

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ESTUDO COMPARATIVO MORFOLÓGICO E
IMUNOISTOQUÍMICO ENTRE CITOINCLUSÃO E ESPÉCIME
CIRÚRGICO DE CARCINOMA PRIMÁRIO DA MAMA**

SOLANGE PERON BUENO

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista-UNESP, para obtenção do
título de Mestre em Patologia.**

BOTUCATU-SP

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ESTUDO COMPARATIVO MORFOLÓGICO E
IMUNOISTOQUÍMICO ENTRE CITOINCLUSÃO E ESPÉCIME
CIRÚRGICO DE CARCINOMA PRIMÁRIO DA MAMA**

SOLANGE PERON BUENO

Orientador: Dra. ROSA MARLENE VIERO

Co-Orientador: Dr. CLÉVERSON TEIXEIRA SOARES

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista-UNESP, para obtenção do
título de Mestre.**

BOTUCATU-SP

2007

*A minha família, em especial a meus pais, Narcizo e
Teresinha, e a minha sobrinha Beatriz, pelo amor, carinho e
compreensão com que sempre me envolveram*

A Rodrigo, por me encorajar estar sempre ao meu lado

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Dra. Rosa Marlene Viero, pelo carinho, compreensão, constante incentivo e orientação, durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Cleverson Teixeira Soares, pela inestimável orientação e inúmeros caminhos para a realização deste trabalho.

Aos patologistas do Instituto de Patologia de Bauru: Dr. Raul Negrão Fleury, Dra. Andréia Aparecida Fassoni e Dr. Maurício Chierici Lopes, pela sincera amizade e incentivo profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gilberto Uemura (Departamento de Ginecologia da UNESP) e ao Dr. Ulisses Frederigue Júnior (Instituto de Patologia de Bauru), pelos importantes aconselhamentos para a finalização desse trabalho.

Aos professores do Departamento de Patologia da UNESP, em especial Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues e Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira pelo ombro amigo e exemplo profissional.

Aos funcionários Anderson Aparecido dos Santos, Cíntia Sanches Tojeiro, Denise Aparecida Pavan, Fábio da Silva Rodrigues, Luiz Henrique Lopes e Rosimary Tedeschi Seme e Silva (Instituto de Patologia de Bauru), pelo importante auxílio no levantamento dos arquivos e etapa técnica; Rosana Aparecida Rodrigues (Instituto “Lauro de Souza Lima”), Celene Maria Carvalho Gandin e Marcos Roberto Franchi (Departamento de Patologia da UNESP), pela etapa da reação de imunoistoquímica; Cícera Aparecida da Silva Brito (Departamento de Patologia da UNESP), pela atenção e prestatividade conferidas durante o processo burocrático e Cristina Aparecida Alquati Dorico (Departamento de Patologia da UNESP), pelos cuidados à finalização desta impressão.

Às queridas amigas Renata Falaguera Villas Boas e Bruna Estrozi, pelo constante incentivo ao meu trabalho.

*“Nunca cometo o mesmo erro duas vezes
Já cometo três quatro cinco seis
Até esse erro aprender
que só o erro tem vez”*

Paulo Leminski

SUMÁRIO

I.	Revisão de Literatura	1
	Referências Bibliográficas	20
II.	Receptores hormonais e her2/neu em câncer de mama. Estudo comparativo por imunohistoquímica entre citoinclusão e espécime cirúrgico	27
	Resumo	29
	Abstract	30
	Introdução	31
	Casuística e Métodos	33
	Resultados	37
	Tabelas	40
	Figuras	44
	Discussão	48
	Referências Bibliográficas	52
III.	Anexos	56
	Cálculos da sensibilidade, especificidade	57
	Cálculos dos valores preditivo positivo e negativo	58
	Cálculos da acurácia	59
	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	60

REVISÃO DE LITERATURA

Epidemiologia e Mecanismos Etiopatogênicos

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum entre os cânceres ginecológicos¹. Representa mais de 1/5 da totalidade de casos de câncer no mundo². É a causa mais comum de morte por câncer em mulheres, no Brasil e no mundo³, liderando entre as causas de morte em mulheres entre 40 e 55 anos⁴.

Nos últimos trinta anos, mundialmente, houve aumento da incidência do câncer em mulheres. Essa evolução é atribuída ao envelhecimento global da população nos países desenvolvidos e em desenvolvimento². Outros fatores são a mudança de hábitos adquiridos pela civilização industrializada ocidental, como sobrecarga de calorias na alimentação, favorecendo a obesidade, gestações tardias, aumento do consumo de álcool entre as mulheres e exposição a diversos poluentes⁵.

Estudos apontam um aumento de 33% na incidência do câncer de mama, na última década. Estimativas mais recentes sugerem que o número de casos é maior em países em desenvolvimento, quando o envelhecimento da população não é considerado. O quadro se modifica quando a idade é considerada, notando-se maior número de casos em países desenvolvidos, onde se observa maior expectativa de vida². Estimaram-se, no ano de 2005, 211.240 novos casos e 40.410 mortes pela neoplasia, somente nos Estados Unidos⁶. Entretanto, mais da metade de novos casos de câncer de mama ocorridos no mundo foram diagnosticados em países em desenvolvimento².

A incidência do câncer de mama está associada ao nível socioeconômico e à urbanização. É maior em mulheres de melhor nível educacional e que habitam a zona urbana. A semelhança de hábitos, de cultura e fatores reprodutivos, como baixa paridade, primeira gestação tardia, baixo índice de amamentação, utilização de hormônios exógenos, maior consumo de álcool e maior acesso à mamografia, oferecendo diagnóstico mais precoce, justificam essa afirmativa⁷.

A mortalidade do câncer de mama decaiu, nas últimas duas décadas, em quase todos os países economicamente desenvolvidos, em razão de avanços no diagnóstico precoce e tratamento do mesmo. Pelos mesmos motivos, a sobrevida nesses países, também é maior. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, não foi observada uma mudança significativa da mortalidade⁸. A proporção entre as taxas de incidência e mortalidade revela uma probabilidade 24% maior de morrer de câncer de mama em países menos desenvolvidos^{2,9}.

O câncer de mama possui uma etiologia complexa. Envolve fatores genéticos, ambientais e hormonais, como história familiar, mutações genéticas, idade avançada, exposição prolongada a estrógenos, etilismo e tabagismo¹⁰.

Os fatores hormonais têm papel fundamental, sendo a exposição endógena ou exógena ao estrogênio e progesterona, o principal estímulo para a atividade mitótica do tecido mamário¹⁰.

O papel do estrogênio na etiologia do câncer de mama é discutido através de observações epidemiológicas e experimentais. Esses estudos revelam maior incidência da neoplasia no sexo feminino, em portadoras de tumores estrogênio-dependentes, como o carcinoma de endométrio, além de comprovarem o estímulo desse hormônio sobre o crescimento de células tumorais *in vitro* e a menor incidência do tumor em mulheres submetidas à ooforectomia antes dos 50 anos. Nota-se ainda, retardo de crescimento tumoral em mulheres submetidas à suspensão da produção hormonal, através de terapia anti-estrogênica, adrenalectomia ou ooforectomia. Outra evidência da influência do estrogênio na etiologia do câncer de mama é a observação do tumor em homens transsexuais que fazem uso de hormônio exógeno ou em homens acometidos por carcinoma de próstata metastático em tratamento⁴.

Várias formas de exposição prolongada ao estrogênio têm sido relacionadas com à susceptibilidade ao câncer de mama, incluindo situações de exposição endógena, como a menarca precoce, menopausa e primeira gestação tardias, obesidade e exposições exógenas, como a terapia de reposição hormonal e a utilização de contraceptivos hormonais^{10,11}.

O início precoce da menstruação e a menopausa tardia prolongam o período de exposição ao estrógeno. Para cada ano de atraso do início da menstruação, o risco de câncer de mama diminui em 5% e para cada ano de atraso da menopausa o risco aumenta em 3%¹⁰.

A gestação exerce um papel protetor sobre a mama, reduzindo o risco de neoplasias. Essa proteção aumenta quanto maior o número de gestações. Mulheres que tiveram pelo menos uma gravidez a termo têm risco reduzido para cerca de 25%. A proteção é maior quando a gravidez ocorre mais cedo. Um estudo revela diminuição em 30% do risco de contrair a doença em mulheres com primeira gestação viável antes dos vinte anos em relação a mulheres com primeira gestação após a idade de 35 anos¹⁰.

A amamentação, provavelmente, também exerce um efeito protetor. A duração da amamentação e a menor idade da mulher têm importância relevante¹⁰. Porém, outros estudos têm associado a prolactina, hormônio envolvido na secreção do leite materno, a modesto aumento no risco de desenvolvimento da neoplasia¹¹.

A obesidade aumenta as concentrações de estrógeno. Mulheres menopausadas obesas têm um risco 50% maior de desenvolver a doença que mulheres menopausadas não obesas¹⁰.

A terapia hormonal, sob a forma de estrógeno isolado ou com progestágenos, é associada a um pequeno aumento do risco de desenvolvimento do tumor. Esse risco é tempo-dependente e tende a diminuir após a parada da sua utilização, havendo divergências de opiniões quanto a influência da composição da terapia sobre esse risco^{10, 12}.

A terapia hormonal também contribui para o diagnóstico tardio da neoplasia, pois leva à intensificação da densidade mamária, que por si só, já é um fator de risco isolado^{9, 12}.

Outros fatores discutidos, relacionados à exposição exógena do tecido mamário ao estrógeno são o uso de contraceptivos hormonais e o tratamento para infertilidade¹⁰.

Os contraceptivos hormonais, assim como a terapia hormonal, conferem pequeno risco, que diminui em 25%, após a parada do uso. O tratamento para

infertilidade submete o tecido mamário à exposição de diversas drogas hormonalmente ativas e hormônios, entre eles, o hormônio liberador de gonadotrofina¹⁰.

Além do estrógeno, outros hormônios também têm sido relacionados ao risco do câncer de mama. Estudos demonstram que o risco é maior com o aumento da concentração de todos os hormônios sexuais, femininos e masculinos, entre eles, estradiol total, estrona, androstenediona, dehydroepiandrosterona e testosterona¹¹.

Com relação à alimentação, há hipóteses formuladas a respeito dos fitoestrógenos, substâncias presentes em alguns alimentos de origem vegetal, como a soja. Eles bloqueariam a ação dos estrógenos endógenos, reduzindo assim, o risco de câncer de mama¹⁰.

A ação da progesterona é controversa. Algumas linhas de pesquisa apontam para um efeito protetor e outras defendem a ação potencializadora desse hormônio, visto que o pico da atividade proliferativa na mama ocorre na fase lútea, quando se observam maiores concentrações do hormônio⁴.

A história familiar parece ter uma pequena participação no aumento do risco. Além dos fatores herdados geneticamente, os estilos de vida são semelhantes, portanto, fatores ambientais contribuem mais que fatores hereditários na suscetibilidade ao câncer de mama. Essa afirmativa se confirma quando são estudadas pacientes migrantes, com origem em países com baixo risco de câncer de mama que se destinam às localizações onde o risco é maior¹⁰. Interações dos fatores genéticos com fatores ambientais e reprodutivos potencializam esse risco. Células dos tecidos mamários com alterações genéticas tornam-se mais suscetíveis aos efeitos produzidos por fatores ambientais¹¹.

Características raciais têm sido relacionadas ao risco do câncer de mama. Estudos apontam para um maior risco entre mulheres brancas com mais de 40 anos, com história familiar. Em mulheres mais jovens, contraditoriamente a incidência observada tem sido maior entre mulheres negras. Essas informações encontram significado em um contexto de aconselhamento de mulheres com história familiar de câncer de mama⁶.

Polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo dos hormônios sexuais também constituem fatores de risco, como observado no gene da

17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase tipo1, enzima que catalisa a etapa final da biossíntese do estradiol¹¹.

Polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do estrogênio podem causar alterações em sua função biológica e contribuir para a suscetibilidade ao câncer de mama. Esses dados sugerem que alterações genéticas da neoplasia, estão relacionadas a um padrão familiar nos metabolismos dos hormônios sexuais, levando a essa suscetibilidade¹¹.

Fatores de risco adicionais são o consumo de álcool, história prévia de câncer de mama, presença de lesões proliferativas atípicas no tecido mamário e exposição à radiação ionizante^{9,10}.

Diagnóstico e Tratamento

O câncer de mama quando diagnosticado em fases avançadas tem prognóstico ruim. Conseqüentemente, as abordagens cirúrgicas são mais agressivas, e por vezes, mutilantes e ineficazes¹³.

Muitos avanços foram obtidos no diagnóstico e tratamento do câncer de mama ao longo dos últimos vinte anos¹⁴.

