

OLAVO PEDROSO CEZAR JUNIOR

**FATORES PROGNÓSTICOS CLÍNICOS,
ANATOMOPATOLÓGICOS E BIOMOLECULARES
DO CÂNCER DE MAMA ESTÁDIO CLÍNICO II**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

**ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO ANTONIO DE SOUZA
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr MARCELO ALVARENGA**

**UNICAMP
2001**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Cezar Junior, Olavo Pedroso

C338f

Fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos e biomoleculares do
câncer de mama estágio clínico II / Olavo Pedroso Cezar Junior. Campinas,
SP : [s.n.], 2001.

Orientadores: Gustavo Antonio de Souza, Marcelo Alvarenga
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Fatores de proliferação celular. 2. Imuno-histoquímica. 3. Oncogene.
4. Receptor de hormônios. I. Gustavo Antonio de Souza. II. Marcelo Alvarenga.
III. Universidade Estadual de Campinas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: OLAVO PEDROSO CEZAR JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. GUSTAVO ANTONIO DE SOUZA

Co-Orientador: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 29/08/2001

*“Não me importo com o que os outros pensam a respeito do que faço,
mas me importo muito com o que eu penso do que eu faço.
Isso demonstra caráter.”*

THEODORE ROOSEVELT
(1858-1919)

Esta tese é dedicada ...

À Priscila,

companheira de todos os momentos,
que SEMPRE me incentivou,
inspirou e estimulou
nos momentos de fraqueza.

Agradecimentos

À Universidade São Francisco, onde completei minha formação acadêmica, profissional e que me possibilitou realizar este trabalho.

Prof. Dr. Gustavo Antonio de Souza, pela orientação neste trabalho.

Prof. Dr. Marcelo Alvarenga, pela orientação neste trabalho, e realização dos testes imuno-histoquímicos.

Mestre Edson Z. Martinez, pelo trabalho estatístico.

Dra. Helenice Piovesan, Dr. Enzo Magrini, Dr. Carlos Alberto Fontes de Souza e Dra. Vera Niero pelo estudo anatomopatológico realizado.

José Aires Pereira, pela colaboração na elaboração do material estudado.

À Margarete Amado de Souza Donadon, pela delicadeza e ajuda prestada no decorrer da Pós-Graduação.

Aos funcionários da Assessoria Técnica do CAISM, pela colaboração na elaboração deste volume.

À Bióloga Marisa de Almeida Matsura, pela ajuda na montagem e coloração das lâminas.

Pelos ensinamentos

Dr. Edson Mantovani Barbosa

Prof. Dr. Gustavo Antonio de Souza

Prof. Dr. Henrique Benedito Brenelli

Dr. José Costa de Andrade

Prof. Dr. Luiz Carlos Teixeira

Dr. Nassif Alexandre Galeb Jr.

Dr. Nelson Cymbalista

A todos os colegas da USF e UNICAMP.

Aos funcionários do SAME da USF.

A todas as pacientes que indiretamente participaram deste trabalho.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	1
1.1. Fatores Clínicos	5
1.2. Fatores Anatomopatológicos	6
1.3. Fatores Detectados por Método Imuno-Histoquímico	11
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. Sujeitos e Métodos	24
3.1. Critérios de Seleção e Exclusão de Pacientes	28
3.2. Desenho do Estudo	29
3.3. Variáveis	29
3.4. Ficha	30
3.5. Coleta de Dados	30
3.6. Acompanhamento das Pacientes	31
3.7. Processamento de Dados	31
3.8. Tamanho Amostral	31
3.9. Análise Estatística	32
3.10. Comissão de Pesquisa	33
4. Resultados	34
5. Discussão	56
6. Conclusões	70
7. Referências Bibliográficas	72
8. Bibliografia de Normatizações	86
9. Anexos	87
9.1. Anexo 1	87
9.2. Anexo 2	90
9.3. Anexo 3	92

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

DAB	3,3 Tetra-hidrocloreto Diaminobenidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio-Padrão
et al.	E outros(as)
GH	Grau Histológico
kDa	QuiloDalton
KM	Kaplan-Meier
OMS	Organização Mundial da Saúde
N+	linfonodos metastáticos
N-	linfonodos livres de metástases
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
QUART	Quadrantectomia, Axilectomia e Radioterapia
RE	Receptor de Estrógeno
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico

TX	tumor primário que não pode ser avaliado
UICC-TNM	União Internacional Contra o Câncer – Classificação dos Tumores
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USF	Universidade São Francisco
?	Erro Tipo I

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar alguns fatores clínicos como a idade da paciente e o estado menopausal, aspectos anatomopatológicos como o grau de diferenciação do tumor e o estado axilar e aspectos imuno-histoquímicos como receptor de estrógeno, proteína p53, c-erbB-2 e PCNA de mulheres com carcinoma de mama estágio clínico II, e correlacioná-los com a evolução da paciente. Foi realizado um estudo retrospectivo, com 74 mulheres do Ambulatório de Mastologia do Hospital de Ensino São Francisco, da Universidade São Francisco, de Bragança Paulista. Essas mulheres foram tratadas com cirurgia e as que apresentaram comprometimento axilar, receberam terapia adjuvante com quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia. O seguimento médio foi de 68,7 meses e a idade média de 53,1 anos (variando de 30 a 82 anos). Quanto à sobrevida total, somente o grau de diferenciação do tumor mostrou-se significativo. Para a sobrevida livre de doença, somente o comprometimento axilar mostrou-se significativo e, apesar de indicar o tratamento adjuvante, manteve-se como forte fator prognóstico para carcinoma de mama. Com estes resultados, concluímos que estes fatores devem ser estudados por um período

de seguimento maior. Entretanto, esforços não devem ser poupados para que se faça diagnósticos mais precoces, pois este ainda é o melhor fator prognóstico conhecido.

Summary

The purpose of this study was to assess some clinical prognostic factors, age and menopausal state, anatomic pathology such as histologic grade and axillary lymphonodal involvement and immunohistochemical like estrogen receptor, p53 protein, c-erbB-2 and PCNA of women with breast cancer clinical stage II and correlate them with the patient's evolution. A retrospective study of 74 women from the mastology clinic at the São Francisco University hospital in Bragança Paulista was carried out. These women were treated with surgery, and those who presented axillary lymphonodal involvement received adjuvant therapy with chemotherapy, radiotherapy and hormonotherapy. The women were followed up to 68.7 months and the average age of the participants was 53.1 years (range: 30-82 years old). Only the histologic grade showed to be significant regarding the overall survival. Concerning the disease free survival, only the axillary lymphonodal involvement showed to be significant and although it indicated the adjuvant treatment, maintained itself as a strong prognostic factor in breast carcinoma. From these results, we are therefore able to conclude, that these factors need to be studied over a longer period of time.

However, no efforts should be spared in the performing of early diagnoses, as this still remains the best-known prognostic factor.

1. Introdução

Atualmente, o câncer de mama é um problema de saúde pública no Brasil (GADELHA et al., 1992). Sua incidência aumenta, lenta e progressivamente, atingindo, inclusive, as mulheres jovens. Para o ano 2001 está prevista a ocorrência de cerca de 305.330 casos novos de câncer, com 117.550 óbitos. Destes, 154.880 no sexo feminino, dos quais 31.590 deverão ser de mama (36,4/100.000 mulheres), com 8.670 óbitos. No Estado de São Paulo a incidência desta patologia é de 60,3/100.000 mulheres, sendo esperados 11.440 novos diagnósticos e 2.800 óbitos. Com estes números constata-se que o carcinoma de mama é a principal causa de morte por neoplasia no sexo feminino, tanto no Estado de São Paulo, como no Brasil (INCA, 2001).

Vários fatores impedem seu diagnóstico precoce: a estrutura anatômica da mama, o pudor exagerado das mulheres mais idosas e o desconhecimento e o temor a respeito do assunto. Por tratar-se de doença com alto poder de metastatização, um número significativo de pacientes morre antes dos cinco anos de evolução, após o tratamento primário. É doença de evolução pouco

previsível. Sua história natural e prognóstico variam muito e tumores muito pequenos (milimétricos) podem apresentar alto potencial metastático (KESARI et al., 1997b).

Vários fatores interferem na evolução do carcinoma, como por exemplo: idade da paciente, volume tumoral, propagação às estruturas adjacentes (principalmente linfonodos), tipo histológico e estado hormonal, fatores estes que permitem ao médico antever a possível evolução da doença.

Os fatores prognósticos são os dados clínicos, anatomopatológicos e as características biológicas da paciente e seu tumor. Eles irão prever a evolução da doença, como, por exemplo, a probabilidade da recidiva local ou sobrevida da paciente quando não tratada. Na prática, significa ausência de tratamento adjuvante adicional após a cirurgia inicial (ALLRED et al., 1998; PUGLISI, DI LORETO, BELTRAMI, 1999).

Os fatores preditivos são os dados clínicos, anatomopatológicos e as características biológicas da paciente e seu tumor, que mostram a probabilidade de resposta a determinada terapia adjuvante, como os receptores hormonais, por exemplo (ALLRED et al., 1998; PUGLISI et al., 1999).

A cirurgia sempre foi a principal arma terapêutica contra o câncer de mama, sendo já na primeira década do século XX, complementada pela radioterapia. Desde então, as técnicas cirúrgicas têm evoluído muito, assim como os tratamentos clínicos.

PATEY & DYSON (1948) e MADDEN (1965) modificaram a mastectomia radical clássica de Halsted, objetivando uma melhor estética. Os primeiros conservaram o músculo grande peitoral e, o segundo, os dois músculos peitorais. Essas técnicas produziram grande melhora na estética e função do membro superior homolateral, sem modificar o resultado oncológico.

Na década de sessenta, em Londres, no Guy's Hospital, foi proposta uma cirurgia onde se retirava o nódulo tumoral, com complementação radioterápica na dose de 38 Gy, hoje considerada inadequada devido ao grande número de recidivas loco-regionais. O resultado foi inferior ao de Halsted (FENTIMAN, 1990).

No Instituto do Tumor de Milão, em 1973, iniciou-se um *trial* (Milan I) com cirurgia conservadora para tumores menores de 2cm, com resultados semelhantes à mastectomia, quanto à sobrevida. Consistia em realizar uma quadrantectomia com esvaziamento axilar e complementação radioterápica de 60 Gy (QUART) (VERONESI et al., 1981).

Na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), o estudo da cirurgia conservadora iniciou-se em 1981, sendo elegíveis as pacientes T1N1-T2N0 (TNM–UICC, 1987). O grupo-controle era de pacientes submetidas à mastectomia radical, pareadas segundo estadiamento clínico e estado menstrual. Após seguimento de 70 meses para as submetidas à QUART e de 150 meses para as com mastectomia, observou-se 1,05% e 5,1% de recidiva local, respectivamente (PINOTTI, TEIXEIRA, MONTI, 1991).

Deve-se, no entanto, conhecer novos fatores prognósticos para diminuir a propagação da doença através do tratamento sistêmico adjuvante, intervindo previamente, permitindo, assim, maior sobrevida sem doença (SANTINHO et al., 1982).

O carcinoma apresenta uma interação individualizada com a paciente e com o potencial de malignidade. Houve, nas últimas décadas, grande avanço nos métodos terapêuticos da neoplasia mamária, embora ela não tenha evolução igual para todas as mulheres. O estudo dos fatores prognósticos irá orientar na individualização da terapêutica a ser instituída em cada caso (SILVA & COELHO Jr., 1987; SILVA et al., 1991).

Os fatores prognósticos e preditivos são úteis nas seguintes situações: a) identificação da paciente cujo prognóstico é bom, e que após o tratamento cirúrgico inicial, a terapia adjuvante não trará benefícios para a maioria, b) identificação da paciente cujo prognóstico é ruim, onde tratamento mais agressivo se faz necessário e c) identificação das pacientes que são resistentes ou responsivas a determinadas formas de terapia (CLARK, 1994).

Tentando enquadrar as pacientes deste estudo em uma das situações acima descritas, serão estudados alguns fatores por elas apresentados, para individualizá-las na condição de risco para má evolução da doença e, assim, poder intervir preventivamente.

Portanto, os fatores prognósticos a serem estudados, por serem importantes e seu estudo de fácil realização (SCHMITT, 1999; HERCHENHORN, et al.,

2000), serão os seguintes: clínicos (idade da paciente e estado menstrual); aspectos anatomopatológicos, reconhecidos e estabelecidos como importantes (comprometimento ganglionar e grau de diferenciação tumoral) e fatores celulares obtidos por imuno-histoquímica (receptor de estrógeno, fator de proliferação celular, oncogene c-erbB-2 e proteína p53).

1.1. FATORES CLÍNICOS

1.1.1. Idade da paciente ao diagnóstico

Trabalho realizado pelo *Columbia Presbyterian Center* evidenciou o ponto culminante do diagnóstico do câncer de mama em mulheres entre 40 e 60 anos (PINHEIRO, 1986). HORST et al. (1994) em estudo realizado em Porto Alegre encontraram idade média de 54,1 anos. LEIS Jr. (1984) referiu que 67% dos casos de câncer de mama são clinicamente detectáveis acima dos 50 anos e 85% dos casos em mulheres acima dos 40 anos.

As mulheres negras norte-americanas tiveram seu diagnóstico da doença com idade média de 54 anos, sendo 37,7% delas com idade inferior a 50 anos. Entre as caucasianas, a idade do diagnóstico foi 62 anos e 24,6% antes dos 50 anos de idade (EL-TAMER & WAIT, 1999).

Quanto à evolução das pacientes, HOST & LUND (1986) e ADAMI et al. (1989), estudando milhares de mulheres sem agrupá-las por estadiamentos, verificaram que aquelas com menos de 34 anos e as com mais de 75

apresentavam pior evolução. O prognóstico piorava sensivelmente a partir dos 50 anos de idade.

1.1.2. Estado menstrual

Vários autores estudaram a idade da menarca em mulheres portadoras de câncer de mama e não encontraram diferença estatisticamente significativa com relação às mulheres sadias (MAMEDE et al., 1992; SOBREIRA et al., 1992; HORST et al., 1994; CEZAR Jr., 1995).

Com relação à menopausa, a parada das menstruações até os 45 anos apresenta redução do risco quando comparado com a ocorrência por volta dos 55 anos. A menopausa artificial exerce efeito protetor semelhante à menopausa natural (MANT & VESSEY, 1994).

1.2. FATORES ANATOMOPATOLÓGICOS

1.2.1. Estadiamento clínico

Fator clássico de prognóstico, o modelo TNM - UICC (1987) (ANEXO 1) é o mais utilizado, onde o T oferece detalhes sobre o tumor, N sobre os linfonodos e M, metástases. Representa a extensão anatômica do câncer, quando diagnosticado. Ainda é o mais aceito como fator prognóstico (ALLRED et al., 1998).

1.2.2. Tumor

CIATTO et al. (1990) avaliaram 1.877 mulheres com axila negativa e encontraram resultado melhor, estatisticamente significativo, a favor de T1. Não houve diferença significativa de prognóstico quando foi comparado T2 com T3 e com T4. ELLEDGE & McGUIRE (1991) também encontraram melhor prognóstico para T1, o mesmo ocorrendo com LAMPE, HANTSCHMANN, DIMPFL, (1998).

