

José Costa de Andrade

Perfil Imunoistoquímico do Carcinoma de Paget da Mama

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, área de Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Laurival Antônio De Luca

***Botucatu
2004***

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SÉLMA MARIA DE JESUS

Andrade, José Costa de.

Perfil imunoistoquímico do carcinoma de Paget de mama / José
Costa de Andrade. – 2004.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu, 2004.

Orientador: Laurival Antonio De Luca

Assunto CAPES: 40101150

1. Mama - Câncer

CDD 616.99449

Palavras-chave: Câncer; c-erbB-2; Doença de Paget; Grau Nuclear;
Imunoistoquímica; p53; Receptor de estrógeno; Receptor de
progesterona



Dedicatória

A minha esposa *Ana Maria* pelo apoio constante, paciência cumplicidade, amor e respeito a mim transmitidos por todos estes anos.

Aos meus filhos Ângela Maria, Arthur Felipe, André Dimitry e Anne Caroline, pela força inconsciente que me transmitiram durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Hilton Andrade e Cristina Costa de Andrade (in memoriam) pelos exemplos de coragem, perseverança, serenidade, dedicação retidão e paciência na realização de seus sonhos.

Aos meus irmãos, Rui, Marlene, Dalva e Fernando, por compartilharem comigo os mesmos anseios.

Aos meus sogros Arthur e Altina pelo apoio, respeito, confiança e carinho a mim dedicados.

*A*o saudoso Prof. Dr. João Sampaio
Góes Jr. (in memoriam) fundador do Instituto
Brasileiro de Controle do Câncer, pela
oportunidade, incentivo, conselhos, amizade e
ensinamentos na área de mastologia.

*Ao Prof. Dr. João Carlos Sampaio Góes,
Diretor Técnico Científico do Instituto
Brasileiro de Controle do Câncer, pelo apoio
confiança, amizade e por acreditar e permitir a
realização deste trabalho.*

*Ao Mestre Laurival Antonio De
Luca, por sua sabedoria, conselhos,
atenção, carinho, amizade, confiança e
paciência na orientação e correção deste
trabalho.*



Homenagens

os Professores João Guidugli Neto e Deborah Krutman Zueibil, patologistas do D.B.C.C / Mattosinho, pela amabilidade, presteza e colaboração na revisão histopatológica, na realização dos testes imunoistoquímicos, e leitura das lâminas.

A minha querida mestra Lilia Mesquita pela minha iniciação na área da Oncologia Ginecológica, pela estima, carinho, amizade e confiança.

A minha amiga e colega Lídia Valdina Primon Pereira de Rezende, por sua amizade, atenção, estímulo, convívio e incentivo na realização deste trabalho.

*A*o meu amigo *Arnaldo Pereira Cortez Jr.*, pela amizade, companheirismo e pelos ensinamentos na área da *Oncologia Ginecológica e Mastologia*.

A minha colega e amiga *Terezinha Vendramini Mariano*, pelo convívio, amizade, perseverança, dedicação, respeito e estímulo desde o início desta jornada.

A minha colega e amiga *Tereza Nakamatu*, pela amizade, respeito, estímulo, perseverança e dedicação desde o início deste trabalho.



Agradecimentos

*A*os colegas do D. B. C. C. Waldir Muniz Oliva Filho, Edison Mantovani Barbosa, Ronaldo Lucio Rangel Costa, Adalgir D' Alessandro, Célia Tosello de Oliveira, Amadeu José Pinto, Nilton José Ferreira, pela estimula amizade e convivência ao longo destes anos.

Ao amigo Nassif Alexandre Galeb Jr. pela companheirismo, respeito e ajuda no início desta jornada.

A Sra. Valquíria Cunha Reis Ritter, pela ajuda na coleta dos dados das pacientes.

As secretárias do Centro de Estudos Prof. Dr. João Sampaio Góes Jr., Sra. Alexandrina Sampaio França e Srta. Kátia Regina de Caria, pelo levantamento das referências bibliográficas e preparação das aulas.

A Srta. Daniela Lais Gomes Rodrigues, responsável pela Serviço de Arquivo e Estatísticas (S. A. E.) do D. B. C. C. e demais funcionárias pela compreensão e dedicação nas inúmeras vezes em que solicitei os prontuários para revisão.

A minha secretária Sra. Rosemeire de Oliveira Castro Paiva, pelas horas dedicadas a digitação deste trabalho.

A Sra. Sueli Aureliano Araújo, Técnica do Laboratório Mattosinho, pelo preparo e coloração das lâminas para o estudo imunoistoquímico.

A Direção do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, por permitir a realização desta pesquisa.

A todas as pacientes do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer que indiretamente participaram deste trabalho, sem as quais nada seria realizado.

A Professora Lídia Raquel de Carvalho do Departamento de Bioestatística, Campus de Botucatu – UNESP, pela orientação e apoio nas análises estatísticas.

Aos docentes do Departamento de Ginecologia da UNESP. Paulo Traiman, José Ricardo P. Rodrigues, Rogério Dias, Gilberto Uemura, pela amizade, ajuda, convívio e troca de experiências durante esta jornada.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ginecologia – Obstetrícia e Mastologia, pelos ensinamentos transmitidos.

A Sra. Cristiane Abe, secretária do Curso de Pós – Graduação pela gentileza e ajuda constante.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu: Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Regina Célia Spadin, Nathanael Pinheiro Salles e Lilian Cristina Nadal Bianchi Nunes, pelas gentilezas, convívio e apoio técnico.

As bibliotecárias do Campus de Botucatu – UNESP Sra. Selma Maria de Jesus pela elaboração da ficha catalográfica e Luciana Pizzani pela correção e orientação nas referências bibliográficas.

A Adnice Ruiz Pedro, pelos trabalhos de digitação, elaboração e apresentação do texto.

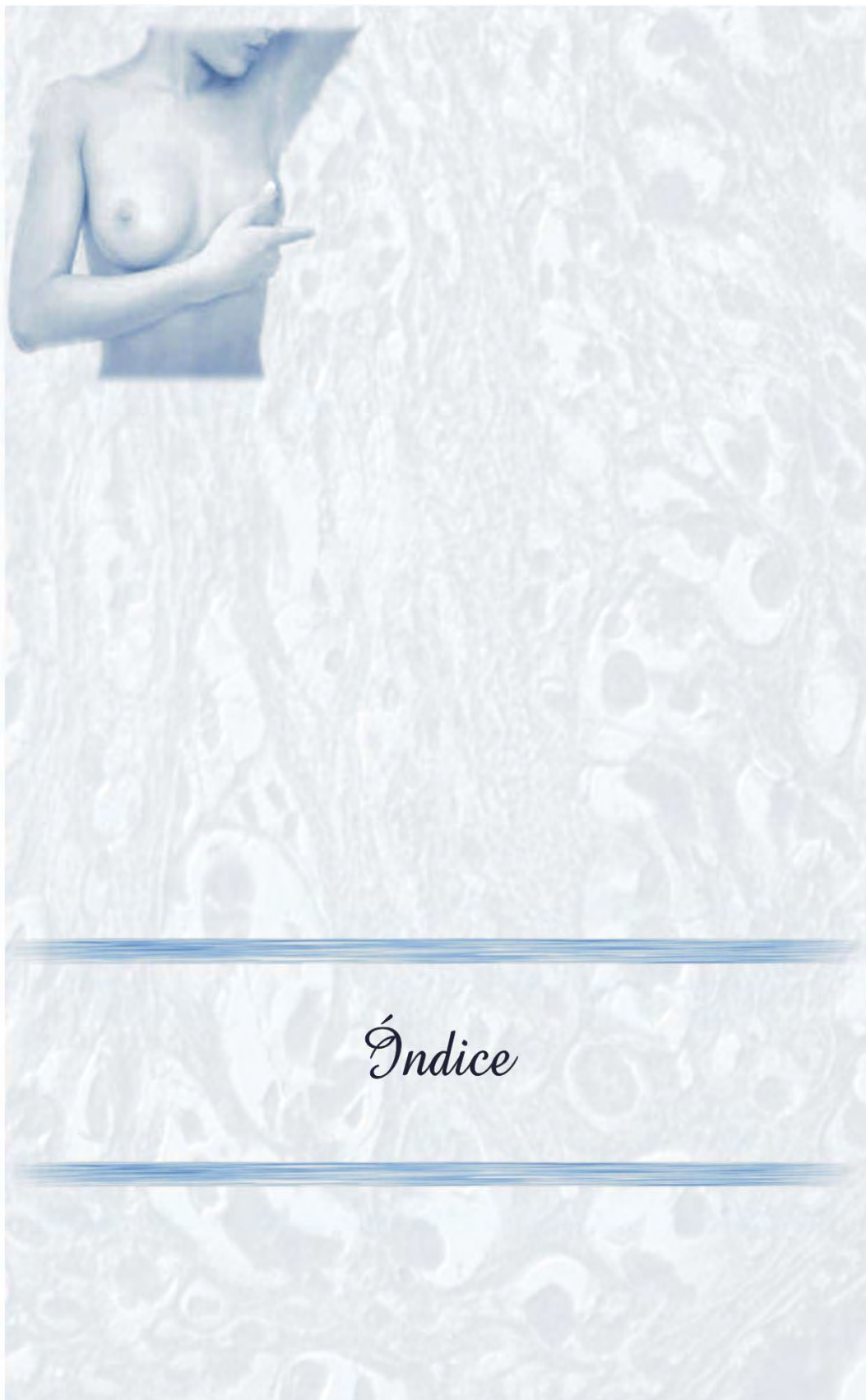
Enfim a todos os colegas, funcionários e as pessoas que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho, o meu muito obrigado!



Epigrafe

*“Tudo o que uma pessoa passa
imaginar, outros podem tornar real”*

(Júlia Verne)



Índice

I.	Introdução	32
II.	Objetivo	42
III.	Metodologia	44
	- Técnica Anatomopatológica.	46
	- Técnica Imunoistoquímica	50
	- Análise Estatística	58
IV.	Resultados	60
V.	Discussão	81
VI.	Conclusões	86
VII.	Referências Bibliográficas.	88
VIII.	Anexo	96



Lista de Abreviaturas

I.B.C.C	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer.
UNESP	Universidade Estadual Paulista.
O. M.S.	Organização Mundial de Saúde.
I N C A	Instituto Nacional do Câncer.
U I C C	União Internacional Contra o Câncer.
E .C.	Estadiamento clínico.
T N M	T= tumor, N= linfonodo, M= metástase.
R E	Receptor de Estrógeno.
R P	Receptor de Progesterona.
K.d	Quilodaltom.
N D I	Neoplasia ductal invasora.
G.N	Grau Nuclear

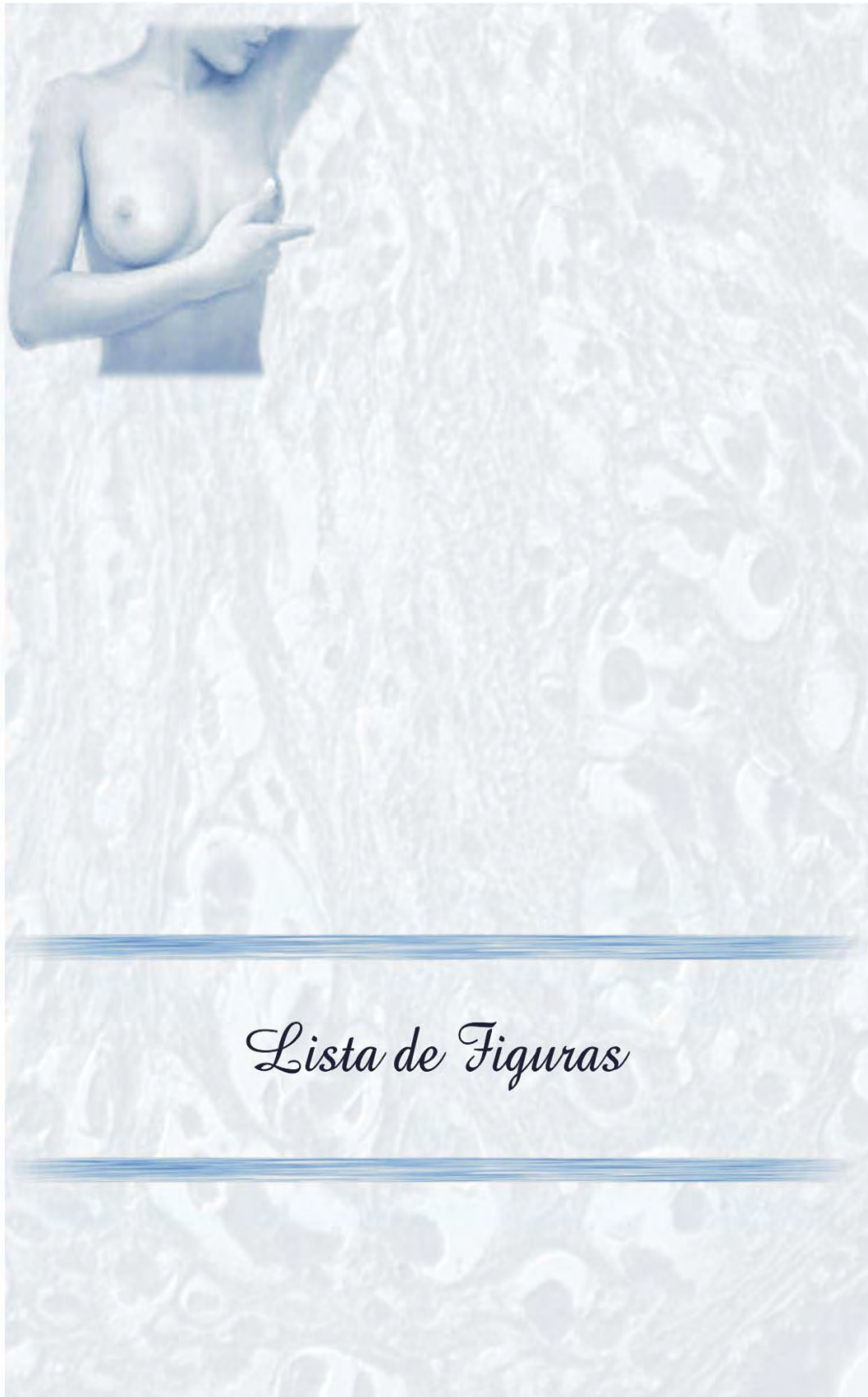


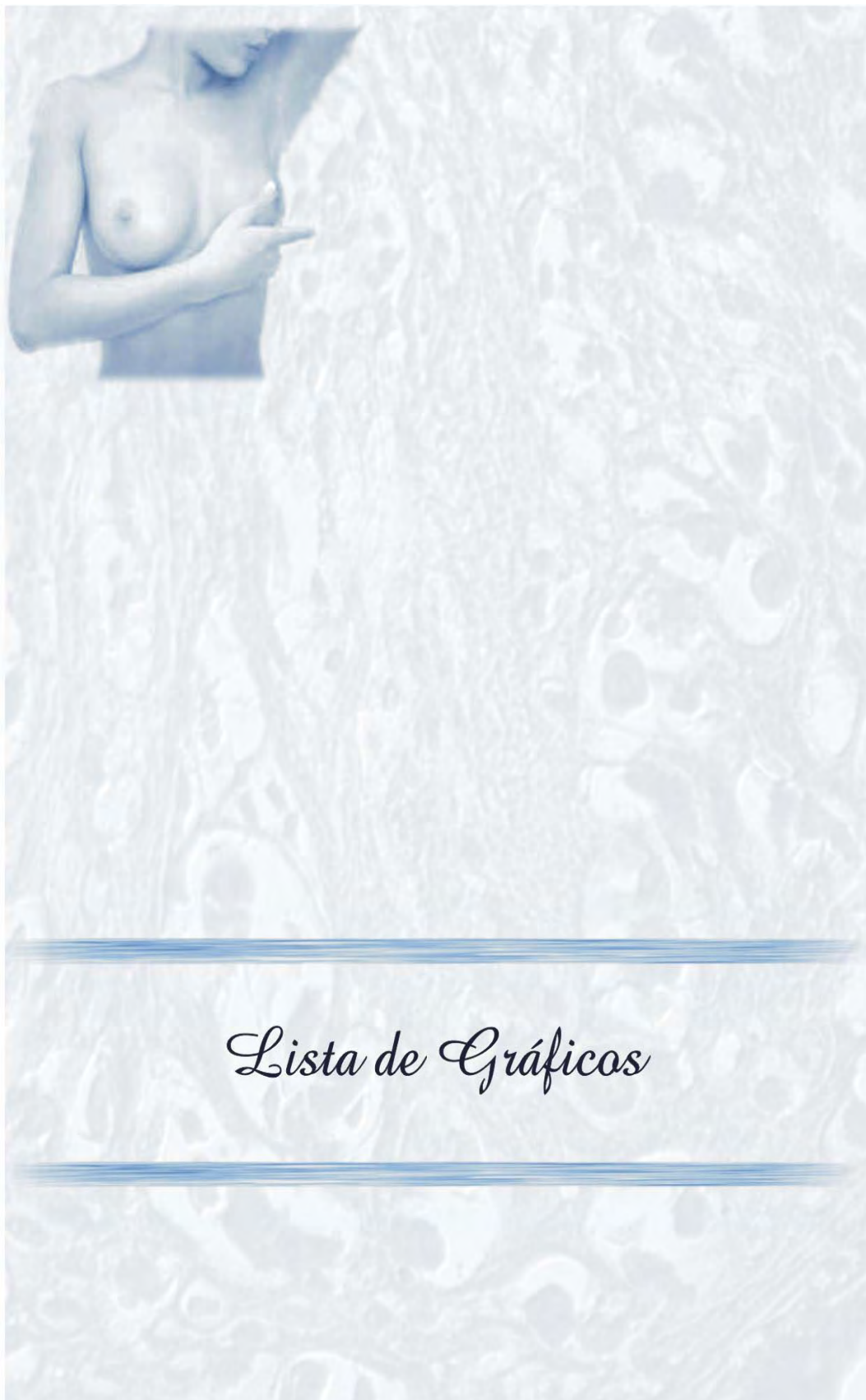
FIGURA 1-	Fotomicrografia - preparação histológica, coloração pela hematoxilina e eosina, mostrando as células de Paget – 10x.....	35
FIGURA 2-	Fotomicrografia - preparação histológica, coloração pela hematoxilina e eosina, mostrando as células de Paget - 20x.....	35
FIGURA 3-	Fotomicrografia - preparação histológica, coloração pela hematoxilina e eosina, mostrando as células de Paget - 20x.	49
FIGURA 4-	Fotomicrografia - preparação histológica coloração pela hematoxilina e eosina, mostrando as células de Paget – 40x.....	49
FIGURA 5-	Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti-receptor de estrógeno, mostrando reação positiva - 10x.....	54
FIGURA 6-	Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti-receptor de estrógeno, mostrando reação negativa - 20x.....	54
FIGURA 7-	Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti-receptor de progesterona, mostrando reação positiva - 20x.....	55
FIGURA 8-	Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti-receptor de progesterona, mostrando reação negativa – 40x	55
FIGURA 9-	Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti-receptor de p53, mostrando reação positiva – 10x.	56
FIGURA 10-	Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti-receptor de p53, mostrando reação negativa – 20x.	56
FIGURA 11-	Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti c-erb B-2, mostrando reação positiva - 20x.....	57
FIGURA 12-	Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti c-erb B-2, mostrando reação positiva - 40x.....	57