A sobrevida é o melhor indicador de progresso no tratamento do câncer. A taxa de sobrevida é medida pela proporção de pacientes vivos após um período de anos de seguimento após o diagnóstico. Notou-se, nos últimos quarenta anos, um aumento global da sobrevida em 5 anos, mais significativo em países desenvolvidos².

A cirurgia é modalidade de tratamento de maior impacto em pacientes portadores de vários tipos de câncer, entre eles o de mama².

Em pacientes com doença metastática, a modalidade de tratamento depende de fatores como as características biológicas do tumor, além dos sítios de envolvimento,

presença de metástases e condições clínicas dos pacientes e a presença de comorbidades⁹.

A forma como a neoplasia é abordada varia em diferentes países, de acordo com as características sócio-econômicas. Ela depende da taxa de incidência, dos recursos disponíveis e de fatores econômicos e culturais¹⁴.

Nas últimas décadas, avanços consideráveis têm sido obtidos na abordagem ao câncer de mama, devido à ênfase dada ao seu rastreamento, através da mamografia. Este recurso permitiu a detecção de tumores menores, minimizando os procedimentos cirúrgicos. Outro campo que trouxe progressos ao tratamento da neoplasia foram os estudos anátomo-patológicos, através de técnicas menos invasivas, como a Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) e a biópsia por agulha grossa, da análise do linfonodo sentinela e da determinação de fatores prognósticos e preditivos por imunoistoquímica (IQ)¹⁵.

O Impacto da Patologia sobre o Câncer de Mama

A anatomia patológica é uma especialidade de importância crítica nos avanços relacionados ao tratamento do câncer de mama. O papel do patologista é fundamental, para melhorar as informações diagnósticas e na caracterização do comportamento biológico das lesões de mama. Além de fornecer o diagnóstico, o patologista estuda as características do câncer, como tamanho, metástase linfonodal, o padrão hormonal, a expressão de oncogenes e genes supressores tumorais e a taxa de proliferação celular, todos eles relacionados com o prognóstico¹⁵. Para isso, utiliza técnicas, como a IQ, método acurado e acessível para auxiliar no diagnóstico de lesões benignas e malignas da mama, determinar seu comportamento biológico e fornecer informações preditivas para o tratamento^{16,17}.

As características e propriedades biológicas do tumor são de grande utilidade para estimar a probabilidade de recorrência, a sobrevida esperada e a resposta a métodos terapêuticos adjuvantes, como a terapia hormonal ou a quimioterapia¹⁸.

Os principais fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama são os oncogenes Her-2/neu, tp53, BRCA1 e 2, os receptores hormonais do estrógeno (RE) e progesterona (RP), e o índice de proliferação celular¹⁹.

BRCA1, BRCA2 e outros Genes Relacionados ao Carcinoma Mamário

Os dois maiores genes associados à susceptibilidade ao câncer de mama são os genes de susceptibilidade breast cancer 1 gene (BRCA1) e breast cancer 2 gene (BRCA2), cujos loci estão nos cromossomos 17q e 13q, respectivamente. Mutações sofridas por esses genes geram um risco de 60 a 85% de desenvolver câncer de mama. Elas são observadas em aproximadamente 20% das famílias com evidência de suscetibilidade herdada ao câncer de mama. Porém, essas mutações são observadas em apenas 2 a 3% dos carcinomas mamários²⁰.

Vários estudos têm identificado fatores associados com a probabilidade de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, entre eles, a ocorrência em mulheres jovens, a concomitância ao câncer de ovário e a história familiar. Esses fatores apontam para a importância na investigação dessas mutações para que estratégias de prevenção sejam realizadas, desde a mamografia anual à mastectomia profilática²⁰.

A identificação de mutações nesses genes também tem sido utilizada em pacientes portadoras de tumores positivos para RE. Estudos indicam a redução na incidência de tumores na mama contralateral, quando essas pacientes são submetidas à terapia neoadjuvante com tamoxifeno²⁰.

Outros genes, cujas mutações, menos frequentes também são implicadas no risco de câncer de mama são o tp53, o PTEN, o STK11/LKB1 e o CHEK2, um importante componente que reconhece e repara danos do DNA e ativa o BRCA1²⁰.

Her-2/neu

O gene neu foi primeiro identificado em tumores neuroectodérmicos de ratos. O gene Her-2/neu, também conhecido como c-erbB2²¹, é seu equivalente nos seres humanos. É um proto-oncogene localizado no cromossomo 17q21, que codifica a proteína de mesmo nome, também designada como p185^{HER}, uma glicoproteína transmembrana de 185KDa, membro da família Her/erbB e importante fator preditivo e prognóstico, no câncer de mama^{22,23,24}.

A ativação do gene Her-2/neu depende de fatores de transcrição, genes e proteínas regulatórias, que osquestram, em conjunto, os sinais que desencadeiam o crescimento e a diferenciação celulares. Quando suas funções se encontram alteradas, desencadeia-se a carcinogênese. Os fatores de transcrição envolvidos na ativação do gene Her-2/neu e na expressão aumentada da proteína Her-2/neu, são o PEA3 e o Esx/Elf-3, sendo este último, detectado em carcinomas *in situ*. A expressão desses fatores de transcrição, nos tumores de mama, correlaciona-se com a expressão aumentada da proteína Her-2/neu²⁵.

A família Her/erbB é constituída por 4 receptores de superfície envolvidos na transmissão de sinais que controlam o crescimento e a diferenciação celular normais. Apresentam-se na forma de monômeros ou dímeros. Os monômeros são representados pelo Her-1, Her-2, Her-3 e Her-4. Quando o fator de crescimento se liga a um deles, este se liga a outro monômero, formando um dímero. A ligação de um fator de crescimento com um dímero gera sinalizações mais potentes que as geradas pela ligação com um receptor monomérico, sobretudo se o heterodímero contiver o Her-2. A partir daí, ocorre a endocitose do receptor e desencadeiam-se sinais que promovem o crescimento celular²³.

Usualmente, o Her-2 é o segundo monômero e não aquele que se liga ao fator de crescimento. O heterodímero que contém o Her-2 é o mais forte, porque nesse caso, a endocitose do receptor é mais lenta que em dímeros onde o Her-2 não está presente. À medida em que sucede a endocitose, a sinalização vai ocorrendo e sendo potencializada²³. O heterodímero mais freqüentemente observado no câncer de mama é

formado pela junção entre os monômeros Her-2 e Her-3, mas o monômero Her-1 também é observado em uma porção significativa dos carcinomas mamários²⁶.

Todos os quatro monômeros possuem um sítio de ligação extracelular rico em cisteína, um domínio lipofílico transmembrana e um domínio intracelular com atividade catalítica tirosina quinase²³. As tirosinas quinases são proteínas que transmitem sinais da membrana celular ao núcleo. As tirosinas quinases MAP sinalizam o processo de proliferação celular. Quando ocorre a ligação do fator de crescimento ao sítio de ligação extracelular, o mais provável é que desencadeiem a autofosforilação do terminal carboxil do ligante e promovam sinais que levam à ativação do domínio intracelular das quinases MAP e, conseqüentemente, da proliferação celular^{22, 27}.

Normalmente, existem poucas moléculas de Her-2 na superfície celular, portanto, poucos heterodímeros são formados e os sinais de crescimento são relativamente fracos e controlados. Quando o Her-2 é expresso em excesso, um sinal de crescimento celular descontrolado é desencadeado, favorecendo o desenvolvimento de vários tumores, incluindo os ovarianos, do trato gastro-intestinal e os mamários. Por isso, a expressão aumentada do Her-2 está associada aos carcinomas mamários assim como à agressividade e à atividade metastática do tumor²³.

No câncer de mama, 92% dos casos de expressão aumentada do monômero Her2 são atribuídos à amplificação do gene Her-2/neu, ou seja, um número aumentado de cópias de um gene normal. Conseqüentemente, a síntese da proteína Her-2/neu encontra-se aumentada²¹. Esse aumento pode ser 100 vezes maior nas células cancerosas²³.

A importância do complexo Her-2/neu, como fator prognóstico e preditivo, está em identificar as pacientes com menor tempo de sobrevida, geralmente portadoras de tumores invasivos²⁸, que apresentam resistência a certos quimioterápicos, como a ciclofosfamida, o metotrexate e o 5- fluorouracil²⁴ e sensibilidade a outros, como a antraciclina^{21, 23, 29}, embora alguns trabalhos contradigam essa última afirmação²⁴. Nota-se também correlação com tumores negativos para RE e RP, conferindo, portanto, resistência à hormonioterapia e com tumores apresentando alto grau nuclear^{22, 30}. Esses casos, de pior prognóstico, constituem 25 a 30% de todos os casos de câncer de mama³¹.

Vários trabalhos estabeleceram a amplificação ou expressão aumentada do Her-2/neu como fator prognóstico independente, em pacientes com ou sem metástase linfonodal²¹. Alguns trabalhos, não relacionam o Her-2/neu ao tamanho do tumor, grau de diferenciação ou potencial metastático²⁶, enquanto outros estudos já o relacionam à atividade metastática²³.

O Her-2/neu indica, também, casos sensíveis ao tratamento com o trastuzumab (Herceptin®), um anticorpo monoclonal contra o domínio extra-celular do Her-2/neu que aumenta a sensibilidade à quimioterapia em pacientes com doença metastática²³. O trastuzumab foi desenvolvido em 1992, produzindo resposta anti-tumoral em 15 a 20% das pacientes com metástase³². O anticorpo monoclonal exerce o papel de controlar o crescimento celular e impedir o desenvolvimento tumoral, através da endocitose e degradação lisossomal do monômero Her-2. Este é altamente específico ao anticorpo monoclonal anti-Her-2. Ele elimina o receptor da superfície celular, diminuindo a formação de heterodímeros, reduzindo, assim, a oncogenicidade²³.

A localização superficial do receptor o torna alvo fácil ao anticorpo anti Her-2. O anti- Her-2 humano recombinante monoclonal (rhuMAb-Her-2, trastuzumab, Herceptin®) também auxilia no tratamento de carcinomas metastáticos através da potencialização dos quimioterápicos paclitaxel, doxorubicina, cisplatina e ciclofosfamida^{23, 32}.

As primeiras pesquisas do marcador em neoplasias mamárias eram realizadas através de técnicas de *southern blotting*, para as quais se obtinha material extraído do DNA de tumores não fixados. A amplificação do gene Her-2/neu era encontrada em 20 a 30% dos tumores. O subsequente desenvolvimento de anticorpos monoclonais e policlonais, possibilitou a pesquisa da proteína Her-2/neu nas células tumorais, através do método de IQ, havendo uma boa correlação com a amplificação gênica obtida através dos métodos anteriores²².

A proteína Her-2/neu pode ser pesquisada através de métodos de biologia molecular, como reação de cadeia da polimerase, a hibridização *in situ* com fluorescência e a hibridização *in situ* cromogênica, que detectam a amplificação gênica. Também podem-se utilizar métodos para a detecção da proteína, como o imunoenensaio enzimático, que detecta a proteína Her-2/neu solúvel em tecido tumoral fresco ou no

sangue. Esta técnica pode ser utilizada para monitorar os níveis sanguíneos da proteína e identificar possível recorrência do tumor. A técnica mais rotineiramente usada é a de IQ^{21,29,30}.

A IQ é uma técnica amplamente difundida e com a possibilidade de ser aplicada em material fixado. Os resultados dependem de vários fatores, como a sensibilidade e a especificidade dos anticorpos utilizados na reação, o tipo de anticorpo²⁸, o período de fixação e a eficiência dos métodos, os controles positivos e a variabilidade inter-observador^{22, 33}. Trabalhos mostram uma alta correlação com métodos considerados mais acurados, como a hibridização *in situ* com fluorescência, chegando a alcançar 90% de concordância^{21,28,30}. A escala de graduação utilizada na avaliação do Her-2/neu é a padronizada para o Herceptest (Dako, CA/USA), aprovada pela Food and Drug Administration, para selecionar as pacientes candidatas ao tratamento com o Herceptin®³². Ela gradua os tumores de 0 a 3+, de acordo com a intensidade e o padrão da reação cromogênica^{34,35}.

A hibridização *in situ* com fluorescência também pode ser realizada em material fixado, tem altas sensibilidade e especificidade e necessita de uma pequena quantidade de material, mas é um método dispendioso, de execução mais complexa e com maior demanda de tempo para ser realizado²².

A hibridização *in situ* cromogênica apresenta 100% de concordância com a hibridização com fluorescência, em certos trabalhos. A reação cromogênica tem maior durabilidade e não há necessidade de equipamentos especiais para sua visualização³⁰, mas apresenta as desvantagens de custo e tempo, apresentadas pelo método anterior²⁹.

As duas últimas técnicas não são utilizadas rotineiramente, devido às dificuldades demonstradas. Só devem ser utilizadas em casos de escore 2+, pelo método de IQ, quando a coloração demarca fracamente toda a membrana celular, visto que a expressão aumentada de Her-2/neu observada por essas técnicas apresenta alta taxa de correlação com a amplificação gênica^{28,30, 36}.