1.2.3. Comprometimento ganglionar

É considerado o mais importante dos fatores prognósticos, juntamente com as dimensões do tumor, no momento da cirurgia (CARTER, ALLEN, HENSON, 1989; HAN et al., 1997; FITZGIBBONS et al., 2000). Os linfonodos axilares são as principais vias de drenagem das células tumorais do carcinoma da mama e não existem dúvidas sobre sua importância no prognóstico e tratamento desta patologia (BRONDI, 1987).

Pacientes com axila negativa têm mostrado sobrevida maior de 85% em cinco anos, enquanto que nas pacientes com axila positiva, esta taxa diminui para 53% ou menos (VALAGUSSA, BONADONNA, VERONESI, 1978; STRAX, 1991). Dados semelhantes foram descritos por FENTIMAN et al. (1984) e PUGLISI et al., (1999).

Mulheres com tumores maiores que 2cm apresentam maior comprometimento axilar quando comparadas àquelas com tumores menores que 2cm, sendo esta diferença estatisticamente significativa (TOMA et al., 1986).

Somente se conhecerá a real situação dos linfonodos axilares após sua retirada e exame histológico em parafina. A amostragem por exame de congelação não é indicada. O número médio de linfonodos dissecados aumenta em relação ao número de comprometimento dos mesmos e a taxa de positividade histológica é proporcional ao tamanho do tumor. O número médio de linfonodos encontrados varia muito segundo os diferentes autores. Fisher encontrou uma média de 17, Rosen de 21, Contesso de 22, Monroe de 30,4, Brondi de 33,2, Montoro e Monteiro de 40,3 e Durkin e Haagensen de 50,3 (BRONDI, 1987).

Nas pacientes tratadas no Departamento de Oncologia da Santa Casa de Sorocaba, do total de 7.608 linfonodos dissecados de 230 mastectomias, 32,6% das pacientes não apresentaram invasão axilar, 33,9% apresentaram de um a três linfonodos comprometidos e 33,5% mais de quatro linfonodos com invasão metastática (BRONDI, STECCA, FERRO, 1993).

Dos dados coletados no *National Surgical Adjuvant Breast Project*, analisando-se a taxa de recorrência e sobrevida de mais de 2.000 pacientes com câncer de mama, provenientes de 46 instituições, encontrou-se número médio de linfonodos variando entre sete e 28. Verificou-se que axila negativa ou com um a três linfonodos metastáticos tem o mesmo prognóstico concernente à sobrevida e recidiva local. A média de linfonodos dissecados foi de 17, quando a axila era negativa e, de 21 quando apresentava mais de quatro linfonodos metastáticos. Os resultados mostraram que o prognóstico não dependia do número de linfonodos dissecados. Isto foi observado em pacientes com cinco a dez linfonodos negativos examinados e que tiveram a mesma taxa de recorrência

que as pacientes com 25 a 30, também negativos. Pacientes que apresentaram dois linfonodos metastáticos, em cinco dissecados, não apresentaram maior risco que aquelas com dois metastáticos, em 30 dissecados (FISHER & SLACK, 1970). TOMA et al. (1986) também encontraram média de linfonodos dissecados maior, quando a axila se encontrava comprometida.

1.2.4. Grau histológico (GH)

A graduação histológica baseia-se nas características arquiteturais do tumor (grau histológico), do núcleo (grau nuclear) e na proliferação celular (grau mitótico). A primeira correlação entre grau tumoral e sobrevida foi relatada por GREENOUGH (1925) e modificada por BLOOM & RICHARDSON (1957), que passaram a usar um sistema de escore. A graduação histológica de tumores tem uma avaliação muito subjetiva, que algumas vezes pode ter problemas de reprodutibilidade. DALTON, PAGE, DUPONT, (1994) demonstraram, em estudo com 25 patologistas de seis diferentes entidades, que quando se seguem normas específicas para esta graduação, esta subjetividade pode ser ultrapassada e a reprodutibilidade da graduação é conseguida.

Baseada nos critérios estabelecidos por BLOOM & RICHARDSON (1957), que incluem a formação de túbulos, o tamanho, a forma das células e seus núcleos, além da frequência de hipercromasia e mitose, a pontuação é feita segundo os critérios abaixo descritos:

- *Diferenciação ou formação de túbulos*: se a lâmina mostrar bem marcada a formação de túbulos, concede-se 1 ponto. Se apenas for moderada a tentativa de formação de túbulos, 2 pontos. Se as células mostraram inadequada formação de túbulos, 3 pontos.

- *Pleomorfismo*: a grande irregularidade nuclear mostra pior prognóstico. Um ponto é concedido se os núcleos mostraram satisfatória uniformidade no tamanho, forma e coloração. Dois pontos, se estas variações forem moderadas. Um marcado grau de pleomorfismo ganha três pontos.

- *Hipercromasia e mitoses*: um leve grau implica na presença ocasional de hipercromasia ou até 10 figuras de mitose, quando estudados 10 campos de maior aumento e ganha 1 ponto. Dois pontos, se a presença for moderada ou de 11 a 20 mitoses e três pontos, se a presença for marcante ou mais de 20 mitoses.

A sobrevida está relacionada com a graduação histológica. grau I (carcinoma bem diferenciado; grau II (moderadamente diferenciado); grau III (pouco diferenciado). Quanto mais indiferenciado o tumor, pior será o prognóstico.

Graduação histológica de Bloom & Richardson (1957) aplicada ao câncer de mama.

1. formação tubular	>50% = 1	10-50% = 2	< 10% = 3
2. pleomorfismo nuclear	Discreto = 1	Moderado = 2	Intenso = 3
Índice mitótico	1-10 (10 cga) = 1	11-20 (10 cga) = 2	>20 (10 cga) = 3

Cga = campo de grande aumento (x400)

Pontos		
3 - 4 - 5	6 - 7	8 - 9
Grau do tumor I	Grau do tumor II	Grau do tumor III

ELSTON & ELLIS (1991), estudaram 1.831 mulheres e encontraram sobrevida livre de doença e sobrevida total, significativamente melhor, em pacientes com tumor grau I.

PINDER, ELLIS, ELSTON, (1995) relataram que a sobrevida em 10 anos foi de aproximadamente 85% nas mulheres com grau I, enquanto que nas com grau III esta taxa caiu para 45%.

NISKANEN et al. (1997) estudaram vários fatores prognósticos e verificaram que pacientes com grau I apresentaram maior período livre de doença, porém a sobrevida total não era modificada. Mulheres com grau III apresentaram pior resposta à quimioterapia.

KEMP (1995) encontrou relação significativa para o PCNA elevado em tumores grau III com axila negativa, concluindo ser este de valor prognóstico o para câncer de mama.

1.3. FATORES DETECTADOS POR MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO

O método imuno-histoquímico oferece várias vantagens sobre o bioquímico: necessita de pequena amostra de tecido; pode ser utilizado em tecido congelado ou em bloco de parafina; permite a identificação de diferentes componentes teciduais, pois mantém a arquitetura celular e a reação fica disponível permanentemente. O mesmo material pode oferecer controles internos positivos e negativos, metodologia relativamente simples e rapidez no

resultado com baixo custo (HALL et al., 1990; BIANCHI et al., 1993; CUMMINGS, et al., 1993; TORRES, COLLAÇO, WERNER, 1996).

1.3.1. Receptor de estrógeno (RE)

Foi Beatson, em 1896, quem primeiro sugeriu a dependência hormonal de um tumor, quando observou a regressão de lesões tumorais mamárias após ooforectomia. JENSEN et al. (1971) demonstraram a existência de receptores hormonais, que são proteínas que se ligam com afinidade e especificidade ao 17 beta-estradiol. São proteínas nucleares, responsáveis pela mediação dos efeitos do estrógeno no epitélio mamário (SCHMITT, 1999). Existem diferentes técnicas para se determinar a positividade para receptores em tumores mamários, sendo os mais usados o método imuno-histoquímico e o bioquímico do “carvão dextran”.

Os tumores receptores negativos têm pouca possibilidade de regressão pela terapia endócrina, enquanto que, nos positivos, a taxa de resposta varia de 40% a 80% (PISANI, 1991; SCHMITT, 1999). O receptor de estrógeno tem a função de fator de transcrição, quando ligado ao hormônio. Quando não está ligado a este, encontra-se geralmente no núcleo celular, sob a forma inativa (PARKER et al., 1993). O crescimento de muitos cânceres de mama depende do efeito proliferativo do estrógeno e esta resposta está correlacionada com a presença de seu receptor. Sua presença é demonstrada quando a paciente com tumor receptor positivo é tratada com antiestrogênio, o qual bloqueia o efeito proliferativo do estrógeno endógeno (FUQUA, 1994).

MASCAREL et al. (1995) avaliaram 938 tumores de mama, quanto à presença de receptores de estrógeno, pelas duas técnicas e encontraram concordância de 87,2%. Os receptores estavam presentes em 75% dos casos estudados pela imuno-histoquímica e em 73% dos avaliados pelo carvão dextran. Pelos dois métodos foi encontrada forte correlação com o tamanho tumoral, comprometimento axilar e grau histológico de Scarff-Bloom e Richardson (SUNDBLAD et al., 1992).

A principal razão para a pesquisa de receptores de estrógeno em tecido tumoral é a sua capacidade preditiva de resposta à terapia endócrina (SUNDBLAD et al., 1992; TORRES et al., 1996; ALLRED et al., 1998; OSBORNE, 1998; SCHMITT, 1999; FITZGIBBONS et al., 2000).

BARBARESCHI et al. (1992) concluíram que a progressão do câncer de mama está relacionada com a perda gradual da necessidade do estrógeno para o crescimento tumoral, até o tumor tornar-se estrógeno- independente.

Recentemente, dois tipos de receptores de estrógeno foram identificados, α e β . Embora exista considerável homologia entre eles, parecem ter diferenças estruturais e funcionais importantes na formação de tecidos e regulação da expressão gênica. A maioria das informações sobre a estrutura e função do receptor de estrógeno foi derivada dos estudos sobre o receptor α . A distribuição dos dois nos tecidos sugere que tenham funções distintas (OSBORNE, 1998).

1.3.2. Gene p53

O ciclo celular é composto por várias etapas, que podem ser reguladas, positiva ou negativamente, por vários fatores. O gene p53 é um gene oncosupressor, localizado no braço curto do cromossomo 17 (ISOBE et al., 1986). Sua alteração ou inativação por mutação favorece o surgimento de um tumor. O *locus* mutante do p53 é recessivo para o alelo primitivo, contribuindo para a carcinogênese somente quando o alelo primitivo é inativado. O alelo primitivo inibe o crescimento de células transformadas em cultura e a formação de tumores em animais (LEVINE, MOMAND, FINLAY, 1991). Existem várias citações de que o p53 exerça papel importante no controle da proliferação celular, sobrevivência da célula e sua diferenciação (OREN, 1992; DABBS, 1995; HAN et al., 1997). Sua mutação constitui a modificação mais freqüente observada em pacientes com câncer de mama. Sua freqüência varia de 15% a 50% (KESARI et al., 1997b).

A mutação do gene p53 leva à alteração de sua função, conferindo resistência à apoptose e perda da capacidade de regular o crescimento celular, levando à sua rápida proliferação (KESARI et al., 1997b; COPPOLA, CATALANO, NICOSIA, 1999).

O p53 tem sido chamado de “guardião do genoma”, devido ao seu papel na resposta celular ao dano do DNA, dano este causado por fatores externos como irradiação γ , ultravioleta ou agentes quimioterápicos; ou por fatores internos, como mau êxito na mitose, que fazem a célula parar em G1/S para ser

reparada. Se o dano foi muito severo, a célula entra em apoptose. Isto previne a propagação do dano do DNA, que poderia conferir à célula crescimento anormal, possibilitando o desenvolvimento neoplásico. O p53 está envolvido em todos estes processos. Recentes evidências indicaram que o p53 também bloquearia as células em G2/M (LANE, 1994).

O p53 controla a interrupção do ciclo celular, o reparo no DNA e a apoptose, através de sua influência na expressão de genes, como foi visto neste processo (LANE, 1994; CHIARUGI & RUGGIERO, 1996; QUESNEL & MALKIN, 1997).

BARNES et al. (1993), estudaram 195 mulheres e encontraram 19% de positividade para a proteína p53, mostrando esta pior evolução, com menor sobrevida livre de doença e sobrevida total, tanto para as mulheres axila negativa quanto para as com axila comprometida.

A detecção da proteína p53 mostrou prognóstico ruim para os cânceres de mama e do trato digestivo, em estudo de LESEC et al. (1997) e sua proporção de positividade imuno-histoquímica nesta série foi de 27%. Vários trabalhos mostraram forte relação entre p53 e má evolução da doença, assim como que ele é um forte fator prognóstico e preditivo de resposta à terapia adjuvante (ALLRED et al., 1998); COLLEONI et al. (1999). HAERSLEV & JACOBSEN (1995) não encontraram significância em seu estudo, mostrando não ser o p53 fator prognóstico para sobrevida total e sobrevida livre de doença, tanto para pacientes axila negativa como para axila positiva.

1.3.3. Oncogene c-erbB-2

Atualmente, a atenção se volta para a expressão dos proto-oncogenes como fator prognóstico potencial. Oncogenes são genes normais das células com importante função no crescimento e diferenciação. Quando se encontra com seu controle alterado, contribui para o desenvolvimento tumoral mudando o código da proteína por ele codificada (mutação por ponto), ou na regulação de sua expressão (amplificação, translocação). Alguns estão envolvidos com a regulação dos fatores de crescimento ou com o receptor do fator de crescimento (ERNBERG, 1990; HAERSLEV & JACOBSEN, 1995).

O c-erbB-2 é um gene normal, pertencente à família das tirosinas quinases, presente no cromossomo 17 e codifica uma proteína transmembrana (185 kDa), semelhante ao *epidermal growth factor receptor*. Sua amplificação e hiperexpressão, freqüentemente encontradas no câncer de mama, são relatadas como indicadoras de maus prognósticos e estão correlacionadas com menor período livre de doença.

A literatura mostra que os tumores apresentam positividade para c-erbB-2, geralmente entre 20% e 30% (WRIGHT, et al., 1989; LOVEKIN, et al., 1991; PAIK, BURKHARD, LIPPMAN, 1991; PERREN, 1991; GELMANN & LIPPMAN, 1994; QUÉNEL, et al. 1995; ALLRED et al., 1998; RÉVILLION, BONNETERRE, PEYRAT 1998; SJÖGREN, et al., 1998; VAN DE VIJVER, 2001), podendo chegar a 40%, quando a axila encontra-se comprometida (HAN et al., 1997).

Hiperexpressão ou amplificação do oncogene no tumor é considerado como indicador de resposta ruim à hormonioterapia (NISKANEN et al., 1997; RÉVILLION, et al., 1998). ALLRED et al., (1998) e COLLEONI et al. (1999) sugeriram que o c-erbB-2 era um fraco fator prognóstico, mas um bom fator preditivo à resposta adjuvante, tanto hormônio como quimioterápica, enquanto que WRIGHT et al. (1989) o consideraram como importante fator prognóstico. VAN DE VIJVER (2001) o considerou como bom fator prognóstico e preditivo de resposta, tanto hormonal como quimioterápica.

