentinela para detecção de micrometástase porém, a importância quanto a decisão do tratamento ainda segue em estudo no mundo científico, Souza (2005) cita vários fatores que levariam ao erro na avaliação da presença de micrometástase como problema na coloração por H-E em células epiteliais benignas, megacariócitos ou a imunorreacção em pacientes sem evidências de doença. Urban *et al*, (2004), também, no artigo de revisão relaciona o indiscutível benefício trazido às pacientes portadoras de câncer de mama com a pesquisa de linfonodo sentinela, para detecção da micrometástase, porém o seu significado biológico, tratamento e prognóstico ainda permanece controverso.

Em casos de câncer de mama c-erbB-2 positivo tem sido utilizado as antraciclina como tratamento quimioterápico de eleição (Paik *et al*, 1998). Outros marcadores tumorais estão sendo estudados na literatura como

um possível fator prognóstico e preditivo no entanto nenhum desses fatores podem ser considerados como marcador individual na predição e evolução do câncer de mama, que é atribuída a sua heterogeneidade de fatores.

Um dos marcadores muito estudado na literatura recentemente, a proteína Bcl-2 está relacionado a sua alta expressão ou não no câncer de mama.

Identificado inicialmente no linfoma folicular célula B por Tsujimoto *et al* (1985), sua expressão está relacionado ao câncer de mama. Entretanto esta proteína é expressa em epitélio ductal normal, em tecido mamário de não grávidas e não involutiva, assim com hiperplasia. Sua ação consiste no bloqueio do processo de morte celular, a apoptose, sendo primeira proteína com ação antiapoptótica descoberta.

Inúmeros fatores prognósticos favoráveis são relacionados quando da presença da expressão da proteína Bcl-2 como receptores de estrogênio e progesterona, diploidia, baixo grau histológico, tumores bem diferenciados, ausência de c-erbB-2 e P 53, assim como em relação à sobrevida, embora alguns autores não os confirmassem (Alsabeh, 1996; Linjawi *et al*, 2004).

Vários autores relacionaram a relação inversa presente entre as proteínas Bcl-2 e P53. Assim, tumores com baixa expressão de Bcl-2 apresentaram menor sobrevida do que quando da elevada expressão da proteína Bcl-2. Observaram também que a elevada expressão de P53 estava relacionada a menor sobrevida (Mc Laughlin *et al*, 2001).

Os trabalhos de Kim *et al* (2001) demonstraram que quimioterapia com antraciclicos em pacientes com tumores com comprometimento axilar e receptor estrogênio negativo principalmente em pré menopausada aumenta a sobrevida, ao contrário, há pouco benefício na sobrevida quando receptor estrogênio positivo, pelo envolvimento da proteína Bcl-2 que induziria as células neoplásicas residuais pelo aumento plasmático de estrogênio provocado pelo tamoxifeno, reduzindo assim a sensibilidade à quimioterapia quando em uso concomitante. Assim, maior benefício à sobrevida ocorreria se quimioterapia precedesse a hormonioterapia. Yang *et al* (2003) no seu estudo demonstraram também maior susceptibilidade à quimioterapia (FEC) e endócrino terapia (Tamoxifeno), em pacientes com carcinoma na ausência de expressão da Bcl-2, porém, a sobrevida estava associada à positividade de expressão da Bcl-2.

Estudo realizado em pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante com FEC por carcinoma de mama ductal invasivo não revelaram diferença estatisticamente significativa (Faneyte *et al*,2003), quanto a expressão da proteína Bcl-2 no pós tratamento.

A expressão da proteína Bcl-2 em carcinoma de mama varia de acordo com autores. Assim, Bhargava *et al* (1994), Silvestrini *et al* (1994), Alsabeh *et al* (1996) e mais recentemente Park *et al* (2002) verificaram presença da expressão de Bcl-2 em 59%; 63%; 79% e 61 a 70% respectivamente. Em nosso estudo realizado em 2001 (tese de mestrado) foi verificado em 53% e neste de 63% a diferença atribuída ao número de casuística.