Lista de Tabelas

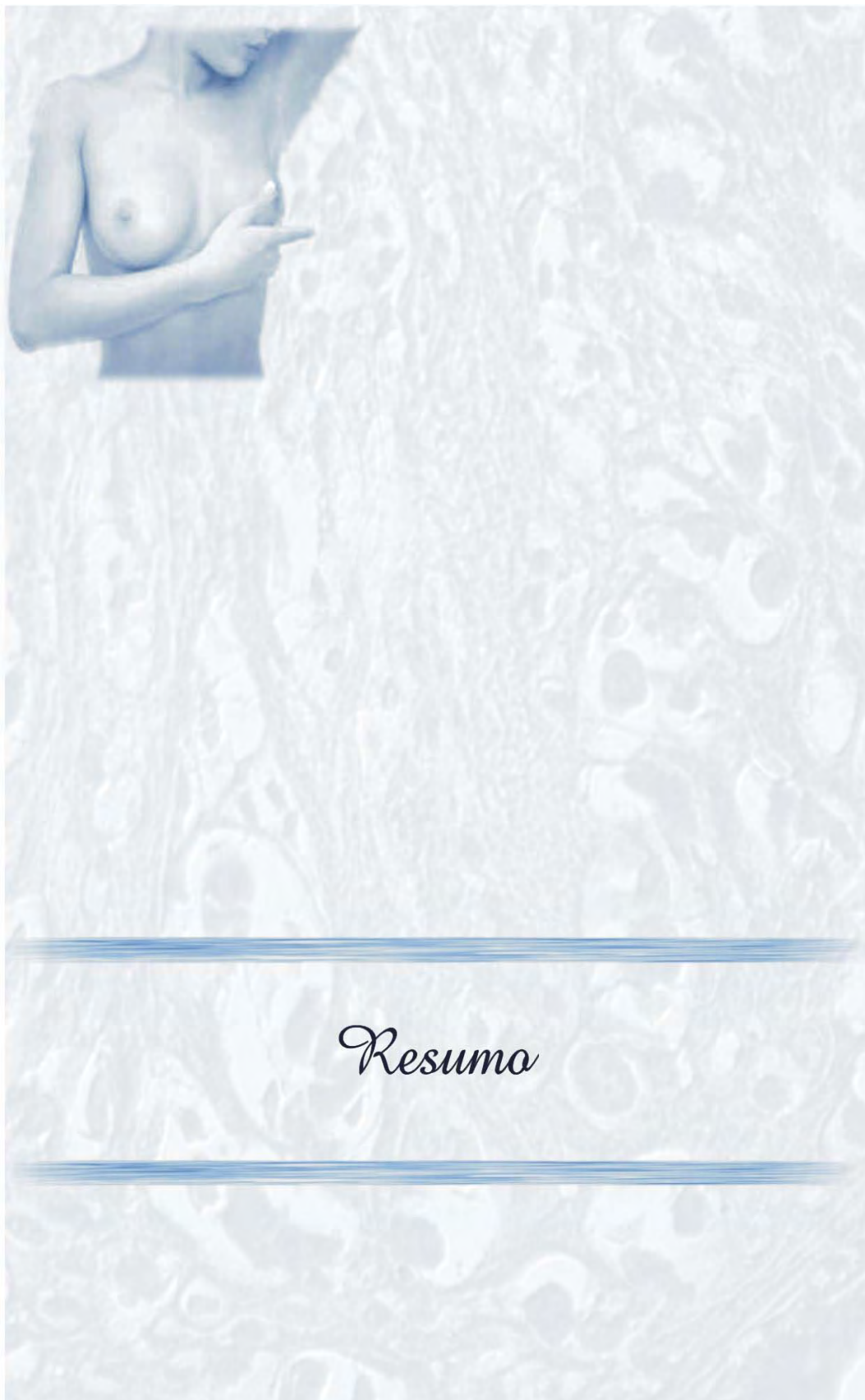
TABELA 1-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo os grupos histológicos.	48
TABELA 2-	Distribuição de freqüência das pacientes segundo o tamanho do tumor.....	63
TABELA 3-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo o estadiamento clínico – número de casos.....	63
TABELA 4-	Distribuição de freqüência das pacientes segundo as variáveis clínicas.....	64
TABELA 5-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo as variáveis histológicas e biológicas...	65
TABELA 6-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo o grupo histológico e grau nuclear.....	66
TABELA 7-	Distribuição de freqüências das pacientes, segundo os grupos histológicos e a expressão de receptor de estrógeno.....	67
TABELA 8-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo os grupos histológicos e a expressão dos receptores de progesterona.....	68
TABELA 9-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo os grupos histológicos e a expressão da proteína c-erbB-2.....	69
TABELA 10-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo os grupos histológicos e a expressão da proteína p53.....	70
TABELA 11-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo o grau nuclear e a expressão do receptor de estrógeno.....	71
TABELA 12-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo o grau nuclear e a expressão do receptor de progesterona.....	72

TABELA 13-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo o grau nuclear e a expressão da proteína c-erbB-2.....	73
TABELA 14-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo o grau nuclear e a expressão da proteína p53.....	74
TABELA 15-	Concordância entre a expressão dos receptores de estrógeno e receptores de progesterona.....	75
TABELA 16-	Concordância entre a expressão dos receptores de estrógeno e proteína c-erbB-2.....	76
TABELA 17-	Concordância entre a expressão de receptores de estrógeno e proteína p53.....	77
TABELA 18-	Concordância entre a expressão dos receptores de progesterona e a proteína c-erbB-2.....	78
TABELA 19-	Concordância entre expressão dos receptores e progesterona e a proteína p53.....	79
TABELA 20-	Concordância entre a expressão das proteínas c-erbB-2 e p53.....	80



Lista de Gráficos

GRÁFICO 1-	Distribuição de freqüência das pacientes segundo a faixa etária.....	62
GRÁFICO 2-	Distribuição de freqüências das pacientes segundo tumor palpável e não palpável.....	62



Resuma

O objetivo deste trabalho foi estudar através do exame Imunoistoquímico, a correlação entre alguns fatores Anatomopatológicos (tipo histológico e grau nuclear) e alguns fatores biológicos (receptores hormonais de estrógeno e de progesterona, proteína c-erbB-2 e proteína p53, no carcinoma de Paget da mama, doença rara e especial.

No período entre Janeiro de 1980 a Dezembro de 1998 foram tratados no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, 6.303 casos de câncer de mama, deste total 98 casos foram diagnosticados como carcinoma de Paget, cuja incidência foi de 1,55%. Estudamos retrospectivamente 60 casos, sendo que 38 deles foram excluídos da análise, devido a limitação e escassez da amostra no material disponível, a idade das pacientes variou entre 26 e 84 anos, com média de 55,4 anos, as informações clínicas e terapêuticas foram obtidas dos prontuários das pacientes considerando, idade na época do diagnóstico, tamanho do tumor quando palpável, estadiamento clínico, e o tipo de cirurgia realizada. As amostras de tecido mamário foram recuperadas dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do I.B.C.C. / MATTOSINHO. Após a revisão histológica, realizada por dois patologistas os casos foram classificados em quatro grupos:

Grupo A- Doença de Paget (forma pura) n = 09

Grupo B- Doença de Paget + neoplasia ductal "in situ", n = 12

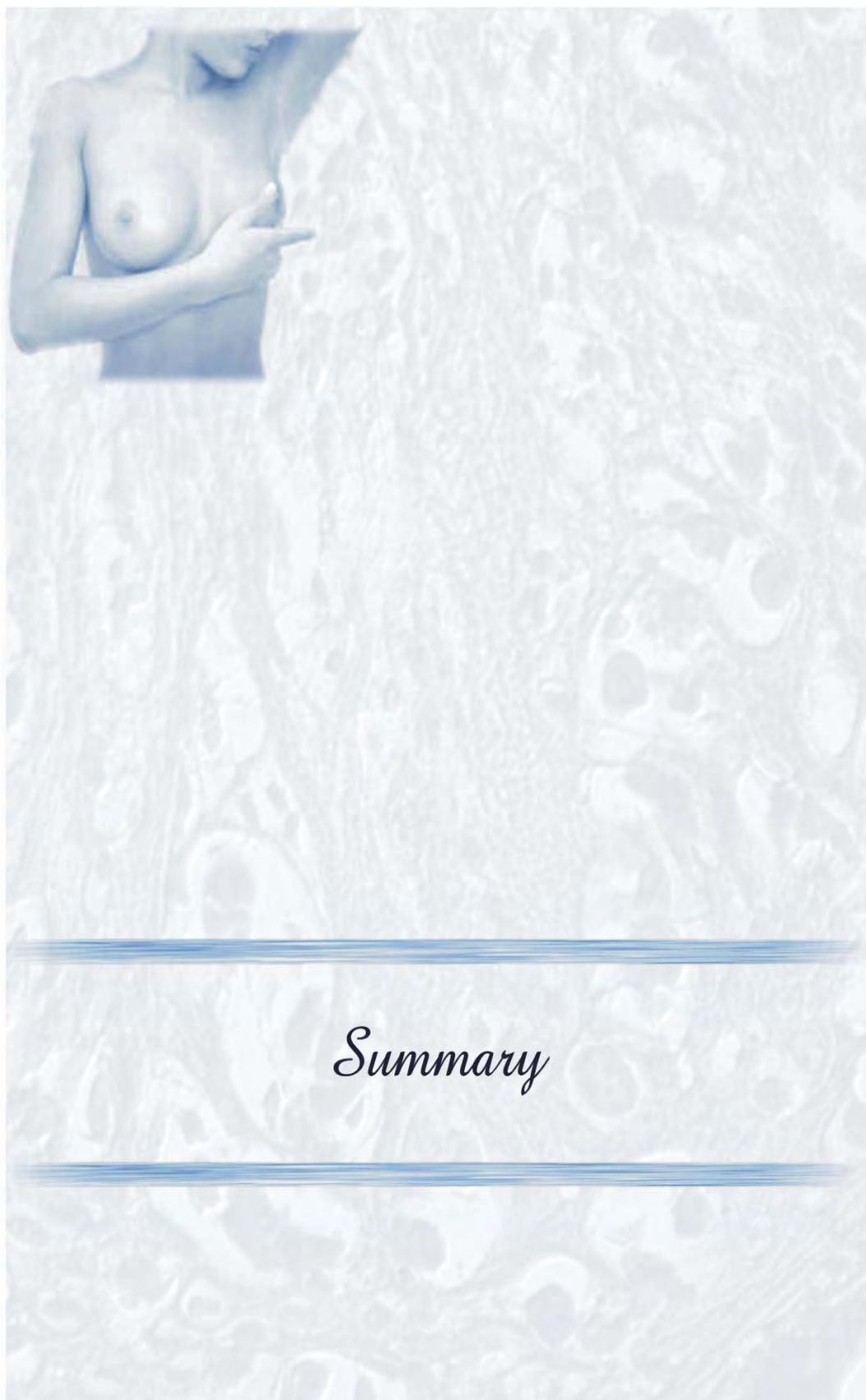
Grupo C- Doença de Paget, neoplasia ductal invasora, n = 30

Grupo D- Doença de Paget + neoplasia ductal “in situ”+ neoplasia ductal invasora, n = 09.

Entre as variáveis anatomopatológicas, o grupo C prevaleceu com 30 casos (50%). O grau nuclear (GN-II) predominou com 45 casos (75%).

Em relação as variáveis biológicas o receptor de estrógeno negativo predominou com 41 casos (68,3%), seguido pelo receptor de progesterona negativo com 40 casos (66,7%), podemos dizer que nesta correlação houve uma concordância boa pelo Teste de Kappa. A proteína c-erbB-2 foi positiva em 53 casos (88,3%) e a proteína p53 foi negativa em 47 casos (78,3%).

Com estes resultados concluímos que não houve significância estatística entre as variáveis anatomopatológicas e biológicas, porém, nossa amostragem foi representativa quando comparada com outros trabalhos da literatura, isto se deve à baixa incidência dessa doença.



Summary

The objective of this paper was to study the immunohistochemical effects of Paget's disease, a rare and special carcinoma of the breast, by correlating anatomopathological (histological and nuclear grade) and biological (estrogen and progesterone hormonal receptors, c-erbB-2 protein and p53 protein) factors.

Between January 1980 and December 1998, 6303 cases of breast cancer were treated at the Brazilian Institute of Cancer Control; 98 of these were diagnosed with Paget's carcinoma, an incidence of 1.55%. We retrospectively studied 60 of these cases; 38 were excluded due to lack of available sample material. Patient age varied between 26 and 84 years (mean 55.4), clinical and therapeutic information were obtained from patient's medical records considering age at time of diagnosis, tumor size when palpable, clinical stage, and type of surgery performed. Samples of breast tissue were retrieved the Anatomical Pathology Department, I.B.C.C. / MATTOSINHO. After histological review, by two different pathologists, they were classified into four groups:

Group A- Paget's disease (pure form) n = 09

Group B- Paget's disease + "in situ" duct neoplasia n = 12

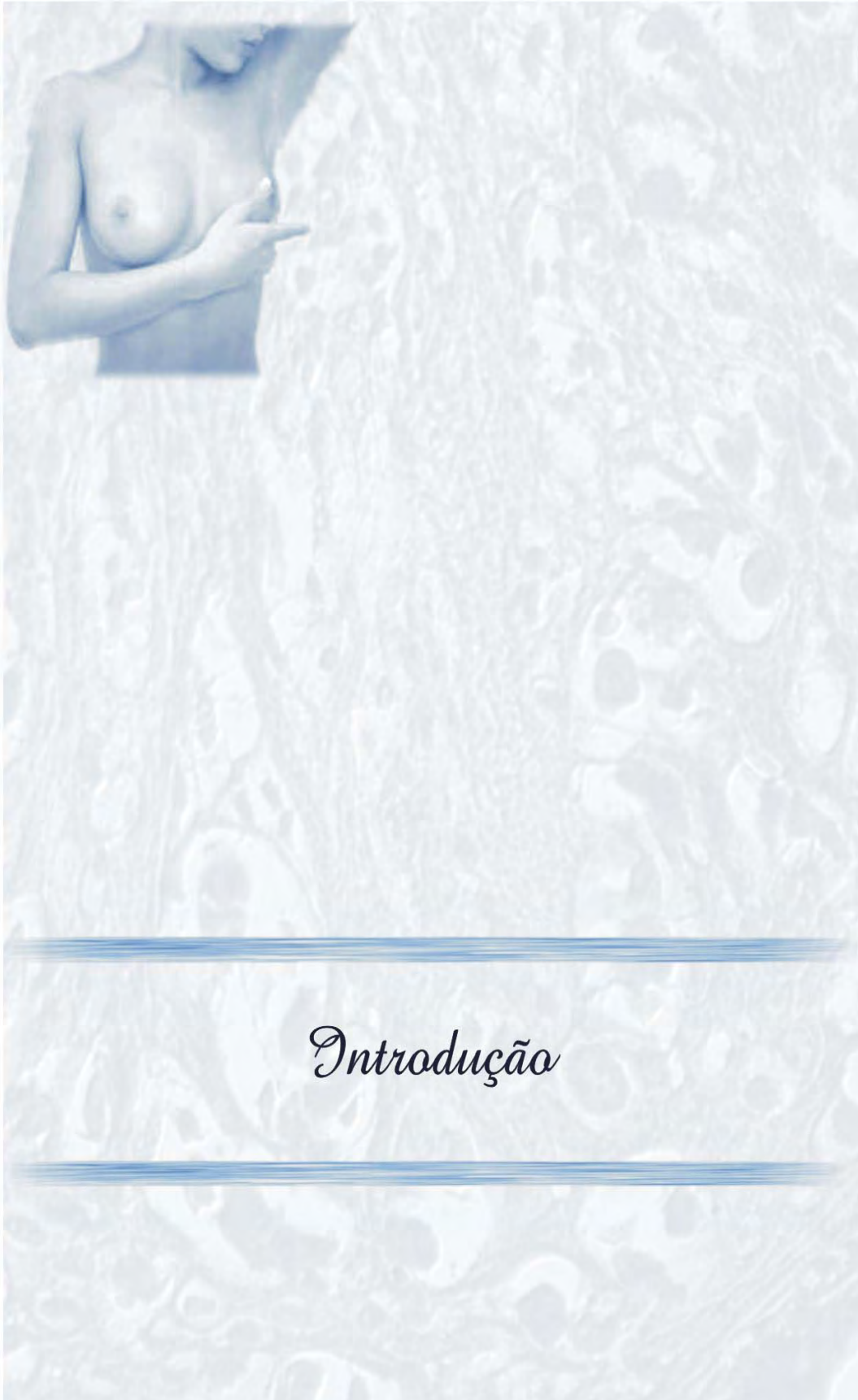
Group C- Paget's disease, invasive duct neoplasia n = 30

Group D- Paget's disease + "in situ" duct neoplasia + invasive duct neoplasia n = 09. Invasive duct neoplasia was the most prevalent

anatomopathological variable (Group C, n = 30, 50%). Nuclear grade (GN-II) was found in 45 cases (75%).