PAVELIC et al. (1992) estudaram a expressão deste gene em tecido normal e tumoral (*in situ* e invasivo) de mama, por imuno-histoquímica. Encontraram 29% de positividade nos tumores *in situ*, 45% nos invasivos e, nenhum, em tecido normal. A hiperexpressão do c-erbB-2 se correlacionou com o comprometimento axilar.

BARBARESCHI et al. (1992) relacionaram a amplificação e o pior prognóstico às pacientes com axila comprometida, e a hiperexpressão à menor sobrevida, não ao intervalo livre de doença. GUSTERSON et al. (1992) encontraram tumores com hiperexpressão de c-erbB-2 em 16% das pacientes com axila negativa e 19% nas com axila positiva e, em ambos os grupos, houve correlação com receptores de estrógeno, progesterona e grau histológico III. Quando submetidas a tratamento quimioterápico adjuvante a resposta mais efetiva foi observada nas mulheres com tumores c-erbB-2 negativo. Segundo CLARK & McGUIRE (1991) a amplificação não está correlacionada com período livre de doença e nem com sobrevida total.

Já SJÖGREN et al. (1998) encontraram diferença significativa na sobrevida em cinco anos para pacientes c-erbB-2 positiva e negativa (58% e 77%, respectivamente). Em mulheres axila positiva a diferença foi significativa (31% para c-erbB-2 positiva e 61% para c-erbB-2 negativa, respectivamente). A hiperexpressão da proteína mostrou que tem valor preditivo de resposta ruim a hormônio e radioterapia, quando as mulheres apresentam axila positiva. Resultados semelhantes foram encontrados por WRIGHT et al. (1992) e NISKANEN et al. (1997).

Alguns autores o correlacionaram a um fator preditivo de resposta ao tratamento sistêmico, em pacientes com doença avançada (WILLSHER et al., 1996; COOKE et al., 2001).

1.3.4. Fator de proliferação celular (PCNA)

A medida do tempo de duplicação tumoral mostra a agressividade do tumor e é diretamente proporcional à sobrevida da paciente. GERSHON-COHEN, BERGER, KLINKSTEIN, (1963) descreveram, pela primeira vez, o tempo de duplicação dos tumores mamários. Este tempo variou de 23 a 209 dias. Mas, como existem mulheres com tumores grandes e longa sobrevida, DENOIX, (1970) enfatizou que importante é o tempo que o tumor leva para chegar a determinado tamanho, e não o tempo e o tamanho, isoladamente.

O PCNA é uma proteína DNA-polimerase, de 36 kDa, que está presente nas células quando da replicação ou síntese de DNA. Aparece no núcleo na

fase G1 tardia, aumenta durante a fase S e diminui na G2 e M; estando, portanto, correlacionada com a proliferação celular (MATHEWS et al., 1984; CUMMINGS, et al., 1993; TAHAN et al., 1993; KESARI et al., 1997a).

Para sua coloração utiliza-se um anticorpo monoclonal, o PC 10, que reconhece o epítipo do PCNA humano (BIANCHI et al., 1993; CUMMINGS, et al., 1993; TAHAN et al., 1993; AGARWAL et al., 1997; SHEEN-CHEN et al., 1997).

TAHAN et al. (1993) e HAERSLEV & JACOBSEN (1994) relataram estar o alto índice de PCNA relacionado com a piora na sobrevida e ao curto período livre de doença, quando comparado com o baixo índice, e esta diferença foi estatisticamente significativa. Relataram, também, que esta diferença só foi encontrada após cinco anos de seguimento. Outros autores (GASPARINI et al., 1992) não chegaram à mesma conclusão, porém o seguimento foi de quatro anos. CUMMINGS et al. (1993) estudaram 68 mulheres, com seguimento de cinco anos, e não encontraram resultado significativo quando avaliaram PCNA e sobrevida total, sobrevida livre de doença, comprometimento axilar, grau histológico e tamanho tumoral. Concluíram que o PCNA não deve ser usado ainda como marcador tumoral para câncer de mama.

Altos índices de PCNA relacionados com a pior sobrevida em mulheres com axila negativa e sem significância em mulheres com axila positiva, foram encontrados por SCHÖNBORN et al. (1995).

SHEEN-CHEN et al. (1997) chegaram à conclusão que o PCNA era bom fator prognóstico para câncer de mama em mulheres com axila positiva. No

entanto, AGARWAL et al. (1997) não encontraram relação entre PCNA e comprometimento axilar.

Mulheres com axila negativa sem terapia adjuvante após cirurgia foram estudadas por BIANCHI et al. (1993), que concluíram ser o PCNA um bom método prognóstico, mas que deve ser associado a outro fator e não deve ser utilizado sozinho.

A avaliação da possível resposta das pacientes ao câncer de mama é importante para se planejar o tratamento ideal. Um só fator prognóstico não pode determinar todo o *status* da paciente, o médico deve considerar todos os fatores (SHEEN-CHEN, et al., 1997). Neste trabalho, serão estudados alguns deles, na esperança de encontrar os que possam ajudar na decisão do tratamento.

Muitas decisões terapêuticas adjuvantes são tomadas, tendo em vista o estadiamento clínico (tamanho tumoral e envolvimento axilar). No entanto, aproximadamente, 30% das mulheres cujo tumor não apresenta comprometimento axilar, dentro dos primeiros cinco anos de seguimento, irão apresentar recorrência da doença. Com base nisso, é imperativo haver outros fatores prognósticos que orientem para a realização de uma terapia adjuvante nessas mulheres, e assim, evitar tais recidivas.

A maior incidência do câncer de mama, em nosso meio, ocorre no estágio clínico II e, como apresenta uma evolução diferente para pacientes em um mesmo estágio, serão estudados os fatores acima relatados, para compará-los com a evolução das pacientes, analisando, deste modo, sua influência no

decorrer do tempo, sua interação com a patologia, verificando se interferem com a sobrevida total e sobrevida livre de doença. Assim, será possível identificar qual paciente irá se beneficiar com um tratamento mais agressivo e o mesmo será feito precocemente, evitando, assim, uma recidiva da doença.

O estágio clínico II foi estudado por ser encontrado com mais frequência no Serviço de Mastologia do Hospital Universitário São Francisco e em outros serviços de atendimento a tumores.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a relação entre fatores prognósticos clínicos (idade e estado menopausal), anatomopatológicos (comprometimento linfonodal e grau de diferenciação do tumor) e imuno-histoquímicos (RE, proteína p53, c-erbB-2 e PCNA) com a evolução clínica das pacientes portadoras de carcinoma ductal de mama estágio clínico II.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar cada um dos fatores acima, em relação à sobrevida total e sobrevida livre de doença.
2. Avaliar a relação de cada um dos fatores com os demais.
 - 2.a. Avaliar a influência da idade da paciente, em relação aos demais fatores.
 - 2.b. Avaliar o estado menopausal, em relação aos demais fatores.

- 2.c.** Avaliar o grau de diferenciação tumoral, em relação aos demais fatores.
- 2.d.** Avaliar o comprometimento axilar, em relação aos demais fatores.
- 2.e.** Avaliar a presença de receptores de estrógeno, em relação aos demais fatores.
- 2.f.** Avaliar a presença da proteína p53, em relação aos demais fatores.
- 2.g.** Avaliar a presença do c-erbB-2, em relação aos demais fatores.
- 2.h.** Avaliar a presença do PCNA, em relação aos demais fatores.

3. Sujeitos e Métodos

Foram avaliadas, retrospectivamente, 74 pacientes portadoras de câncer de mama estágio clínico II com tipo histológico de carcinoma ductal invasivo sem outras especificações, diagnosticadas e tratadas no período de janeiro de 1984 a fevereiro de 1998, oriundas do Serviço de Mastologia do Hospital Universitário São Francisco, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade São Francisco de Bragança Paulista.

Em dezembro de 2000, quando foi encerrada a coleta de dados, as pacientes estavam nas seguintes condições: 29 vivas sem doença (39,2%); 8 vivas com doença, (10,8%); 22 óbitos, (29,7%); e perda de seguimento em 15 casos (20,3%). A sobrevida foi avaliada em meses. Para as que obituaram, foi contado o tempo decorrido da cirurgia até o momento da morte. Para as vivas, com ou sem doença, o dado foi censurado em dezembro de 2000. Para as que apresentaram perda de seguimento, a censura foi a data da última consulta.

As pacientes foram avaliadas segundo:

A) Fatores prognósticos clínicos:

Estes dados foram coletados dos prontuários das pacientes, arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital Universitário São Francisco.

B) Fatores anatomopatológicos:

Para a avaliação do grau de diferenciação tumoral, foram realizados cortes de quatro micras, montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina-eosina.

C) Fatores imuno-histoquímicos:

Estes exames foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental da UNICAMP. O estudo foi efetuado em blocos de parafina, do qual foram recortados cortes de espessura de quatro a seis micras, montados em lâminas de vidro e corados seguindo a técnica de imunoperoxidase, abaixo descrita:

? Reação de rotina de imunoperoxidase avidina-biotina

1º etapa: desparafinização

1. Xilol I. incubar por 15 minutos à 60º (dissolver a parafina).
2. Xilol II e III. incubar por 10 minutos à temperatura ambiente (retirar excesso de parafina).
3. Álcool I e II. incubar por 2 minutos à temperatura ambiente (hidratação progressiva).

4. Álcool III, 80% e 50%. incubar por 2 minutos à temperatura ambiente (para completar a hidratação).

5. Lavagem em água corrente e destilada.

6. Bloqueio da peroxidase endógena, incubar por 15 minutos à temperatura ambiente em solução 3%

H₂O₂ (30%).....10ml

metanol.....90ml

7. Lavagem em água corrente e destilada. Aguardar em tampão PBS

8. Digestão enzimática

a) sim-incubar os anticorpos em solução de tripsina 0,1% durante 8 minutos a 37°C. Terminado o tempo, lavar em água corrente e destilada. Colocar em BPS.

b) não-colocar em tampão citrato PH 6,0 em microondas a 70°C por 5 minutos, 2 vezes. Deixar esfriar por 10 minutos

- O antígeno pode ficar mascarado durante a fixação com formalina ou outro fixador, quando ocorre formação de ligações químicas. Romper as ligações químicas causadas pela fixação.

9. Retirar reações inespecíficas incubando por 20 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida, seguindo as especificidades dos anticorpos:

Ac. monoclonal-soro normal cavalo ()

Ac. policlonal-soro normal suíno ()

10. Terminado o tempo de incubação, secar o excesso de soro normal com papel de filtro e pingar os Ac. primários específicos. Incubar em câmara úmida durante a noite a 4°C () ou durante o dia à temperatura ambiente durante duas horas ().

2ª etapa: coloração

11. Retirar as lâminas da incubação com Ac. primário e fazer 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada à temperatura ambiente.
12. Secar em papel de filtro e pingar os Ac. secundários especificados abaixo, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente (câmara úmida).

Ac. monoclonal-Ac. secundário biotinilado anti-mouse ()

Ac. policlonal- Ac. secundário Multi-Link ()

13. Terminado o tempo de incubação, fazer 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada à temperatura ambiente.
14. Secar com papel de filtro e pingar complexo ABC (Ac. terciário). Incubar por 30 minutos à temperatura ambiente (câmara úmida).
15. Terminado o tempo colocar as lâminas no tampão PBS e preparar o DAB (diamino benzidina)

DAB.....40 mg

PBS.....100 ml

H₂O₂ (30%).....40 ?l

misturar a solução e colocar as lâminas para corar.

16. Lavar em água corrente e passar em água destilada.
17. Contracorar com hematoxilina de Mayer por 30 a 60 segundos, de acordo com a sua concentração. Lavar novamente.
18. Passar por alguns segundos em água amoniacal e passar por água corrente e destilada.
19. Desidratar e montar.

Foram utilizados para os testes de imuno-histoquímica:

- ? Para a proteína p53 foi utilizado anticorpo monoclonal, clone D07, M7001 Dako, na diluição de 1:100 (marcador nuclear). Classificado de positivo (+), quando 10% ou mais de suas células se coram e negativo (-), quando até 9% (VIACAVA et al., 1999).
- ? Para o c-erbB-2 foi utilizado anticorpo policlonal, A 0485 Dako, na diluição de 1:300 (marcador de membrana). Classificado em positivo (+), quando 10% ou mais de suas células se coram e negativo (-), quando até 9% (QUERZOLI et al., 1998) .
- ? Para o PCNA utilizou-se anticorpo monoclonal, clone PC10, M879 Dako, na diluição de 1:150 (marcador nuclear). Classificado em (+) quando apresenta até 25% de positividade, (++) de 26 a 50%, (+++) de 51 a 75% e (+++++) de 76 a 100% (GARCIA, COLTRERA, GOWN, 1989).
- ? Para o receptor estrogênico utilizou-se anticorpo monoclonal, 1D5 Delsol, na diluição de 1:2000 (marcador nuclear). Classificado em positivo (+), quando 10% ou mais das células se apresentam coradas, ou negativo (-), quando se coram até 9% (QUÉRZOLI et al., 1998).

3.1. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO E EXCLUSÃO DE PACIENTES

As pacientes selecionadas foram as portadoras de câncer de mama, estágio clínico II, diagnosticadas histologicamente e estadiadas segundo classificação internacional da União Internacional Contra o Câncer (UICC) 1987). Os demais estadiamentos foram excluídos.

3.2. DESENHO DO ESTUDO

O estudo foi descritivo, observacional e retrospectivo.

3.3. VARIÁVEIS

? CLÍNICAS

? *idade da paciente*: idade em anos completos, no momento do diagnóstico do câncer de mama.

? *estado menstrual*: dividido em duas categorias: pré e pós menopausa. Menopausadas foram consideradas as mulheres com amenorréia há 12 meses ou mais, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981) ou acima de 50 anos para as histerectomizadas, no momento do diagnóstico.

? ANATOMOPATOLÓGICAS

? *estado dos linfonodos axilares ao exame anatomopatológico*: o número de linfonodos axilares homolaterais retirados e o seu estudo anatomopatológico. Foram divididos em quatro categorias: a) axila negativa – nenhum, b) de um a três, c) de quatro a nove e d) mais de dez linfonodos comprometidos.

? *grau de diferenciação do tumor*: classificado segundo o esquema de BLOOM & RICHARDSON (1957), resultado da avaliação final do grau histológico, nuclear e índice mitótico. Dividido em três categorias: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado).

? IMUNO-HISTOQUÍMICAS

- ? receptor de estrógeno. – dicotomizado em positivo e negativo.
- ? fator de proliferação celular (PCNA). Dividido em quatro categorias: + até 25%, ++ de 26 a 50%, +++ de 51 a 75% e ++++ de 76 a 100% de positividade.
- ? oncogene c-erbB-2. Dicotomizado em positivo e negativo.
- ? proteína p53. Dicotomizado em positivo e negativo.

Estes fatores foram avaliados seguindo a técnica de imunoperoxidase, nos blocos de parafina dos tumores das mulheres tratadas de câncer de mama, estágio clínico II, estudadas neste trabalho.

3.4. FICHA

A ficha, onde foram coletados os dados das pacientes, encontra-se no ANEXO 2.

3.5. COLETA DE DADOS

Os dados foram coletados dos prontuários das pacientes, pelo autor, no SAME do Hospital Universitário São Francisco.