5.1. Discussão de metodologia

Somente 117 casos foram selecionados dos aproximadamente 1050 laudos de exames anatomopatológicos de carcinoma ductal invasivo de mama abordados do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), que abrangeu o período de 1986 a 2003, por razões relacionadas a prontuários incompletos, abandono de tratamento, seguimento, por ter vindo a submeter-se somente ao tratamento cirúrgico sem intuito de prosseguimento na instituição e ainda pela insuficiência de obtenção de amostras nos blocos de parafina em alguns casos. Foram também excluídos os casos mais recentes em que foram submetidos ao tratamento neoadjuvante quimioterápico.

A maioria das pacientes foram submetidas à mastectomia, as mais recentes conforme a possibilidade do protocolo, à conservadora o que não interferiu na sobrevida das mesmas.

Em relação ao tratamento quimioterápico e hormonioterápico as pacientes foram divididas em três grupos: G1, G2 e G3 de acordo com os esquemas terapêuticos utilizados. Os três grupos de pacientes não apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à sobrevida, tamanho do tumor, grau histológico e expressão da proteína Bcl-2, enquanto em relação ao comprometimento de linfonodo axilar foi demonstrado diferença estatisticamente significativa entre os três grupos.

A sobrevida foi considerada em três períodos: até 5 anos, de 5 a 10 anos e acima de 10 anos, ao contrario dos descritos nos estudos de

literatura que consideraram o período de dez ou mais anos (Lipponen *et al*, 1995 ; Berardo *et al*, 1998; Zhang *et al*, 1998; Schiller *et al*, 2001).

Vários critérios de estratificação são adotados por autores em relação ao estudo imunohistoquímico para a proteína Bcl-2. Alsabeh *et al* (1996); dividiram em três grupos de acordo com a intensidade de imunorreatividade em células neoplásicas em forte (3+) moderada (2+) e fraca (1+); enquanto Schiller *et al* (2001); utilizaram dois parâmetros para dividir inicialmente em três categorias : intensidade da imunorreatividade e porcentagem de células neoplásicas imunorreativas , assim : negativo: menor de 10% de células neoplásicas imunorreativas; fracamente positiva: 2+ de intensidade de imunocoloração em 10 – 50% células neoplásicas ou 1+ em acima de 10% das células neoplásicas; e fortemente positiva : 3+ de imunocoloração em maior ou igual a 10% das células neoplásicas ou 2+ de imunocoloração em acima de 50% das células neoplásicas ; considerando-se somente dois grupos, positivo e negativo para imunorreatividade para proteína Bcl-2 pelo número pequeno de carcinoma fracamente positivo.

Em nosso trabalho também utilizamos o critério de divisão em dois grupos: que foram denominados como GA (grupo de baixa imunorreatividade em padrão citoplasmática nas células neoplásicas) e GB (grupo com alta presença de imurreatividade em padrão citoplasmática nas células neoplásicas). Considerando-se como negativo para proteína Bcl-2 quando a imunorreatividade estava ausente ou fracamente presente em menos de 50% e positivo para presença de proteína Bcl-2 quando a imunorreatividade estava presente moderada ou fortemente, em 50% ou mais de células

neoplásicas.

Consideramos como fatores anatomopatológicos o tamanho do tumor, grau histológico e comprometimento axilar por serem marcadores clássicos na literatura.

O tamanho do tumor e o comprometimento de linfonodos axilares foram submetidos de acordo com as classificações internacionais TNM e NSABP.

Em relação à graduação histológica o método proposto foi de Bloom & Richardson (1957), que é o mais utilizado em nosso meio.

5.2. Discussão dos Resultados

5.2.1. Frequência da idade nos grupos G1,G2 e G3.

Verificamos em nosso resultado que no grupo G3 houve predomínio de mulheres acima de 50 anos pós menopausadas grupo este que receberam tratamento adjuvante, a radioterapia seguida de hormonioterapia. O tamoxifeno por 5 anos, sendo esta prevalência de acordo com a literatura.