Receptor de Estrógeno (RE)

A exposição prolongada ao estrógeno exerce grande influência no desenvolvimento do câncer de mama. Os efeitos do estrógeno são, em parte, mediados pelo RE. São conhecidos dois tipos de receptor, α e β , membros da família de receptores esteróides nucleares^{25,37} e são expressos nas células do estroma e das glândulas mamárias. Também são observados no útero, ovário, próstata, epidídimo, testículo, pituitária, rins, timo, ossos e sistema nervoso central. Eles são estruturalmente similares em seus domínios de ligação, embora apresentem diferenças em seus efeitos globais, nos diferentes órgãos²⁶.

Na ausência de seu ligante, o RE forma um complexo inativo com a proteína HSP 90. Quando o estrógeno se liga a seu receptor, através de seu domínio periférico, este se dissocia dessa proteína, dimeriza e é transformado em uma forma ativa. Esta forma ativa dá início à atividade mitótica, através da interação direta do domínio central do receptor com os elementos de resposta ao estrógeno, localizados na região promotora do gene alvo no DNA. Essa interação ativa co-fatores, promovendo, assim, a proliferação celular. Dois co-fatores importantes, envolvidos nas vias de ativação da proliferação celular são o proto-oncogene c-myc e a molécula cyclina D1^{25,37}. Outra via utilizada para a promoção da proliferação celular é a via de sinalização através das quinases MAP^{26,37}.

O RE- α é expresso em 70-80% dos tumores de mama. São tumores de crescimento mais lento e melhor diferenciados e por isso apresentam melhor prognóstico²⁶. A ausência de expressão do RE- α é associada a tumores de fenótipo mais agressivo³⁸.

Alguns estudos indicam que o RE- β atua em fases mais precoces do desenvolvimento tumoral, porque é expresso principalmente em carcinomas *in situ* e tem sua expressão diminuída em tumores mais avançados²⁶. Porém, outros estudos já mostram a expressão aumentada do RE- α como evento inicial significativo na carcinogênese da mama. Outro papel do RE- β seria a de modulador do RE- α ,

atenuando ou suprimindo sua função e reduzindo a proliferação celular, através de diferentes mecanismos, já que eles são co-expressos nos tumores de mama³⁸.

Os genes RE- α e RE- β promovem a expressão de seus respectivos receptores. Por várias décadas, acreditou-se que havia apenas um gene até que em 1996, foi isolado o gene RE- β do DNA de um rato e posteriormente do DNA humano²⁶.

Trabalhos têm mostrado que a ausência da expressão do RE está relacionada a mutações, deleções, perda de heterozigose ou polimorfismos no gene responsável pela sua expressão²⁶.

O RE é importante indicador de resposta à endocrinoterapia, com moduladores ou destruidores deste, que antagonizam o efeito do estrógeno sobre o aumento da massa tumoral^{26,37,38}. Esse receptor foi o primeiro passo na tentativa de uma subclassificação por biomarcadores dos tumores de mama no intuito de auxiliar a conduta da doença, há três décadas³⁹.

Entre os anti-estrógenos não esteroidais, utilizados no tratamento do câncer de mama, estão os moduladores seletivos do RE, sendo o tamoxifeno o representante mais conhecido. Ele antagoniza os efeitos do estrógeno, através da competição por seus receptores. O tamoxifeno foi introduzido para a indução da ovulação, no tratamento de infertilidade, por exercer ação semelhante à do estrógeno em alguns órgãos, como o ovário. Outros efeitos semelhantes aos do hormônio são a reabsorção óssea, a redução das taxas de LDL e colesterol e um pequeno aumento na incidência de hiperplasia e câncer de endométrio^{4,40}.

O fulvestrant é um anti-estrógeno esteroideal utilizado como terapia alternativa aos moduladores do receptor. Ele se liga ao complexo RE, provocando sua destruição prematura. Não tem propriedades semelhantes às do estrógeno. Uma terceira alternativa seria a utilização de inibidores da aromatase, enzima envolvida na síntese de estrógeno. É representado por substâncias como o anastrozol e o letrozol⁴⁰. Aproximadamente 50% dos tumores positivos para Her2-neu são positivos para RE. Esses tumores são frequentemente resistentes à hormonioterapia. Uma das hipóteses é a promoção à expressão dos receptores de crescimento epidérmico, entre os quais o Her-2/neu está classificado. Essa expressão aumentada de Her-2/neu é associada ao aumento de co-

ativadores, que estabilizam o RE e promovem a resistência. Pacientes portadoras desse tipo de tumor devem receber terapia anti-hormonal combinada à administração do trastuzumab³¹. Outros estudos não demonstram uma resistência absoluta, mas uma probabilidade reduzida de resposta à hormonioterapia. Assim, não se deveria negar a oportunidade desta modalidade de tratamento a essas pacientes²⁹.

Os primeiros ensaios utilizados rotineiramente para a identificação do RE foram os ensaios com ligantes radiomarcados. Para a realização desses ensaios, eram utilizados fragmentos frescos de tumor, portanto, apenas coletas prospectivas podiam ser realizadas. O método era quantitativo e o resultado expresso em fentomoles/mg de proteína do citosol⁴¹.

Com o advento da ultrassonografia, a realização do diagnóstico mais precoce do câncer de mama tornou-se viável, possibilitando a identificação de lesões muito menores. Isso impossibilitou, em muitos casos, a obtenção de material para a quantificação do RE por ligantes radiomarcados. Contudo, a introdução do método de IQ possibilitou a identificação do receptor em fragmentos de tumor fixados em formalina e incluídos em parafina. Consequentemente, a IQ substituiu gradativamente os ensaios realizados anteriormente. Vários estudos mostram a superioridade da IQ em determinar a positividade para o RE nos tumores de mama, além de oferecer a vantagem de se realizar uma pesquisa retrospectiva em material já fixado⁴¹ e de atender à necessidade de se utilizar uma tecnologia com boa reproducibilidade e de custo mais acessível, comparando-se com outras técnicas³⁹.

Trabalhos relatam ainda, a importância do tempo de fixação para a identificação do RE pelo método de IQ, sendo necessário, portanto, um tempo mínimo de seis a oito horas., independente do tamanho do tumor⁴¹.

A IQ não é um método quantitativo, portanto, a intensidade da coloração não tem uma relação linear direta com a quantidade de RE presente nos núcleos das células tumorais. Um consenso estabelecido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos recomendou que, para fins terapêuticos, qualquer positividade para o RE pelo método de IQ é o suficiente para considerar o tumor estrógeno-positivo e a paciente candidata à endocrinoterapia. Mas para fins de estudo, se a quantificação é necessária, outros métodos seriam mais adequados, como a reação em cadeia da polimerase⁴¹.

A pesquisa do RE, através de imunocitoquímica aplicada ao material obtido por PAAF tem demonstrado uma correlação favorável quando comparada ao material da peça cirúrgica⁴².

Receptor de Progesterona (RP)

O RP, assim como o RE, pertence à família de receptores esteróides nucleares. Sem o seu hormônio ligante, reside inativo no núcleo celular, formando um complexo latente com proteínas. São conhecidas duas isoformas do receptor, o RPA e o RPB, cuja expressão depende de um único gene. Seus domínios são homólogos e semelhantes aos domínios do RE, incluindo um domínio central que se liga ao DNA e um domínio C-terminal, que se liga à progesterona e medeia a dimerização e a ativação do processo de transcrição. Esse processo é executado através da atuação de fatores de transcrição, como a proteína C/EBP β . Assim, finalmente se desencadeia o processo de proliferação celular.^{25, 43}

Na década de 70, o RP foi valorizado, por fornecer informações adicionais mais precisas, junto ao RE e atuar como fator preditivo à resposta à hormonioterapia⁴⁴. Assim, o RP, similarmente ao RE, é indicador de boa resposta a essa modalidade de tratamento²⁶.

O RP também é um importante fator que prediz a responsividade do câncer de mama à terapia hormonal. Aproximadamente 50% dos tumores positivos para o RE são positivos para o RP e destes, cerca de 75% são sensíveis à terapia hormonal. Tumores positivos para RE e negativos para RP são menos sensíveis à hormonioterapia, sugerindo uma possível contribuição do RP em uma resposta positiva à este tratamento⁴⁵.

O RE é um fator de transcrição chave para a ativação do RP. Este é induzido pelo primeiro receptor. Por isso, também, o segundo pode ser utilizado como referência para a atividade estrogênica, confirmando, assim, sua função como fator preditivo adicional na hormonioterapia⁴⁵.

Cerca de 5% dos tumores são negativos para RE e positivos para RP. Estes tumores demonstram uma resposta intermediária à hormonioterapia²⁶.

Há diferenças entre as respostas dos tumores às diferentes modalidades de hormonioterapia. Tumores positivos para ambos RE e RP, respondem melhor à terapia com tamoxifeno, enquanto tumores positivos para RE e negativos para RP respondem melhor aos inibidores da aromatase⁴⁶.

Outro trabalho mostra que a expressão aumentada do RP, no câncer de mama, está associada a tumores mais agressivos e à expressão aumentada da proteína Her-2/neu. Não obstante, a positividade para RP, independente da expressão do Her2 é um fator preditivo de risco de recorrência⁴⁷. As concentrações de RPB estão particularmente aumentadas no carcinoma mamário, o que diminui a razão RPA: RPB²⁶.

O RP pode ser pesquisado pelas mesmas técnicas utilizadas para a pesquisa do RE, sendo a mais usual, a de IQ. Esta técnica apresenta boa reprodutibilidade e alta correlação com métodos utilizados anteriormente, como os ensaios com ligantes radiomarcados. Assim, como na pesquisa do RE, 1% de positividade das células tumorais para o marcador, é suficiente para eleger a paciente como candidata à hormonioterapia⁴⁵. A pesquisa desse receptor através da imunocitoquímica também apresenta uma boa correlação com a pesquisa no espécime cirúrgico e proporciona maior agilidade na abordagem das neoplasias mamárias⁴⁸.

A Punção Aspirativa e a Citopatologia Aplicadas à Patologia do Câncer de Mama

James Paget, em 1853, foi o primeiro a utilizar a punção aspirativa para o exame microscópico de tumores de mama⁴⁹.

A PAAF tem se mostrado excelente método para o diagnóstico de diversas neoplasias, incluindo o câncer de mama. É procedimento simples, rápido, de menor custo e pouco invasivo⁵⁰. Apresenta importante contribuição na diminuição de procedimentos cirúrgicos desnecessários⁵¹. Tem acurácia semelhante ao material obtido

por biópsia percutânea, quando há correlação entre os achados clínicos, de imagem e citológicos. Isso permite maior agilidade no acompanhamento dos pacientes⁵² e diminuição do estresse experimentado no período entre a suspeita e confirmação do diagnóstico⁵³. Estudos provam que a PAAF muitas vezes, é mais sensível e oferece diagnóstico mais rápido que as biópsias por agulha grossa⁵⁴. Vale lembrar que o aumento da sensibilidade dos métodos radiológicos permitiu a identificação de lesões menores, na mama e em outras localizações, facilitando a realização desse método¹⁸.

Várias publicações mostram que a PAAF fornece subsídios, não apenas morfológicos, podendo-se utilizar o material para estudo imunocitoquímico, citometria de fluxo ou técnicas de biologia molecular^{52,55}, auxiliando, assim, no diagnóstico de lesões benignas e malignas, nos mais diversos órgãos^{56, 57, 58}. Ainda possibilita a avaliação de resposta a tratamentos quimioterápicos e da recorrência, através da detecção de tumor residual ou metástases linfonodais⁵⁹. O material obtido através de punção aspirativa apresenta moderada acurácia quando utilizado na gradação dos carcinomas da mama e comparado ao material da peça cirúrgica⁴². As amostras citológicas podem ser rapidamente coradas e examinadas, tornando possível a avaliação imediata da adequação da amostra e em muitos casos, um diagnóstico provisório pode ser feito ainda na presença do paciente. Acrescenta-se, que o envolvimento do patologista no ato da coleta, otimiza a correlação clínica e permite o manuseio apropriado da amostra e seu encaminhamento para estudo por técnicas complementares, como as supracitadas⁵⁴.

A PAAF também permite a obtenção de material para a confecção das cito-inclusões. Estas podem ser obtidas diretamente do material colhido através da PAAF ou do material raspado de esfregaços muito espessos, que apresentam dificuldades na interpretação das lâminas. Esse material é então fixado e processado de forma semelhante ao cortes histológicos do espécime cirúrgico^{60,61}.

Estudos demonstram a utilidade da citoinclusão na pesquisa de vários tipos de neoplasias em diversos órgãos e efusões cavitárias, apresentando altas sensibilidade e especificidade^{62,63,64}. Sua aplicabilidade e superioridade aos esfregaços são reconhecidas na realização da imunocitoquímica para a diferenciação entre diversos tumores, metastáticos ou primários^{58,62}.