3.6. ACOMPANHAMENTO DAS PACIENTES

As pacientes do Ambulatório de Mastologia do Hospital Universitário São Francisco, portadoras de câncer de mama, após terminarem o tratamento inicial indicado para cada caso, foram acompanhadas semestralmente para avaliar se ainda são portadoras de doença em atividade ou não.

3.7. PROCESSAMENTO DE DADOS

Foi feita uma revisão manual dos dados, com nova leitura das fichas dos prontuários. Os dados foram digitados e processados usando-se os *softwares* "Epi Info" e SAS versão 8.0 para os testes paramétricos ou não paramétricos, quando necessário.

3.8. TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho amostral mínimo foi de 61 casos, calculados para uma probabilidade de 80%, para um $\alpha = 5\%$. O tamanho amostral é dado pela fórmula: $n = z^2 p.q / e^2$, onde, para $\alpha = 5\%$, $z = 1,96$, de uma tabela de coordenadas de uma distribuição normal padrão, e "e", a medida da amplitude de um intervalo de confiança 95% para a probabilidade considerada é fixada em 10%.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estatísticas descritivas, como a média, o desvio-padrão e a mediana, foram utilizadas para caracterizar as variáveis contínuas, enquanto as categóricas (ou contínuas categorizadas) foram descritas conforme suas frequências e porcentagens.

O teste exato de Fisher e o teste qui-quadrado, quando adequados, foram utilizados para testar a associação entre as variáveis independentes e a associação de cada variável independente com o evento óbito ou recidiva (AGRESTI, 1990).

As curvas de sobrevida, estimadas pelo método de Kaplan-Meier (KM), foram utilizadas para descrever as proporções acumuladas de óbitos (sobrevida total) e de recidivas (sobrevida livre de doença), conforme o tempo de acompanhamento das pacientes. Estas curvas foram construídas em algumas situações distintas, conforme categorizações das variáveis independentes, e posteriormente comparadas através do teste de Wilcoxon (COLLETT, 1994).

Em todos os testes estatísticos de hipóteses considerados neste trabalho, obteve-se como significantes os resultados associados a um p valor menor que 5%.

3.10. Comissão de Pesquisa

O presente estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade Ciências Médicas da UNICAMP e pelo Comitê de Ética da Universidade São Francisco, sendo cumpridos os termos da Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde.

4. Resultados

O tempo de seguimento médio das mulheres, desde o tratamento inicial (cirurgia) até o evento: óbito, perda de seguimento ou censura por interrupção do tempo para análise do estudo (dezembro 2000) foi de 68,7 meses (variando de 8 a 196 meses). O período livre de doença foi de 58,1 meses (variando de 3 a 196 meses). Na Tabela 1 pode-se observar a distribuição destas mulheres.

TABELA 1

**TEMPO DE EVOLUÇÃO DAS MULHERES, SEGUNDO
SOBREVIDA E PERÍODO LIVRE DE DOENÇA**

	Sobrevida (em meses)	PLD (em meses)
1. Vivas sem doença (n=29)	86,9	-
2. Vivas com doença (n=8)	81,7	40,5
3. Óbito (n=22)	57,5	41,3
4. Perda de Seguimento (n=15)	42,9	36,3

PLD – período livre de doença

Na Tabela 2, observou-se que a faixa etária mostrou-se significativa para o comprometimento axilar e receptor de estrógeno, onde as mulheres mais idosas apresentaram menor comprometimento axilar e maior positividade para receptor de estrógeno.

TABELA 2

DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES, SEGUNDO FAIXA ETÁRIA, NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO, EM RELAÇÃO AS DEMAIS CARACTERÍSTICAS

Variáveis		Idade				p
		Até 35	36-50	51-65	+ 66	
Menopausa	Sim	0	5 (18,5)	25 (100)	15 (100)	<0,01
	Não	7 (100)	22 (81,5)	0	0	
Grau de Diferenciação tumoral	I	2 (28,6)	2 (7,4)	4 (16)	2 (13,3)	0,44
	II	5 (71,4)	16 (59,3)	15 (60)	11 (73,3)	
	III	0	9 (33,3)	6 (24)	2 (13,3)	
Axila	0	1 (14,3)	5 (18,5)	12 (48)	9 (60)	0,01
	1 – 3	1 (14,3)	14 (51,9)	4 (16)	1 (6,7)	
	4 – 9	2 (28,6)	5 (18,5)	5 (20)	4 (26,7)	
	+ 10	3 (42,9)	3 (11,1)	4 (16)	1 (6,7)	
RE	+	0	7 (25,9)	15 (60)	6 (40)	<0,01
	-	7 (100)	20 (74,1)	10 (40)	9 (60)	
p53	+	1 (14,3)	7 (25,9)	6 (24)	1 (6,7)	0,53
	-	6 (85,7)	20 (74,1)	19 (76)	14 (93,3)	
c-erbB-2	+	2 (28,6)	12 (44,4)	11 (44)	7 (46,7)	0,93
	-	5 (71,4)	15 (55,6)	14 (56)	8 (53,3)	
PCNA	+	1 (71,4)	0	1 (40)	2 (13,3)	0,18
	++	3 (42,9)	8 (29,6)	7 (28)	2 (13,3)	
	+++	3 (42,9)	12 (44,4)	15 (69)	10 (66,7)	
	++++	0	7 (25,9)	2 (8)	1 (6,7)	
n		7 (100)	27 (100)	25 (100)	15 (100)	

*Teste exato de Fisher Os números entre parênteses são porcentagens.

Observa-se nas Figuras 1 e 2, que a faixa etária não foi um fator determinante de maior ou menor sobrevida total e sobrevida livre de doença.

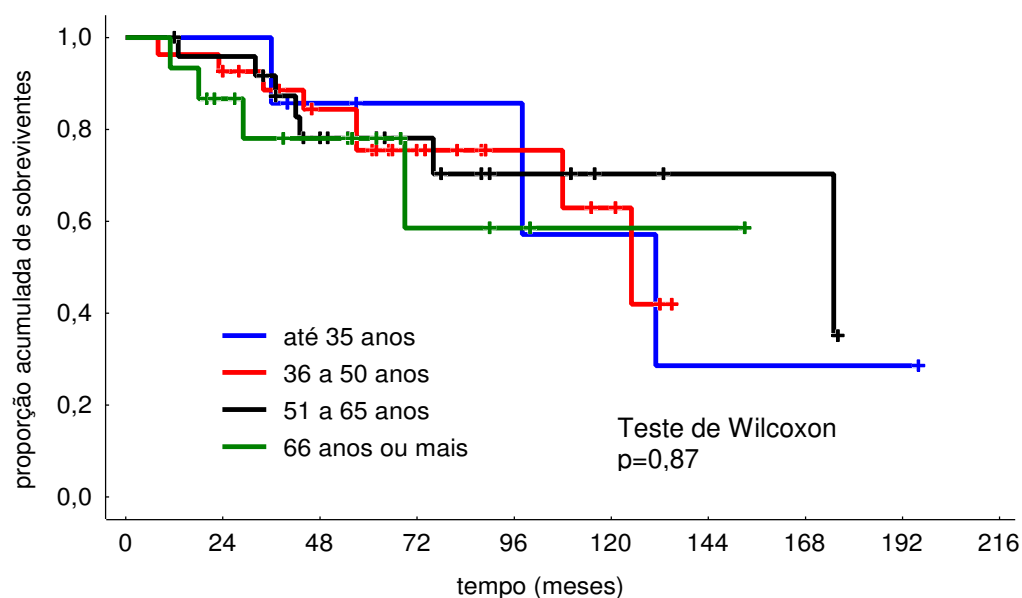


FIGURA 1. Taxa de sobrevida total, segundo faixas etárias.

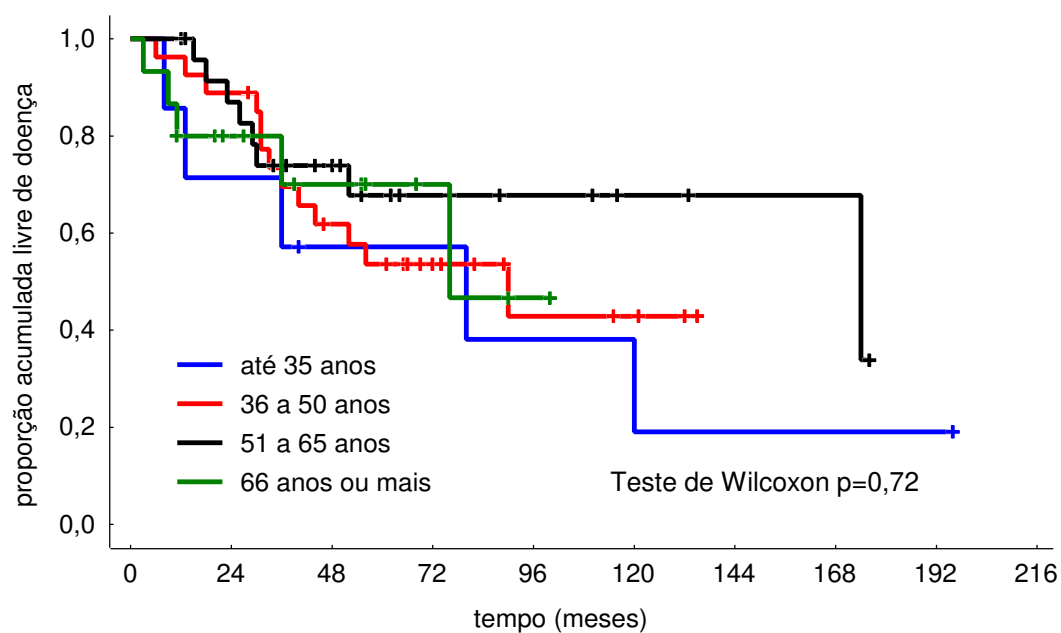


FIGURA 2. Taxa de sobrevida livre de doença, por faixas etárias.

Na Tabela 3, foi observado que 60,8 % das mulheres encontravam-se na pós-menopausa no momento do diagnóstico.

TABELA 3

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DAS MULHERES, SEGUNDO ESTADO MENSTRUAL

	N	%
Pós menopausadas	45	60,8
Pré menopausadas	29	39,2
Total	74	100,0

Houve significância estatística em relação ao comprometimento axilar, onde as mulheres menopausadas apresentaram uma axila menos metastática. A ausência de receptor de estrógeno foi correlacionada com as pré-menopausadas. O PCNA ++++ foi significativamente maior nas pré-menopausadas (Tabela 4).

TABELA 4

**DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES, SEGUNDO ESTADO MENSTRUAL, EM RELAÇÃO ÀS
DEMAIS CARACTERÍSTICAS**

Variáveis		Pré-menopausa		Pós-menopausa		p
		n	%	N	%	
Grau de Diferenciação tumoral	I	4	13,8	6	13,3	0,37*
	II	16	55,2	31	68,9	
	III	9	31,0	8	17,8	
Axila	0	4	13,8	23	51,1	0,02*
	1 a 3	12	41,4	8	17,8	
	4 a 9	7	24,1	9	20,0	
	10 ou +	6	20,7	5	11,1	
RE	+	5	17,2	23	51,1	<0,01*
	-	24	82,8	22	48,9	
p53	+	6	20,7	9	20,0	0,94*
	-	23	79,3	36	80,0	
c-erbB-2	+	12	41,4	20	44,4	0,80*
	-	17	58,6	25	55,6	
PCNA	+	1	3,4	3	6,7	0,05**
	++	10	34,5	10	22,2	
	+++	11	37,9	29	64,4	
	++++	7	24,1	3	6,7	
total		29	100,0	45	100,0	

* Teste qui-quadrado

**Teste exato de Fisher

A sobrevida livre de doença e sobrevida total não mostraram relação estatisticamente significativa com o estado menopausal (Figuras 3 e 4).

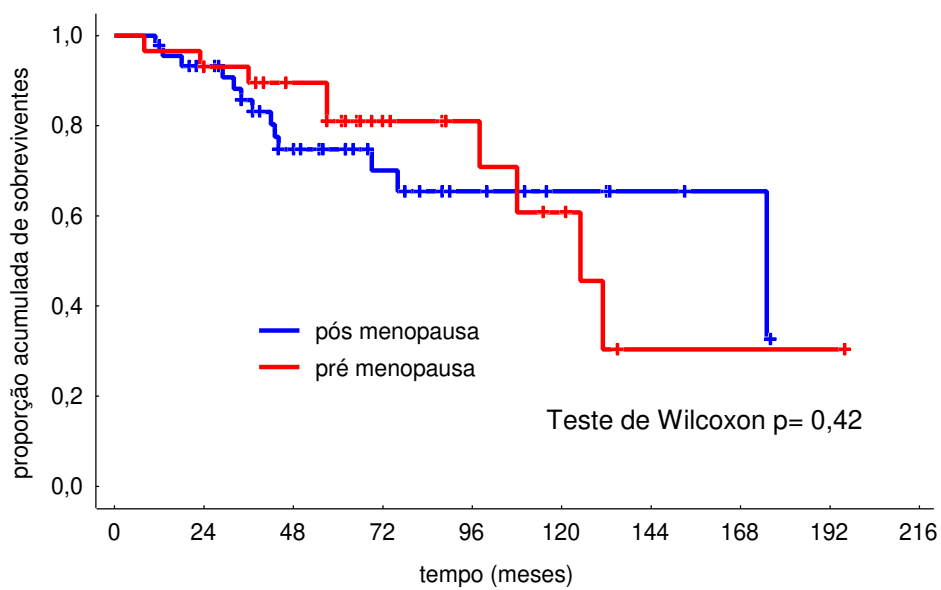


FIGURA 3. Taxa de sobrevida total, segundo estado menopausal.

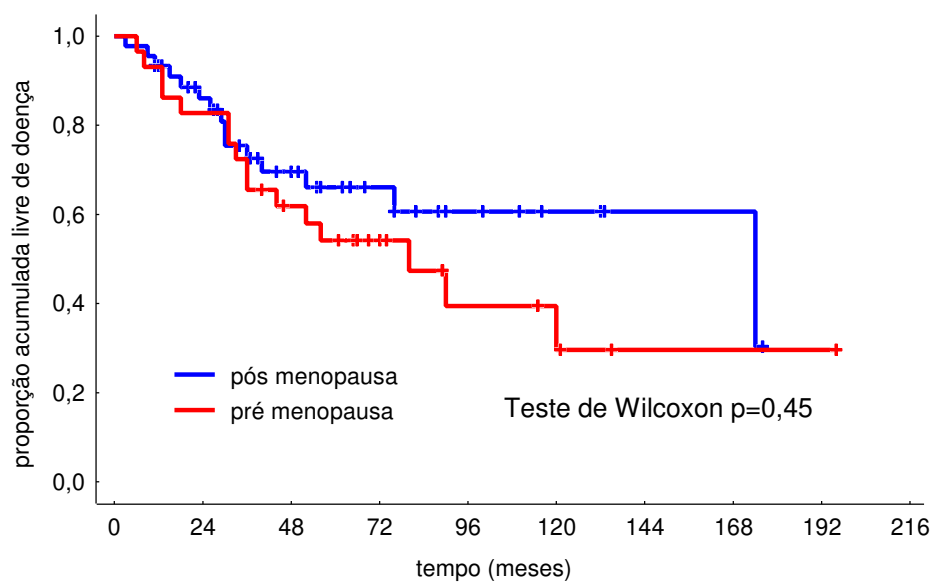


FIGURA 4. Taxa de sobrevida livre de doença, segundo estado menopausal.