In relation to the biological variables, the negative estrogen receptor was predominant with 41 cases (68.3%), followed by the negative progesterone receptor with 40 cases (66.7%); this correlation had good concordance by the Kappa test. The c-erbB-2 protein was positive in 53 cases (88.3%) and p53 was negative in 47 cases (78.3%).

From these results, we concluded that there was no statistical significance between anatomopathological and biological variables, even though our sample was representative with other literature, this could have been due to the low incidence of this disease.



Introdução

Entre as neoplasias que acometem a população feminina, o câncer de mama permanece como a neoplasia maligna mais freqüente. É a doença de maior impacto na vida da mulher, devido suas repercussões orgânicas e psico-sociais, além de responder por expressivas taxas de morbidez e mortalidade.

Apesar da evolução dos métodos de diagnóstico e do desenvolvimento de vários protocolos de tratamento nos últimos dez anos, a mortalidade pela doença ainda é muito alta. Estudos genéticos e melhor conhecimento da relação tumor hospedeiro fornecem subsídios para conduta individualizada e objetiva em relação ao tratamento do câncer de mama. (Silva e Coelho JR. 1997). Por outro lado devemos considerar os fatores prognósticos: anátomopatológicos, imunoistoquímicos e biologia molecular.

Os fatores anátomospatológicos incluem, tamanho do tumor, tipo histológico, graduação histológica, graduação nuclear e linfonodos axilares. Entre os fatores biológicos destacamos na prática os receptores hormonais (de estrógeno e de progesterona) os marcadores tumorais c-erbB-2 (onco-proteína que mede o índice de proliferação celular), p53 (gene supressor de tumor) que foi associado a neoplasia mamária humana em 1992, (Thor e col), Ki-67 (marcador de proliferação celular) e o CD-34 (marcador da angiogênese).

Os proto-oncogenes promovem a proliferação celular ordenada enquanto que os genes supressores mantêm esta proliferação sob controle, mutações nos proto-oncogenes podem transformá-los em oncogenes, a inativação dos genes supressores possuem importante participação na gênese do câncer.

O carcinoma de Paget da mama, encontra-se definido no relatório da OMS, sobre a classificação Histológica dos Tumores Mamários, como lesão na qual células de coloração pálida estão presentes no interior da epiderme do mamilo, (Rosen, 1997). É caracterizado por eritema, eczema, formação de crostas, erosão ou ulceração com ou sem tumor palpável, confinados ao mamilo e aréola, está quase sempre associado a neoplasia ductal subjacente, "in situ" ou invasora. É considerado tipo especial de câncer da mama, sua incidência, no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, foi de 1,55%, resultado que está de acordo com os dados relatados na literatura (Haagensen 2,0%; Rosen 1,0% à 2,0%; Silva Neto 1,4%; Basegio 0,5 à 5,0%; Gupta 3,0 à 5,0%; Invang 0,7 à 4,3%. Sua origem é no epitélio dos ductos mamários e se espalha até a epiderme superior. Entretanto, lembramos que a histogênese dessa doença ainda é matéria de discussão.

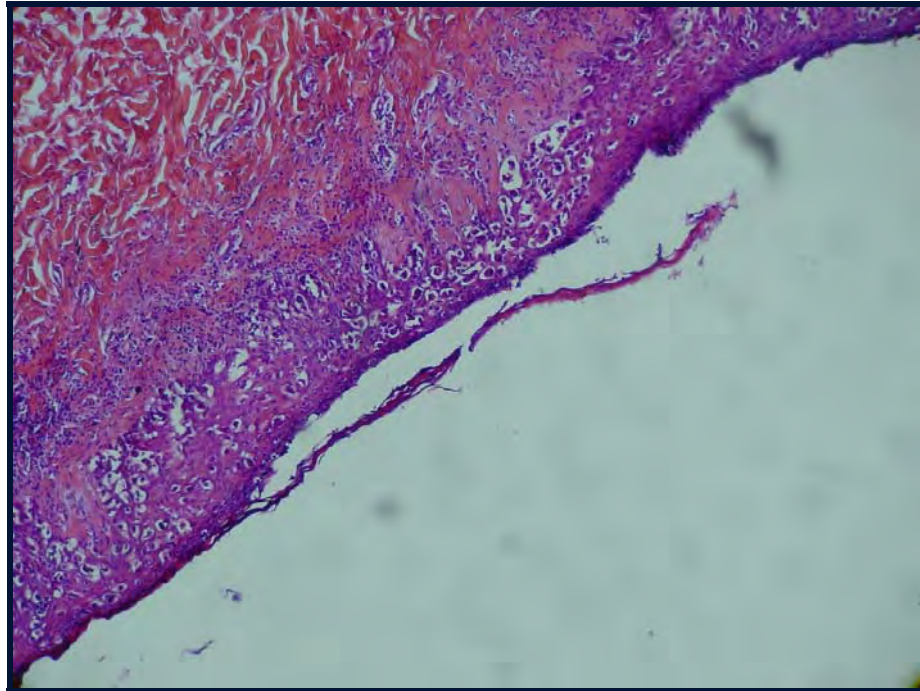


FIGURA 1- Fotomicrografia - preparação histológica coloração pela hematoxilina e eosina, mostrando as células de Paget. 10x.

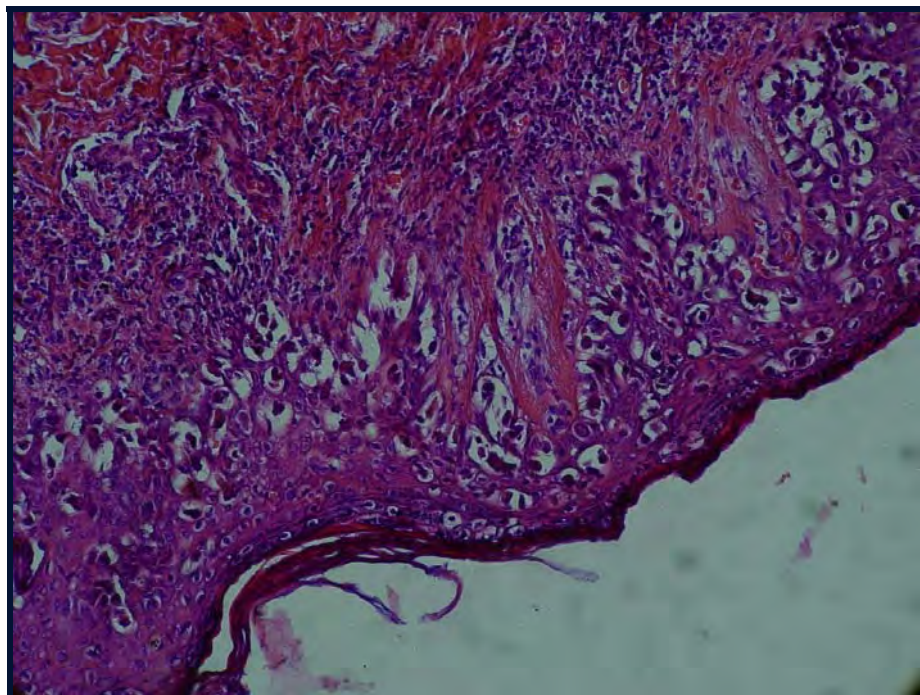


FIGURA 2- Fotomicrografia - preparação histológica, coloração pela hematoxilina e eosina, mostrando as células de Paget. 20x.

Nos últimos anos a imunoistoquímica vem revolucionando a prática da anatomia patológica, prestando inestimável auxílio no diagnóstico dos diferentes tipos de neoplasias. Embora o exame anatómico patológico tradicional forneça dados fundamentais para o prognóstico, tornou-se necessário o estudo de outros marcadores, determinados por técnicas adicionais: citometria, biologia molecular e a imunoistoquímica.

Marcador prognóstico é definido como, aquele capaz de no momento do diagnóstico da neoplasia, fornecer informações sobre sua evolução clínica, devendo-se relacionar à determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular, no crescimento tumoral ou no processo de metastatização.

Neste estudo utilizamos a imunoistoquímica para analisar a expressão dos receptores hormonais (de estrógeno e de progesterona), c-erbB-2 e p53, nas células de Paget.

Os receptores de estrógeno (RE) e os receptores de progesterona (RP), são proteínas nucleares responsáveis pela mediação dos efeitos do estrógeno e da progesterona no epitélio mamário, sua expressão tem correlação com o curso clínico dos carcinomas da mama. (Torres.1996, Schmitt. 1999).

No final do século XIX, alguns autores passaram a estudar a interferência da atividade dos hormônios esteróides sexuais, em relação ao crescimento e na diferenciação das células do carcinoma mamário. A

dependência hormonal dos carcinomas da mama é conhecida desde 1896, Beatson, citado por Torres. 1996 - Barbosa 2000 – César JR. 2001, foi o primeiro autor a perceber que o crescimento do câncer mamário humano, é influenciado por secreções endócrinas, ao observar regressão de lesões tumorais mamárias em pacientes que tinham sido submetidas a ooforectomia. A partir desta constatação numerosos trabalhos ressaltam a interação hormônio – câncer de mama. Estes conhecimentos serviram de base para que a terapia hormonal fosse paulatinamente estabelecida. Os receptores hormonais são proteínas que se ligam com afinidade e especificidade ao 17 beta estradiol, foram descobertos por Jensen e col, (1971). São bons marcadores na diferenciação dos carcinomas da mama, além de representarem fator preditivo a resposta terapêutica. Receptores de estrógeno e de progesterona positivos em câncer de mama, indica sensibilidade a terapia endócrina anti-estrogênica (Wei-qiang - Zheng. e col 2001).

Sabe-se que 70% a 80% dos tumores mamários RE e RP positivos respondem a terapia endócrina, enquanto que os 20% a 30% restantes não respondem (Tani. e col 1988, Torres. 1996, Schmitt.1999, Jensen. e col 2001). O receptor de progesterona expressa melhor resposta das células tumorais ao estímulo hormonal, já que a síntese de RP em células de carcinoma mamário é estrógeno dependente (Torres. 1996, Schmitt. 1999). Recentemente dois tipos de RE foram identificados, alfa e beta, embora exista considerável homologia entre eles, parecem ter

diferenças estruturais e funcionais importantes na formação de tecido de regulação de expressão gênica. A maioria das informações sobre a estrutura e função do RE, foi derivada de estudos sobre o receptor alfa, a distribuição de ambos nos tecidos sugere que tenham funções distintas. Osborne. 1998. No presente estudo os receptores hormonais foram considerados positivos, quando houve coloração nuclear.

O proto-oncogene c-erbB-2, também conhecido como HER-2/neu, está localizado no cromossomo 17, na banda q 21 e codifica uma glicoproteína receptora de membrana cujo peso molecular é de 185 Kd. Pertence a família de oncogenes com atividade tirosina quinase, intimamente relacionada ao receptor de fator de crescimento epidermal humano. A nomenclatura HER-2/neu, teve origem a partir do termo - Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Um dímero (par de receptores da mesma família), forma uma espécie de canal que permite a passagem de sinais de fora para dentro da célula e é ele que recebe ordens para que a célula se multiplique. Em algumas células tumorais, ocorrem erros na replicação do DNA, resultando em amplificação gênica, isto é, a ocorrência de dez ou mais cópias do gene por célula. Consequentemente mais cópias da proteína c-erbB-2 vão aparecer na superfície da célula, caracterizando a super-expressão do c-erbB-2.

Quanto mais receptores de estímulo de crescimento, maior a expressão da proteína c-erbB-2, que tende a se multiplicar causando desequilíbrio no processo de reparação celular. (Borresen. e

col 1990; Keatings. e col 1990; Revillion. e col 1998; Schmitt. 1999; Bacchi. 2001). Em 1987, Slamon. e col, descreveram este marcador e demonstraram a existência da correlação entre a amplificação deste oncogene e a agressividade biológica nos carcinomas mamários. Geralmente os tumores que super-expressam a proteína c-erbB-2 possuem alto grau histológico e nuclear, alta taxa de proliferação celular e baixa expressão dos receptores de estrógeno. (Revillion e col 1998). A amplificação da proteína c-erbB-2 está associada com a recorrência e com menor sobrevivência global, sendo encontrada em cerca de 10% a 30% dos casos (Slamon . 1987; Lamie.1989 ; Allred. e col 1992; Taikkanen. e col 1992; Oliveira.1999; Schmitt .1999).

Recentemente foi demonstrado que a proteína c-erbB-2 é responsável pela promoção da mobilidade das células neoplásicas no interior do ducto mamário. Estes achados foram determinados a partir de casos de carcinoma de Paget da mama em que o gene encontrava-se super-expresso em torno de 70% a 90% dos casos. O gene c-erbB-2, encontra-se dentro das células de Paget, na epiderme do mamilo, apoiando a hipótese de que as mesmas se originam de carcinomas subjacentes e não de queratinócitos epidérmicos. (Lamie. e col 1989; Keatings. e col 1990; Hitchcok. e col 1992; Potter.1994; Schmitt.1999; Bacchi.2001; Kothari. e col 2002). A positividade da oncoproteína c-erbB-2, pela imunistoquímica é considerada somente quando houver a coloração completa da membrana celular.

O gene p53, foi identificado pela primeira vez por Jenkins e. col 1984 e definido como gen supressor em 1989, Baker e.col citado por Pradal e col. – 1998. Está localizado no braço curto do cromossomo 17, no segmento 13.1, codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 Kd, que atua na proliferação celular regulando a transcrição do D.N.A. (Andersen. e col 1993; Chitemererê. e col 1996; Schmitt. 1999; Wei-qiang-Zheng e col 2001).

Embora a função exata da proteína normal codificada pelo gene p53 não seja clara, parece estar envolvida na regulação negativa da transição da fase S para G1 do ciclo celular, (Schimmelpenning.1994). Ao parar o ciclo celular em G1, o gene p53, permite que os mecanismos de reparação atuem sobre os erros espontâneos ou induzidos no D.N.A . Se houver mutação o p53 aciona eventos apoptóticos que levam a destruição da célula danificada. (Schmitt.1999).

Diversos estudos indicam que a inativação funcional da proteína p53 seja por mutação ou por deleção, representa uma das anormalidades genéticas mais frequentemente encontrada, associada com o crescimento dos tumores. (Andersen. e col 1993; El-Deiry. e col 1993; Done e col 1998).

Nas células normais a proteína p53 tipo selvagem não é detectada pela imunistoquímica o que só ocorre quando há mutação. Assim sendo a super expressão do p53 mutante parece indicar potencial

aumento de malignidade. A taxa média de expressão da proteína p53 é de 35%, (Schimmelpenning. e col 1994; Chitemerere . e col 1996; Schmitt. 1999).

A alta freqüência destas mutações na grande variedade de tumores, muitas das quais foram ligadas as exposições carcinógenas, salienta a importância deste tipo de mecanismo no desenvolvimento e progressão dos cânceres humanos. (Kastan. e col 1991).

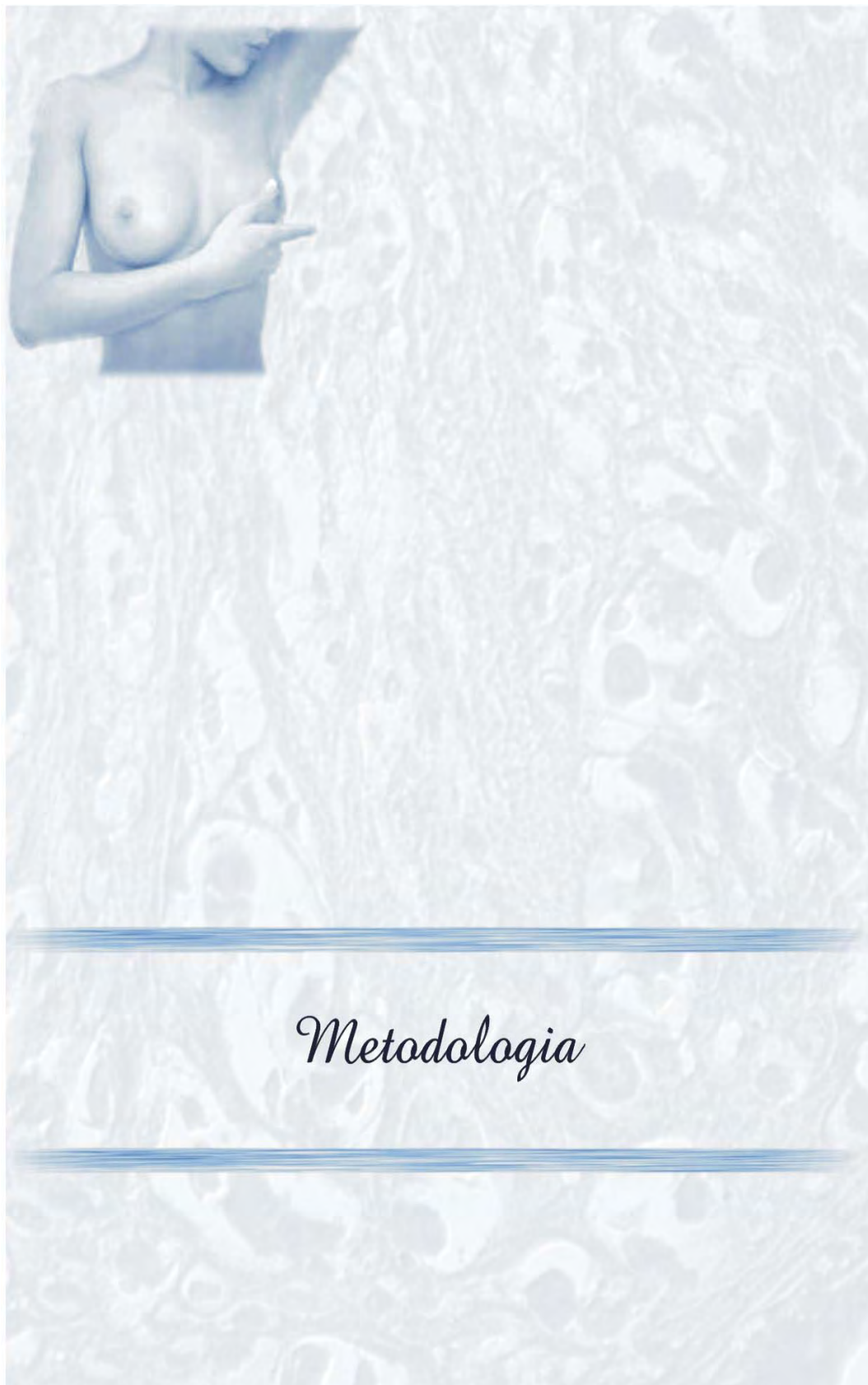
A proteína p53 quando mutada perde a função reparadora do DNA e indutora da apoptose, provocando aumento do número de mutações celulares, com perpetuação de danos celulares anormais. A superexpressão da proteína p53 mutante no carcinoma mamário, pode ser considerada como fator de mau prognóstico, em relação ao período livre de doença e sobrevivência. A positividade para proteína p53 no presente estudo ocorreu somente quando houve a coloração nuclear.