A citoinclusão tem importante papel no diagnóstico das lesões de mama, permitindo a identificação de padrões histológicos e diminuindo o número de casos com diagnóstico indefinido. Ela poderá ser utilizada na realização de técnicas complementares citadas anteriormente, colorações específicas e prover excelente material para imunocitoquímica. A imunocitoquímica aplicada à citoinclusão, na pesquisa da patologia mamária, apresenta boa reproducibilidade⁶⁵. O material é fácil de ser estocado e permite a utilização de um painel amplo de anticorpos. Entre os fatores que determinam o sucesso do método está a experiência do profissional, na obtenção de material com celularidade suficiente.^{54, 66}.

A citoinclusão oferece mais vantagens sobre os esfregaços na realização da imunocitoquímica, porque, o procedimento é o mesmo usado para os cortes histológicos, a interpretação apresenta menor dificuldade, as lâminas apresentam menos artefatos e notam-se menos casos falso-positivos, além de oferecer a possibilidade da realização de múltiplos cortes e de pesquisar vários marcadores. Ela pode ser utilizada na pesquisa de marcadores prognósticos da mama, através do material obtido por punções aspirativas dos tumores ou dos linfonodos^{65,67,68}. Pode-se obter material representativo, com alta celularidade, de onde podem ser extraídas informações úteis a respeito do prognóstico para auxiliar na conduta clínica da paciente⁶⁵.

Dessa forma, a PAAF possibilita ao patologista oferecer à equipe clínica desde dados morfológicos, através da identificação de lesões proliferativas atípicas em pacientes de risco até dados adicionais, relativos a fatores prognósticos e preditivos⁶⁹.

Neste estudo, realizamos a avaliação do RE, do RP e do Her-2/neu, três importantes fatores prognósticos e preditivos na conduta do câncer de mama. Essa avaliação foi realizada através da técnica de IQ aplicada em material de citoinclusão, obtido através de PAAF e em material do espécime cirúrgico⁶⁵

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Pöhls UG, Renner SP, Fasching, PA, Lux MP, Kreis H, Ackermann S, et al. Awareness of breast cancer incidence and risk factors among healthy women. *Eur J Can Prev.* 2004; 13 (4): 249-56.
- 2- Pecorelli S, Favalli G, Zigliani L, Odicino, F. Cancer in woman. *Int J Gynaecol.* 2003; 82 (3): 369-79.
- 3- Wunsch Filho V, Moncau JE. Cancer mortality in Brazil 1980-1995: regional patters and trends. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48 (3): 250-7.
- 4- Benschushan A, Brzezinski A. Hormonal manipulations and breast cancer. *Obstet Gynaecol Surv.* 2002; 57 (5): 314-23.
- 5- Euhus DM. Breast cancer prevention in the 21st century: defining the challenge. *Breast J.* 2006; 12 (2): 97-8.
- 6- Simon MS, Korczak JF, Yee CL, Malone KE, Ursin G, Bernstein L, et al. Breast cancer risk estimates for relatives of white and african american women with breast cancer in the women's contraceptive and reproductive experiences study. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (16): 2498-504.
- 7- Robert SA, Strombom I, Trentham-Dietz A, Hampton JM, McElroy JA, Newcomb PA, et al. Socieconomic risk factors for breast cancer distinguishing individual and community level effects. *Epidemiology.* 2004; 15 (4): 442-50.
- 8- Zago A, Pereira LA, Braga AL, Bousquat A. Breast cancer mortality in women of southern Brazil, 1980-1999. *Rev Saude Publica.* 2005; 39 (4): 641-5.
- 9- Mincey BA, Perez EA. Advances in screening, diagnosis, and treatment of breast cancer. *Mayo Clin Proc.* 2004; 79 (6): 810-6.
- 10- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2001; 2 (3): 133-40.

- 11- Vogel VG, Taioli E. Have we found the ultimate risk factor for breast cancer?. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (12): 1791-4.
- 12- Gertig DM, Fletcher AS, English DR, Macinnis RJ, Hopper JL, Giles GG. Hormone therapy and breast cancer: what factors modify the association?. *Menopause.* 2006; 13 (2): 178-84.
- 13- Cotlar AM, Dubose JJ, Rose DM. History of surgery for breast cancer: radical to the sublime. *Curr Surg.* 2003; 60 (3): 329-32.
- 14- Collyar DE. Breast cancer: a global perspective. *J Clin Oncol.* 2001; 19 (18): 101-5.
- 15- Masood S. The expanding role of pathologists in the diagnosis and management of breast cancer: worldwide excellence in breast pathology program. *Breast J.* 2003; 9 (2): S94-7.
- 16- Lerwill MF. Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28 (8): 1076-91.
- 17- Werling RW, Hwang H, Yaziji H, Gown AM. Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27 (1): 82-90.
- 18- Carlson RW, Anderson BO, Chopra R, Eniu AE, Jakesz R, Love RR, et al. Treatment of breast cancer in countries with limited resources. *Breast J.* 2003; 9 (2): S67-4.
- 19- Domchek SM, Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol.* 2002; 14 (6): 589-93.
- 20- Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348 (23): 2339-47.
- 21- Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech.* 2002; 59 (2): 102-8.

- 22- Walker RA. The significance of histological determination of HER-2 status in breast cancer. *Breast*. 2000; 9 (3): 130-3.
- 23- Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol*. 2001; 12 (1): S3-8.
- 24- Bozzetti C, Musolino A, Camisa R, Bisagni G, Flora M, Bassano C, et al. Evaluation of Her2/neu amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant anthracycline based chemotherapy in primary breast cancer. The role of anthracycline dose intensity. *Am J Clin Oncol*. 2006; 29 (2): 171-7.
- 25- Visvader JE, Lindeman GJ. Transcriptional regulators in mammary gland development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35 (7): 1034-51.
- 26- Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer*. 2003; 97 (3): 825-33.
- 27- Craven RJ, Lightfoot H, Cance WG. A decade of tyrosine kinases: from gene discovery to therapeutics. *Surg Oncol*. 2003; 12 (1): 39-50.
- 28- Falo C, Moreno A, Lloveras B, Figueras A, Varela M, Escobedo A .Algorithm for the diagnosis of Her2/neu status in breast-infiltrating carcinomas. *Am J Clin Oncol*. 2003; 26 (5): 465-70.
- 29- Hayes D, Thor AD. C-erb-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol*. 2002; 29 (3): 231-45.
- 30- Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA. Comparative assays for the Her2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2004; 128 (6): 627-33.
- 31- Nahleh ZA, Jazieh AR. Multitargeted therapy in estrogen receptor- positive human epidermal growth factor receptor-2 positive breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 2005; 28 (6): 631-3.
- 32- Oliveira MA, Santos GS, Kanamura CT, Alves VAF. Immunoexpression of Her-2 protein in fine-needle aspirates of breast carcinoma:correlation with surgical specimens. *Rev Bras Ginecol Obst*. 2003; 25 (1): 23-8.

- 33- Pauletti G, Danderkar S, Rong H, Ramos L, Peng, H, Seshadri R, et al. Assessment of methods for tissue based detection of the Her2/neu alteration in human breast cancer: comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 2000; 18 (21): 3651-64.
- 34- Rosai J. Breast. In: Rosai J, editor. *Surgical Pathology*. St Louis: Mosby; 2004. p. 1763-876.
- 35- Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry of Breast. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry*. New York: Churchill Livingstone; 2002. p. 536-58.
- 36- Field AS, Chamberlain NL, Tran D, Morey AL. Suggestions for HER-2/neu testing in breast carcinoma, based on a comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Pathology.* 2001; 33 (3): 278-82.
- 37- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2003; 10 (2): 179- 86.
- 38- Hayashi SI, Eguchi H, Tanimoto K, Yoshida T, Omoto Y, Inoue A, et al. The expression and function of estrogen receptor α and β in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer.* 2003; 10 (2): 193-202.
- 39- Ellis MJ. Functional analysis of breast cancer genome. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (11): 1649-50.
- 40- Jordan VC, Osipo C, Schafer JM, Fox JE, Cheng D, Liu H. Changing role of the oestrogen receptor in the life and death of breast cancer cells. *Breast.* 2003; 12: 432-41.
- 41- Schnit SJ. Estrogen receptor testing of breast cancer in current clinical practice: what's the question?. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (12): 1797-9.
- 42- Jayaram G, Elysayed EM. Cytologic evaluation of prognostic markers in breast carcinoma. *Acta Cytol.* 2005; 49 (6): 605-10.

- 43- Man JH, Li HY, Zhang PJ, Zhou T, He K, Pan X, et al. PIAS3 induction of PRB sumoylation represses PRB transactivation by destabilizing its retention in the nucleus. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34 (19): 1-15.
- 44- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol.* 2003; 21 (10): 1973-9.
- 45- Yamashita H, Yando Y, Nishio M, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer.* 2006; 13 (1): 74-83.
- 46- Punglia RS, Kuntz KM, Winer EP, Weeks JC, Burnstein HJ, et al. The impact of tumor progesterone receptor status on optimal adjuvant endocrine therapy for menopausal patients with early-stage breast cancer: a decision analysis. *Cancer.* 2006; 106 (12): 2576-82.
- 47- Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A' Hern R, et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol.* 2006; 17 (5): 818-26.
- 48- Jayaram G, Elsayed EM. Cytologic evaluation of prognostic markers in breast carcinoma. *Acta Cytol.* 2005; 49 (6): 605-10.
- 49- Bales EC. Laboratory techniques. In: Koss LG, editor. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1569-634.
- 50- Vargas HI, Masood S. Implementation of a minimally invasive breast biopsy program in countries with limited resources. *Breast J.* 2003; 9 (2): S81-5.
- 51- Annema JT, Versteegh MI, Veselic M, Voight P, Rabe KF. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration in the diagnosis and staging of lung cancer and its impact on surgical staging. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (33): 8283-5.

- 52- Schmitt FC, Soares R, Cirnes L, Seruca R. PCR amplification of DNA obtained from archived hematoxylin-eosin- and giemsa-stained breast cancer aspirates. *Diagn Cytopathol.* 1998; 19 (5): 395-7.
- 53- Saegrov S, Halding AG. What is it like living with the diagnosis of cancer?. *Eur J Cancer Care.* 2004; 13 (2): 145-53.
- 54- Stewart CJ, Coldewey J, Stewart IS. Comparison of fine needle aspiration cytology and needle core biopsy in the diagnosis of radiologically detected abdominal lesions. *J Clin Oncol.* 2002; 55 (2): 93-7.
- 55- Mayall F, Dray M, Stanley D, Harrison B, Allen R. Immunoflow cytometry and cell block immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases. *J Clin Pathol.* 2000; 53 (6): 451-7.
- 56- Fröstad B, Martinsson T, Tani E, Falkmer U, Darnfors C, Skoog L, et al. The use of fine needle aspiration cytology in the molecular characterization of neuroblastoma in children. *Cancer.* 1999; 87 (2): 60-8.
- 57- de Boer WB, Segal A, Frost FA, Sterrett GF. Can CD34 discriminate between benign and malignant hepatocytic lesions in fine needle aspirates and thin core biopsies? *Cancer.* 2000; 90 (5): 273-8.
- 58- Wu M, Szporn AH, Zhang D, Wasserman P, Gan L, Miller L, et al. Cytology applications of p63 and TTF-1 immunostaining in differential diagnosis of lung cancers. *Diagn Cytopathol.* 2005; 33 (4): 223-7.
- 59- Varadarajulu S, Eloubeidi M. Can endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration predict response to chemoradiation in non-small cell lung cancer? A pilot study. *Respiration.* 2006; 73 (2): 213-20.
- 60- Kulkarni MB, Prabhudesai NM, Desai SB, Borges AM. Scrape cell-block technique for needle aspiration cytology smears. *Cytopathology.* 2000; 11 (3): 179-84.
- 61- Hudock JA, Hanau CA, Christen R, Bibbo M. Expression of estrogen and progesterone receptors in cytologic specimens using various fixatives. *Diag Cytopathol.* 1996; 15 (1): 78-83.