5.2.2. Grupos G1, G2 e G3 X Fatores Anatomopatológicos X Sobrevida.

As pacientes foram divididas em três grupos, G1, G2 e G3, de acordo com o tratamento instituído após cirurgia, radioterapia e esquemas terapêuticos a quimioterapia e hormonioterapia, porém os mesmos não influenciaram na sobrevida como também em relação ao tamanho do tumor e grau histológico. No entanto houve diferença estatisticamente significativa em relação ao comprometimento de linfonodo axilar.

Os esquemas quimioterápicos e hormonioterápicos eram os preconizados no período considerado no nosso trabalho. Atualmente com novos estudos, através dos marcadores tumorais veio a somar ao tratamento adjuvante possibilitando até individualização das pacientes e assim aumentando a sobrevida.

5.2.3. Expressão da proteína Bcl-2 X Tamanho do tumor (T) X Sobrevida.

A maioria dos estudos da literatura não relacionam a expressão da proteína Bcl-2 com tamanho do tumor e sobrevida. Silvestrini *et al*, (1994) no seguimento clínico de 6 anos de 283 casos que elevada expressão estava presente em tumores menores no entanto não observaram relação estatisticamente significativa com sobrevida. Lipponen *et al* (1995), em seguimento de 10 anos, verificou também que a sobrevida fora independente ao tamanho do tumor e ausência de comprometimento de linfonodo axilar.

Os resultados de nosso trabalho, de acordo com os autores, não houve relação significativa entre a expressão da proteína Bcl-2 com tamanho do tumor e sobrevida nos três períodos considerados até 5 anos, de 5 a 10 anos e acima de 10 anos.

5.2.4. Expressão da proteína Bcl-2 X Grau histológico X Sobrevida.

Desde que Greenough (1925), demonstrou a relação entre grau histológico e sobrevida sua importância através do tempo como fator prognóstico é reconhecido, embora não incluído no estadiamento TNM, porém obrigatoriamente avaliado em todos os casos de carcinoma de mama. A maioria dos autores na literatura relaciona a baixa expressão da proteína Bcl-2 com alto grau histológico e piora na sobrevida. (Yang *et al*, 2003) e Hlupic *et al*,(2004) demonstraram diferença estatisticamente significativa com relação inversa entre expressão da proteína Bcl-2, grau histológico e sobrevida no

seguimento de 106 e 156 meses, respectivamente. Os resultados do nosso estudo mostraram a sobrevida considerada até 5 anos em relação à expressão da proteína Bcl-2 e grau histológico, ausência de diferença estatisticamente significativa, no entanto devemos notar que não houve casos de tumor de grau histológico I. Entretanto, tanto os períodos compreendidos de 5 a 10 anos como acima de 10 anos, observamos relação entre a expressão da proteína Bcl-2 e tumores GI e GII, mostrando diferenças estatisticamente significante em relação a sobrevida, concordando com o trabalho de Yang *et al* (2003) e Hlupic *et al* (2004), embora com os períodos de seguimento em nosso trabalho seja até 10 ou mais anos. No entanto devemos considerar estes resultados com ressalva devido ao número de casos.

5.2.5. Expressão da proteína Bcl-2 X Comprometimento axilar X Sobrevida.

Os resultados demonstrados por vários autores são diversos quanto a avaliação da expressão da proteína Bcl-2 com comprometimento axilar e sobrevida.

Silvestrini *et al* (1994), observaram em estudo de 283 pacientes com carcinoma ductal sem comprometimento axilar mais tempo livre de recidiva e sobrevida total, enquanto Lipponen *et al* (1995), demonstraram que havendo comprometimento axilar a presença da proteína Bcl-2 não tem significado prognóstico. Berardo *et al* (1998), Zhang *et al* (1998), relaciona a alta expressão da proteína Bcl-2 com menor número de linfonodos comprometidos com maior período livre de recorrência e sobrevida total, ao

contrário Hlupic *et al* (2004), não demonstraram relação significativa entre as três variáveis em estudo.