Na Tabela 5 encontra-se a distribuição das mulheres segundo o grau de diferenciação dos tumores.

TABELA 5

DISTRIBUIÇÃO DAS MULHERES, SEGUNDO GRAU DE DIFERENCIAÇÃO DE SEUS TUMORES

Grau de diferenciação	n	%
I	10	13,5
II	47	63,5
III	17	22,9
Total	74	100,0

O grau de diferenciação tumoral não mostrou significância em relação à menopausa, comprometimento axilar, RE e proteína p53. No entanto, mostrou significância quanto à ausência de c-erbB-2 nos tumores bem diferenciados e maior positividade para o PCNA nos tumores pouco diferenciados (Tabela 6).

TABELA 6

RELAÇÃO ENTRE GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL E AS DEMAIS VARIÁVEIS

Variáveis		Grau de diferenciação tumoral						p
		I		II		III		
		n	%	N	%	n	%	
Menopausa	Sim	6	60,0	31	66,0	8	47,1	0,39*
	Não	4	40,0	16	34,0	9	52,9	
Axila	0	6	60,0	16	34,0	6	35,3	0,21**
	1 a 3	0	0	15	31,9	5	29,4	
	4 a 9	4	40,0	9	19,2	3	17,6	
	10 ou +	0	0	7	14,9	3	17,6	
RE	+	6	60,0	19	40,4	3	17,6	0,08*
	-	4	40,0	28	59,6	14	82,4	
p53	+	1	10,0	8	17,0	6	35,3	0,26**
	-	9	90,0	39	83,0	11	64,7	
c-erbB-2	+	1	10,0	21	44,7	10	58,8	0,05*
	-	9	90,0	26	55,3	7	41,2	
PCNA	+ / ++	8	80,0	14	29,8	2	11,8	<0,01*
	+++ / ++++	2	20,0	33	70,2	15	88,2	
Total		10	100,0	47	100,0	17	100,0	

*Teste qui-quadrado

**Teste exato de Fisher

A sobrevida total foi significativa para o grau de diferenciação tumoral (Figura 5), mas a sobrevida livre de doença não mostrou ser significativa (Figura 6).

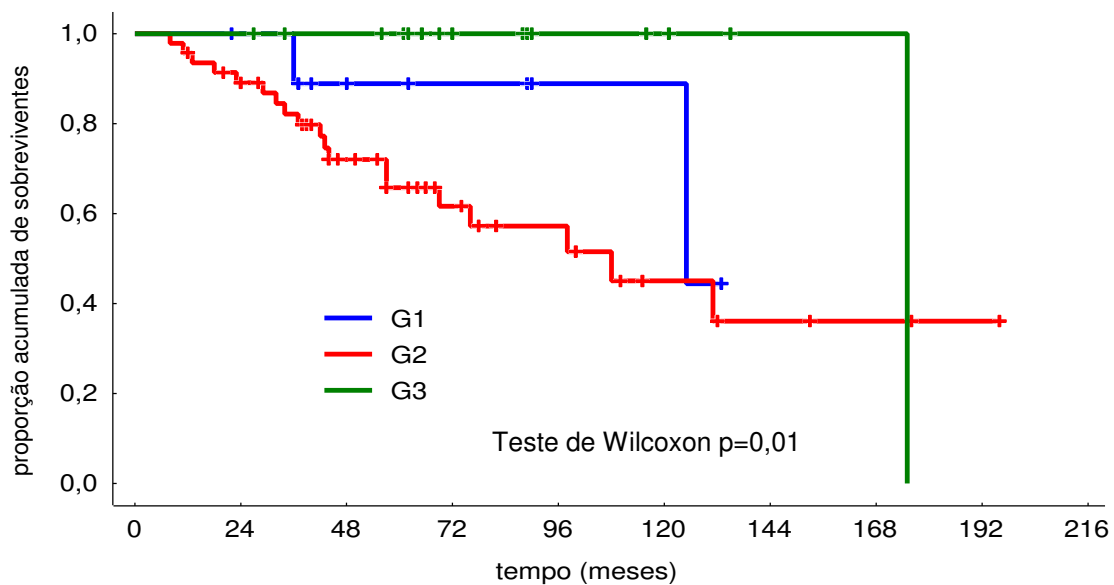


FIGURA 5. Taxa de sobrevida total, segundo grau de diferenciação do tumor.

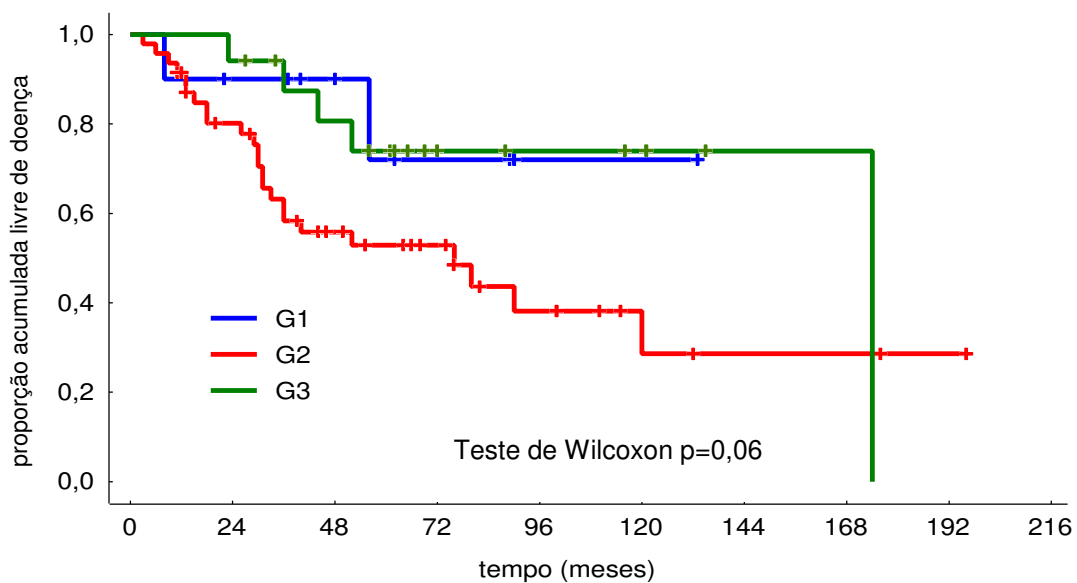


FIGURA 6. Taxa de sobrevida livre de doença, segundo grau de diferenciação do tumor.

A Tabela 7 mostra a distribuição das pacientes, segundo o comprometimento axilar. A maioria das mulheres (62,2%) apresentou comprometimento dos linfonodos após tratamento cirúrgico.

TABELA 7

DISTRIBUIÇÃO DAS MULHERES, SEGUNDO O COMPROMETIMENTO AXILAR

Comprometimento axilar	n	%
N0	28	37,8
1 a 3	20	27,0
4 a 9	16	21,6
10 ou +	10	13,5
Total	74	100,0

As variáveis grau de diferenciação tumoral, RE, proteína p53, c-erbB-2 e PCNA não mostraram significância estatística em relação à axila. Somente o estado menopausal mostrou ser significativo (Tabela 8).

TABELA 8

CORRELAÇÃO ENTRE O COMPROMETIMENTO AXILAR E AS DIVERSAS VARIÁVEIS

Variáveis		Comprometimento axilar								p
		0		1 a 3		4 a 9		10 ou +		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Menopausa	Sim	23	82,1	8	40,0	9	56,3	5	50,0	0,02*
	Não	5	17,9	12	60,0	7	43,7	5	50,0	
Grau de Diferenciação tumoral	I	6	21,4	0	0	4	25,0	0	0	0,21**
	II	16	57,2	15	75,0	9	56,3	7	70,0	
	III	6	21,4	5	25,0	3	18,7	3	30,0	
RE	+	11	39,3	6	30,0	7	43,8	4	40,0	0,85*
	-	17	60,7	14	70,0	9	56,3	6	60,0	
p53	+	6	21,4	5	25,0	2	12,5	2	20,0	0,82**
	-	22	78,6	15	75,0	14	87,5	8	80,0	
c-erbB-2	+	12	42,9	9	45,0	7	43,8	4	40,0	1,00*
	-	16	57,1	11	55,0	9	56,3	6	60,0	
PCNA	+/++	8	28,6	7	35,0	6	37,5	3	30,0	0,93*
	+++ / +++++	20	71,4	13	65,0	10	62,5	7	70,0	
Total		28	100,0	20	100,0	16	100,0	10	100,0	

*Teste qui-quadrado

**Teste exato de Fisher

A sobrevida total não se mostrou significativa (Figura 7), porém a sobrevida livre de doença mostrou-se significativa em relação ao comprometimento linfonodal (Figura 8).

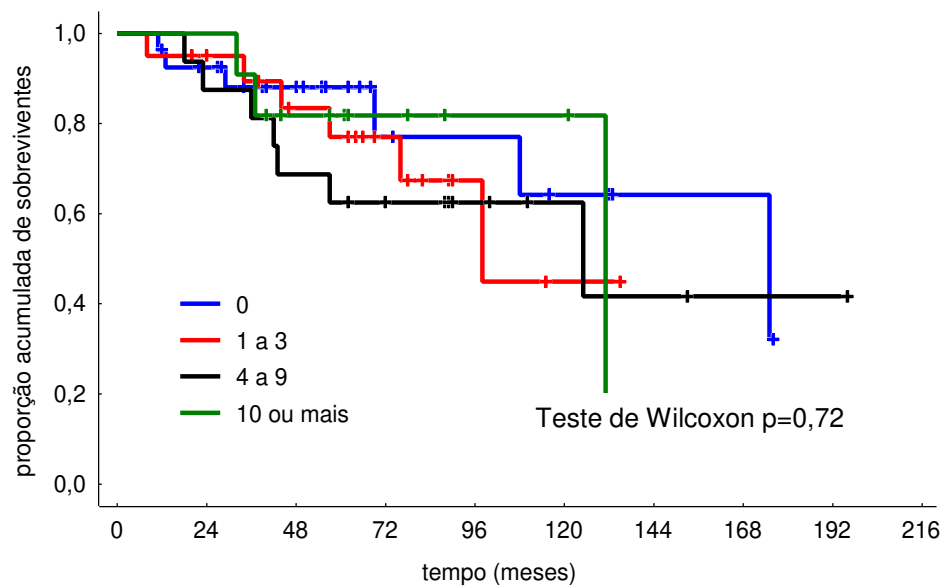


FIGURA 7. Taxa de sobrevida total, segundo comprometimento linfonodal.

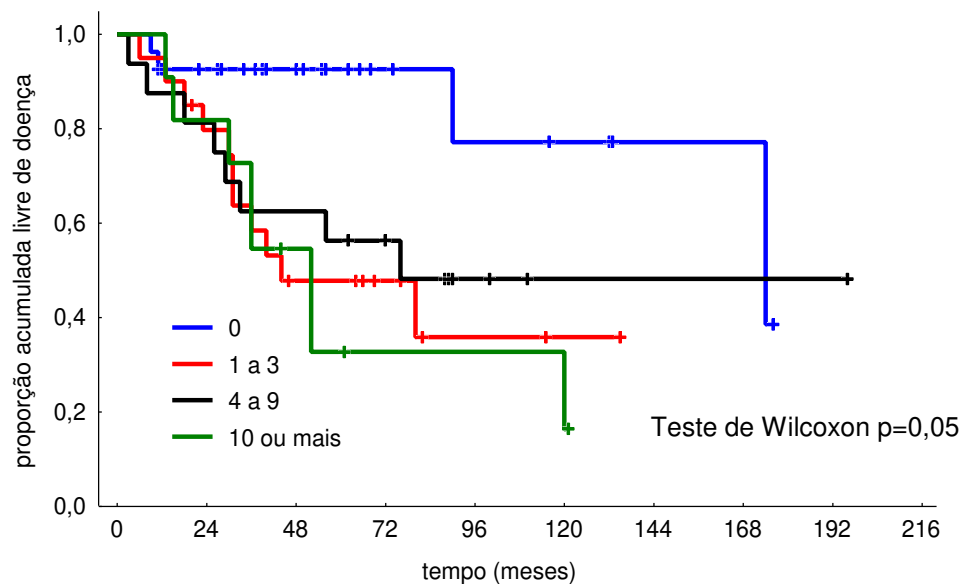


FIGURA 8. Taxa de sobrevida livre de doença, segundo comprometimento linfonodal.

A Tabela 9 mostra a distribuição das mulheres, referente à positividade para receptores de estrógeno.

TABELA 9

DISTRIBUIÇÃO DAS MULHERES, SEGUNDO POSITIVIDADE PARA RECEPTORES DE ESTRÓGENO

Receptor de estrógeno	N	%
+	28	37,8
-	46	62,2
Total	74	100,0

A positividade para RE mostrou-se significativa apenas quanto ao estado menopausal (Tabela 10). Os tumores pouco diferenciados (G III), apresentaram uma baixa positividade de receptores, enquanto que os bem diferenciados (G I) baixa negatividade.

TABELA10

CORRELAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES DE ESTRÓGENO, E AS DIVERSAS VARIÁVEIS

Variáveis		Receptor de estrógeno				p
		+		−		
		n	%	n	%	
Menopausa	Sim	23	82,1	22	47,8	<0,01*
	Não	5	17,9	24	52,2	
Grau de Diferenciação tumoral	I	6	21,4	4	8,7	0,08*
	II	19	67,9	28	60,9	
	III	3	10,7	14	30,4	
axila	0	11	39,3	17	37,0	0,85*
	1 a 3	6	21,4	14	30,4	
	4 a 9	7	25,0	9	19,6	
	10 ou +	4	14,3	6	13,0	
P53	+	5	17,9	10	21,7	0,69*
	-	23	82,1	36	78,3	
c-erbB-2	+	11	39,3	21	45,7	0,59*
	-	17	60,7	25	54,3	
PCNA	+/++	9	32,2	15	32,6	0,97*
	+++ /++++	19	67,8	31	67,4	
Total		28	100,0	46	100,0	

*Teste qui-quadrado

**Teste exato de Fisher

A sobrevida total e sobrevida livre de doença não apresentaram significância em relação aos receptores de estrógeno (Figuras 9 e 10).

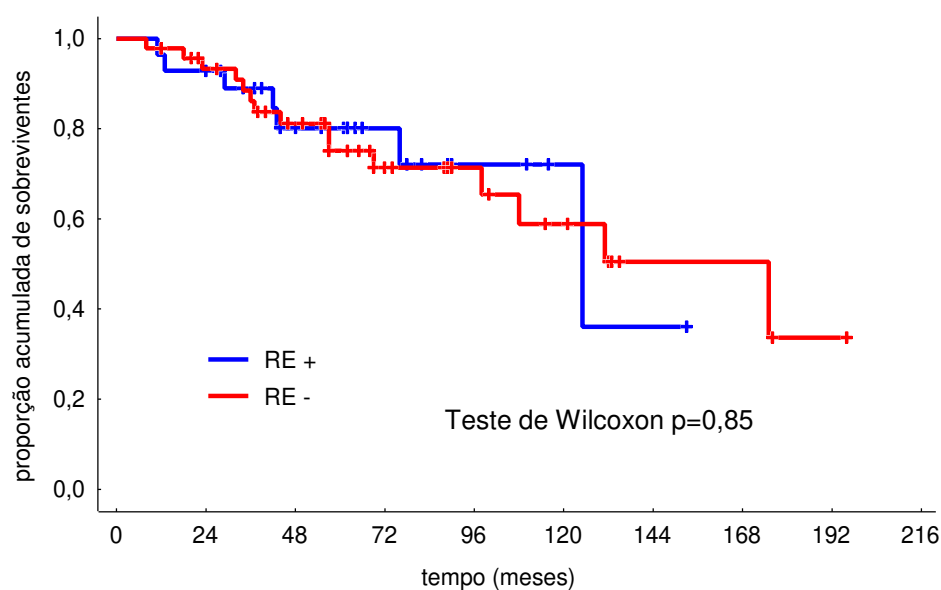


FIGURA 9. Taxa de sobrevida total, segundo presença de receptores de estrógeno.