- 62- Liu J, Farhood A. Immunostaining for thyroid transcription factor-1 on fine-needle aspiration specimens of lung tumors: a comparison of direct smears and cell-block preparations. *Cancer*. 2004; 102 (2): 109-14.
- 63- Levine PH, Joutovsky A, Cangiarella J, Yee H, Simsir A. CDX-2 expression in pulmonary fine-needle aspiration specimens: a useful adjunct for the diagnosis of metastatic colorectal adenocarcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2006; 34 (3): 191-5.
- 64- Lee BH, Hecht JL, Pinkus JL, Pinkus GS. WT1, estrogen receptor, and progesterone receptor as markers for breast or ovarian primary sites in metastatic adenocarcinoma to body fluids. *Am J Clin Pathol*. 2002; 117 (5): 745-50.
- 65- Briffod M, Hacene K, Le Doussal V. Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases. *Mod Pathol*. 2000; 13 (8): 841-50.
- 66- Mayall F, Chang B, Darlington A. A Review of 50 consecutive cytology cell block preparations in a large general hospital. *J Clin Pathol*. 1998; 50 (12): 985-90.
- 67- Vesoulis Z, Rajappannair L, Define L, Beach J, Schnell B, Myers S. Quantitative image analysis of estrogen receptor in breast fine needle aspiration biopsies. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004; 26 (6): 323-30.
- 68- Briffod M, Le Doussal V, Spyrtos F. Immunohistochemical determination of hormonal receptors on cell-block from fine-needle cytopunctures of breast carcinoma. *Bull Cancer*. 2001; 88 (10): 1028-35.
- 69- Masood S. Expanding role of breast cytopathology as a risk predictor. *Adv Anat Pathol*. 2001; 8 (5): 255-63.

Receptores hormonais e Her-2/neu em câncer de mama.

Estudo comparativo por imunoistoquímica entre citoinclusão e espécime cirúrgico*.

Solange Peron Bueno, MD¹

Rosa Marlene Viero, MD²

Cleverson Teixeira Soares, MD³

1- Pós-Graduanda. Curso de Pós-Graduação em Patologia- Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP- Botucatu, São Paulo- Brasil.

2- Professor Assistente Doutor- Departamento de Patologia- Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP- Botucatu, São Paulo- Brasil.

3- Patologista e Doutor em Patologia- Departamento de Anatomia Patológica do “Instituto Lauro de Souza Lima” - Bauru, São Paulo-Brasil.

Palavras chave: Carcinoma mamário, Citoinclusão, Receptores Hormonais, Her-2/neu.

* Trabalho apresentado de acordo com as normas da revista Diagnostic Cytopathology
ISSN: 8755-1039

Endereço para correspondência:

Rosa M. Viero, M.D.

Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP

18.618-000- Botucatu- SP

Telefone: (14) 3811-6238

Fax: (14) 3815-2348

e-mail: viero@fmb.unesp.br

RESUMO

Foram selecionados 62 casos de carcinoma de mama, diagnosticados por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), com confirmação pelo espécime cirúrgico. Citoinclusão e espécime cirúrgico foram submetidos à reação imunoistoquímica (IQ) para receptor de estrógeno (RE), de progesterona (RP) e proteína Her-2/neu. Consideraram-se positivos para RE e RP, casos com 1% ou mais de células coradas. Positividade para Her-2/neu foi avaliada numa escala de 0 a 3+. O índice de concordância entre citoinclusão e espécime cirúrgico variou de 90 a 94%. Sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia da citoinclusão na pesquisa para os RE e RP e proteína Her-2/neu (3+) foram respectivamente: RE (92,7%; 85,7%; 92,7%; 85,7% e 90,3%), RP (92,7%; 94,7%; 97,4%; 87,0% e 93,5%) e Her-2/neu (70,0%; 100,0%; 100,0%; 94,5% e 95,2%). A citoinclusão apresenta excelente correlação com o espécime cirúrgico na pesquisa por IQ dos receptores hormonais e da proteína Her-2/neu.

ABSTRACT

It was selected 62 cases of breast carcinoma, diagnosed by fine needle aspiration (FNA), with confirmation by surgical specimen. Cell-block and surgical specimen were submitted to immunohistochemistry (IHC) reaction, for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and Her-2/neu protein. Cases with 1% or more cells stained were considered positive for ER and PR. Her-2/neu Positivity was evaluated by a score from 0 to 3+.

The concordance index between cell-block and surgical specimen had a variation of 90 to 94%. Sensibility, specificity, predictive positive and negative values and accuracy for ER, PR and Her-2/neu protein, was respectively: ER (92,7%; 85,7%; 92,7%; 85,7% and 90,3%), PR (92,7%; 94,7%; 97,4%; 87,0% and 93,5%) and Her-2/neu (70,0%; 100,0%; 100,0%; 94,5% and 95,2%).

Cell-block shows excellent correlation with surgical specimen in assessment of hormonal receptors and Her-2/neu protein, by IHC.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a causa mais freqüente de morte por neoplasia em mulheres, principalmente entre 40 e 55 anos^{1,2}. Ao longo de trinta anos houve aumento da incidência, sendo 33% na última década. O aumento da incidência é atribuído, entre outros fatores, ao envelhecimento global da população, em países desenvolvidos e em desenvolvimento³. Sua etiologia é complexa, multifatorial e envolve fatores genéticos, hormonais e ambientais. Os fatores hormonais têm papel fundamental, sendo a exposição endógena ou exógena ao estrogênio e progesterona, o principal estímulo para a atividade mitótica do parênquima mamário⁴.

Os principais fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama, avaliados por testes moleculares e IQ, são os oncogenes BRCA1 e 2, Her-2/neu, tp53, os receptores de estrogênio e progesterona e o índice de proliferação celular⁵. O gene Her-2/neu, um proto-oncogene localizado no cromossomo 17q21, é importante fator preditivo e prognóstico, no câncer de mama^{6,7,8}. Em 92% dos casos, a expressão aumentada da proteína Her-2/neu é atribuída à amplificação do gene Her-2/neu e está associada à maior agressividade e atividade metastática da neoplasia^{7,9}. A importância da detecção do complexo Her-2/neu está em identificar as pacientes com menor tempo de sobrevida, geralmente portadoras de tumores invasivos¹⁰ e que apresentam resistência a certos quimioterápicos, como a ciclofosfamida, o metotrexate e o 5 – fluorouracil⁸. Esses casos, em geral, de pior prognóstico, constituem 25 a 30% dos casos de câncer de mama¹¹. O Her-2/neu indica, também, casos sensíveis ao tratamento com o trastuzumab, anticorpo monoclonal contra o domínio extra–celular do Her-2/neu, que aumenta a sensibilidade à quimioterapia em pacientes com doença metastática⁷. A proteína do Her-2/neu pode ser pesquisada através de métodos de biologia molecular, como reação em cadeia da polimerase ou por hibridização in situ com fluorescência e por IQ^{9,12,13}. Aproximadamente 50% dos tumores positivos para Her2-neu são positivos para RE. Esses tumores são freqüentemente resistentes à hormonioterapia. O RP, similarmente ao RE, é indicador de boa resposta à endocrinoterapia^{11,14}. Em geral, 50% dos tumores positivos para o RE são positivos para o RP e destes, cerca de 75% são sensíveis à terapia hormonal¹⁵.

A PAAF tem se mostrado excelente método para o diagnóstico do câncer de mama. É procedimento simples, rápido, de menor custo e pouco invasivo¹⁶. Apresenta

acurácia semelhante ao material obtido por biópsia percutânea, quando há correlação entre os achados clínicos, exames de imagem e citológicos. O método permite maior agilidade no acompanhamento dos pacientes¹⁷ e diminuição do estresse experimentado no período entre a suspeita e confirmação do diagnóstico¹⁸. Estudos mostram que a PAAF é mais sensível e oferece diagnóstico mais rápido que as biópsias por agulha grossa¹⁹. Várias publicações mostram que a PAAF fornece subsídios, não apenas morfológicos, podendo-se utilizar o material para estudo por IQ, citometria de fluxo ou técnicas de biologia molecular^{17,20}. A obtenção de material para citoinclusões através da PAAF tem importância no diagnóstico das lesões de mama, permitindo a identificação de padrões histológicos e diminuindo o número de casos com diagnóstico indefinido. Além disso, podem ser utilizadas na realização das técnicas complementares. O material é fácil de ser estocado e permite a obtenção de múltiplos cortes, podendo-se pesquisar um amplo painel de anticorpos^{19,20}. A pesquisa do RE, através de IQ em material de citoinclusão, tem demonstrado uma correlação favorável, quando comparada ao material da peça cirúrgica²¹.

Realizamos, no presente trabalho, estudo comparativo com marcadores para RE, RP e Her-2/neu, através de IQ, em material de citoinclusão e em espécimes cirúrgicos de carcinoma de mama, com objetivo de identificar a confiabilidade do método.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Seleção dos Casos

Foram avaliados 126 casos com diagnóstico de carcinoma de mama por PAAF, que possuíam citoinclusão, no período de janeiro de 1999 a janeiro de 2006. Destes, selecionaram-se 62 casos, após a exclusão dos casos de pacientes submetidas à quimioterapia prévia, material de citoinclusão insuficiente ou sem comprovação histológica de carcinoma. O material foi obtido dos arquivos do Instituto de Patologia de Bauru-SP e cedido sem dados que permitissem a identificação das pacientes. Foram incluídos casos de lesões palpáveis e não palpáveis, com exames de mamografia e ultrassonografia. As lesões não-palpáveis foram puncionadas por orientação ultrassonográfica. Todos os casos foram puncionados por patologistas, com esfregaços corados por Giemsa e HE. Dados como sexo, idade, mama e quadrantes acometidos, tamanho do tumor, acometimento de linfonodos e estadiamento patológico foram obtidos através dos laudos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP-SP (OF.563/2004-CEP).

Seleção das lâminas e blocos de parafina

Os 62 casos selecionados apresentavam esfregaços corados por HE e Giemsa, e cortes histológicos de material de citoinclusão e do espécime cirúrgico. Foram considerados suficientes os cortes de citoinclusão que apresentavam pelo menos dez campos de grande aumento preenchidos por células junto a elementos do sangue periférico. Foram selecionados, de cada caso, duas lâminas de PAAF, uma corada por HE e outra por Giemsa, uma lâmina e um bloco do material de citoinclusão e uma lâmina e um bloco representativos da lesão do espécime cirúrgico. Foram, então, realizados cortes histológicos com 4µm de espessura dos blocos em parafina e procedeu-se às colorações por HE para avaliação dos dados morfológicos e IQ para pesquisa de RE, RP e da proteína Her2/ neu (Fig. 1).

Preparação prévia do material de citoinclusão e dos esfregaços

As PAAF foram realizadas utilizando-se agulha de calibre 25 x 6 mm. O material foi, em parte, colocado sobre as lâminas para realização dos esfregaços e o que restou no bulbo da agulha e no interior da seringa, foi processado para citoinclusão. Em nenhum caso, realizou-se o ato da PAAF para a obtenção exclusiva do material para citoinclusão. Foram realizados, em geral, de 2 a 6 esfregaços, metade corados por HE e metade por Giemsa. Os esfregaços para HE foram fixados em álcool 95% e para Giemsa a seco, em temperatura ambiente. O material de citoinclusão foi fixado, primeiramente, com aspiração de 1,0 ml de álcool 95 %, seguido, imediatamente, por aspiração de 5,0 ml de solução de formalina 10% tamponada, permanecendo em fixação por um período de 6 a 24 horas (Fig. 2). Posteriormente, foi submetido a processamento histológico com cortes em parafina para colorações por HE e IQ.

Reação de Imunoistoquímica

A reação de IQ foi realizada segundo protocolos internacionais²², pelo método indireto streptavidina-biotina peroxidase (LSAB – Dako, CA/USA), para pesquisa do RE (anticorpo monoclonal anti-humano, clone 1D5, 1/200 – Dako, CA/USA), RP (anticorpo monoclonal anti-humano, clone PgR 636, 1/300 - Dako, CA/USA) e Her-2/neu (anticorpo policlonal, 1/300- Dako, CA/USA), utilizando-se o anticorpo isolado, em lâminas separadas, nas diluições especificadas. As lâminas foram incubadas em três banhos de xilol (Synth, Diadema/SP, Brasil), de cinco minutos cada. Posteriormente, foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio 1,5 % em álcool metílico absoluto por 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas por 10 minutos em água destilada, sendo então, realizada a reativação antigênica, utilizando-se tampão citrato (pH: 6,0). As amostras foram, então, resfriadas e lavadas em tampão fosfato (pH: 7,6) por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram recobertos pelo anticorpo primário anti-estrógeno, anti-progesterona e anti-Her-2/neu, previamente diluídos em tampão TRIS-HCL (pH:7.6). As amostras foram então levadas para uma câmara úmida, à temperatura de 36-37° C, por uma hora. A seguir, foram lavadas em tampão fosfato, dois banhos por 5 minutos. Após a lavagem, as amostras foram incubadas com anticorpos secundários IgG/IgM biotilado

(Dako,CA/USA), em câmara úmida por 25 minutos, à temperatura ambiente. Novamente, as amostras foram lavadas por 5 minutos, em dois banhos com tampão fosfato com pH 7,6 e incubadas com conjugado streptavidina-biotina peroxidase (Dako,CA/USA) por 25 minutos, à temperatura ambiente. Foram novamente lavadas em tampão fosfato, dois banhos por 5 minutos à temperatura ambiente. A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio como substrato (Dako, CA/USA). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) e montadas com lamínulas e entelan (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). O controle positivo foi mama normal adjacente ao tumor na peça cirúrgica para RE e RP e casos positivos para Her-2/neu, classificados nos escores 0,1+,2+ e 3+²³. Controles negativos e positivos externos de material de carcinoma de mama, conhecidamente negativos e positivos, foram realizados.