Em nossos estudos foi verificada relação entre a proteína Bcl-2 com comprometimento de linfonodo axilar no período de sobrevida acima de 10 anos, enquanto nos períodos compreendidos até 5 anos e de 5 a 10 anos não foi demonstrada relação significativa.

Como para efeito de análise atualmente são considerados, em relação ao envolvimento de linfonodo axilar a presença ou não de linfonodo metastático axilar e também linfonodo sentinela optamos por dividir em dois grupos: L1 e L2; ausência e presença de linfonodo metastático axilar respectivamente.

Assim talvez possamos intuir que a relação presente entre as três variáveis seja decorrente da presença de casos de menor número de linfonodos metastático com alta expressão da proteína Bcl-2 como observados por Berardo *et al* (1998) e Zhang *et al* (1998).

5.2.6. Expressão da proteína Bcl-2 X Sobrevida

A maioria dos trabalhos da literatura comparando a expressão da proteína Bcl-2 x sobrevida tem demonstrado relação positiva entre presença da proteína Bcl-2 e sobrevida. Lipponen *et al* (1995), demonstraram no seguimento de até 10 anos que a alta expressão da proteína Bcl-2 ocorreu em 75% dos tumores e 55% dos tumores quando em baixa expressão, com longo período livre de recidiva corroborados por Berardo *et al* (1998), Mc Laughlin *et*

al (2001), Schiller *et al* (2002) e Yang *et al* (2003), que observaram também que alta expressão da proteína Bcl-2 estava relacionada maior período livre de recorrência e sobrevida, baixa expressão da proteína Bcl-2 com menor tempo livre de recorrência e sobrevida. Entretanto Linjawi *et al* (2004) e Hlupic *et al* (2004) não observaram associação entre expressão da proteína Bcl-2 e período livre de recorrência e sobrevida. Nossos resultados não demonstraram relação estatisticamente significativa entre a expressão da proteína Bcl-2 e sobrevida avaliados até 5 anos, 5 a 10 anos e acima de 10 anos em concordância com os trabalhos de Linjawi *et al* (2004) e Hlupic *et al* (2004). A maioria dos trabalhos direcionam no sentido de que a presença de proteína Bcl-2 está relacionado com bom fator prognóstico pela demonstração da mesma junto aos outros fatores de bom prognóstico conhecidos como diploidia, baixo índice mitótico, presença de receptores estrogênio e progesterona; assim como ausência de P53 mutado e Cerb B-2 entre os mais estudados. Porém, após avaliarmos a importância da proteína Bcl-2 relacionados aos fatores anatomopatológicos com sobrevida, acreditamos que no momento seja um fator que possa ser somado na estratégia do tratamento.

Neste cenário de intensa busca para o tratamento de câncer de mama feminino, segundo registro hospitalar do INCA (período 2000/2001) os estádios III e IV foram os mais frequentes mostrando a necessidade de melhores estratégias para alcançar o diagnóstico precoce para assim melhorar a sobrevida das pacientes.

6. Conclusões

Os resultados obtidos em nosso estudo nos permitem as seguintes conclusões:

- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1, G2 e G3 quanto ao tamanho do tumor, grau histológico, expressão da proteína Bcl-2 e sobrevida.

- Não houve diferença estatisticamente significativa entre expressão da proteína Bcl-2 e sobrevida em nenhum dos períodos avaliados.

- Não houve diferença estatisticamente significativa entre tamanho do tumor e proteína Bcl-2 em nenhum dos períodos de sobrevida avaliados.

- Houve diferença estatisticamente significativa entre grau histológico e expressão da proteína Bcl-2 e sobrevida nos períodos de 5 a 10 anos e acima de 10 anos.

- Houve diferença estatisticamente significativa entre comprometimento axilar e expressão da proteína Bcl-2 no período de sobrevida acima de 10 anos.