Objetiva

Conhecer e avaliar o perfil imunoistoquímico do carcinoma de Paget da mama, correlacionando alguns fatores anatomopatológicos: tipo histológico, e graduação nuclear, com alguns fatores biológicos: receptores hormonais de estrógeno e de progesterona oncoproteína c-erbB-2 e gene supressor de tumor p53.

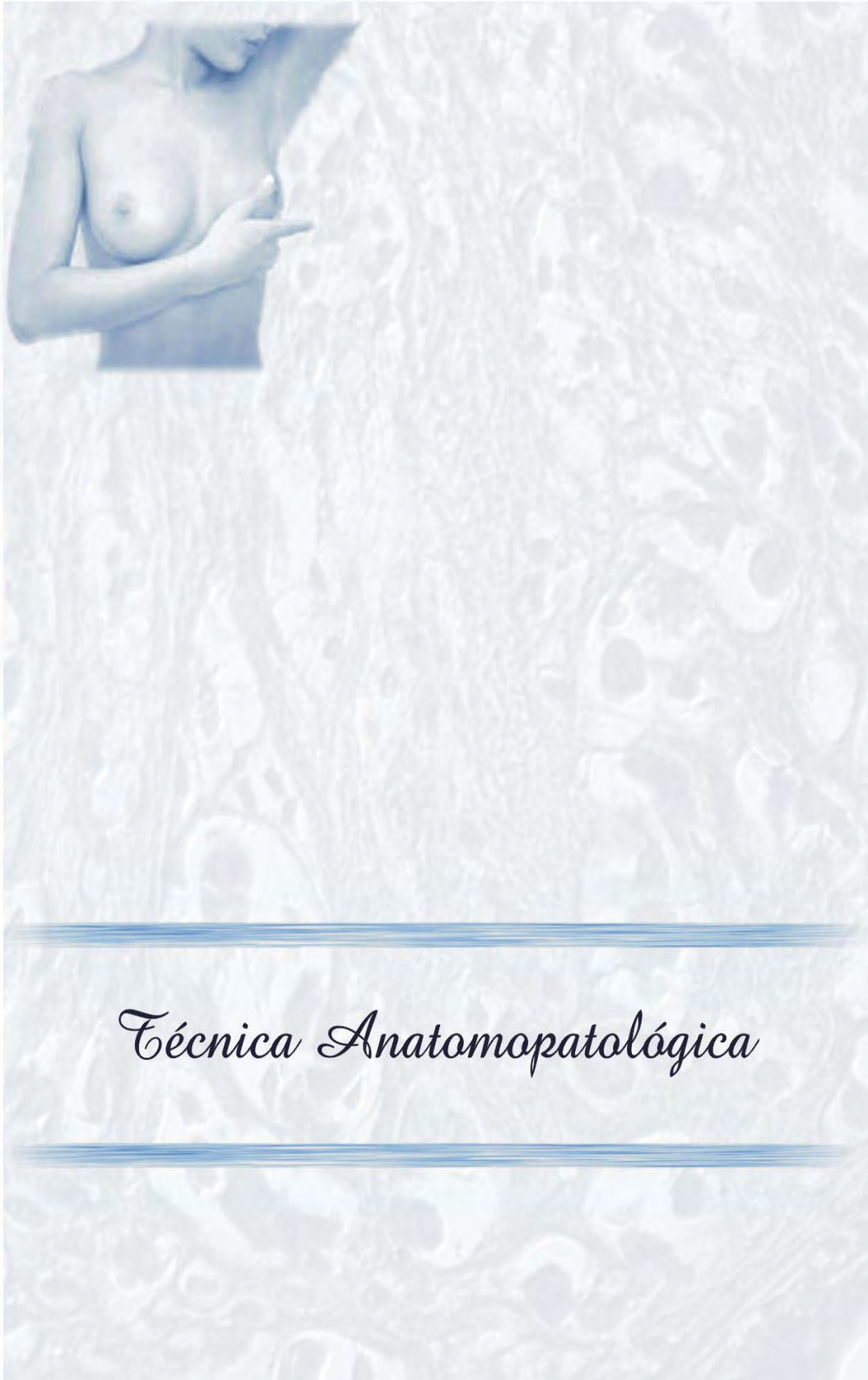
O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do I.B.C.C. , de acordo com os termos da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.



Metadologia

No período entre 1980 e 1998, no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (I.B.C.C), Departamento de Mastologia, foram atendidos 6.303 casos de câncer de mama, deste total 98 (1.55%) casos foram catalogados como carcinoma de Paget da mama. Estudamos, retrospectivamente, 60 casos de neoplasias malignas da mama, diagnosticadas como carcinoma de Paget, 38 deles foram excluídos da análise, devido a limitação e escassez da amostra no material disponível. A idade das pacientes variou de 26 a 84 anos com média de 55.4 anos, todas com diagnóstico de carcinoma de Paget da mama, na forma pura ou associado a uma neoplasia ductal subjacente “in situ” ou invasora. O material de estudo incluiu espécimes provenientes de cirurgias: biópsias, setorectomias, quadrantectomias e mastectomias. As informações clínicas e terapêuticas foram obtidas dos prontuários das pacientes, considerando, idade na época do diagnóstico, tamanho do tumor quando palpável, estadiamento clínico e tipo de cirurgia realizada.

Os tumores foram clinicamente estadiados de acordo com a classificação T.N.M, da União Internacional Contra o Câncer – U.I.C.C. A doença de Paget de mama, quando associada a tumor palpável é classificada de acordo com o tamanho do tumor.



Após avaliação macroscópica da peça cirúrgica, fragmentos do tumor foram fixados em solução de formalina líquida a 10% por 24 horas e em seguida submetidos aos procedimentos de rotina para o estudo anatomopatológico. Estes incluíram desidratação em álcool etílico, diafanização pelo xilol e emblocamento em parafina líquida em estufa regulada a temperatura de 59°C. De cada bloco de parafina foram obtidos 05(cinco) novos cortes teciduais, sendo um com cinco micrômetros de espessura, destinado à revisão histológica e outros quatro com três micrômetros de espessura, destinados ao estudo imunohistoquímico, estes cortes foram colocados em banho-maria e colhidos em lâmina de vidro, a seguir desparafinados em estufa a 60 graus. As lâminas histológicas foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina e revista por dois patologistas, que analisaram, tipo histológico, e o grau nuclear, os casos revisados foram diagnosticados e classificados em quatro grupos:

Grupo A: doença de Paget (forma pura), (n=09).

Grupo B: doença de Paget + neoplasia ductal "in situ" (n=12),

Grupo C: doença de Paget + neoplasia ductal invasora (n=30).

Grupo D: doença de Paget + neoplasia ductal invasora + neoplasia ductal "in situ"; (n =09).

TABELA 1 – Distribuição de freqüências das pacientes segundo os grupos histológicos

Tipos Histológicos	Nº casos	%
Grupo A Doença de Paget (forma pura)	09	15
Grupo B Doença de Paget + neoplasia ductal "in situ"	12	20
Grupo C Doença de Paget + Neoplasia ductal invasora	30	50
Grupo D Doença de Paget. + Neoplasia ductal invasora + neoplasia ductal "in situ"	09	15
Total	60	100

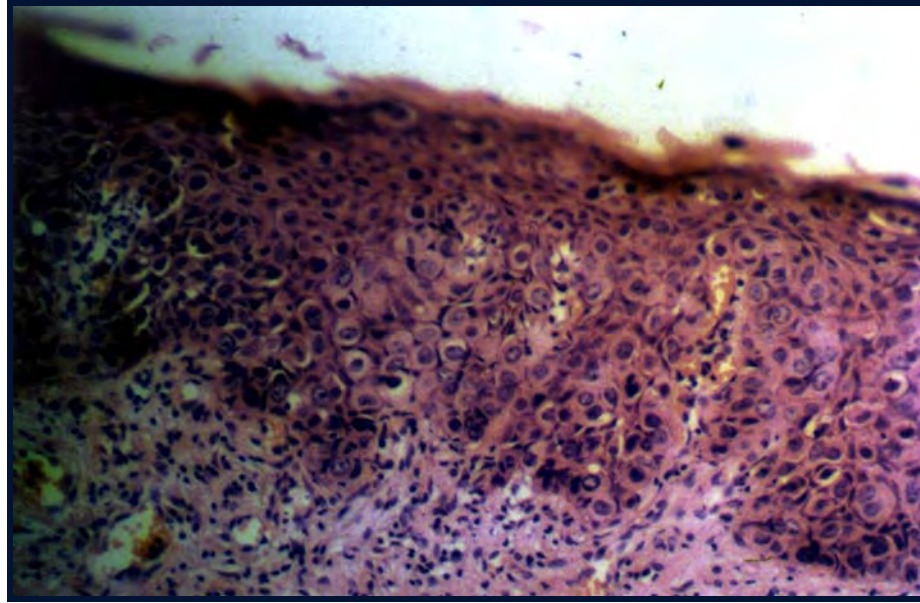


FIGURA 3 - Fotomicrografia - preparação histológica coloração pela hematoxilina e eosina mostrando célula de Paget – 20x.

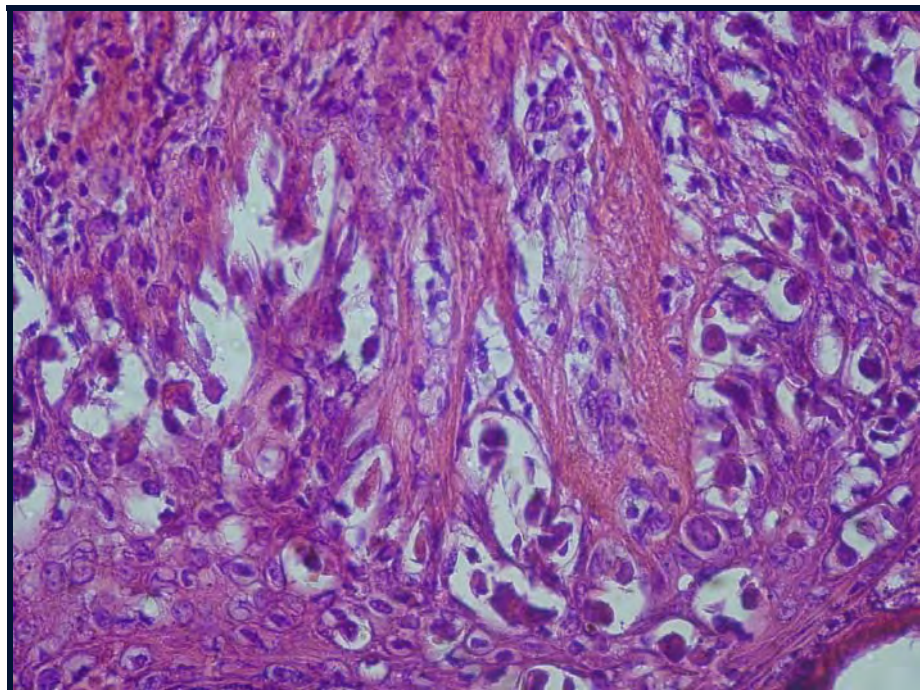


FIGURA 4 - Fotomicrografia - preparação histológica coloração pela hematoxilina e eosina mostrando célula de Paget – 40x.



Técnica Inmunoistoquímica

As amostras do tecido mamário recuperadas a partir do material embocado em parafina, foram montadas em lâmina de vidro e realizada a reação de imunoistoquímica, pelo método da Estreptavidina-Biotina -Peroxidase.

Os cortes de três micrômetros estendidos em lâmina de vidro, previamente tratados pelo 3 – aminopropiltriétoxissilano, foram submetidos a ação dos seguintes anticorpos: contra receptor de estrógeno e de progesterona, oncoproteína c-erbB-2 , e gene supressor de tumor p53. Estes cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, o primeiro à 60°C com duração de 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos, a seguir os cortes foram rehidratados em cadeia descendente de etanóis. Após a rehidratação o pigmento formólico foi removido por meio de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica por dez minutos. Após lavagem em água corrente e dois banhos em água destilada, as lâminas receberam o tratamento da recuperação antigênica. Na recuperação antigênica os cortes foram tratados mediante digestão enzimática por pepsina a 1%, durante 60 minutos, em estufa a 37°C. Em seguida os cortes foram novamente lavados em água corrente e água destilada e passaram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, que foi realizada pela incubação em dois banhos de cinco minutos cada, em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. Após nova lavagem em água corrente e passagem em água destilada, os cortes foram imersos em

solução de PBS - pH 7,4, (solução tampão da reação), em três banhos de cinco minutos cada, seguindo-se a incubação do anticorpo primário. Essa etapa foi realizada com diluição adequada previamente estabelecida para cada anticorpo em estudos preliminares, durante a noite, sob refrigeração. A diluição do soro primário foi realizada em solução de PBS - pH 7,4, acrescido de albumina bovina. Os anticorpos utilizados foram anti-receptores de estrógeno (1D5), receptores de progesterona (clone PgR-636¹), oncoproteína c-erbB-2 (Her-2/neu) (anticorpo policlonal) e p53 (clone DO-7). Após incubação do anticorpo primário, seguiu-se a incubação do anticorpo de ligação, diluído em PBS – pH 7,4 em diluição de 1:150. O anticorpo utilizado foi o anti-soro do animal em que se produziu o anticorpo primário.

Para essa etapa utilizou-se o Kit - DUET da AKO (K-492). Em seguida foi realizada a incubação do complexo terciário, formado pela estreptavidina – biotina –peroxidase. O diluente também foi o PBS - pH 7.4, a incubação ocorre em 30 minutos à temperatura ambiente. A revelação da reação foi feita pela diaminobenzidina (DAB), diluída em PBS - pH 7,4 e ativada por 600ml de peróxido de hidrogênio a 6% em câmara escura, durante 3 minutos. Após nova lavagem em água corrente e água destilada, os cortes foram contra-corados pela hematoxilina de HARRIS, e a seguir desidratados em seqüência de concentração crescente de etanóis, diafanizados em xilol, montados em resina para microscopia e examinados em microscópio ótico. Como controle positivo

das reações foram usados os mesmos cortes com tecido normal adjacente, exibindo vasos normais. A análise dos preparados foi realizada usando método semi-quantitativo de 0 a 4 + (cruzes), segundo o percentual de células expressando o antígeno, quando os anticorpos utilizados foram receptores de estrógeno, receptores de progesterona e p53. A análise dos preparados com o uso do c-erbB-2 (Her-2/neu), obedeceu padrão internacional de 0 a 3 + (cruzes), sendo de 0 e 1 + (cruz) considerado negativos e 2 e 3 + (cruzes) positivos, segundo a intensidade de marcação na membrana citoplasmática de forma completa.

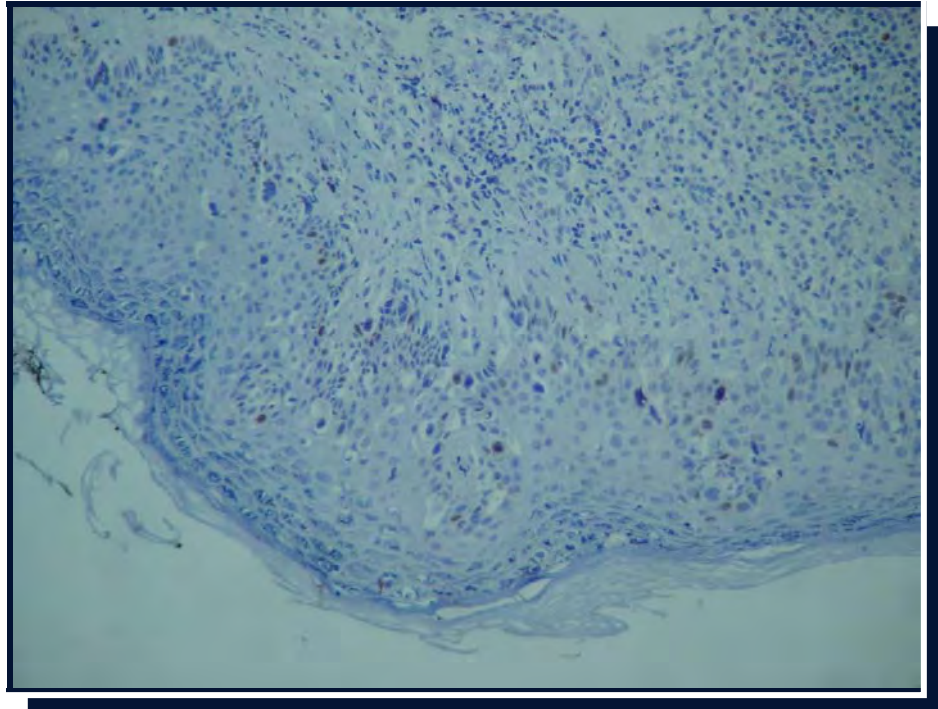


FIGURA 5- Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica, com anticorpo anti receptor de estrógeno, mostrando reação positiva - 10x.