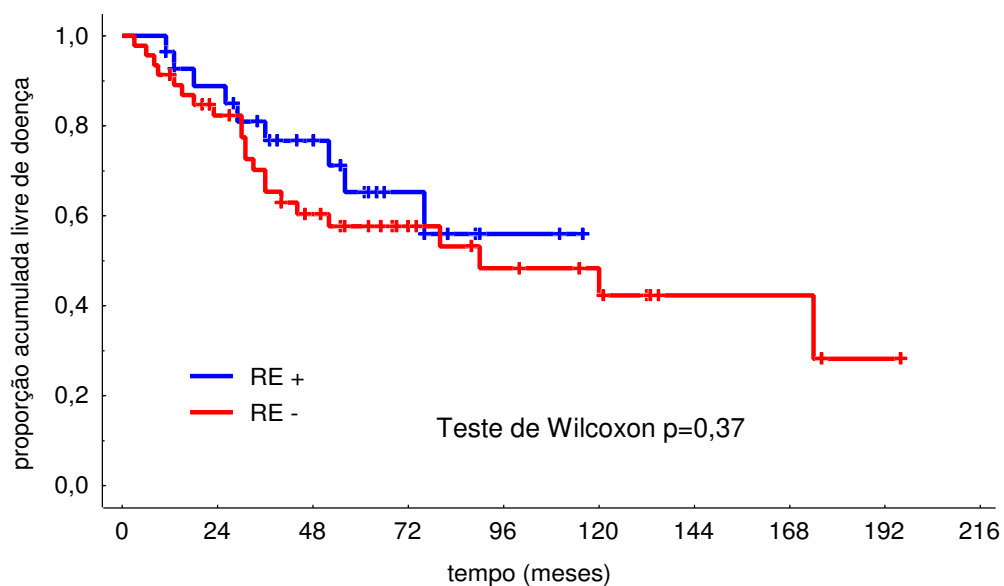


FIGURA 10. Taxa de sobrevida livre de doença, segundo presença de receptores de estrógeno.

TABELA 11**DISTRIBUIÇÃO DAS MULHERES, SEGUNDO EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53**

p53	n	%
+	15	20,3
-	59	79,7
Total	74	100,0

A proteína p53 mostrou ser estatisticamente significativa para o PCNA. Quanto menor o índice de proliferação celular, menor a positividade para a proteína p53.

TABELA 12**CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 E AS DEMAIS VARIÁVEIS**

Variáveis		p53				p
		+		-		
		n	%	n	%	
Menopausa	Sim	9	60,0	36	61,0	0,94*
	Não	6	40,0	23	39,0	
Grau de Diferenciação tumoral	I	1	6,7	9	15,3	0,26**
	II	8	53,3	39	66,1	
	III	6	40,0	11	18,6	
Axila	0	6	40,0	22	37,3	0,82**
	1 a 3	5	33,3	15	25,4	
	4 a 9	2	13,3	14	23,7	
	10 ou +	2	13,3	8	13,6	
RE	+	5	33,3	23	39,0	0,69*
	-	10	66,7	36	61,0	
c-erbB-2	+	9	60,0	23	39,0	0,14*
	-	6	40,0	36	61,0	
PCNA	+/++	1	6,7	23	39,0	0,03**
	+++ /++++	14	93,3	36	61,0	
Total		15	100,0	59	100,0	

*Teste qui-quadrado

**Teste exato de Fisher

A sobrevida livre de doença e sobrevida total não mostraram diferença significativa quanto à expressão da proteína p53 (Figuras 11 e 12).

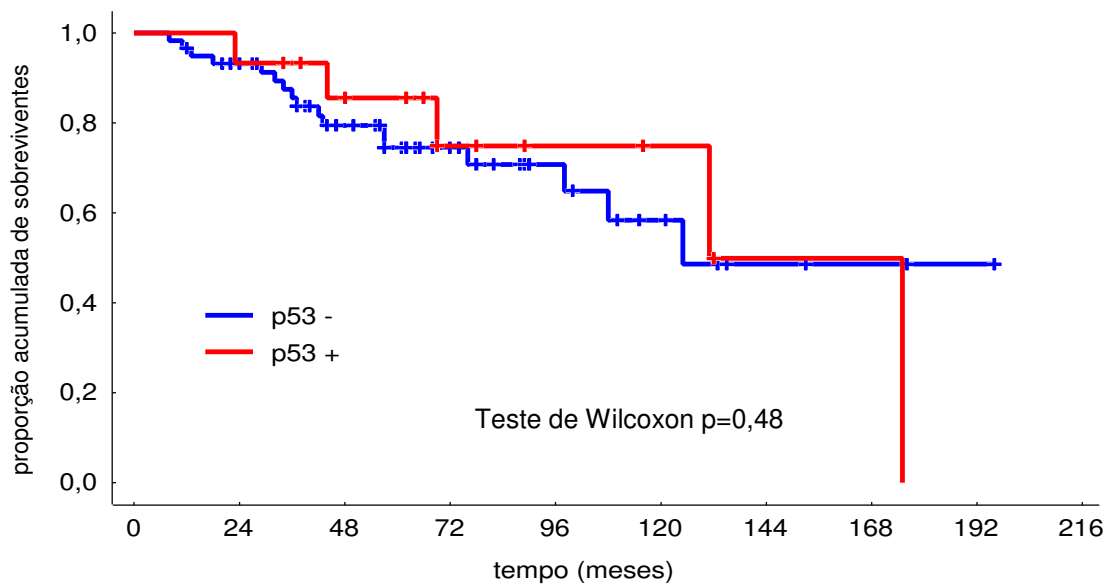


FIGURA 11. Taxa de sobrevida total, segundo expressão da proteína p53.

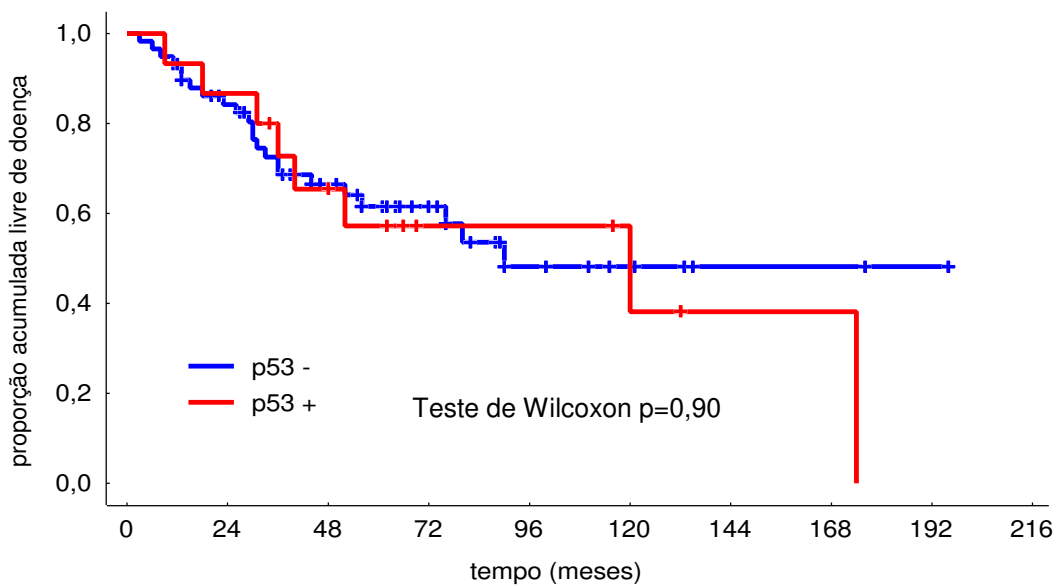


FIGURA 12. Taxa de sobrevida livre de doença, segundo expressão da proteína p53.

TABELA 13**DISTRIBUIÇÃO DAS MULHERES, SEGUNDO c-erbB-2**

c-erbB-2	n	%
+	32	43,2
-	42	56,8
Total	74	100,0

O c-erbB-2 mostrou significância somente em relação à diferenciação tumoral. Tumores pouco diferenciados apresentaram uma maior positividade para o c-erbB-2.

TABELA 14**CORRELAÇÃO ENTRE c-erbB-2 COM AS DEMAIS VARIÁVEIS**

Variáveis		c-erbB-2				p
		+		-		
		N	%	n	%	
Menopausa	Sim	20	62,5	25	59,5	0,80*
	Não	12	37,5	17	40,5	
Grau de Diferenciação tumoral	I	1	3,1	9	21,4	0,05*
	II	21	65,6	26	61,9	
	III	10	31,3	7	16,7	
Axila	0	12	37,5	16	38,1	0,99*
	1 a 3	9	28,1	11	26,2	
	4 a 9	7	21,9	9	21,4	
	10 ou +	4	12,5	6	14,3	
RE	+	11	34,4	17	40,5	0,59*
	-	21	65,6	25	59,5	
P53	+	9	28,1	6	14,3	0,14*
	-	23	71,9	36	85,7	
PCNA	+ / ++	7	21,9	17	40,5	0,09*
	+++ / ++++	25	78,1	25	59,5	
Total		32	100,0	42	100,0	

*Teste qui-quadrado

**Teste exato de Fisher

A sobrevida livre de doença e sobrevida total não mostraram diferença significativa em relação ao c-erbB-2 (Figuras 13 e 14).

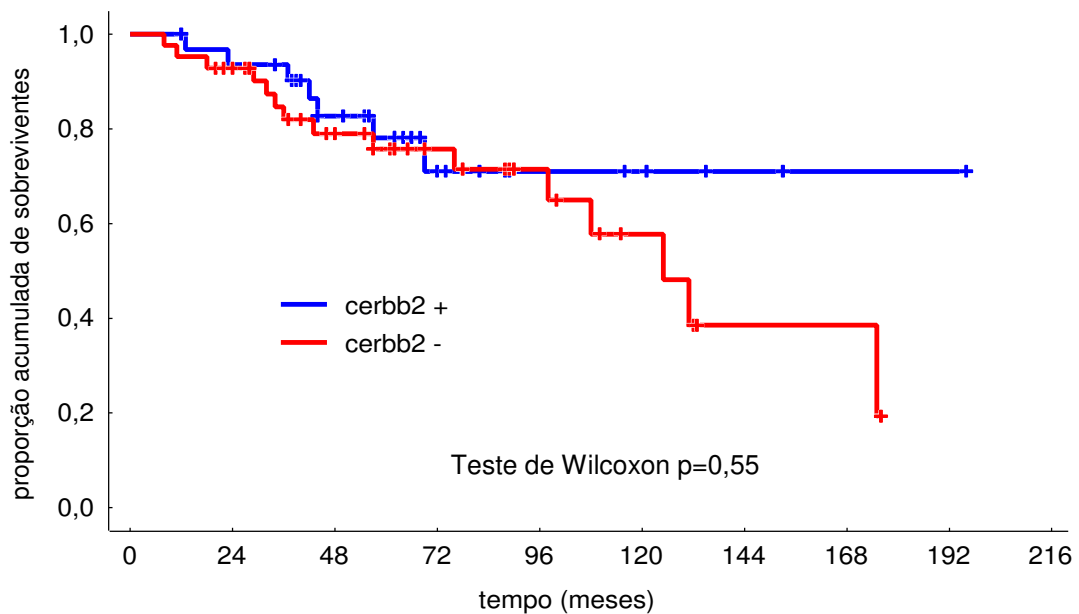


FIGURA 13. Taxa de sobrevida total , segundo expressão de c-erbB-2.

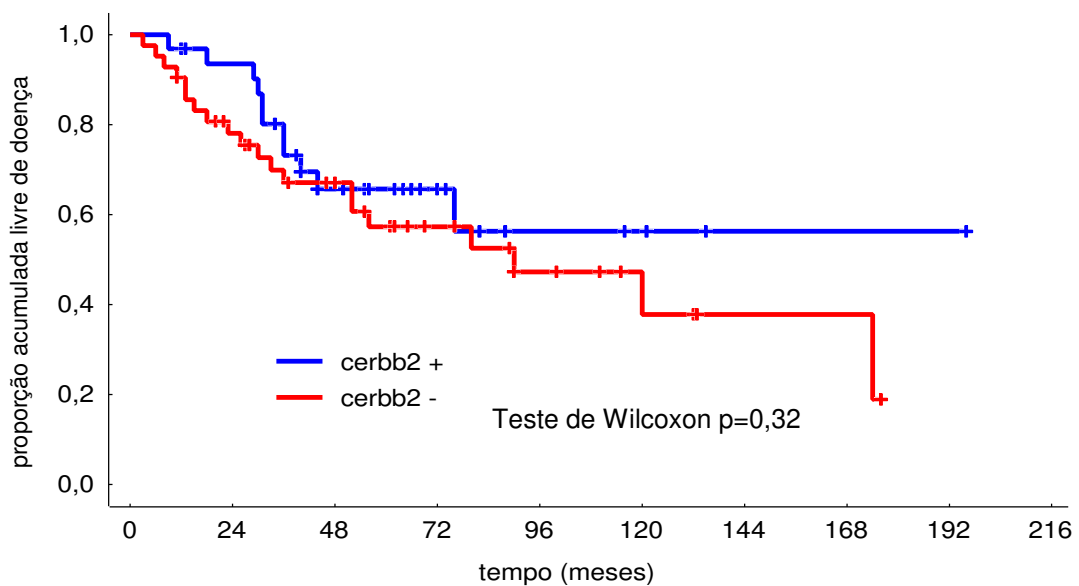


FIGURA 14. Taxa de sobrevida livre de doença, segundo expressão de c-erbB-2.

TABELA 15**DISTRIBUIÇÃO DAS MULHERES, SEGUNDO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR**

PCNA	n	%
+	4	5,4
++	20	27,0
+++	40	54,1
++++	10	13,5
Total	74	100,0

A Tabela 16 mostra que existe significância entre grau de diferenciação tumoral e PCNA (quanto mais diferenciado o tumor, menor a positividade para o PCNA). E a negatividade da proteína p53 também foi significativa quanto à proliferação celular (quanto menor a proliferação celular do tumor, maior a negatividade para a proteína p53).