Análise Morfológica

Os casos foram analisados conjuntamente por três patologistas, sem conhecimento prévio do diagnóstico, e os resultados anotados após consenso entre os mesmos. A análise morfológica foi realizada através de microscópio óptico (Nikon-eclipse-50i). Para cada lâmina, foi realizada a leitura de 10 campos em aumento de 400x (campos de 0,152 mm²), tanto nos esfregaços, como nas lâminas de citoinclusão e do espécime cirúrgico. As lâminas foram analisadas separadamente, de forma a não se identificar a correspondência entre as lâminas de esfregaços, de citoinclusão e do espécime cirúrgico de um mesmo caso ou entre os mesmos. Foi realizada a classificação dos carcinomas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)²⁴.

Análise Imunoistoquímica

Foi realizada análise comparativa dos RE e RP na citoinclusão e no espécime cirúrgico. Foram considerados positivos, os casos que apresentavam grau de positividade nuclear maior que 1%, de acordo com a literatura¹⁵ (Figs. 3 e 4). Foram utilizados controles externos e internos, como parâmetros para a reação. Os controles internos foram representados por glândulas mamárias não tumorais, adjacente à área neoplásica.

Posteriormente, foi realizada a pesquisa para Her-2/neu na forma de anticorpo isolado, utilizando-se a escala de graduação semiquantitativa, semelhante à padronizada para o Herceptest (Dako, CA/USA)²⁵. A reação cromogênica foi semi-quantificada de 0 a 3+: 0 = ausência de coloração ou < 10% das células tumorais; 1+ = coloração parcial da membrana celular > 10% das células; 2+ = coloração fraca da membrana > 10% das células; 3+ = forte coloração da membrana > 10% do tumor (Figs. 3 e 4)²³. Foram comparados os padrões obtidos na citoinclusão e espécime cirúrgico.

Análise Estatística

Os dados foram armazenados em um banco de dados do software Excel, pertencente ao Windows XP®. Para a análise dos resultados da reação de IQ, foram utilizados os cálculos para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia. Os cálculos foram realizados separadamente, para RE, RP e Her-2/neu. A peça cirúrgica foi considerada como padrão-ouro. Os dados foram expressos em percentagem.

RESULTADOS

Prevaleceram as pacientes do sexo feminino (98,4%) com idade variando de 38 a 85 anos (média $58,6 \pm 12,7$). A mama direita foi acometida em 51,6%, a esquerda em 46,8% e bilateralmente em 1,6%. O quadrante súpero-externo foi o mais acometido (42,2%), seguido pelo súpero-interno (22,7%). A presença de neoplasia na transição dos quadrantes ocorreu em 22,6% dos casos. As localizações menos frequentes foram a retroareolar (4,8%), o quadrante ínfero-externo (3,2%) e o ínfero-interno (3,2%). Em um dos casos (1,6%), houve acometimento extenso da mama, abrangendo todos os quadrantes.

Os carcinomas mediram em média 32,4mm. Foram classificadas de acordo com a OMS como carcinoma ductal sem outras especificações em 72,6% dos casos, dos quais 45,2% foram grau I, 35,5% grau II e 19,3% grau III, segundo a graduação de Scaff-Bloom & Richardson, modificada por Elston e Ellis²⁴. Dois carcinomas foram lobulares, sendo um clássico e outro pleomórfico. Os carcinomas ductais especiais foram 07 casos (11,3%), sendo 02 apócrinos, 01 cribriforme, 01 pleomórfico, 01 com diferenciação neuroendócrina, 01 com células em anel de sinete e 01 com produção de muco. Os demais foram: 03 colóides, 01 tubular, 01 medular, 01 neuroendócrino, 01 papilífero e 01 metaplásico com diferenciação condróide.

Quanto ao estadiamento patológico, 27,4% foram classificados como pT1, 54,9% como pT2, 4,8% como pT3 e 12,9% como pT4. O comprometimento dos linfonodos caracterizou-se como pN0 em 41,9%, como pN1 em 37,1% dos casos, pN2 em 11,3% e nenhum caso como pN3 ou pN4. Observaram-se ainda, 9,7% em pNx, onde o comprometimento linfonodal não pôde ser avaliado. Observou-se a ocorrência de micrometástase em apenas um dos casos (pN0mi).

No material de citoinclusão, 66,1% dos casos foram positivos para receptor de estrógeno, 62,9% para receptor de progesterona e 11,3% de casos positivos para Her-2/neu. No espécime cirúrgico, houve positividade de 66,1% tanto para RE quanto para RP e 16,1% para Her-2/neu. A positividade concomitante para RE e RP foi observada em 61,3% e 62,9% das citoinclusões e espécimes cirúrgicos, respectivamente. A positividade concomitante para RE e Her-2/neu foi de 42,9% e 40,0% pela citoinclusão e espécime cirúrgico, respectivamente.

Os casos compostos por verdadeiro-positivos para RE foram 61,3%, ou seja, ambos citoinclusão e espécime cirúrgico foram positivos. Em 29,0%, a citoinclusão e o espécime cirúrgico foram negativos para RE, caracterizando o grupo de verdadeiro-negativos. O grupo de falso-negativos, no qual se observaram citoinclusão negativa e espécime cirúrgico positivo, totalizaram em 4,9%. Em 4,8% dos casos, observaram-se citoinclusão positiva e espécime cirúrgico negativo, caracterizando os casos falso-positivos. Em 90,3% dos casos houve concordância nas interpretações da reação de IQ para RE, entre citoinclusão e espécime cirúrgico. Em 9,7% houve discordância, tanto da positividade quanto da negatividade, para o RE (Tabela I).

A sensibilidade foi de 92,7%, especificidade de 85,7%, VPP de 92,7%, VPN de 85,7% e acurácia de 90,3% (Tabela II).

Na análise do RP, observaram-se 61,3% de verdadeiro-positivos, 32,3% de verdadeiro-negativos, 4,8% de falso-negativos e 1,6% de falso-positivos. Notou-se concordância de interpretação em um total de 93,5% dos casos e discordância em um total de 6,5% (Tabela I). A sensibilidade de 92,7%, especificidade de 94,7%, VPP de 97,4%, VPN de 87,0% e acurácia de 93,5% (Tabela II).

A reação para o marcador Her-2/neu, considerando-se somente a marcação 3+, revelou 83,9% de verdadeiro-negativos, 11,3% de verdadeiro-positivos, 4,8% de falso-negativos e nenhum caso falso-positivo. Ou seja, em 95,2% houve concordância e em 4,8% houve discordância na interpretação. (Tabela I).

A sensibilidade foi de 70,0%, especificidade de 100,0%, VPP de 100,0%, VPN de 94,5% e acurácia de 95,2% (Tabela II).

Quando consideramos a escala de positividade de 0 a 3+, observamos que a soma dos casos de escore 2+ e 3+, resultou em 19 casos (30,7%) positivos na citoinclusão e 15(24,2%) no espécime cirúrgico. Em relação à soma dos casos 0 e 1+, foram 43 (69,3%) na citoinclusão e 47(75,8%) no espécime cirúrgico (Tabela III). Nenhum caso com escore 0 na citoinclusão, recebeu escore 2+ ou 3+ no espécime cirúrgico. Aqueles com escore 3+ na citoinclusão, também foram 3+ no espécime. Dos 26 casos que receberam escore 1+ na citoinclusão, 21(80,8%) receberam escore 0 ou 1+ no espécime cirúrgico. Dos 12 casos que receberam escore 2+ na citoinclusão, 9

(75,0%) receberam escore 0 ou 1+ e 3 (25,0%) receberam escore 2+ ou 3+ no espécime cirúrgico (Tabela IV).

Tabela I. Porcentagens de verdadeiro-positivos, verdadeiro-negativos, falso-positivos e falso-negativos entre citoinclusão e espécime cirúrgico.

	Verdadeiro-positivos	Verdadeiro-negativos	Falso-positivos	Falso-negativos
RE	61,3	29,0	4,8	4,9
RP	61,3	32,3	1,6	4,8
Her-2/neu(3+)	11,3	83,9	0,0	4,8

Os valores especificados estão em porcentagem.

Tabela II. Valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da citoinclusão para a pesquisa de receptor de estrógeno, receptor de progesterona e Her-2/neu (3+).

	RE	RP	Her-2/neu(3+)
Sensibilidade	92,7	92,7	70,0
Especificidade	85,7	94,7	100,0
VPP	92,7	97,4	100,0
VPN	85,7	87,0	94,5
Acurácia	90,3	93,5	95,2

VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; RE, receptor de estrógeno; RP, receptor de progesterona. Os valores especificados estão em porcentagem.

Tabela III. Resultados da positividade para Her-2/neu por escore de 0 a 3+ na citoinclusão e espécime cirúrgico

Escore	Citoinclusão	Espécime Cirúrgico
	n (%)	n (%)
0 +	17 (27,4)	25 (40,3)
1 +	26 (41,9)	22 (35,5)
2 +	12 (19,4)	05 (08,1)
3 +	07 (11,3)	10 (16,1)

Tabela IV. Comparação dos resultados do escore 0 - 3+ para Her-2/neu, entre citoinclusão e espécime cirúrgico.

<i>Citoinclusão</i>	<i>Espécime cirúrgico</i>	<i>n (%)</i>
0	0	11 (64,7)
	1+	6 (35,3)
	2+	0 (0)
	3+	0 (0)
1+	0	11 (42,3)
	1+	10 (38,5)
	2+	4 (15,3)
	3+	1 (3,9)
2+	0	3 (25,0)
	1+	6 (50,0)
	2+	1 (8,3)
	3+	2 (16,7)
3+	0	0 (0,0)
	1+	0 (0,0)
	2+	0 (0,0)
	3+	7 (100,0)

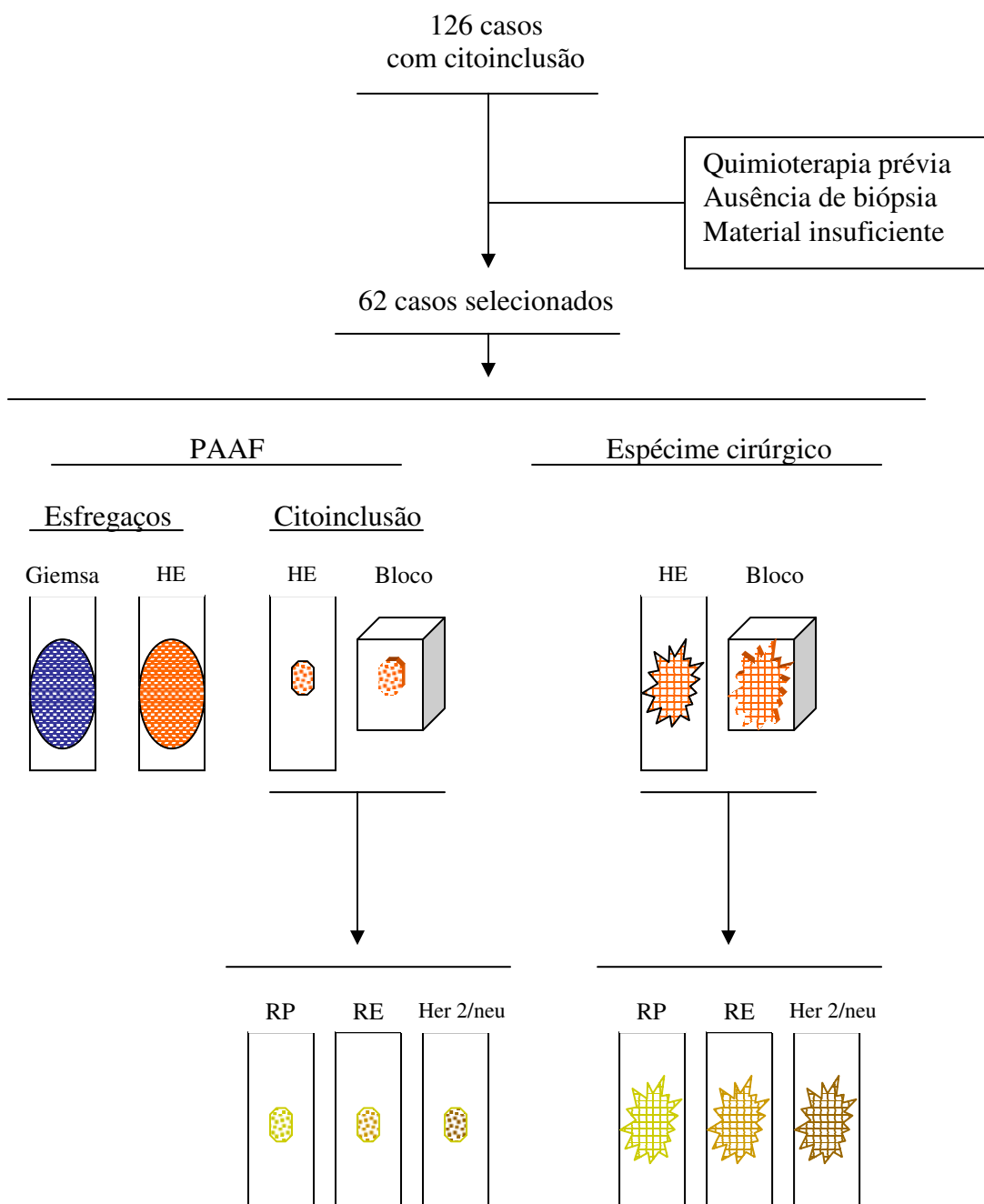


Fig. 1. Representação do processo de seleção dos casos, blocos e lâminas.