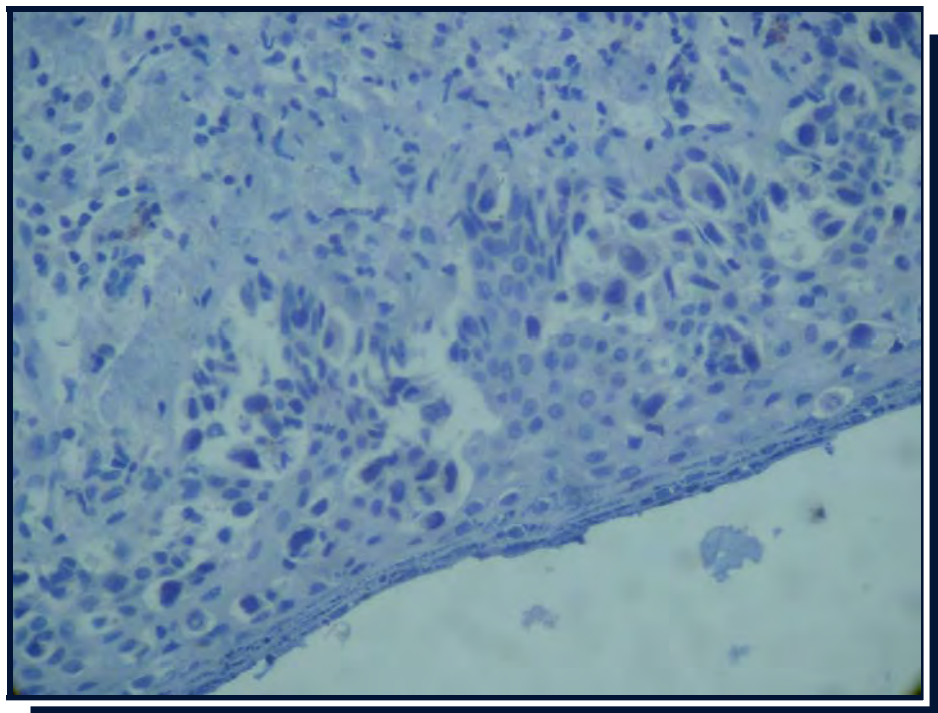


FIGURA 6 - Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica, com anticorpo de anti receptor estrógeno, mostrando reação negativa - 40x.

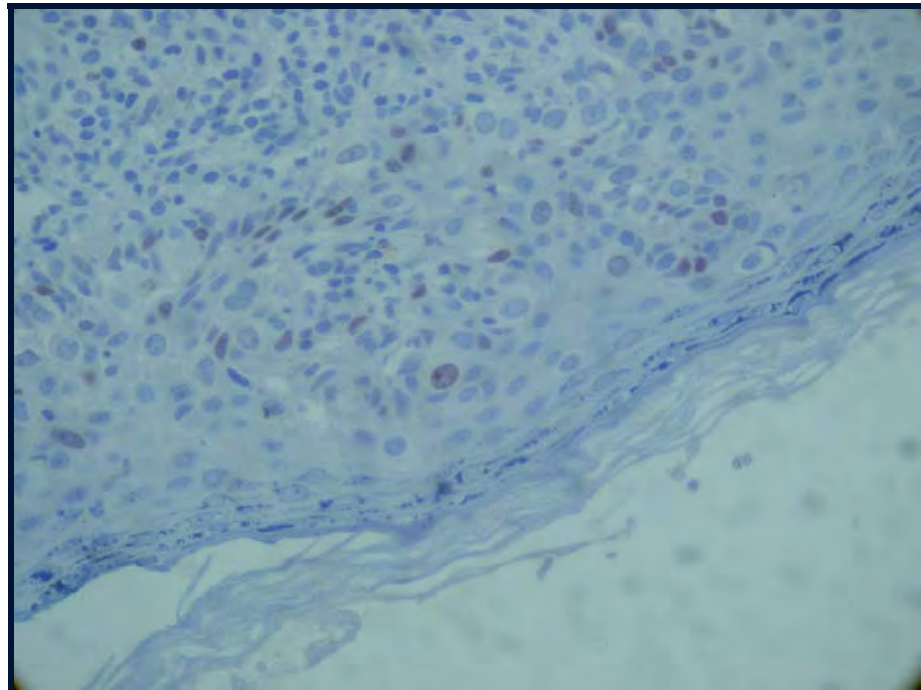


FIGURA 7 - Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com Anticorpo anti receptor de progesterona, mostrando reação positiva - 20x.

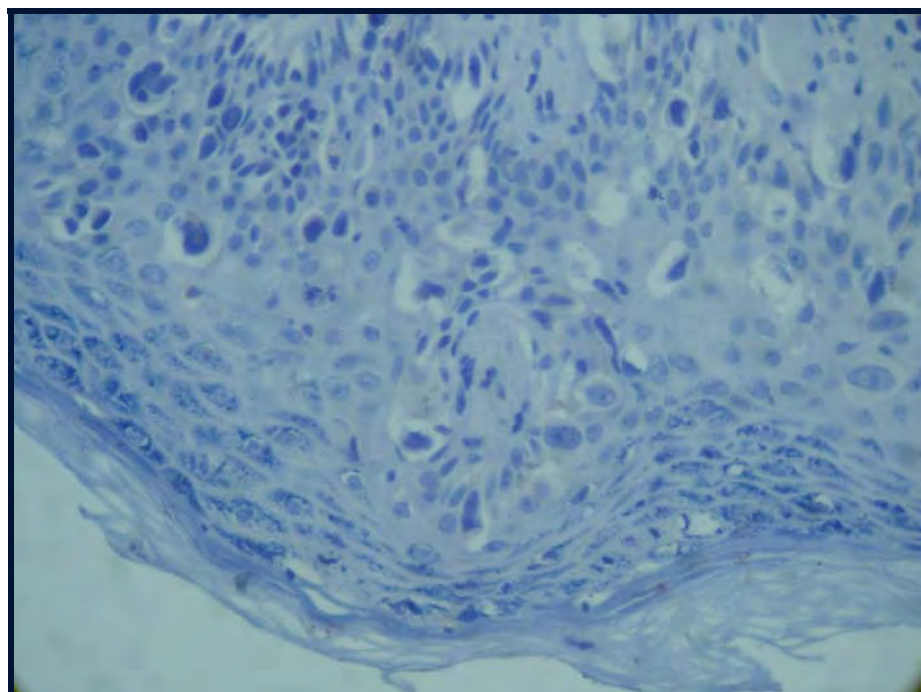


FIGURA 8 - Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com Anticorpo anti receptor de progesterona, mostrando reação negativa - 20x.

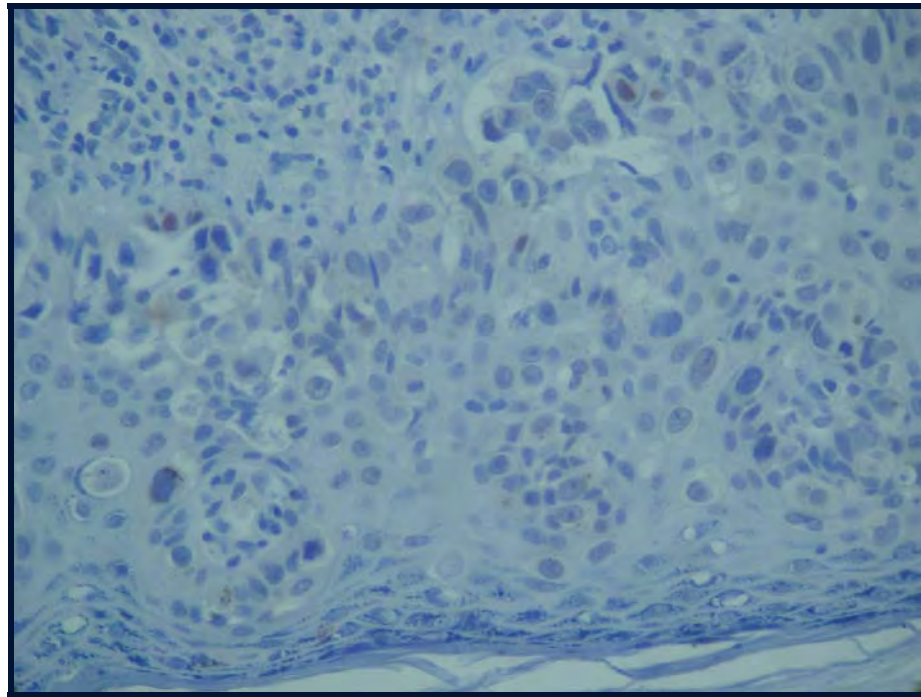


FIGURA 9 - Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti p53, mostrando reação positiva - 20x.

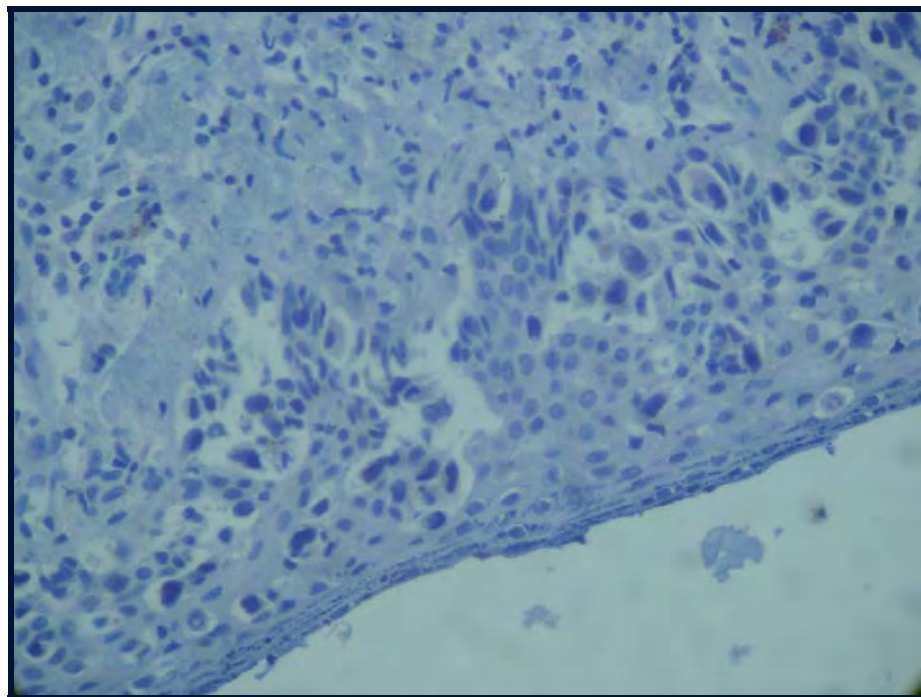


FIGURA 10 -Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com anticorpo anti p53, mostrando reação negativa - 20x.

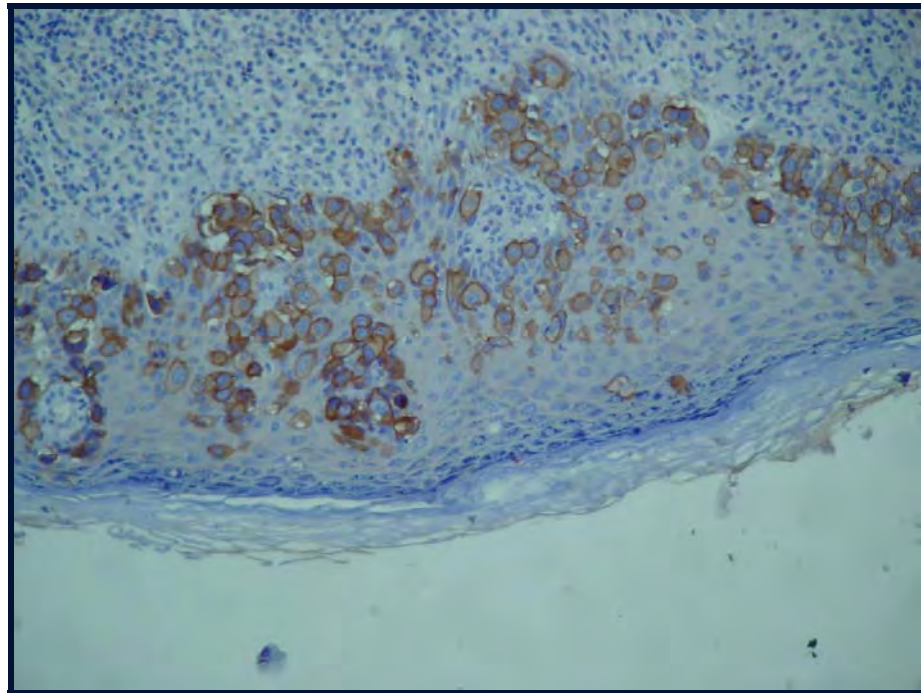


FIGURA 11 -Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com Anticorpo anti c-erbB-2, mostrando reação positiva - 20x