TABELA 16

CORRELAÇÃO ENTRE PCNA E AS DIVERSAS VARIÁVEIS

Variáveis		PCNA				p
		+ / ++		+++ / ++++		
		n	%	n	%	
Menopausa	Sim	13	54,2	32	64,0	0,45*
	Não	11	45,8	18	36,0	
Grau de Diferenciação tumoral	I	8	33,3	2	4,0	<0,01*
	II	14	58,4	33	66,0	
	III	2	8,3	15	30,0	
	axila	0	8	33,3	20	
	1 a 3	7	29,2	13	26,0	0,93*
	4 a 9	6	25,0	10	20,0	
	10 ou +	3	12,5	7	14,0	
RE	+	9	37,5	19	38,0	0,97*
	-	15	62,5	31	62,0	
P53	+	1	4,1	14	28,0	0,03**
	-	23	95,9	36	72,0	
c-erbB-2	+	7	29,1	25	50,0	0,09*
	-	17	70,9	25	50,0	
Total		24	100,0	50	100,0	

*Teste qui-quadrado

**Teste exato de Fisher

O PCNA não mostrou ser significativo para a sobrevida total e sobrevida livre de doença (Figuras 15 e 16).

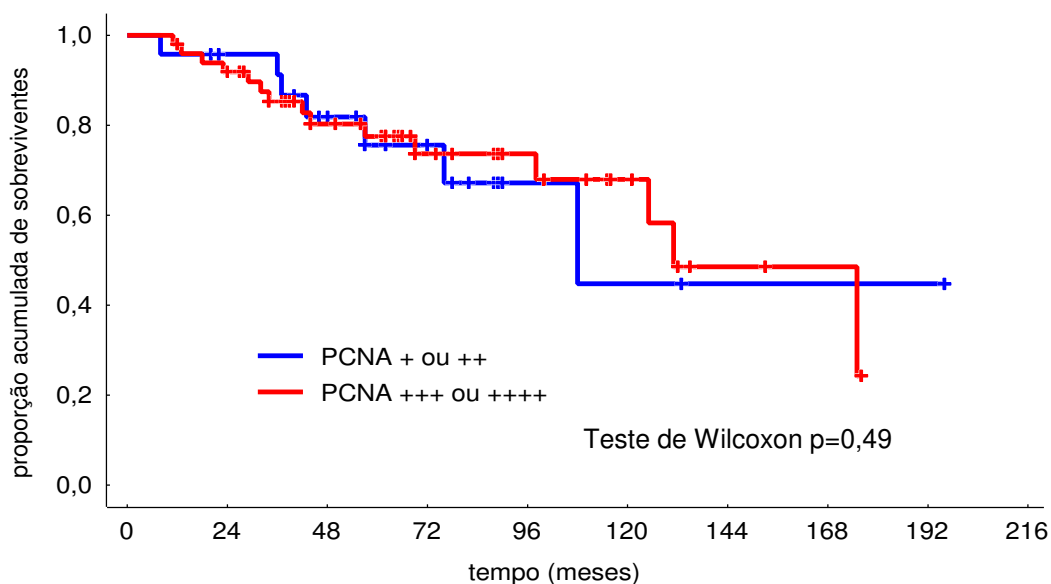


FIGURA 15. Taxa de sobrevida total, segundo expressão do PCNA.

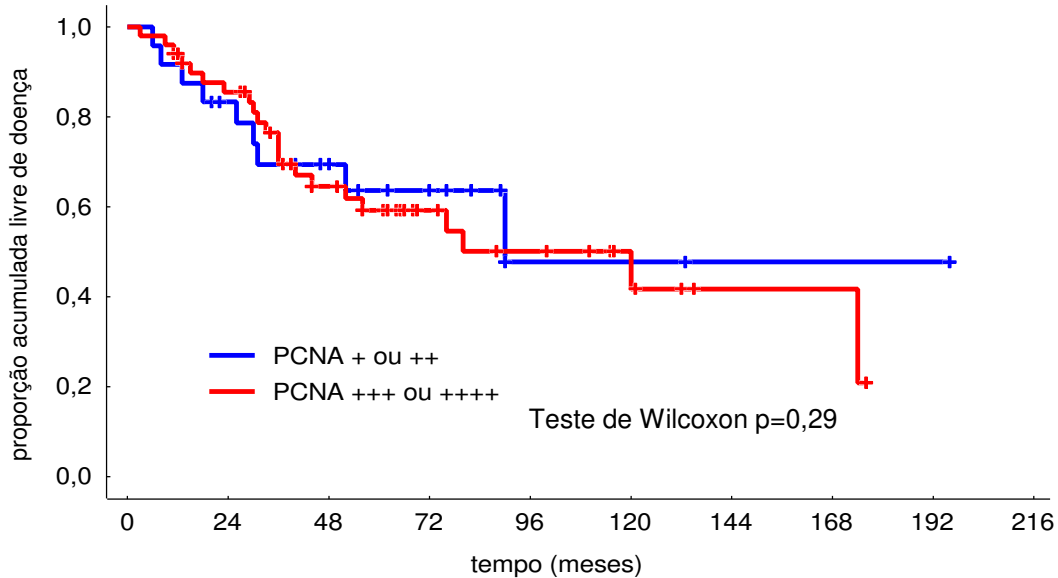


FIGURA 16. Taxa de sobrevida livre de doença, segundo expressão do PCNA.

5. Discussão

O câncer de mama é uma doença crônica, de evolução imprevisível, variando muito seu comportamento entre as mulheres, mesmo quando pareadas segundo parâmetros clínicos de maior importância.

Algumas vezes tumores grandes evoluem bem, ao passo que tumores milimétricos podem evoluir rapidamente, com óbito precoce. O seu controle pode ser hormonal e/ou quimioterápico, porém, a grande maioria das mulheres portadoras de câncer de mama irá, provavelmente, morrer em decorrência da evolução desta patologia.

O prognóstico destas mulheres tem sido determinado por alguns aspectos patológicos bem estabelecidos, como grau de diferenciação tumoral, tamanho do tumor e envolvimento axilar. O mais confiável deles, isoladamente, é o comprometimento linfonodal. As pacientes com axila negativa têm um baixo risco de recorrência da doença; entretanto, aproximadamente 30% delas, após aparente cura cirúrgica, irão apresentar doença em evolução. A quimioterapia adjuvante pode reduzir consideravelmente este risco; no entanto, não é um

tratamento inócuo. Tendo isto como certo, procura-se identificar alguns fatores que possam indicar quem irá se beneficiar do tratamento preventivo (adjuvante).

Recentemente, muitos outros parâmetros moleculares têm sido estudados como fatores prognósticos, incluindo genes oncosuppressores e proto-oncogenes.

Neste trabalho procuramos avaliar alguns parâmetros, cujos valores prognóstico e preditivo já são conhecidos, como estado axilar, grau de diferenciação tumoral e receptores de estrógeno e alguns outros que estão em estudo há alguns anos, porém, com resultados ainda conflitantes, como c-erbB-2, proteína p53 e PCNA. Estudamos também idade da paciente ao diagnóstico e estado menopausal, em um grupo homogêneo de pacientes já que todas apresentavam o mesmo estágio clínico.

Neste estudo, as 74 mulheres avaliadas apresentaram idade média de 53,1 anos, variando de 30 a 82, sendo que idade inferior a 50 anos foi encontrada em 45,9 % delas. HORST et al. (1994) encontraram idade média de 54,1 anos, em mulheres estudadas no Rio Grande do Sul. EL-TAMER & WAIT (1999) referiram idade média, no ato do diagnóstico, entre as negras americanas de 54 anos e entre as caucasianas de 62 anos. PINHEIRO (1986), no Rio de Janeiro, encontrou idade média de 54,2 anos. Houve concordância com nossas pacientes, tendo apenas as caucasianas apresentado a doença em idade mais avançada, provavelmente devido a fatores hereditários. A idade entre 40 e 60 anos foi encontrada em 51,6%, coincidente com a literatura (PINHEIRO, 1986; HORST, 1994).

HOST & LUND (1986) referiram que as mulheres com idade ao diagnóstico entre 35 e 49 anos têm melhor prognóstico. Aquelas entre 50 e 74 anos, apresentam um prognóstico intermediário e as em idades extremas, menor que 34 e superior a 75 anos, evoluem pior, provavelmente pelas características do tumor nas jovens e pelo tratamento incompleto na idosa.

Quando foram relacionadas as variáveis grau de diferenciação tumoral, expressão da proteína p53, c-erbB-2 e PCNA com a idade no momento do diagnóstico, estas não apresentaram significado estatístico.

Os receptores de estrógeno mostraram diferença significativa, quando relacionados à idade, sendo que as mais jovens apresentaram maior negatividade para estes receptores e maior comprometimento linfonodal, sendo, portanto, submetidas a tratamento complementar mais agressivo.

A sobrevida total e sobrevida livre de doença, em relação à faixa etária, não mostraram diferenças significativas. Estas diferenças não foram significativas, provavelmente devido ao tratamento complementar ao qual as mais jovens (pré menopausa) se submeteram.

Mais da metade de nossas pacientes (60,8 %) estavam na pós-menopausa no momento do diagnóstico. Mas este fato não apresentou relação significativa com grau de diferenciação tumoral, proteína p53 e c-erbB-2.

O comprometimento axilar mostrou-se significativo onde as mais jovens apresentaram axila mais comprometida ($p=0,02$).

O estado menopausal mostrou uma associação significativa ($p=0,01$) para receptor de estrógeno, onde as mais jovens apresentaram tumores com menores índices de positividade para estes receptores. O PCNA também se manifestou significativo em relação ao estado menopausal ($p=0,05$). O tratamento complementar mostrou ser significativo, onde 93,1% das pré-menopausadas o receberam.

A sobrevida total e sobrevida livre de doença não apresentaram diferença significativa em relação a esta variável. As curvas de Kaplan Meier (KM) não demonstraram diferenças significativas, devido, provavelmente, ao fato de que as pacientes pré-menopausadas e com maior comprometimento axilar terem recebido tratamento complementar.

As mulheres deste estudo apresentaram, em sua maioria, tumores moderadamente diferenciados. A distribuição das mesmas, segundo o grau de diferenciação do tumor, não mostrou significância quanto às variáveis estado menopausal, axila, RE e proteína p53.

Encontrou-se uma diferença significativa em relação ao c-erbB-2, onde tumores pouco diferenciados apresentaram maior presença. O PCNA também se mostrou significativo ($p<0,01$), os tumores bem diferenciados (G I) apresentaram PCNA +/++ e os pouco diferenciados (G III) PCNA +++/++++.

As curvas de KM mostraram ser significativa para a sobrevida total ($p=0,01$) e não significativa, porém com tendência a melhor sobrevida livre de doença, para as pacientes com G I ($p=0,06$). Esta significância para sobrevida

total mostrou uma melhor evolução para G III, mas, possivelmente, isto se deve ao fato da amostra ser muito pequena, onde verificamos que a maioria dos óbitos se deu no G II (intermediário). Os outros três óbitos ocorreram: dois no grupo I e um no III, o que dificulta muito a interpretação e uma conclusão clara. Porém, o que pode nos orientar a este resultado é que as mulheres com tumores G III apresentaram a grande maioria axila metastática (64,7%), receptores de estrógeno negativo (82,4%), c-erbB-2 positivo (58,8%) e PCNA elevado (88,2%); mas, como a terapia adjuvante foi orientada pelo estado axilar, 64 % delas receberam tratamento complementar .

ELSTON & ELLIS (1991); PINDER et al. (1995); NISKANEN et al. (1997); PUGLISI et al. (1999) relataram ter encontrado uma sobrevida total e sobrevida livre de doença significativamente maiores para o G I.

Neste estudo houve sete casos de recidiva local (9,45%), das quais cinco no G II, uma no G I e outra no G III. Fica, portanto, impossível com casuística tão pequena afirmar que a sobrevida livre de doença é melhor no GH I. Entretanto, a recidiva local no G I ocorreu após 109 meses e no G III após 36 meses.

A axila é considerada um dos mais importantes fatores prognósticos (CARTER, et al., 1989; HAN, et al., 1997; FITZGIBBONS et al., 2000).

Ao analisar a axila, verificamos que a grande maioria de nossas pacientes (62,2%) apresentou-a comprometida, mostrando que estas mulheres tiveram seu diagnóstico firmado tardiamente, o que compromete a sobrevida. As mulheres menopausadas apresentaram um maior percentual de axila negativa.

Nossa média de linfonodos dissecados assemelha-se à encontrada por Fisher, 17 (CEZAR Jr, 1995) e o índice de comprometimento é bem semelhante ao encontrado nas pacientes da Santa Casa de Sorocaba (BRONDI, 1987).

Estudamos, juntamente com a axila, o grau de diferenciação tumoral, expressão da proteína p53, c-erbB-2, PCNA, RE e em nenhum deles houve correlação significativa.

A literatura mostra uma melhor sobrevida em cinco anos para as mulheres com axila negativa (VALAGUSSA, et al., 1978; FENTIMAN, et al., 1984; STRAX, 1991; PUGLISI et al., 1999). Nossos resultados discordam da literatura, pois a sobrevida total não foi expressiva nas pacientes com axila negativa sobre as com axila comprometida. No entanto, a sobrevida livre de doença foi concordante com a literatura, onde as sem comprometimento linfonodal apresentaram um maior intervalo livre de doença.

O tratamento complementar mostrou ser significativo ($p < 0,01$) em relação ao comprometimento axilar, pois ao analisar axila versus tratamento complementar, verificamos que 91,3% das mulheres com comprometimento linfonodal foram tratadas com rádio e/ou quimioterapia após o tratamento cirúrgico (as que não o receberam foi por opção própria, apesar de serem esclarecidas da necessidade). Das mulheres com axila negativa 3,5% delas apresentaram recidiva local da doença, enquanto que naquelas com axila comprometida este percentual foi de 13%. Esta diferença mostra que as pacientes submetidas a

tratamento complementar têm melhor sobrevida, o que é mostrado pela curva de KM, onde temos um resultado não significativo para sobrevida total.

O RE foi positivo em 37,8% das mulheres deste estudo, mas mostrou uma associação estatisticamente significativa somente em relação ao estado menopausal, onde mulheres na pós-menopausa apresentaram uma maior positividade de RE.

Apesar de ser não significativa, observamos que o G I apresentou maior positividade para os receptores de estrógeno, enquanto que o G III revelou maior ausência destes receptores. Houve semelhança no G II, revelando certa tendência ($p=0,08$) para a presença de receptores nos tumores mais diferenciados.

A presença de receptores estrogênicos está correlacionada com prognóstico favorável e é preditiva de resposta à terapia hormonal (SUNDBLAD et al., 1992; FUQUA, 1994; TORRES et al., 1996; OSBORNE, 1998).

Para o comprometimento axilar, proteína p53, c-erbB-2 e PCNA não houve nenhuma diferença. E não houve diferenças significativas tanto para sobrevida total como para sobrevida livre de doença, concordando com SUNDBLAD et al., (1992).

As mulheres com ausência de receptores hormonais em seus tumores receberam tratamento complementar em 73,9% dos casos.

Nossa casuística mostrou 20,3% de positividade para a proteína p53 e esta foi significativa somente em relação ao PCNA, onde a positividade para

aquele foi maior nas pacientes com tumores com altos índices deste (maior de 50%), sendo o mesmo encontrado por BARBARESCHI et al., (1992); HAERSLEV & JACOBSEN (1995); KESARI et al. (1997b).

KESARI et al., (1997b) relatou sua freqüência de p53 entre 15% e 50% nos tumores de mama, BARNES et al. (1993) em 19%, BARBARESCHI et al. (1992) em 25,8%, DABBS (1995) em 13%, HAN et al. (1997) em 41%, ALEXIEV et al. (1997) em 28,6%, LESEC et al. (1997) em 27% e HERCHENHORN et al. (2000) em 47%.