7. Referências Bibliográficas

ADAIR, F.; BERG, J.; JOCEBERT, L.; ROBINS, G.F. Long-term follow-up of breast cancer patients: The 30 years report. **Cancer**, v.33, p.1145-50,1974.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the cell, 4a ed., New York, Garland Science, 2002, 1463p.

ALSABEH, R.; WILSON, C.S.; AHH,C.W.; VASEF, M.A.; BATTIFORA, H. Expression of Bcl-2 by breast cancer: a possible diagnostic aplication. **Mod. Pathol.** v. 9; 439-44. 1996.

BERARDO, M.D.; ELLEGE, R.M.; MOOR, C.; CLARK. G.M.; OSBORNE, C.M.; ALLRED, D.C. Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. **Cancer**, v. 82p.1296-1302, 1998.

BEZWODA, W.R.; ESSER, J.B.; DANSEY, R.; KESSEL, I.; LANGE, M. The value of oestrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. Oestrogen receptor level but not progesterone receptor level correlates with response to tamoxifen. **Cancer**, v.68, p 867-72, 1991.

BHARGAVA, V.; KELL, D.L.; VAN DE RIJN, M.; WARNKE, R.A. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. **Am. J. Pathol.**, v.145,p.535-49, 1994.

BLOOM, H.J.M.; RICHARDSON, W.W. Histological grading and prognosis in breast cancer. **Br.J. Cancer** v.11, p.359-77, 1957.

CANAVESE, J.; CATTURICHI, A.; VECCHIO, C.; TOMEI, D.; GIPPONI, M.; BRUZZI, P.; BADELLINO, F. Prognostic role of lymph node level involvement in patients undergoing axillary dissection for breast cancer. *Eur. J. Surg Oncol*, v.24, p.104-9, 1998.

CHANG, J.; CLARK, GM.; ALLED, DC.; MOHSIN, S.; CHAMNESS, G.; ELLEGE, RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma importance of prognostic markers primary tumor. *Cancer*. Feb 1; 97 (3): 545-53, 2003.

CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors. In: HARRIS, J.R.; LIOOMAN, M.E.; MORROW, M.; HELLMAN. S. *Diseases of the breast*. Philadelphia: Lippincott, 1996. p.461-85.

DANFORTH, JR. D.N. The role of axillary lymph node dissection in the management of breast cancer. *P.P.O. Updates*, v.6, p.16, 1992.

DAVIDSON, T. Why I favour axillary node clearance in the management of breast cancer. *Eur. J. Surg.Oncol.*, v.21, p.5-7,1995.

EISSA, S.; SHOMAN, S. Markers of apoptosis and their use in cancer therapy. In:____. *Tumor markers*. London: Chapman & Hall, 1998a. Chap. 12, p.145-50.

EISSA, S.; SHOMAN, S. Tumor markers in non-Hodgkin's lymphomas. In:____. *Tumor markers*. London: Chapman & Hall, 1998b. chap.23, p. 241-56.

ELLIS, I.O.; GALEA, M.; BROUGHTON, N.; LOCKER, A.; BLAMEY, R.W.; ELSTON, C.W. Pathological prognostic factors in breast cancer, II. Histological type. Relationships with survival in a large study sit long-term follow-up. *Histopathology*, v.20, p.479-89.1992.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factor in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up. *Cancer*, v.19, p.403-10, 1991.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Prognostic factors in breast cancer. Nottingham: United States and Canadian Academy of Pathology, 1996. 73p. (Handout, Short Cours, 41).

ELSTON, C.W.; GRESHAM, G.A.; RAO, G.S.; ZEBRO, T.; HAYBITTLE, J.L.; HOUGHTON, J.; KEARNEY, G. The cancer research campaign (Kings/Cambridge) trial for early breast cancer: clinico-pathological aspects. *Br. J. Cancer*, v.45, p.655-69.1982.

ESTIMATIVA, 2008 : INCIDENCIA DE CANCER NO BRASIL (INCA).