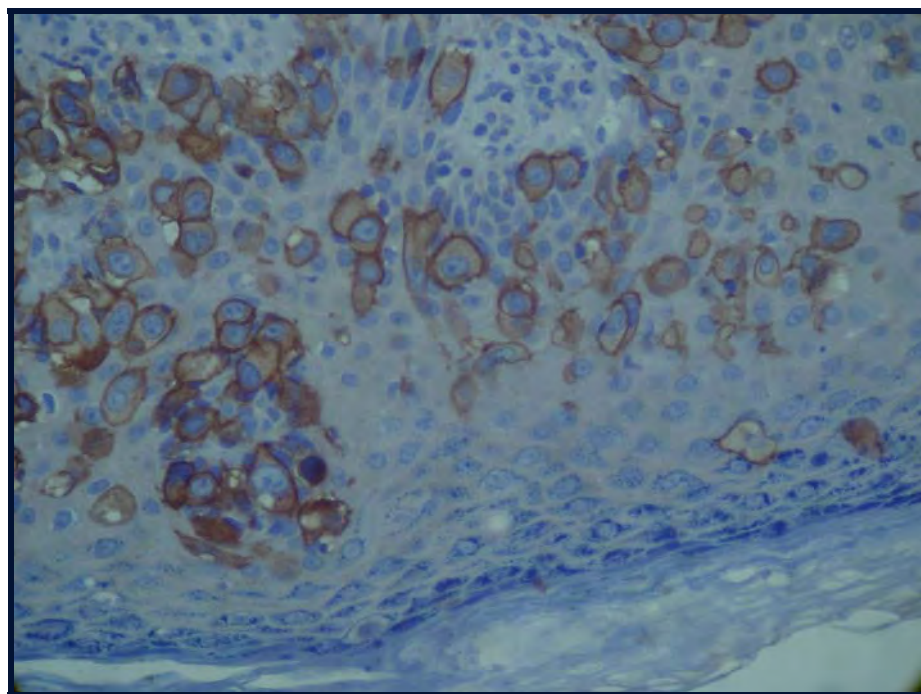
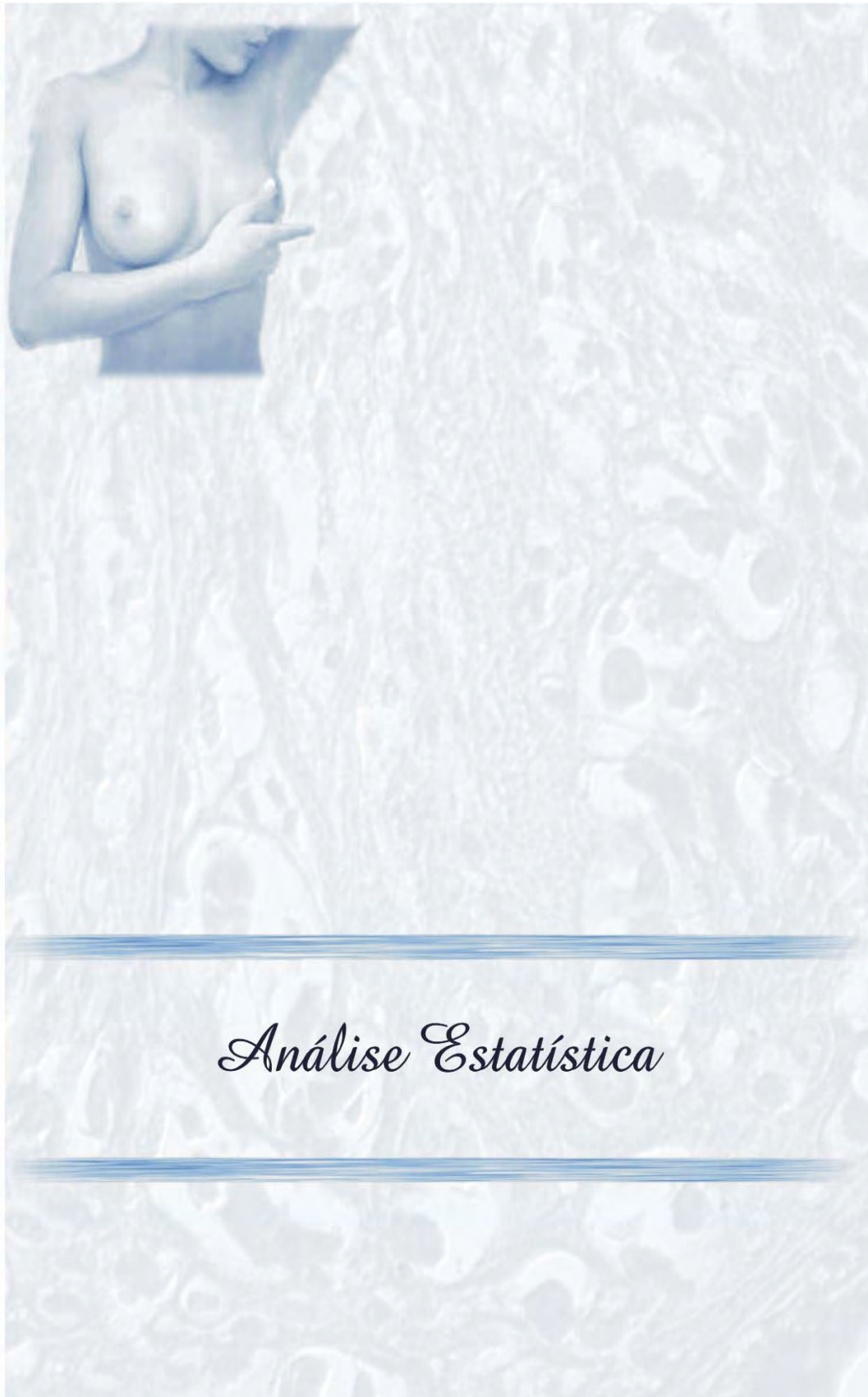
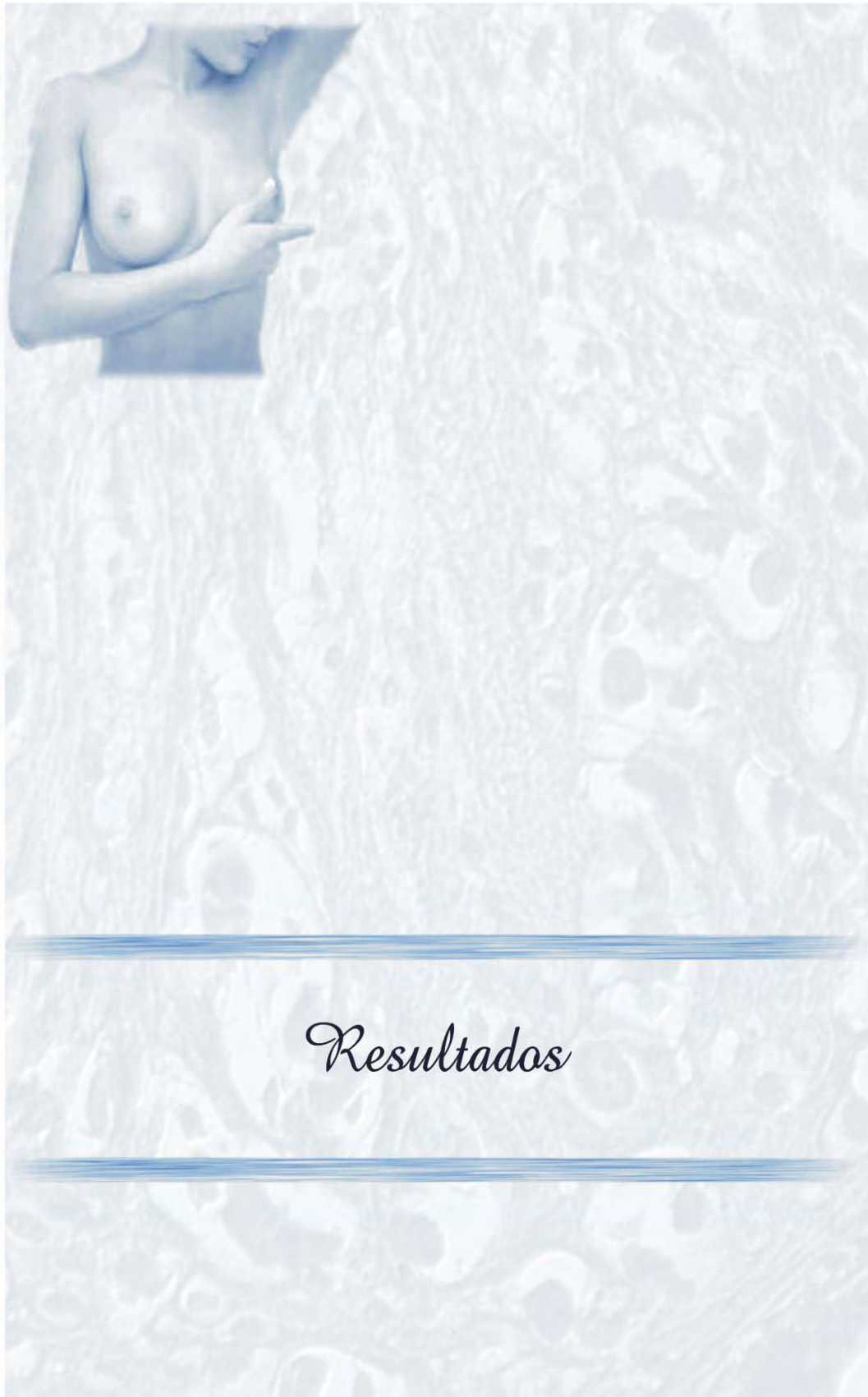


FIGURA 12 -Fotomicrografia - preparação imunoistoquímica com Anticorpo anti c-erbB-2, mostrando reação positiva - 40x



Para estudo da associação entre as variáveis qualitativas, foi utilizado o teste exato de Fischer. Para comparação dos grupos em relação as variáveis quantitativas foi utilizada a análise de variância e o teste T de Student. Para estudo da concordância entre os marcadores tumorais foi utilizado o coeficiente Kappa, com os respectivos intervalos de confiança. O nível de significância utilizado foi de 5% ou seja valores de $p < 0,05$, considerados estatisticamente significantes.



Utilizamos 60 amostras de tumores diagnosticadas como carcinoma de Paget da mama, na forma pura ou associado a outra neoplasia ductal subjacente, "in situ" ou invasora, todas pertencentes a igual número de pacientes portadoras dessa doença. A idade da população estudada variou de 26 a 84 anos, com média de 55,4 anos. Os resultados clínicos, fatores anatomopatológicos e biológicos estão expressos nos gráficos 1 e 2 e tabelas 2,3,4 e 5.

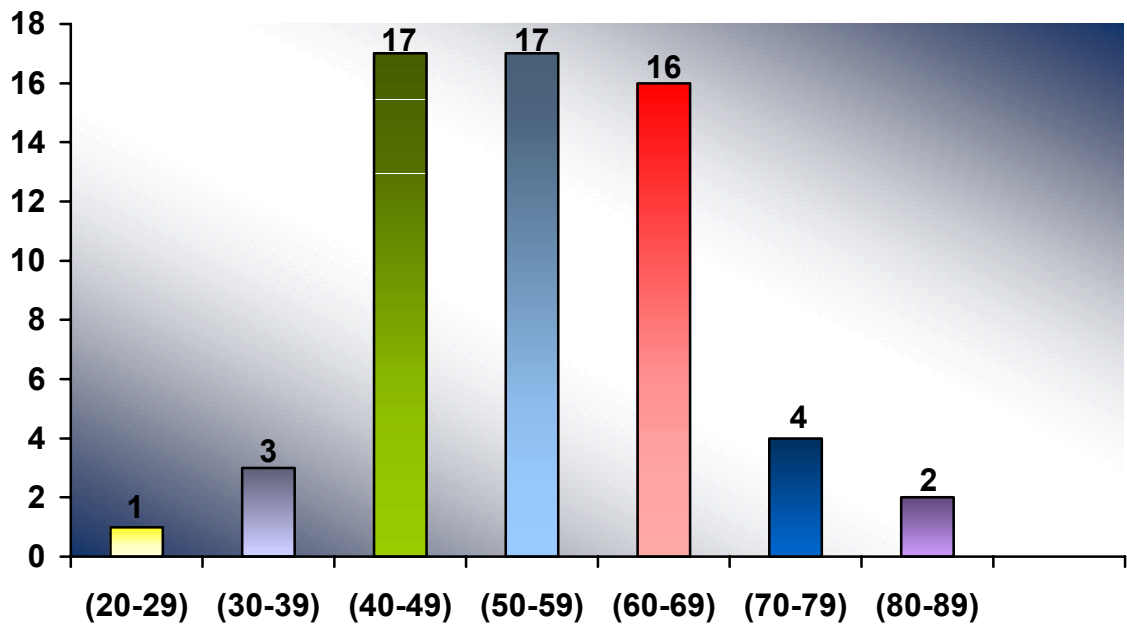


GRÁFICO 1 - Distribuição de frequências das pacientes segundo a faixa etária.

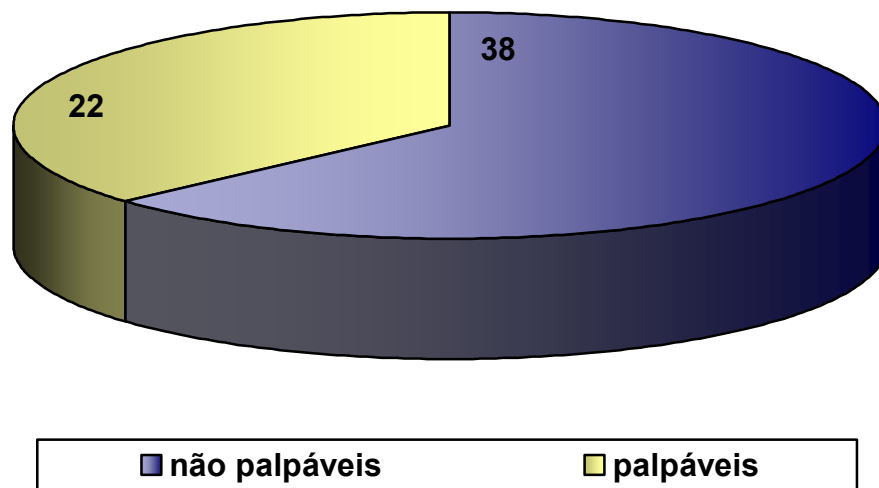


GRÁFICO 2 - Distribuição de frequências das pacientes segundo tumor palpável e não palpável

TABELA 2 – Distribuição de freqüência das pacientes segundo o Tamanho do tumor.

T = Tumor Primário	Nº casos
Tis = Neoplasia “in situ”	22
T1 = Tumor de 0,1 à 2,0cm [0,1;2,0]	
T1a = Tumor de 0,1 à 0,5cm [0,1;0,5]	1
T1b = Tumor > 0,5cm à 1,0cm [0,5;1,0]	7
T1c = Tumor > 1,0cm à 2,0cm [0,1;2,0]	6
T2 = Tumor > 2,0cm à 5,0cm]2,0;5,0[14
T3 = Tumor > 5,0cm >5,0	4
T4 = Tumor de qualquer tamanho	6
Total	60

TABELA 3- Distribuição de freqüências das pacientes segundo o Estadiamento Clínico

EC	TNM	Nº CASOS
0	Tis No Mo	22
	T1a N0 M0	1
I	T1b N0 M0	04
	T1c N0 M0	04
	T1b N1 M0	03
II A	T1c N1 M0	02
	T2 N0 M0	05
II B	T2 N1 M0	07
	T3 N0 M0	01
III A	T2 N2 M0	02
	T3 N1 M0	03
III B	T4b N1 M0	02
	T4b N2 M0	02
	T4c N1 M0	01
IV	T4b N1 M1	01

TABELA 4 – Distribuição de frequências das pacientes segundo as variáveis clínicas.

Idade	Nº	%
20-29	1	1,7
30-39	3	5,0
40-49	17	28,3
50-59	17	28,3
60-69	16	26,7
70-79	4	6,7
80-89	2	3,3
Tumor	Nº	%
Palpável	38	63,3
Não palpável	22	36,7
Tamanho do tumor(cm)	Nº	%
0-2 [0,2]	36	60
>2-5 [2,1;5]	16	26,7
> 5	8	13,3
Estadiamento	Nº	%
0	22	36,7
I	9	15,0
IIA	10	16,7
IIB	8	13,3
IIIA	5	8,3
IIIB	5	8,3
IV	1	1,7

TABELA 5- Distribuição de frequência das pacientes segundo as variáveis histológicas e imunoistoquímicas.

Grupo histológico	Nº	%
Grupo A	9	15,0
Grupo B	12	20,0
Grupo C	30	50,0
Grupo D	9	15,0
Grau nuclear	Nº	%
I	2	3,3
II	45	75,0
III	13	21,7
Receptor de estrógeno	Nº	%
Negativo	41	68,3
Positivo	19	31,7
Receptor de progesterona	Nº	%
Negativo	40	66,7
Positivo	20	33,3
C-erbB-2	Nº	%
Negativo	7	11,7
Positivo	53	88,3
P53	Nº	%
Negativo	47	78,3
Positivo	13	21,7

Analisando a frequência dos grupos histológicos e grau nuclear: observamos que no grupo A houve 2 casos GN-I (22,2%) e 7 casos GN-II (77,8%); no grupo B houve 11 casos GN-II (91,7%) e 1 caso GN-III (8,3%); no grupo C houve 21 casos GN-II (70,0%) e 9 casos GN-III (30,0%); no grupo D houve 6 casos de GN-II (66,7%) e 3 casos de GN-III (33,3%). (Tabela 6)

TABELA 6 - Distribuição de frequência das pacientes segundo grupo histológico e grau nuclear.

Grupo	Grau Nuclear						Total
	I		II		III		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Grupo A D. de Paget (forma pura)	2	22,2	7	77,8	-	0,0	9
Grupo B D. de Paget + neoplasia ductal "in situ"	-	0,0	11	91,7	1	8,3	12
Grupo C D. de Paget + neoplasia ductal invasora	-	0,0	21	70,0	9	30,0	30
Grupo D D. de Paget + neoplasia ductal invasora + neoplasia ductal "in situ"	-	0,0	6	66,7	3	33,3	9
Total	2		45		13		60
		3,3		75,0		21,7	100,0

p = 0,04.

Comparando-se a frequência dos grupos histológicos e a expressão de receptores de estrógenos, observamos que: no grupo A houve 7 casos de RE negativo (77,8%) e 2 casos RE positivo (22,2%); no grupo B temos 7 casos de RE negativo (58,3%) e 5 casos de RE positivo (41,7%); no grupo C houve 21 casos de RE negativo (70,0%) e 9 casos de RE positivo (30,0%) e finalmente no grupo D houve 6 casos de RE negativo (66,7%) e 3 casos de RE positivo (33,3%). (Tabela7).

TABELA 7- Distribuição de frequência das pacientes segundo grupo histológico receptor de estrógeno.

Grupo	Receptor de Estrógeno				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Grupo A D. de Paget (forma pura)	7	78,8	2	22,2	09
Grupo B D. de Paget + neoplasia ductal "in situ"	7	58,3	5	41,7	12
Grupo C D. de Paget + neoplasia ductal invasora	21	70,0	9	30,0	30
Grupo D D. de Paget + neoplasia ductal invasora + neoplasia ductal "in situ"	6	66,7	3	33,3	9
Total	41		19		60
		68,3		31,7	100,0%

p = 0,86.

Na análise da frequência dos grupos histológicos e a expressão de receptores de progesterona, observamos: no grupo A houve 7 casos de RP negativo (77,8%) e 2 casos de RP positivo (22,2%); no grupo B temos 9 casos de RP negativo (75,0%) e 3 casos de RP positivo (25,0%); no grupo C houve 19 casos de RP negativo (63,3%) e 11 casos de RP positivo (36,7%); no grupo D 5 casos foram RP negativo (55,6%) e 4 casos RP positivo (44,4%). (Tabela 8).

TABELA 8- Distribuição de frequência das pacientes segundo grupo histológico e a expressão dos receptores de progesterona.

Grupo	Receptor de Progesterona				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Grupo A D. de Paget (forma pura)	7	77,8	2	22,2	9
Grupo B D. de Paget + neoplasia ductal "in situ"	9	75,0	3	25,0	12
Grupo C D. de Paget + neoplasia ductal invasora	19	63,3	11	36,7	30
Grupo D D. de Paget + neoplasia ductal invasora + neoplasia ductal "in situ"	5	55,6	4	44,4	9
Total	40		20		60
		66,7		33,3	100,0%

p = 0,71.

Na análise da frequência entre os grupos histológicos e a expressão da proteína c-erbB-2 observamos: no grupo A somente 1 caso foi c-erbB-2 negativo (11,1%) e 8 casos positivos (88,9%); no grupo B 12 casos c-erbB-2 positivo (100%); no grupo C 6 casos foram negativos (20,0%) e 24 foram positivos (80,0%); no grupo D os 9 casos foram positivo (100%). (Tabela 9).

TABELA 9 - Distribuição de frequência das pacientes segundo grupo histológico e a expressão da proteína c-erbB-2.

Grupo	c-erbB-2				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Grupo A D. de Paget (forma pura)	1	11,1	8	88,9	9
Grupo B D. de Paget + neoplasia ductal "in situ"	-	0,0	12	100,0	12
Grupo C D. de Paget + neoplasia ductal invasora	6	20,0	24	80,0	30
Grupo D D. de Paget + neoplasia ductal invasora + neoplasia ductal "in situ"	-	0,0	9	100,0	9
Total	7		53		60
		11,7		88,3	100,0%

p = 0,26.

Comparando-se a frequência dos grupos histológicos e a expressão da proteína p53, observamos: no grupo A 6 casos foram p53 negativo (66,7%) e 3 casos foram positivo (33,3%); no grupo B temos 11 casos negativos (91,7%) e 1 caso positivo (8,3%); no grupo C 23 casos foram negativos (76,7%) e 7 casos foram positivos (23,3%); no grupo D 7 casos foram negativos (77,8%) e 2 casos positivos (22,2%). (Tabela10).

TABELA 10- Distribuição de frequência das pacientes segundo grupo histológico e a expressão da proteína p53.