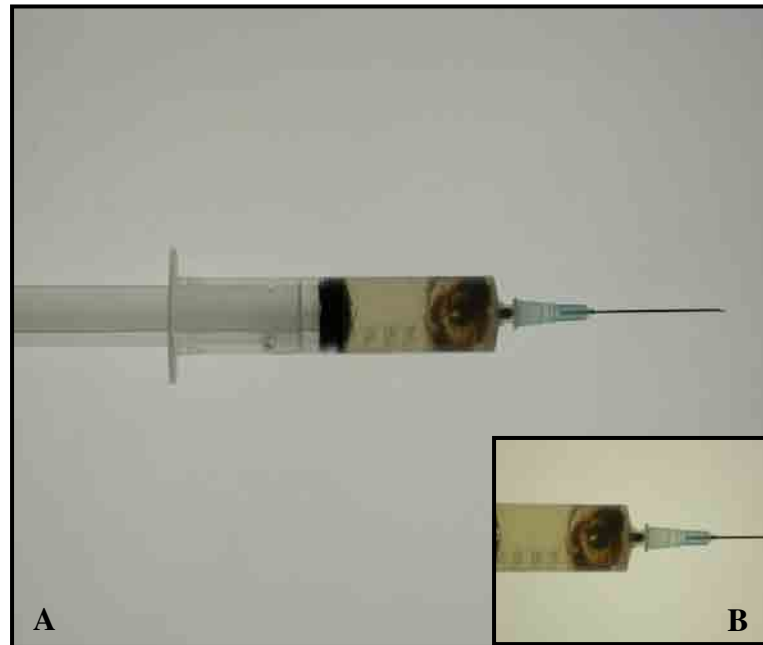


Fig. 2. (A) Seringa contendo material obtido através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Presença de coágulo coeso após aspiração de álcool 95% seguido por formalina tamponada 10%. (B) Detalhe do coágulo.

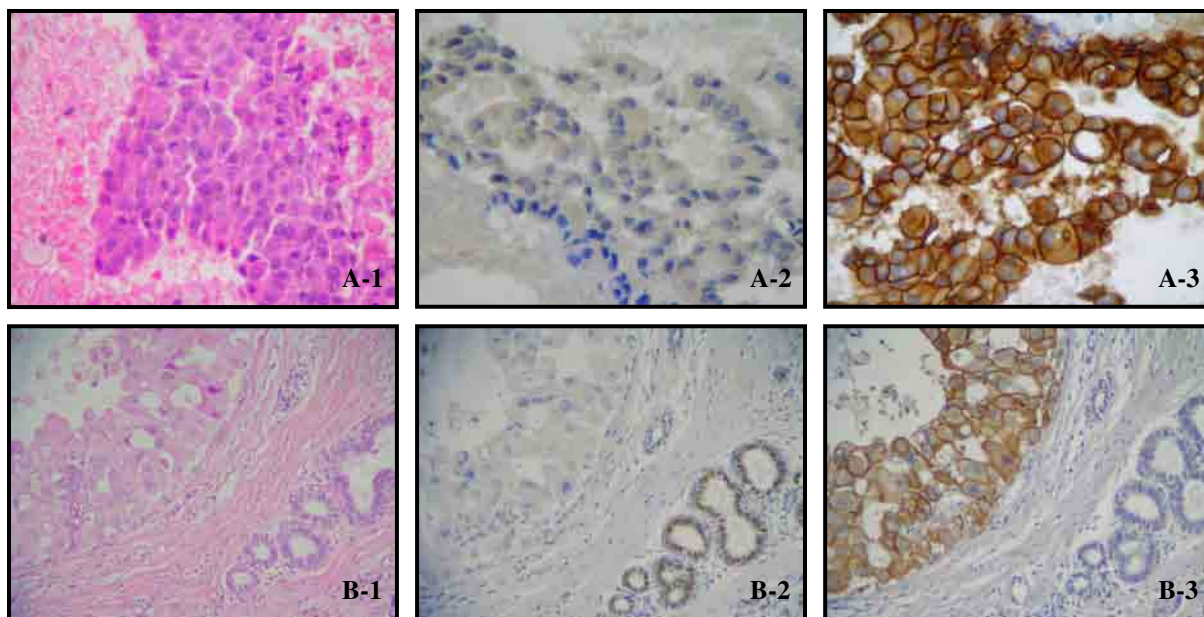


Fig. 3. Expressão de receptor de estrógeno (RE) e proteína Her-2/neu em citoinclusão e espécime cirúrgico de carcinoma ductal grau III. **(A-1)** Citoinclusão (HE, X 400). **(A-2)** Citoinclusão negativa para RE, com controle interno positivo (IQ, X 400). **(A-3)** Citoinclusão positiva para Her-2/neu (IQ, X 400.). **(B-1)** Espécime cirúrgico (HE, X 200). **(B-2)** Espécime cirúrgico negativo para RE (IQ, X 200). **(B-3)** Espécime cirúrgico positivo para Her-2/neu (IQ, X 200).

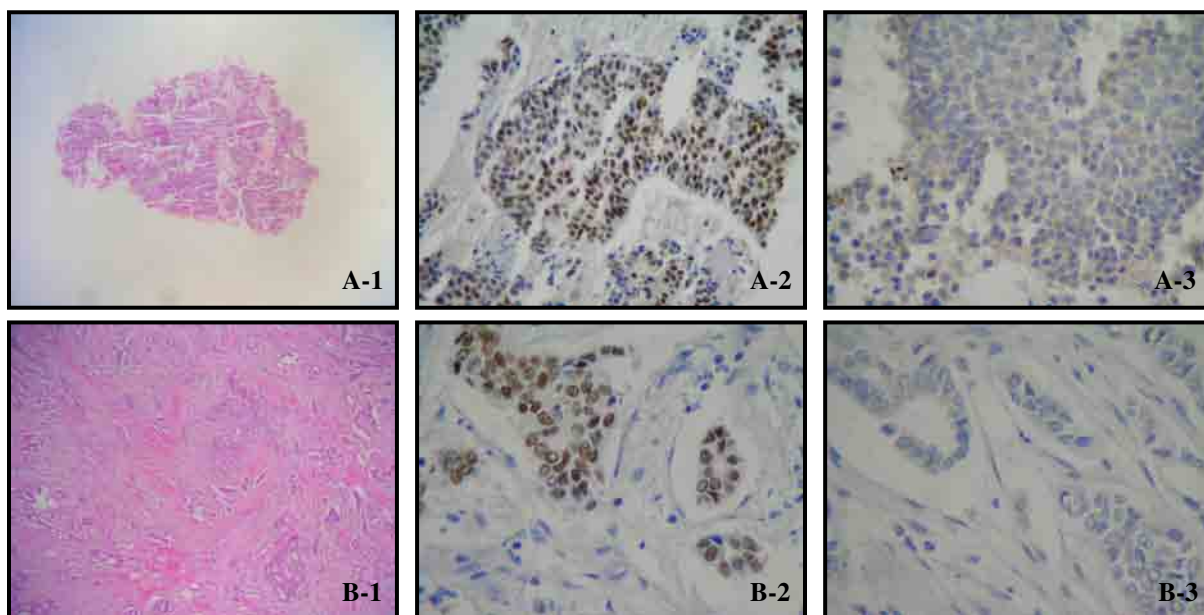


Fig.4. Expressão de receptor de progesterona (RP) e Her-2/neu em citoinclusão e espécime cirúrgico de carcinoma ductal grau I. **(A-1)** Citoinclusão (HE, X 40). **(A-2)** Citoinclusão positiva para RP (IQ, X 200). **(A-3)** Citoinclusão negativa para Her-2/neu (IQ, X 400). **(B-1)** Espécime cirúrgico (HE, X 100). **(B-2)** Espécime cirúrgico positivo para RP (IQ, X 400). **(B-3)** Espécime cirúrgico negativo para Her-2/neu (IQ, X 400).

DISCUSSÃO

A PAAF tem-se revelado um método simples, rápido, de baixo custo, e de grande utilidade no diagnóstico das neoplasias mamárias¹⁶. E o aumento da sensibilidade dos métodos radiológicos têm permitido o acesso a lesões cada vez menores, facilitando a realização do procedimento com obtenção de material adequado para análise²⁶. Por outro lado, o material citológico permite estudos complementares com IQ, citometria de fluxo e técnicas moleculares, fundamentais para o conhecimento do comportamento biológico da neoplasia e decisivo na conduta clínica dos pacientes^{17,20}. Os receptores de estrógeno e progesterona, e a proteína Her-2/neu, são fatores prognósticos e preditivos importantes para a conduta do carcinoma mamário⁵.

Desta forma, a punção aspirativa guiada pelos exames de imagem, com utilização de técnicas complementares, possibilita rapidez no diagnóstico, instituição precoce do tratamento, evitando-se procedimentos cirúrgicos desnecessários^{17,27}. Neste sentido, é necessária uma melhor orientação dos clínicos para esta conduta mais ágil, de menor custo e menos traumática para a paciente portadora de câncer de mama.

A IQ para pesquisa de marcadores hormonais, com resultados confiáveis, pode ser realizada em esfregaços, citocentrifugados ou na citoinclusão, que constitui material aspirado incluído em parafina²⁸.

A realização da IQ na citoinclusão, mostra resultados superiores, quando comparada aos esfregaços, apresentando menor quantidade de artefatos, de casos falso-positivos e com boa correlação com os achados do espécime cirúrgico^{29,30}.

A verificação da positividade para RE e RP na citoinclusão, possibilita a realização de quimioterapia neo-adjuvante com escolha adequada dos agentes quimioterápicos, principalmente para pacientes com tumores em estadiamento mais avançado, facilitando, posteriormente o procedimento cirúrgico e diminuindo seus custos. E a pesquisa positiva para Her-2/neu na citoinclusão, permite a identificação mais precoce de tumores de pior prognóstico, que apresentam resistência a alguns quimioterápicos³¹.

No presente estudo, a PAAF proporcionou material suficiente para a realização dos esfregaços e da citoinclusão, permitindo o diagnóstico da neoplasia e a pesquisa dos

marcadores hormonais e da proteína Her-2/neu. Em nenhum caso foi realizada PAAF adicional para a confecção da citoinclusão, o que confirma a facilidade na obtenção de material.

A citoinclusão de material aspirado de mama, pode ser obtida por diferentes técnicas. Inicialmente o material é submetido à ação de soluções ou materiais que promovam agregação celular, como agar, plasma-trombina e filtros de papel. Posteriormente, é feita fixação com Bouin, ácido pícrico, soluções alcoólicas ou formalina tamponada³². Neste estudo, observamos que a fixação direta com formalina a 10%, determinava dispersão do material, dificultando a formação do coágulo, inclusão e processamento histológico. A aspiração de pequena quantidade de álcool 95%, antecedendo à fixação com formalina, favorece a agregação do material e preserva as características morfológicas das células neoplásicas. Os autores desconhecem relato de técnica semelhante na literatura.

A análise do espécime cirúrgico mostrou 66,1% de positividade tanto para RE como para RP, resultado este semelhante ao referido na literatura¹⁴. A concomitância de positividade para os dois receptores, de 62,9%, está também de acordo com a literatura, que relata cerca de 50% de concordância¹⁵. A concomitância de positividade para RE e Her-2/neu, no espécime cirúrgico, foi de 40,0%. A literatura refere aproximadamente 50% de concomitância de positividade dos dois marcadores¹¹.

Na citoinclusão, 66,1% dos casos foram positivos para RE e 62,9% para RP. Positividade concomitante para os dois receptores foi de 61,3%. A concomitância de positividade para RE e Her-2/neu, na citoinclusão, foi de 42,9%.