FANEYTE, I.F.; SCHRAMA, J.G.; PETERSE, L.J.; REMIJNSE, P.L.; RODENHUIS, S.; VIJVER, M.J. van de. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br. J. Cancer*, (2003)88, 406-412.

FISHER, E.R.; SASS, R.; FISHER, R.B.; WICKERMAN, L. Pathologic finding from the National Surgical adjuvant Project for breast cancer (protocol n.4) X: Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer*, v.53, p.712-23, 1984.

FISHER, L.D. and BELLE, G.V. *Biostatistics methodology for the health Science*. Wiley interscience. New York. 991 p. 1993.

FONTANINI, G.; VIGNATI, S.; BIGINI, D.; MUSSI, A.; LUCCHI, M.; ANGELETTI, C.A.; BASOLO, F.; BEVILAQUA, G. Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to P53 in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, v.71, p.1003-7, 1995.

GASPARINI, G.; BARBARESCHI, M.; DOGLIONI, C.; PALMA, P.D.; MAURI, F.A.; BORASHI, P.; BEVILAQUA, P.; CAFFO, O.; MORELLI, L.; VERDERIO, P. Expression of Bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 1: 189-98, 1995.

GENESTIE, C.M.; ZAFRANI, B.; ASSELIAN, B.; FOURQUET, A.S.; ROSAN, S.; VALIDIRE, P.; VICENT-SALOMON, A.; SASTREGAROU, X. Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grade in a serie of 825 cases of breast cancer: major important of the mitotic count as component of both grading systems. *Anticancer Res.*, v.18, p.571-6, 1998.

GIULIANO, A.E.; KIRGAN, D.M.; GUENTHER, I.M.; MORTON, D.L. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *An. Surg.*, v.220, p.391-401, 1994.

GREENOUGH, R.B. Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J.Cancer Res.* v.9, p.452-63,1925.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. *An Introduction to Genetic Analysis*.7a ed. New York.W.H. Freeman, 2000. 860p.

HEIM, S.; TEIXEIRA, M.A.R.; PANDIS, N. Are some breast carcinomas polyclonal in origin? *J. Pathol:* v.194, p.395-397, 2001.

HLUPIC, L.; RAZUMOVIC, J.J.; BOZIKOV, J.; BELEV, B.; VRBANEC, D. Prognostic value of different factors in breast carcinoma. *Tumori*, v.90 ,p.112-119, 2004.

HOCKENBERY, D.M.; ZUTTER, M.; HICKEY, W.; NAHN, M.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88,p.6961-5, 1991.

HOPTON, D.S.; THOROGOOD, J.; CLAYDEN, A.D.; MACKINNON, D. Observer variation in histological grading of breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.*, v.15, p.21-3, 1989.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem Cytochem.*, v.29, p.577-80, 1981.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-57, 1972.

KIM, R.; OSAKI, A.; TOGE, T. A pitfall in the survival benefit of adjuvant chemotherapy for node and hormone receptor-positive patients with breast cancer: the paradoxical role of Bcl-2 oncoprotein (Review). *Int. J. Oncol.* Nov: 1915: 1075-80, 2001.

KOBAYASHI, S.; IWASE, H.; ITO, Y.; YAMASHITA, H.; YAMASHITA, H.; IWATA, H.; YAMASHITA, T.; ITO, K.; TOYAMA, T.; NAKAMURA, T.; MASAOKA, A. Clinical significance of Bcl-2 gene expression in human breast cancer tissues. *Breast Cancer Res. Treat.*, v.42, p.173-81, 1997.

KRAG, D.N.; WEAVER, D.L.; ALEX, J.C.; FAIRBANK, J.T. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg. Oncol.*, v.2, p.335-9, 1993.

KRAJEWSKA, M.; FERROGLIO-PREISER, C.M.; KRAJEWSKI, S.; SONG, K.; MACDONALD, J.S.; STEMMERMAN, G.; REED, J.C. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am. J. Pathol.*, v.149, p.1449-57, 1996.