Grupo	p53				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Grupo A D. de Paget (forma pura)	6	66,7	3	33,3	9
Grupo B D. de Paget + neoplasia ductal "in situ"	11	91,7	1	8,3	12
Grupo C D. de Paget + neoplasia ductal invasora	23	76,7	7	23,3	30
Grupo D D. de Paget + neoplasia ductal invasora + neoplasia ductal "in situ"	7	77,8	2	22,2	9
Total	47		13		60
		78,3		31,7	100,0%

p = 0,55.

Analisando a distribuição da frequência do grau nuclear e a expressão de receptor de estrógeno, observamos: no GN-I houve 2 casos de RE negativo (100%); no grupo GN-II tivemos 32 casos negativos (71,1%) e 13 RE positivo (28,9%); e no GN-III temos 7 casos RE negativo (53,9%) contra 6 RE positivo (46,1%). (Tabela 11).

TABELA 11- Distribuição de frequência das pacientes segundo o grau nuclear e a expressão receptor de estrógeno.

Grau Nuclear	Receptor de Estrógeno				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
I	2	100,0	-	0,0	2
II	32	71,1	13	28,9	45
III	7	53,9	6	46,1	13
Total	41		19		60
		68,3		31,7	100,0%

p = 0,38

Comparando-se a frequência do grau nuclear e a expressão de receptor de progesterona, observamos: no GN-I temos 2 casos de RP negativo (100%); no GN-II houve 32 casos de RP negativo (71,1%) contra 13 RP positivo (28,9%) e no GN-III 6 casos foram negativos (46,1%) e 7 foram RP positivo (53,9%). (Tabela 12).

TABELA 12- Distribuição de frequência das pacientes segundo o grau nuclear e a expressão receptor de progesterona.

Grau nuclear	Receptor de Progesterona				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
I	2	100,0	-	0,0	2
II	32	71,1	13	28,9	45
III	6	46,1	7	53,9	13
Total	40		20		60
		66,7		33,3	100,0%

p = 0,20

Comparando-se a frequência do grau nuclear e a expressão da proteína c-erbB-2, observamos: no GN-I somente 1 caso foi c-erbB-2 negativo (50%) e 1 caso c-erbB-2 positivo (50%); no GN-II temos 4 casos negativos (8,9%) contra 41 positivos (91,1%); no GN-III 2 casos foram negativos (15,3%) e 11 foram positivos (84,7%). (Tabela 13).

TABELA 13 - Distribuição de frequência das pacientes segundo o grau nuclear e a expressão da proteína c-erbB-2.

Grau nuclear	c-erbB-2				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
I	1	50,0	1	50,0	2
II	4	8,9	41	91,1	45
III	2	15,3	11	84,7	13
Total	7		53,		60
		11,7		88,7	100,0%

p = 0,17

Na análise das freqüências do grau nuclear e a expressão da proteína p53, observamos: em GN-I 2 casos p53 negativo (100%); em GN-II 33 casos p53 negativo (73,3%), contra 12 casos p53 positivo (26,7%); em GN-III foram 12 casos p53 negativo (92,3%) e 1 caso p53 positivo (7,7%). (Tabela 14).

TABELA 14 - Distribuição de freqüência das pacientes segundo o grau nuclear e a expressão da proteína p53.

Grau nuclear	p53				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
I	2	100	-	0,0	2
II	33	73,3	12	26,7	45
III	12	92,3	1	7,7	13
Total	47		13		60
		78,3		21,7	100,00%

p = 0,35

Quando analisamos a concordância entre a expressão de receptores de estrógeno e de progesterona, observamos: que 41 casos foram RE negativo (68,3%) enquanto que 19 foram RE positivo (31,7%); 40 casos foram RP negativo (66,7%) e 20 RP positivo (33,3%). Houve uma concordância boa entre os receptores de estrógeno e progesterona negativos. (Tabela 15).

TABELA 15 - Concordância entre receptores de estrógeno e receptores de progesterona.

Receptor Estrógeno	Receptor Progesterona				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Negativo	38	63,3	3	5,0	41
Positivo	2	3,4	17	28,3	19
Total	40		20		60
		66,7		33,3	100,0

Kappa = 0,81

I C (Kappa): [0,65;0,97]

Analisamos a concordância entre a expressão de receptores de estrógeno e a proteína c-erbB-2, observamos: que 41 casos RE negativo (68,3%) e 19 RE positivo (31,7%); 7 casos foram c-erbB-2 negativo (11,7%) e 53 casos c-erbB-2 positivo (88,3%). Houve uma concordância pobre entre os receptores de estrógeno e o c-erbB-2. (Tabela 16).

TABELA 16 - Concordância entre a expressão de receptores de estrógeno e proteína c-erbB-2.

Receptor Estrógeno	c-erbB-2				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Negativo	5	8,3	36	60,0	41
Positivo	2	3,4	17	28,3	19
Total	7		53		60
		11,7		88,3	100,0

Kappa = 0,01

I C (Kappa): [0,0;0,13]

Na análise da concordância entre a expressão de receptores de estrógeno e a proteína p53, observamos: que 41 casos foram RE negativo (68,3%) e 19 foram positivos (31,7%), com relação a proteína p53 temos 47 casos negativos (78,3%) e 13 positivos (21,7%). A concordância entre as variáveis biológicas acima foi pobre. (Tabela 17).

TABELA 17 - Concordância entre a expressão de receptores de estrógeno e a proteína p53

Receptor Estrógeno	p53				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Negativo	30	50,0	11	18,3	41
Positivo	17	28,3	2	3,4	19
Total	47		13		60
		78,3		21,7	100,0

Kappa = 0,0

I C (Kappa): [0,0 ; 0,03]

Analisando a concordância entre a expressão dos receptores de progesterona e a proteína c-erbB-2, observamos: que 40 casos foram RP positivo (66,7%) e 20 casos RP negativo (33,3%); 7 casos c-erbB-2 negativo (11,7%) contra 53 casos c-erbB-2 positivo (88,3%). A concordância entre os grupos foi pobre. (Tabela 18).

TABELA 18 - Concordância entre a expressão de receptores de progesterona e a proteína c-erbB-2.

Receptor Progesterona	c-erbB-2				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Negativo	5	8,4	35	58,3	40
Positivo	2	3,3	18	30,0	20
Total	7		53		60
		11,7		88,3	100,0

Kappa = 0,02

I C (Kappa): [0,0;0,14]

Na análise da concordância entre a expressão de receptores de progesterona e a proteína p53, observamos que 40 casos foram RP negativo (66,7%) e 20 casos foram RP positivo (33,3%); 47 casos foram p53 negativo (78,3%) e 13 foram p53 positivo (21,7%). A concordância entre os grupos foi pobre. (Tabela 19).

TABELA 19 - Concordância entre a expressão de receptores de progesterona e a proteína p53.

Receptor Progesterona	p53				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Negativo	30	50,0	10	16,7	40
Positivo	17	28,3	3	5,0	20
Total	47		13		60
		78,3		21,7	100,0

Kappa = 0,0

I C (Kappa): [0,0; 0,115]

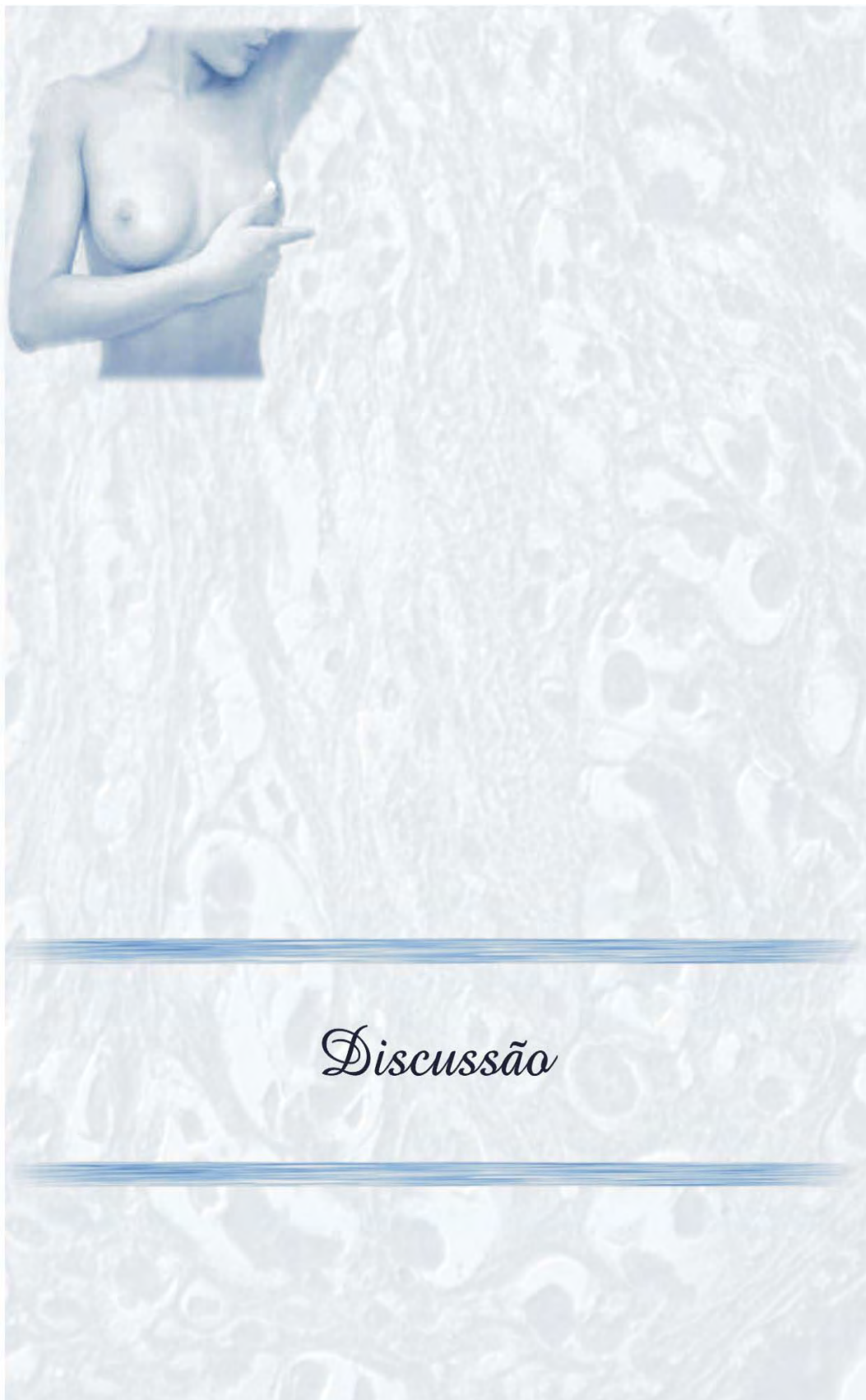
Após análise da concordância entre a expressão das proteínas c-erbB-2 e p53, observamos: 7 casos c-erbB-2 negativo (11,7%), contra 53 casos c-erbB-2 positivo (88,3%), em relação ao p53 temos 47 casos negativo (78,3%) e 13 casos positivo (21,7%). A concordância entre os grupos foi pobre (Tabela 20).

TABELA 20 - Concordância entre a expressão das proteínas c-erbB-2 e p53.

c-erbB-2	p53				Total
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Negativo	6	10,0	1	1,7	7
Positivo	41	68,3	12	20,0	53
Total	47		13		60
		78,3		21,7	100,0

Kappa = 0,024

I C (Kappa): [0,0 ; 0,107]



Entre as neoplasias que acometem a população feminina o câncer de mama permanece como a neoplasia maligna mais freqüente. Doença crônica de evolução imprevisível, variando seu comportamento entre as mulheres e causando grande impacto em suas vidas, devido a repercussões orgânicas e psico-sociais, além do mais responde por expressivas taxas de morbidez e mortalidade. No Brasil, devido a alta incidência de morbidez e mortalidade, tem sido considerado grave problema de Saúde Pública (GADELHA e.col). No ano de 2003 foi prevista a ocorrência de 402.190 casos novos de câncer , com 126.960 óbitos. Deste total 216.035, casos atingirão a mulher, dos quais 41.610 serão câncer de mama, responsáveis por 9.335 óbitos (INCA 2003).Entre os tipos histológicos especiais de câncer da mama, existe o carcinoma de Paget, doença rara, que embora de menor incidência, possui grande importância na oncologia mamária, lamentamos inaceitável atraso em seu diagnóstico. Andrade e col.– 2003.

Nosso objetivo foi estudar o perfil imunoistoquímico do carcinoma de Paget, correlacionando alguns fatores anátomopatológicos: tipo histológico e grau nuclear, com alguns fatores biológicos: receptores hormonais de estrógeno e de progesterona, oncoproteína c-erbB-2 e a proteína p53. Na literatura há escassos trabalhos que correlacionam o carcinoma de Paget da mama, com os marcadores tumorais, possivelmente, devido a sua baixa incidência. Pouco se conhece sobre receptores de estrógeno e de progesterona nas células do carcinoma de

Paget da mama, a presença dos receptores hormonais nas células de Paget, deve refletir as características do tumor subjacente no parênquima mamário (Tani e col.1991).

Com relação a oncoproteína c-erbB-2, temos vários estudos indicando que esta proteína desempenha papel fundamental no desenvolvimento do câncer de mama, na fase inicial da carcinogênese. (Bacchi – 2001).

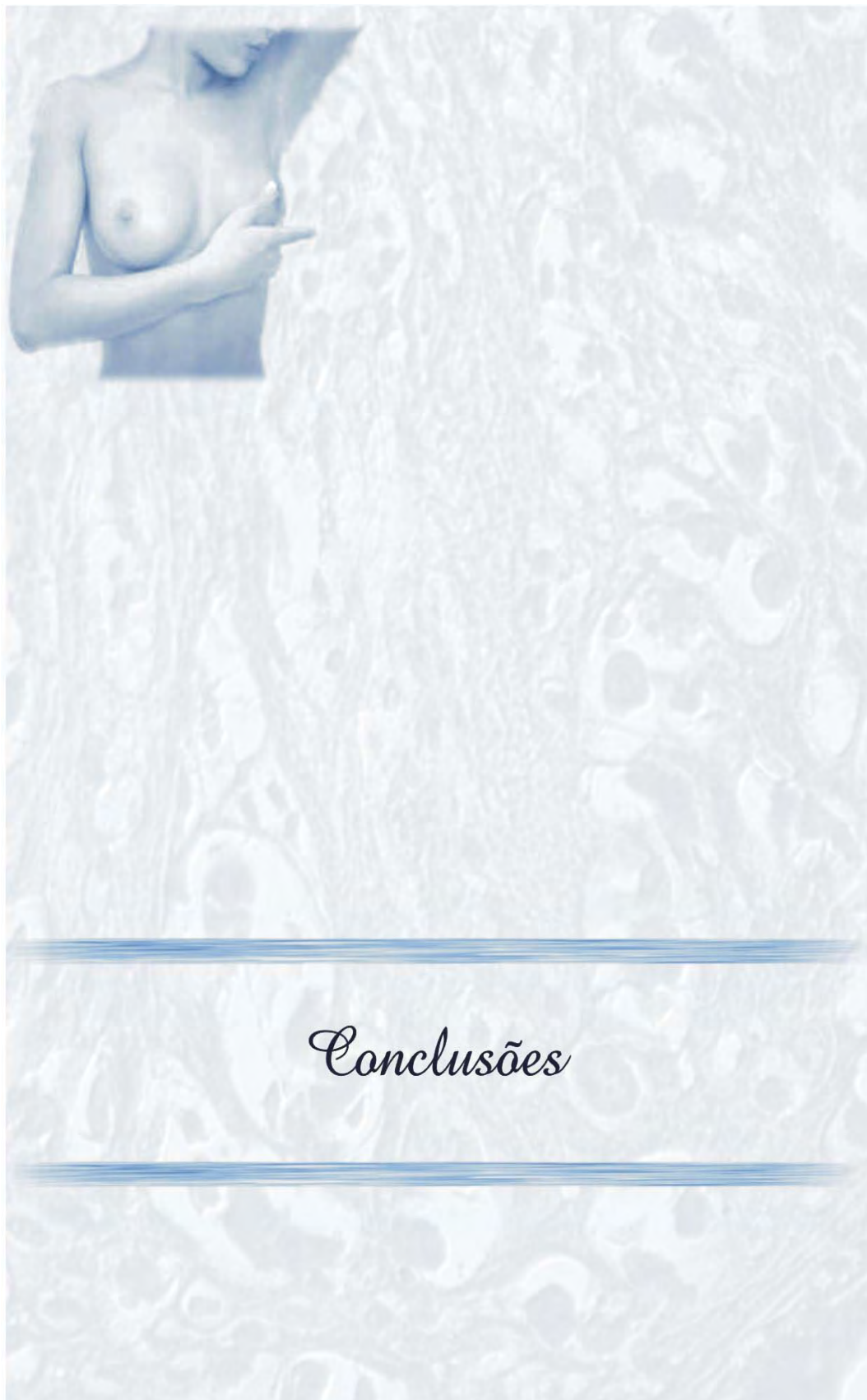
A expressão positiva da oncoproteína c-erbB-2 possui comportamento biológico mais agressivo, associado a um pior prognóstico, (Keatings e col – 1990). A positividade do c-erbB-2 está inversamente relacionada com os receptores hormonais, sendo encontrado com mais freqüência em pacientes jovens, é considerado marcador de agressividade do tumor. (Revillion e col – 1998). A concordância negativa entre RE e RP, ocorre em virtude dos tumores positivos para c-erbB-2 não produzirem hormônios, possivelmente a amplificação do c-erbB-2 interrompa a produção de hormônios locais e de receptores envolvidos na modulação do crescimento (Borresen e col. - 1990).