O marcador Her-2/neu foi positivo em 16,1% dos espécimes cirúrgicos, positividade inferior à relatada pela maioria dos autores, em torno de 25 a 30%¹¹. Esta discordância pode ser explicada por termos considerado positivos apenas os casos com escore 3+. Na citoinclusão a positividade também foi baixa, em 11,3% dos casos.

Há poucos estudos mostrando a expressão dos receptores hormonais e da proteína Her-2/neu em material de citoinclusão. Seus resultados mostraram a utilidade do método na pesquisa desses fatores prognósticos e na orientação da conduta clínica, no câncer de mama^{28,33}.

Neste estudo, a análise comparativa dos resultados do espécime cirúrgico e citoinclusão, mostrou que os casos com escore 0 e 1+, que não se correlacionam com a superexpressão do gene Her-2/neu, apresentaram valores aproximados entre a citoinclusão e o espécime cirúrgico, de 69,3% e 75,8%, respectivamente (Tabela III). Os casos com escore 0 na citoinclusão foram 0 ou 1+ no espécime cirúrgico. Somente um caso com escore 1+ na citoinclusão foi 3+ no espécime cirúrgico. Observamos em 75,0% dos casos com positividade de 2+ na citoinclusão, considerada fracamente positiva e necessitando de comprovação da superexpressão do gene Her-2/neu, escores de 0 e 1+ no espécime cirúrgico (Tabela IV). Na literatura, a positividade de 2+ no espécime cirúrgico, correlaciona-se entre 25 e 50% de positividade para o gene Her-2/neu, detectado por hibridização *in situ* com fluorescência^{24,34}. No presente estudo, a baixa correlação de casos 2+ na citoinclusão (25,0%) com casos 2+ e 3+ no espécime cirúrgico, mostrou que menos de 25% dos casos na citoinclusão apresentam superexpressão do gene Her-2/neu. Estes resultados podem ser explicados, provavelmente por antígenos ou moléculas de peroxidase aderidas na membrana das células tumorais, melhor observados no material de citoinclusão, onde as células encontram-se isoladas ou formando pequenos grupamentos, envolvidos por hemácias e plasma. Todos os casos com positividade de 3+ na citoinclusão foram confirmados no espécime cirúrgico. A positividade 3+ é considerada forte e correlaciona-se com a comprovação da superexpressão do gene Her-2/neu em quase 100% dos casos^{9,10,12}. Estes dados refletem o fato de que o padrão 3+ é de fácil identificação, pois a marcação é intensa e geralmente presente na maioria das células. Também, a especificidade para a detecção do Her-2/neu com 3+ de 100,0%, mostra a grande confiabilidade do método para conduzir o tratamento das pacientes.

Os marcadores com maior índice de verdadeiro-positivos foram os RE e RP, ambos totalizando 61,3%. O marcador com menor índice foi a proteína Her-2/neu com 11,3% de verdadeiro-positivos. A proteína Her-2/neu obteve o maior índice de verdadeiro-negativos com um total de 83,9%. O RP apresentou o segundo maior índice, totalizando 32,3% e o RE o menor índice de 29,0%. Os dados apresentam boa correlação com a literatura, quando se constata negatividade para a proteína Her-2/neu na maioria dos casos positivos para os RE e RP²¹.

O RE mostrou sensibilidade de 92,7% e especificidade de 85,7%, VPP de 92,7%, VPN de 85,7% e acurácia de 90,3%. O RP mostrou sensibilidade de 92,7%, especificidade de 94,7%, VPP de 97,4%, VPN de 87,0% e acurácia de 93,5%. A proteína Her-2/neu revelou sensibilidade de 70,0%, especificidade de 100,0%, VPP de 100,0%, VPN de 94,5% e acurácia de 95,2%. Portanto a citoinclusão apresentou alta sensibilidade na pesquisa dos receptores de estrógeno e progesterona. A facilidade na interpretação de positividade, que considera positivo se 1% ou mais dos núcleos estão corados, poderia explicar estes altos índices. A sensibilidade da citoinclusão na pesquisa da proteína Her-2/neu foi moderada, de 70,0% quando consideramos positivos somente os casos de escore 3+.

Em resumo, este estudo revelou alta correlação entre a citoinclusão e o espécime cirúrgico na pesquisa por IQ do receptor de estrógeno, receptor de progesterona e da proteína Her-2/neu, em carcinoma de mama. O método é confiável e pode ser utilizado para a triagem de pacientes candidatas à quimioterapia neo-adjuvante e avaliação dos fatores preditivos e prognósticos relacionados a estes marcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Pöhls UG, Renner SP, Fasching, PA, Lux MP, Kreis H, Ackermann S, et al. Awareness of breast cancer incidence and risk factors among healthy women. *Eur J Can Prev.* 2004; 13 (4): 249-56.
- 2- Benschushan A, Brzezinski A. Hormonal manipulations and breast cancer. *ObstetGynaecol Surv.* 2002; 57 (5): 314-23.
- 3- Pecorelli S, Favalli G, Zigliani L, Odicino, F. Cancer in woman. *Int J Gynaecol.* 2003; 82 (3): 369-79.
- 4- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2001; 2 (3): 133-40.
- 5- Domchek SM, Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol.* 2002; 14 (6): 589-93.
- 6- Walker RA. The significance of histological determination of HER-2 status in breast cancer. *Breast.* 2000; 9 (3): 130-3.
- 7- Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol.* 2001; 12 (1): S3-8.
- 8- Bozzetti C, Musolino A, Camisa R, Bisagni G, Flora M, Bassano C, et al. Evaluation of Her2/neu amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant anthracycline based chemotherapy in primary breast cancer. The role of anthracycline dose intensity. *Am J Clin Oncol.* 2006; 29 (2): 171-7.
- 9- Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech.* 2002; 59 (2): 102-8.
- 10- Falo C, Moreno A, Lloveras B, Figueras A, Varela M, Escobedo A. Algorithm for the diagnosis of Her2/neu status in breast-infiltrating carcinomas. *Am J Clin Oncol.* 2003; 26 (5): 465-70.

- 11- Nahleh ZA, Jazieh AR. Multitargeted therapy in estrogen receptor- positive human epidermal growth factor receptor-2 positive breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 2005; 28 (6): 631-3.
- 12- Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA. Comparative assays for the Her2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2004; 128 (6): 627-33.
- 13- Hayes D, Thor AD. C-erb-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol.* 2002; 29 (3): 231-45.
- 14- Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer.* 2003; 97 (3): 825-33.
- 15- Yamashita H, Yando Y, Nishio M, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer.* 2006; 13 (1): 74-83.
- 16- Vargas HI, Masood S. Implementation of a minimally invasive breast biopsy program in countries with limited resources. *Breast J.* 2003; 9 (2): S81-5.
- 17- Schmitt FC, Soares R, Cirnes L, Seruca R. PCR amplication of DNA obtained from archived hematoxylin-eosin- and giemsa-stained breast cancer aspirates. *Diagn Cytopathol.* 1998; 19 (5): 395-7.
- 18- Saegrov S, Halding AG. What is it like living with the diagnosis of cancer?. *Eur J Cancer Care.* 2004; 13 (2): 145-53.
- 19- Stewart CJ, Coldewey J, Stewart IS. Comparison of fine needle aspiration cytology and needle core biopsy in the diagnosis of radiologically detected abdominal lesions. *J Clin Oncol.* 2002; 55 (2): 93-7.
- 20- Mayall F, Dray M, Stanley D, Harrison B, Allen R. Immunoflow cytometry and cell block immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases. *J Clin Pathol.* 2000; 53 (6): 451-7.
- 21- Jayaram G, Elysayed EM. Cytologic evaluation of prognostic markers in breast carcinoma. *Acta Cytol.* 2005; 49 (6): 605-10.

- 22- Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry of Breast. In: Dabbs DJ, editor. Diagnostic Immunohistochemistry. New York: Churchill Livingstone; 2002. p. 536-58.
- 23- Rosai J. Breast. In: Rosai J, editor. Surgical Pathology. St Louis: Mosby; 2004. p. 1763-876.
- 24- Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre –Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, et al. Tumors of the breast. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. Tumors of breast and female genital organs. Lyon: IARCPress; 2003. p. 9-112.
- 25- Oliveira MA, Santos GS, Kanamura CT, Alves VAF. Immunoexpression of Her-2 protein in fine-needle aspirates of breast carcinoma: correlation with surgical specimens. Rev Bras Ginecol Obst. 2003; 25 (1): 23-8.
- 26- Carlson RW, Anderson BO, Chopra R, Eniu AE, Jakesz R, Love RR, et al. Treatment of breast cancer in countries with limited resources. Breast J. 2003; 9 (2): S67-4.
- 27- Annema JT, Versteegh MI, Veselic M, Voight P, Rabe KF. Endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration in the diagnosis and staging of lung cancer and its impact on surgical staging. J Clin Oncol. 2005; 23 (33): 8283-5.
- 28- Briffod M, Hacene K, Le Doussal V. Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases. Mod Pathol. 2000; 13 (8): 841-50.
- 29- Wu M, Szporn AH, Zhang D, Wasserman P, Gan L, Miller L, et al. Cytology applications of p63 and TTF-1 immunostaining in differential diagnosis of lung cancers. Diagn Cytopathol. 2005; 33 (4): 223-7.
- 30- Liu J, Farhood A. Immunostaining for thyroid transcription factor-1 on fine-needle aspiration specimens of lung tumors: a comparison of direct smears and cell-block preparations. Cancer. 2004; 102 (2): 109-14.
- 31- Varadarajulu S, Eloubeidi M. Can endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration predict response to chemoradiation in non-small cell lung cancer? A pilot study. Respiration. 2006; 73 (2): 213-20.

32- Bales EC. Laboratory techniques. In: Koss LG, editor. Diagnostic cytology and its histopathologic bases. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1569-634.

33- Briffod M, Le Doussal V, Spyrtos F. Immunohistochemical determination of hormonal receptors on cell-block from fine-needle cytopunctures of breast carcinoma. Bull Cancer. 2001; 88 (10): 1028-35.

34- Euhus DM. Breast cancer prevention in the 21st century: defining the challenge. Breast J. 2006; 12 (2): 97-8.

ANEXOS

Anexo 1 - Cálculos da sensibilidade e especificidade

		ESPÉCIME CIRÚRGICO		
		+	-	
CITOINCLUSÃO	+	VERDADEIRO POSITIVO a	FALSO POSITIVO b	TOTAL DE POSITIVOS (a+b)
	-	FALSO NEGATIVO c	VERDADEIRO NEGATIVO d	TOTAL DE NEGATIVOS (c+d)
TOTAL		PRESENÇA DE POSITIVIDADE (a+c)	AUSÊNCIA DE POSITIVIDADE (b+d)	TOTAL DE CASOS (a+b+c+d)

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{(a+c)}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{(b+d)}$$

Anexo 2 - Cálculos dos valores preditivo positivo e negativo

		ESPÉCIME CIRÚRGICO		
		+	-	
CITOINCLUSÃO	+	VERDADEIRO POSITIVO a	FALSO POSITIVO b	TOTAL DE POSITIVOS (a+b)
	-	FALSO NEGATIVO c	VERDADEIRO NEGATIVO d	TOTAL DE NEGATIVOS (c+d)
TOTAL		PRESENÇA DE POSITIVIDADE (a+c)	AUSÊNCIA DE POSITIVIDADE (b+d)	TOTAL DE CASOS (a+b+c+d)

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = \frac{a}{(a+b)}$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = \frac{d}{(c+d)}$$

Anexo 3 - Cálculo da acurácia

		ESPÉCIME CIRÚRGICO		
		+	-	
CITOINCLUSÃO	+	VERDADEIRO POSITIVO a	FALSO POSITIVO b	TOTAL DE POSITIVOS (a+b)
	-	FALSO NEGATIVO c	VERDADEIRO NEGATIVO d	TOTAL DE NEGATIVOS (c+d)
TOTAL		PRESENÇA DE POSITIVIDADE (a+c)	AUSÊNCIA DE POSITIVIDADE (b+d)	TOTAL DE CASOS (a+b+c+d)

$$\text{Acurácia} = \frac{(a + d)}{(a + b + c + d)}$$

Anexo 4 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

	<p>Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu</p>	
<p>Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br</p>		
		<p>Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997</p>

Botucatu, 22 de novembro de 2004

*Of: 563/2004-CEP
MACAH/ase*

*Ilustríssima Senhora
Prof.ª Dr.ª Rosa Marlene Viero
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Prof.ª Rosa,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Estudo comparativo morfológico e imunoistoquímico entre cito-inclusão e espécime cirúrgico de carcinoma primário de mama", de autoria de Solange Perón Bueno, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 22/11/2004.

O CEP solicita a Vossa Senhoria que elabore e envie para instrução processual, o Cronograma de Execução deste trabalho.

Situação do Projeto: APROVADO

Atenciosamente,



*Alberto Santos Capellupi
Secretário do CEP*