KYMIONIS, G.D.; DIMITRAKAKIS, C.E.; KONSTADOULAKIS, M.M.; ARZIMANOGLU, I.; LEANDROS, E.; CHALKIADAKIS, G.; KERAMOPOULOS, A.; MICHALAS, S. Can expression of apoptosis genes Bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients? *J Surg Res.*, Aug: 99(2): 161-8, 2001.

LEE, W.Y.; JIN, Y.T.; TSENG, C.C. Reciprocal expression of Bcl-2 and p53 in breast ductal carcinoma. *Anticancer Res.*, v.16, p.3007-12, 1996.

LINJAWI, A.; KONTOGIANNEA, M.; HALWANI, F.; EDWARDES, M.; METERISSIAN, S. Prognostic significance of P53 Bcl-2 and bax expression in early breast cancer. *J. Am. Coll. Surg.* v. 198, p.83-90, 2004.

LIPPONEN, P.; PIETILAINEN, T.; KOSMA, V.M.; AALTOMAA, S.; ESKELINEN, M.; SYRJANEN, K. Apoptosis suppressing protein Bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J. Pathol.*, v.177, p.49-55, 1995.

LOURO, I.D.; LLERENA JR, J.C.; DE MELO, M.S.V.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. *Genética molecular do câncer*. 2ª edição. São Paulo, MSG Produção Editorial, 2002. 275p.

McLAUGHLIM, R.; O'HANLON, D.; McHALE, T.; CONNOLLY, C.E.; GIVEN, H.F. Prognostic implications of p53 expression in 108 women with stage two breast cancer. *Ir.J.Med. Sci* .2001 Jan-Mar,170 (1):11-3.

MUSTONEN, M.; RAUNIO, H.; PAAKKO, P.; SOINI, Y. The extent of apoptosis is inversely associated with Bcl-2 expression in premalignant and malignant breast cancer. *Histopathology*, v.31, p.347-54, 1997.

PARK, S.H.; KIM, H.; SONG, B.J. Down regulation of Bcl-2 in invasive ductal carcinomas is both estrogene-receptor dependent an associated with poor prognostic factors. *Pathol. Oncol. Res.* v.8, nº 1, 2002.

PATEY, D.H.; SCARFF, R.W. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet*, v.1, p.801-4, 1928.

REED, J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*. Jun, v.387 (19), 1997.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer, *Curr Opin. Oncol.* Jan, v.11(1), p.68-76, 1999.

REED, J.C. The surviving saga goes in vivo. *J. Clin. Invest.*, 108 (7): 965-9, 2001.

ROGER, V.; BEITO, G.; JOLLY, P.C. Factors affecting the incidence of the lymph node metastases in small cancer of the breast. *Am. J. Surg.*, v.15, p.501-2,1989.

ROSEN, P.P.; GROSHEN, S. Factors influencing survival and prognosis in early breast carcinoma (T1NoMo;T1N1Mo). Assessment of 644 patients with median follow-up of 18 years. *Surg. Clin. N. America*, v.70, p.937-62, 1990.

RUVOLO, P.P.; DENK, X.; MAY, W.S. Phosphorilation of Bcl-2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, v.15, p.515-22, 2001.

SATHER, H.N. The use prognostic factors in clinical trials. *Cancer*, v.58, p.461-7, 1986.

SHILLER, A.B.; CLARK, W.S.; COTONIS, G.; LAWSON, D.; DEROSE, P.B.; COHEN, C. Image cytometric Bcl-2; bax and Bcl-2 ; bcl-x ration in invasive breast carcinoma: Correlation with prognosis cytometry, *ang 15*, 50(4), p.203-9, 2002.

SIERRA, A.; CASTELLSAGUE, X.; ESCOBEDO, A.; GARCIA-RAMIREZ, M.; MORENO, A.; FABRA, A. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. *Int. J. Cancer*. V.89, p.142-7,2000.