Em relação a positividade da proteína c-erbB-2 no carcinoma de Paget, alguns trabalhos na literatura como os de Lamie e col 1989 demonstraram que em 45 casos foram observados 41 casos positivos (91%), Revillion e col. 1998 em seu trabalho cita vários autores

que observaram positividade acima de 80% dos casos. Potter. 1994 refere ter encontrado positividade da proteína c-erbB-2 em 20% dos carcinomas ductais “in situ” e quase 100% nos casos de doença de Paget. Ashutosh. 2002 em seu 70 casos analisados encontrou 82,5% de casos positivos. Nosso trabalho está em concordância com a literatura demonstrando que dos 60 casos avaliados 53 foram c-erbB-2 positivos (88,3%).

Diversos marcadores biológicos adicionais tais como as proteínas p53, c-erbB-2 e os receptores de estrógeno e progesterona, têm sido relacionados com o prognóstico do câncer de mama. A inativação da proteína p53 é comum no desenvolvimento de neoplasias mamárias (Kastan e col – 1991; Reed e col – 2001). Há evidências consideráveis de que o gene supressor de tumor desempenha papel importante na carcinogênese mamária. Chitemerere. e col 1996. O gene supressor de tumor p53, possui a capacidade de regular funções como, controle do ciclo celular e da apoptose. A inativação destas funções ocorre quando há mutação do gene e sua detecção pela imunohistoquímica identifica os tumores de pior prognóstico. Em nosso levantamento não encontramos nenhum trabalho específico sobre p53 e doença de Paget. O método imunohistoquímico oferece vantagens no procedimento e os resultados são de fácil interpretação. A presença de receptores hormonais no carcinoma mamário são importantes fatores prognósticos, tendo influência na terapêutica hormonal.

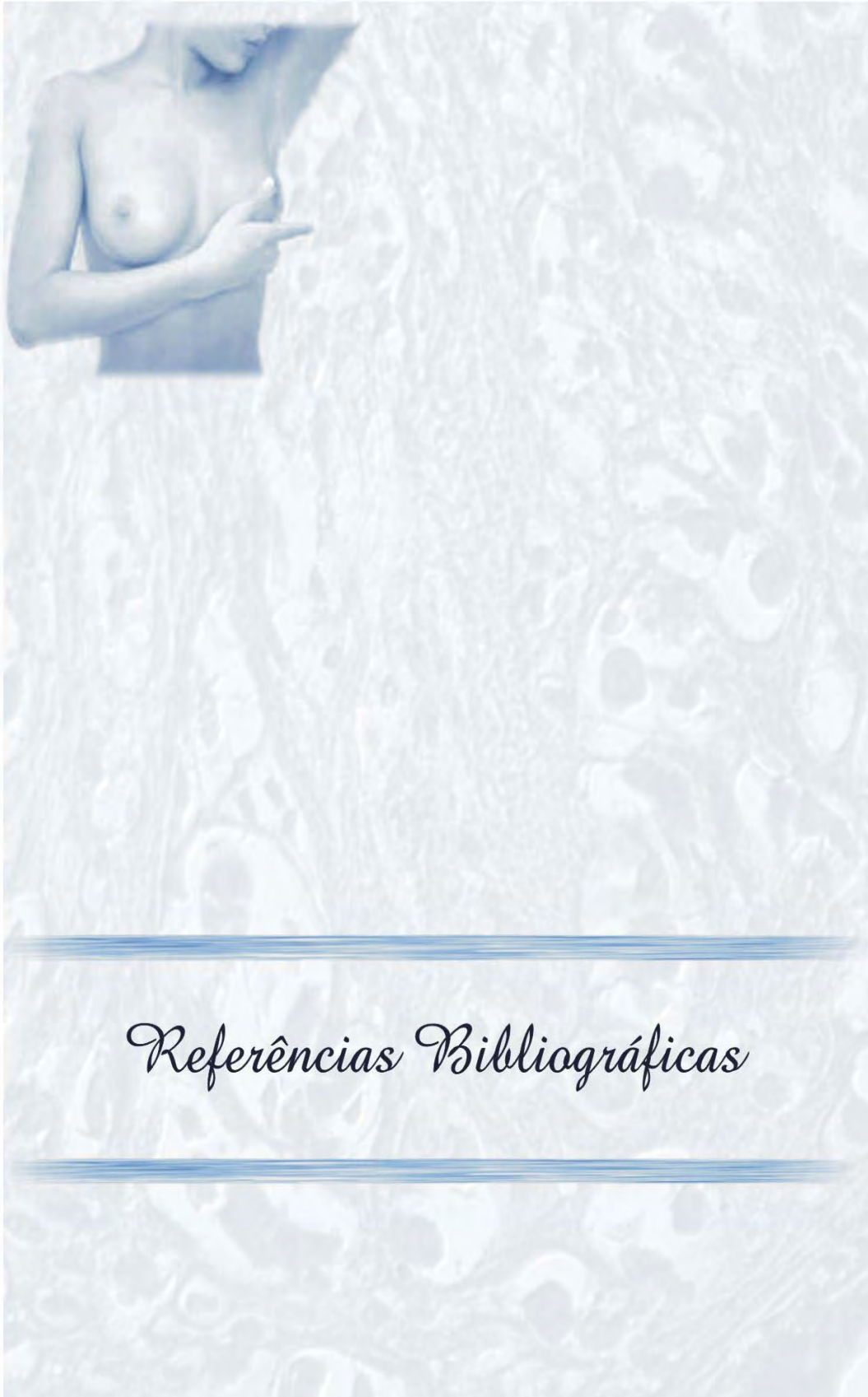
Entre as variáveis histológicas e biológicas em nenhuma delas houve correlação estatisticamente significativa, o que somente ocorreu quando comparamos o grupo histológico e o grau nuclear. Em relação a concordância entre as variáveis biológicas, obtivemos boa concordância entre receptores de estrógeno e receptores de progesterona.



1) Houve correlação estatisticamente significativa, quando comparamos as várias associações do Carcinoma de Paget com o Grau Nuclear.

2) Embora não se conheça o real significado da associação do Carcinoma de Paget com a neoplasia ductal invasora, onde encontramos maior número de casos com expressão positiva para proteína c-erbB-2, não nos foi possível concluir, se este achado estava relacionado a pior prognóstico em relação as pacientes estudadas.

3) Também observamos concordância entre a frequência de receptores de estrógeno negativo com os receptores de progesterona negativo.



Referências Bibliográficas

ALLRED, D.C. e col Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. **Hum. Pathol.**, 23, 9, 974-979, 1992.

ANDRADE, J.C., DE LUCA, L.A., GOES, J.C.S., OSORIO, C.A.B.T., GAMEIRO, P., DONOSO, N.F. Estudo Anatomopatológico do Carcinoma de Paget da Mama, *Rev. Bras. de Mastologia*. 13, 1, 13-18-2003.

ANDERSEN, T.I. e col Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. **J. Cancer**, 68, 540-548, 1993.

BACCHI, C.E. Her-2/neu (C-erbB-2) e câncer de mama. **Rev. Bras. Mastol.**, 11, 4, 143-150, 2001.

BARBOSA, E.M. **Determinação do RNA mensageiro do receptor de vitamina em amostras de carcinoma de mama e da ação dessa vitamina sobre marcadores de proliferação e invasão.** 2000. 122p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus.** Washington, 2001. 240p.

BASEGIO, D.L. **Câncer de mama**. Rio de Janeiro: Revinter, 1988. cap.30, 257-261, 1988.

BORRENSEN, A.L. e col Amplification and protein over-expression of the neu/Her-2/C-erb B-2 protooncogene in human breast carcinomas: relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis. **Br. J. Cancer**, 62, 585-590, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em: nov. 2003.

CEZAR JUNIOR, O.P. **Fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos e biomoleculares do câncer de mama estágio clínico II**. 2001. 93p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHITEMERERE, M. e col TP53 alterations in atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of the breast. **Breast Cancer Res. Treat.**, 41, 103-109, 1996.

COHEN, C. e col Mammary paget's disease and associated carcinoma. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 117, 291-294, 1993.

DONE, S.J. e col Mutations in mammary ductal carcinoma in situ but not in epithelial hyperplasias. **Cancer Res.**, 58, 785-789, 1998.

EL-DEIRY, W.S. e col WAF.1, a potencial mediator of p53 tumor suppression, **Cell**, 75, 817-825, 1993.

ERNEBERG, I.T. Oncogenes and tumor growth factors in breast cancer: a minireview. **Acta Oncol.**, 29, 3, 331-334, 1990.

GADELHA, I.P. e col Câncer, um problema de Saúde Pública no Brasil. **JBM**, 1, 38-45, 1992.

GUPTA, S.; KHANNA, N.N. Paget's disease of the male breast: a clinicopathologic study and a collective review. **J. Surg. Oncol.**, 22, 151-156, 1983.

HAAGENSEN, C.D. **Doenças da mama**. São Paulo: Roca, 1989. cap.44, 777-801, 1989.

HAERSLEV.T., JACOBSEN, G.K., Expression of Cytokeratin and erbB-2 oncoprotein in Paget's disease of the nipple. **APMIS** 100; 1041-1047, 1992.

HITCHLOCK, A. e col Routine diagnosis of mammary paget's disease. **Am. J. Surg. Pathol.**, 16, 1, 58-61, 1992.

HORTOBAGYI, G.N. Current status of adjuvant systemic therapy for primary breast câncer: progress and controversy. **CA Cancer J. Clin.**, 45, 4, 199-226, 1995.

INWANG, E.R.; FENTIMAN, I.S. Paget's disease of the nipple. **Br. J. Hosp. Med.**, 44, 392-395, 1990.

JENSEN, E.V. e col Estrogen receptor and breast câncer response to Adrenalectomy. *Natl. cancer. Inst. Monogr*; 34: 55-79,1971.

JENSEN, E.V. e col Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. **PNAS**, 98, 26, 15197-15202, 2001.

KASTAN, M.B. e col Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res.**, 51, 6304-6311, 1991.

KEATINGS, L. e col Cerb B2 oncoproteina expression in mammary and extramammary Paget's disease and immunohistochemical study. **Histopathology**, 17, 3, 243-247, 1990.

KOTHARI, A.S. e col Paget disease of the nipple. **Cancer**, 95, 1, 1-7, 2002.

LAMMIE, G.A. e col An immunohistochemical study of the presence of cerb-b2 protein in paget's disease of the nipple. **Histopathology**, 16, 5, 505-514, 1989.

MARK, J. Many gene change in cancer. **Science**, 246, 1386-1388, 1989.

OLIVEIRA, C.T. Ploidia de DNA e características imunocitoquímicas de células tumorais de mama humana: associação com resposta a terapia neo-adjuvante. 1999. 99p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OSBORNE, C.K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. **Cancer Res. Treat.**, 51, 227-238, 1998.

POTTER, C.R. The neu-oncogene: more than a prognostic indicator? **Hum. Pathol.**, 25, 12, 1264-1268, 1994.

PRADAL, M. e col, Marcadores tumorais: breve revisão, parte-II. **Rev. Soc. Bras. Cancerol.**, 5, 20-29, 1999.

REED, W. e col The prognostic value of p53 and C-erbB-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. **Câncer**, 88, 4, 804-813, 2000.

RÉVILLION, F. e col ERb B2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance – review. **Eur. J. Cancer**, 34, 6, 791-808, 1998.

ROSEN, P.P. **Rosen's breast pathology**. Philadelphia: Lippincolt Raven Press, 1997. cap.34, 493-506.

SCHIMMELPENNING, H. e col Association of immunohistochemical p53 tumor suppressor gene protein overexpression with prognosis in highly proliferative human mammary adenocarcinomas. **World J. Surg.**, 18, 827-833, 1994.

SCHMITT, F.C. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. cap.4, 30-45.

SILVA, H.M.S.; COELHO JÚNIOR, J.L. Fatores prognósticos do câncer da mama. In: FRANCO, J.M. e col **Mastologia: formação do especialista**. São Paulo: Atheneu, 1997. 167.

SILVANETO, J.B. e col Carcinoma de Paget da mama. Considerações clínico patológicas sobre 85 casos. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 32, 165-168, 1986.

SLAMON, D.J. e col Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. **Science**, 235, 177-182, 1987.

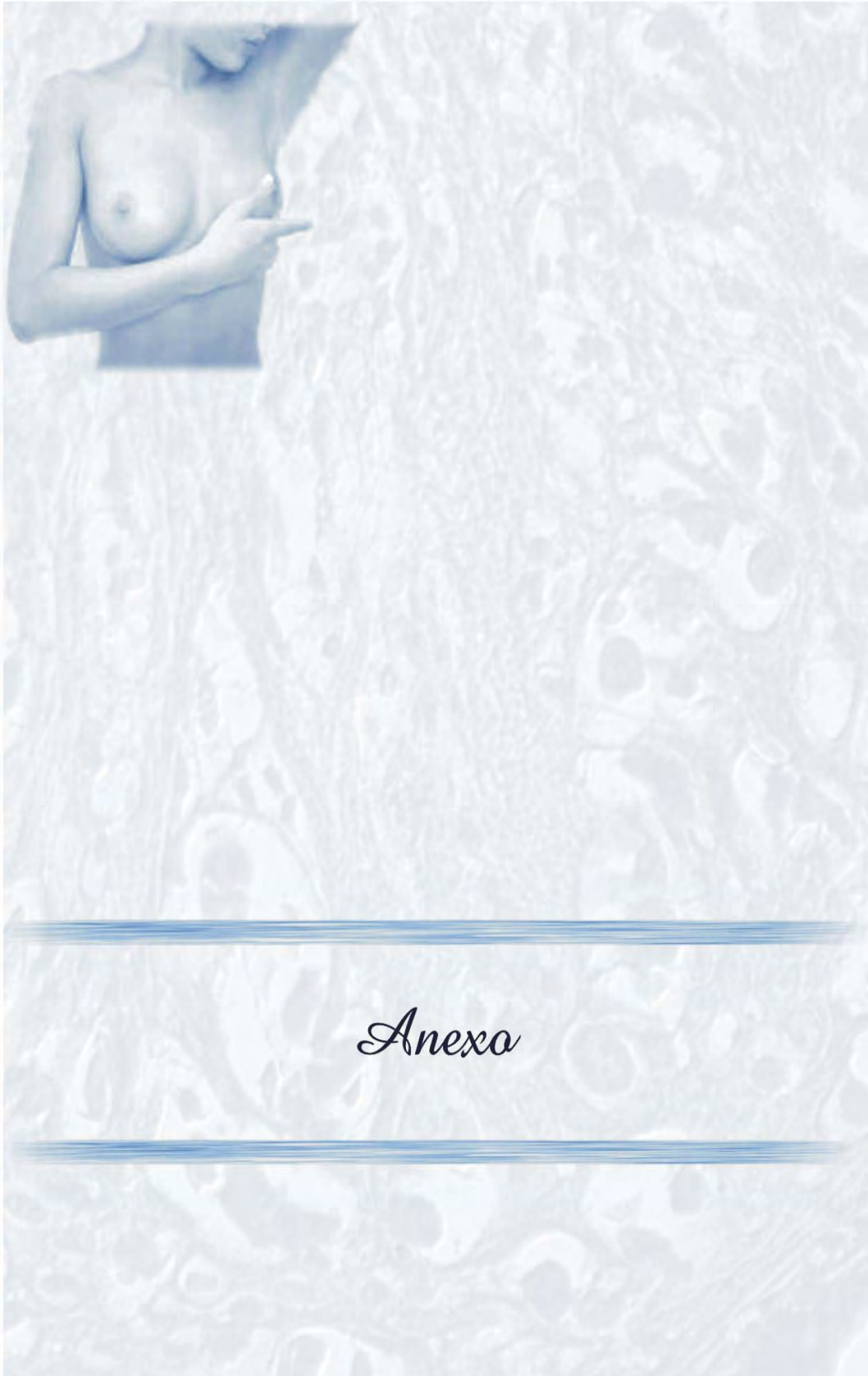
TAIKKANEN, S. e col Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. **J. Clin. Oncol.**, 10, 7, 1044-1048, 1992.

TANI, E.M.; SKOOG, L. Immunocytochemical detection of estrogen receptors in mamary paget cells. **Acta Cytol.**, 6, 825-828, 1988.


THOR, A.D. e col Accumulation of p53 tumor supressor gene protein: an independent maker of prognosis in breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, 84, 855-863, 1992.

TORRES, L.F.B. Contribuição da imuno-histoquimica na avaliação do carcinoma de mama: analise dos receptores de estrogênio, progesterona e antígeno carcino embrionário. **Rev. Med. Paraná**, 53, 3/4, 28-34, 1996.

WEI-QIANG, Z. e col Variation of ER status between primary and metastatic breast cancer and relationship to 53 expression. **Steroids**, 66, 905-910, 2001.



ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



IBCC
www.ibcc.org.br

INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CÂNCER
Sociedade Beneficente São Camilo
Hospital Prof. Dr. João Sampaio Góes Júnior


Missão
"Levar a conscientização, a prevenção e o tratamento do Câncer de forma humanizada e ao alcance de todos"

São Paulo, 26 de abril de 2002.

Em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do IBCC, realizada no dia 26 de abril de 2002, foi apresentado o Projeto de Doutorado: "Perfil Imuno Histoquímico do Carcinoma de Paget da Mama" - pesquisador responsável Dr. José Costa de Andrade - orientador Prof^o Dr. Laurival Antônio De Luca.

Após apreciação do CEP, o Projeto de Doutorado em questão foi aprovado.

O Dr. José Costa de Andrade é membro deste Comitê e **não participou** do processo de aprovação do Projeto em questão.


Dra. Célia Tosello de Oliveira
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa
IBCC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer

Av. Alcântara Machado, 2.576 - CEP: 03102-002 - São Paulo - SP - Brasil - Tel.: (11) 6099-3999 - e-mail: ibcc@ibcc.org.br
CNAS - Proc. Nº 289.960.200.79/04-75 - UPF Decreto Nº 95.025 de 14/10/87 - UPE Decreto Nº 9880 de 13/06/77 - UPM Decreto Nº 14.747 de 03/11/77