SILVESTRINI, M.J.; GIERSON, E.D.; WAISMAN, J.R.; SENOFKY, G.M.; COLBURN, W.J.; GAMAGAMI, P. Axillary lymph node dissection for T1a breast carcinoma. Is it indicated? *Cancer*, v.73, p.664-7, 1994.

SINICROPE, F.A.; RUAN, S.; CLEARY, Y.R.; STEPHENS, L.C.; LEE, J.J.; LEVIN, B. Bcl-2 and P53 oncoprotein expression during colorectal tumor genesis. *Cancer Res.*, v.55, p.237-41, 1995.

SIZIOPIKOU, K.P.; PRIOLEAU, J.E.; HARRIS, J.R.; SCHINITT, S.J. Bcl-2 expression in the spectrum of pre-invasive breast lesions. *Cancer*, v.77, p499-506, 1996.

SOUZA, C.T. (2005). Detecção de micrometástases por imunohistoquímica nos linfonodos sentinelas. O xis do problema – *Boletim de Mastologia*.

TEIXEIRA, C.; REED, J.C.; PRATT, C. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 55: 3902-7, 1995.

THE ATAC TRIALISTS GROUP. The Atac (ARIMIDEX, TAMOXIFEN, ALONE or in Combination), adjuvant breast cancer trial in postmenopausal women with early breast cancer. *Lancet*, v.359, p.2131-9, 2002.

TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E C.M. Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, v.228, p.1440, 1985.

TSUJIMOTO, Y.; CROCE, C.M. Analysis of the structure, transcripts and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.83, p.5214-8, 1996.

URBAN, C.A.; PELIZZON, C.; ZERWES, F.; FRASSON, A. O exame intraoperatório do linfonodo sentinela na realidade brasileira. R.B.M. Set, v.14, nº 3, p.07-11, 2004.

VALLE, J.C. Câncer de mama locorregional avançado. Rio de Janeiro : MEDSI, P.93 1999.

VERONESI, S.; MAURI, F.A.; CAFFO, O.; SCAIOLI, M.; ALDOVINI, D.; PERRONE, G.; GALLIGIONI, E.; DOGLIONI, C.; PALMA, P.D.; BARBARESCHI, M. Bax immunohistochemical expression in breast carcinoma a study with long term follow-up. Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 79: 13-8, 1998.

VERONESI, U.; GALIMBERTI, V.; ZURRIDA, S. Prognostic significance of number and level of axillary node metastases in breast cancer. Breast, v.2, p.22408, 1993.

YANG, Q.; SAKURAI, T.; YOSHIMURA, G.; SUZUMA, T.; UMEMURA, T.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, Y.; MORI, I.; KAKUDO, K. Prognostic value of Bcl-2 in invasive breast cancer receiving chemotherapy and endocrine therapy. Oncology Rep. Jan-feb; 10(1) p. 121-5, 2003.

WYLLIE, A.; CURRIE, S.A. Apoptosis: An overview. *Br. J. Cancer*, 53 (3): 451-65, 1997.

ZHANG, G.J.; KIMIJIMA, I.; TSUCHIYA, A.; ABE, R. The role of Bcl-2 expression in breast carcinomas (Review). *Oncol. Rep.*, v.5, p.1211-6, 1998.

Anexo



INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CÂNCER
Sociedade Beneficente São Camilo


Centro de Estudos "Prof. Dr. João Sampaio Góes Júnior"



São Paulo, 02 de agosto de 2002.

Vimos informar que, em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do I.B.C.C., realizada no dia 02 de agosto de 2002, foi apresentado projeto de pesquisa: "Estudo da Relação da Expressão da Proteína Bcl-2 em Mulheres com Carcinoma Ductal Invasivo de Mama. Correlação Anatomopatológica e da Sobrevida" – Pesquisadora Responsável: Dra. Tereza Nakamatu – orientador Prof^o Dr. Gilberto Uemura.

Após apreciação do CEP, o projeto de pesquisa supracitado foi aprovado.



Dr. José Costa de Andrade
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP
Instituto Brasileiro de Controle do Câncer – IBCC