Em relação ao grau de diferenciação do tumor verificou-se o dobro de negatividade para p53 nos tumores diferenciados e o dobro de positividade nos tumores pouco diferenciados, porém, esta diferença não foi significativa, provavelmente devido a pequena casuística.

O comprometimento axilar e os receptores de estrógeno foram negativos e positivos nas mesmas proporções.

O c-erbB-2 foi maior em positividade para p53 positivo e mais negativo para p53 negativo, não havendo relação entre eles, como também mostraram HAERSLEV & JACOBSEN (1995).

ALLRED et al., (1998) e COLLEONI et al. (1999) referiram-se ao p53 como bom fator prognóstico e preditivo de resposta, tanto para quimioterapia como hormonioterapia, em contradição às conclusões de HAERSLEV & JACOBSEN (1995) e HAN et al. (1997). ALEXIEV et al. (1997) referiram-se ao

p53 somente como bom fator prognóstico. BARNES et al. (1993) encontraram para mulheres com e sem comprometimento axilar, menor sobrevida total e menor sobrevida livre de doença, para as pacientes com positividade para a proteína. O pior prognóstico foi referido por BARNES et al. (1993), HAN et al. (1997) e LESEC et al. (1997).

A sobrevida total e a sobrevida livre de doença não foram estatisticamente significativas, concordante com HAERSLEV & JACOBSEN (1995) e discordante de BARNES et al. (1993). Das pacientes p53 positivo, 66% delas receberam tratamento complementar.

Pesquisando o c-erbB-2, PAVELIC et al. (1992) encontraram 45% de positividade nos tumores invasivos. WRIGHT et al. (1989), LOVEKIN et al. (1991), PAIK et al. (1991), PERREN (1991), GELMANN & LIPPMAN (1994), QUÉNEL et al. (1995), ALLRED et al., (1998), RÉVILLION et al. (1998), SJÖGREN et al. (1998) e VAN DE VIJVER (2001) mostraram que sua positividade encontrava-se geralmente entre 20% e 30%, podendo chegar a 40% (HAN et al., 1997) quando a axila estava comprometida. ALEXIEV et al. (1997) referiram 48%. HERCHENHORN et al. (2000) encontraram também 48%, em pacientes estágio clínico IIIA e IIIB. Aqui, o c-erbB-2 foi encontrado como positivo em 43,2% das amostras tumorais e a axila comprometida em 62,5%, estando sua positividade acorde com a literatura.

Vários trabalhos apontam-no ser um fraco fator prognóstico e que sua implicação como fator preditivo e prognóstico ainda são incertos (ALLRED et

al., 1998). A literatura é farta em trabalhos demonstrando ser o c-erbB-2 um bom fator preditivo de resposta a terapia hormonal e quimioterápica.

Pacientes c-erbB-2 positivo não respondem bem a quimioterapia com esquemas que utilizam CMF (ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil), mas têm uma boa resposta quando se utiliza agentes antracíclicos, o que não é visto com as c-erbB-2 negativo (GUSTERSON et al., 1992; VAN DE VIJVER, 2001).

Assim, com o tempo, vários estudos mostraram ser o receptor de estrógeno bom fator preditivo de resposta hormonal e um bom fator prognóstico. Outros estudos estão mostrando que o c-erbB-2 também é um bom fator preditivo de resposta à terapia com trastuzumab e um bom fator prognóstico, indicando, quando presente, uma má evolução da paciente, principalmente, se for axila positiva. A avaliação do c-erbB-2 é essencial para indicar a terapia com trastuzumab.

O c-erbB-2 é bem aceito como fator prognóstico, apontando pior evolução nas pacientes com carcinoma de mama invasivo, principalmente, naquelas com comprometimento axilar. Porém, nas com axila negativa, os resultados ainda são conflitantes (VAN DE VIJVER, 2001). WRIGHT et al. (1989), BARBARESCHI et al. (1992), GUSTERSON et al. (1992), WRIGHT et al. (1992), SCHÖNBORN et al. (1995), RÉVILLION et al. (1998) e SJÖGREN et al. (1998) consideram-no como importante fator prognóstico, mostrando má evolução da doença na presença de comprometimento axilar.

BARBARESCHI et al. (1992); GUSTERSON et al. (1992); WRIGHT et al. (1992) relacionaram-no com pior prognóstico e menor sobrevida total. Menor sobrevida livre de doença foi relatado por GUSTERSON et al. (1992); WRIGHT et al. (1992); SJÖGREN et al., (1998). No entanto, CLARK & McGUIRE (1991) não encontraram relação com nenhum modo de sobrevida.

Neste trabalho, encontrou-se significância somente quanto ao grau de diferenciação tumoral, onde sua positividade se relaciona com a indiferenciação tumoral (G III). O mesmo resultado foi encontrado por LOVEKIN et al., (1991); GUSTERSON et al. (1992); RÉVILLION et al., (1998); VAN DE VIJVER (2001).

O PCNA baixo mostrou o dobro do percentual em tumores c-erbB-2 negativo. Para estado axilar, receptor de estrógeno e p53, a distribuição foi homogênea.

As curvas de KM, tanto para sobrevida total como para sobrevida livre de doença foram não significativas, concordantes com o trabalho de CLARK & McGUIRE (1991). O tratamento complementar aqui foi utilizado em 65,6% das mulheres c-erbB-2 positivo.

Houve uma relação significativa de tumores PCNA baixo (+/++) com G I e p53 negativo e uma tendência à negatividade do c-erbB-2, sendo o mesmo encontrado por KESARI et al. (1997a) e KESARI et al. (1997b). ALEXIEV et al. (1997) não encontraram relação entre PCNA e p53.

O comprometimento axilar e os receptores de estrógeno apresentaram distribuição percentual semelhantes, não significativas.

TAHAN et al. (1993), HAERSLEV & JACOBSEN (1994) e KESARI et al. (1997a) relacionaram o PCNA elevado com pior sobrevida total e curta sobrevida livre de doença. CUMMINGS et al. (1993) não o relacionaram com sobrevida total e sobrevida livre de doença e concluíram que não deve ser usado como marcador tumoral para câncer de mama.

BIANCHI et al. (1993), afirmaram que o PCNA tem valor prognóstico para pacientes axila negativa, mas, não o suficiente para ser utilizado na prática como único fator.

CUMMINGS et al., (1993); HAERSLEV & JACOBSEN (1994); KEMP (1995); SCHÖNBORN et al. (1995); AGARWAL et al., (1997) concluíram em seus trabalhos que o PCNA é encontrado com níveis elevados (maior de 50%) nos tumores pouco diferenciados (G III), distinguindo um grupo de mulheres de alto risco, sendo isto mais importante nas pacientes axila negativa, demonstrando, ser, portanto, um bom fator prognóstico para axila negativa.

SHEEN-CHEN et al. (1997), chegaram à conclusão que o PCNA é um bom fator prognóstico para câncer de mama axila positiva, enquanto CUMMINGS et al. (1993); AGARWAL et al. (1997) não encontraram relação entre PCNA e o comprometimento axilar, o mesmo ocorrendo aqui.

As curvas de KM para sobrevida total e sobrevida livre de doença foram não significativas, não concordando com os resultados de TAHAN et al. (1993); HAERSLEV & JACOBSEN (1994); SCHÖNBORN (1995).

As mulheres com PCNA elevado, acima de 50% (+++/++++), receberam tratamento complementar em 68% dos casos.

LAMPE et al., (1998) não encontraram relação entre recorrência da doença e p53, c-erbB-2 e PCNA, não considerando estes como fatores prognósticos para câncer de mama. Encontraram significância somente para receptores de estrógeno.

Outro fator que, provavelmente, tenha interferido nas conclusões onde houve discordância da literatura, foi o fato de a amostra não ser grande e o seguimento relativamente curto (68,7 meses). Com o aumento da amostra e do tempo de seguimento talvez isto possa mudar.

Em nosso estudo o tratamento complementar, rádio e/ou quimioterápico, foi indicado baseando-se somente na avaliação histológica da axila, não tendo sido nenhum outro fator levado em consideração. Todas as curvas de KM não se mostraram significativas, orientando-nos na direção de que nenhum destes fatores pode ser usado como prognóstico, mas isto não deve ser tomado como verdadeiro, pois a grande maioria das mulheres recebeu tratamento complementar baseado na axila, o que, com certeza, modificou o rumo da evolução da doença.

Acredito, com estes dados, que a axila é um forte fator prognóstico (concordante com a literatura) e que os demais devam continuar sendo estudados, com uma maior amostragem e um seguimento mais prolongado.

Penso que, para o estudo de fatores prognósticos, logo após o diagnóstico e tratamento cirúrgico, as pacientes deveriam ser seguidas e avaliadas periodicamente, permanecendo virgens de tratamento adjuvante (quimioterápico, radioterápico e hormonioterápico), para que estes não interfiram na evolução natural da doença. Tal conduta é antiética, uma vez que já sabemos que o estudo dos linfonodos axilares proporciona uma boa avaliação desta evolução. Como esta conduta não pode e não deve ser realizada, devemos continuar tratando nossas pacientes com base nos fatores que já conhecemos e continuar estudando outros fatores, com maior número de pacientes e maior tempo de seguimento. Devemos, ainda, intensificar as ações de rastreamento, para que possamos fazer o diagnóstico mais precoce e com axila negativa.

6. Conclusões

1. Os fatores estudados: clínicos (idade e estado menopausal), anatomopatológico (grau final do tumor) e imuno-histoquímicos (RE, proteína p53, PCNA e c-erbB-2) não foram considerados bons fatores prognósticos para carcinoma de mama. Isto, provavelmente, devido ao pequeno número de casos e seguimento não muito prolongado. Somente o comprometimento axilar mostrou-se com valor prognóstico para período livre de doença.
- 2.a. A idade não foi um fator determinante na sobrevida total e sobrevida livre de doença. Foi significativa quanto a presença de receptores de estrógeno e mostrou um comprometimento axilar significativamente maior nas pacientes mais jovens.
- 2.b. O estado menopausal não mostrou diferença significativa quanto à sobrevida total e sobrevida livre de doença. Mostrou estar relacionado com o menor comprometimento axilar, receptor de estrógeno positivo e baixo PCNA.

- 2.c.** O grau de diferenciação dos tumores mostrou-se significativo para a sobrevida total e não significativo para a sobrevida livre de doença. Está relacionado com: a) carcinomas bem diferenciados (G I) com negatividade para c-erbB-2 e b) carcinomas pouco diferenciados (G III) com PCNA elevado (+ 50%).
- 2.d.** O comprometimento axilar não foi significativo em relação à sobrevida total. A sobrevida livre de doença foi significativamente maior nas pacientes com axila não comprometida. O comprometimento axilar foi significativamente menor nas pacientes menopausadas.
- 2.e.** O estudo dos receptores de estrógeno não mostrou diferença quanto à sobrevida total e sobrevida livre de doença. Foi significativamente mais elevado nas pacientes pós menopausadas. Não houve significância estatística entre os receptores de estrógeno e os demais fatores estudados.
- 2.f.** A proteína p53 não mostrou diferença quanto à sobrevida total e sobrevida livre de doença. Mostrou-se significativamente positiva nas pacientes com tumores com PCNA maior de 50% (+++/++++).
- 2.g.** O c-erbB-2 não mostrou diferença significativa quanto a sobrevida total e sobrevida livre de doença. Foi encontrado com positividade significativa em tumores pouco diferenciados (G III).
- 2.h.** O PCNA não mostrou diferença quanto à sobrevida total e sobrevida livre de doença. Foi significativo para o grau do tumor (G I e PCNA baixo; G III e PCNA elevado) e para o p53 (PCNA baixo com maior negatividade para p53).

7. Referências Bibliográficas

- ADAMI, H. O.; MALKER, B.; HOLMBERG, L.; PERSSON, I.; STONE, B. – The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. ***N Engl. J. Med.***, **315**:559-63, 1986.
- AGARWAL, S.; JAIN, R.; RUSIA, U.; GUPTA, R. L. – Proliferating cell nuclear antigen Immunostaining in breast carcinoma and its relationship to clinical and pathological variables. ***Indian J. Pathol. Microbiol.***, **40**:11-6, 1997.
- AGRESTI, A. – **Categorical data analysis**. Editora John Wiley., New York. 1990. 576p.
- ALEXIEV, B. A.; BASSAROVA, A. V.; POPOVSKA, S. L.; POPOV, A. A.; CHRISTOV, C. Z. – Expression of c-erbB-2 Oncogene and p53 tumor suppressor gene in benign and malignant breast tissue: correlation with proliferative activity and prognostic index. ***Gen. Diagn. Pathol.***, **142**:271-9, 1997.
- ALLRED, D. G.; HARVEY, J. M.; BERARDO, M.; CLARK, G. M. – Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. ***Mod. Pathol.***, **11**:155-68, 1998.
- BARBARESCHI, M.; LEONARDI, E.; MAURI, F. A.; SERIO, G.; PALMA, P. D. – p53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinomas. An

immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferation markers, and clinical stage in human breast cancer. **Am. J. Clin. Pathol.**, **98**:408-18, 1992.

BARNES, D. M.; DUBLIN, E. A.; FISHER, C. J.; LEVISON, D. A.; MILLIS, R. R. – Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? **Hum. Pathol.**, **24**:469-76, 1993.

BIANCHI, S.; PAGLIERANI, M.; ZAMPI, G.; CARDONA, G.; CATALIOTTI, L.; BONARDI, R.; ZAPPA, M.; CIATTO, S. – Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in lymph node negative breast cancer patients. **Cancer**, **72**: 120-5, 1993.

BLOOM, H. J. G. & RICHARDSON, W. W. - Histological grading and prognosis in breast cancer. **Br. J. Cancer**, **11**:359-77, 1957.

BRONDI, L.A.G.- Importância da linfadenectomia axilar no tratamento cirúrgico do câncer de mama. **Rev. Bras. Cancerol.**, **33**:119-26, 1987.

BRONDI, L.A.G.; STECCA, J.; FERRO, M.C.- Linfadenectomia axilar completa no tratamento do câncer da mama. Experiência com 230 casos. **RBGO**, **15**:266-70, 1993.

CARTER, C. L.; ALLEN, C.; HENSON, D. E. – Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24 740 breast cancer cases. **Cancer**, **63**:181-7, 1989.

CEZAR Jr, O. P. - **Carcinoma de mama em Bragança Paulista: experiência de uma década**. Campinas, 1995. [Dissertação – Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas –UNICAMP].

CHIARUGI, V. & RUGGIERO, M. – Role of three cancer “master genes” p53, bcl2 and c-myc on the apoptotic process. **Tumori**, **82**:205-9, 1996.

CIATTO, S.; CECCHINI, S.; GRAZZINI, G.; IOSSA, A.; BARTOLI, D.; RASPONI, A.- Tumor size and prognosis of breast cancer with negative axillary nodes. **Neoplasma**, **37**:179-84, 1990.

CLARK, G. M. & MCGUIRE, W. L. – Follow-up study of HER-2/neu amplification in breast cancer. **Cancer Res.**, **51**:944 -8, 1991.

CLARK, G. M. - Do we really need prognostic factors for breast cancer? **Breast Cancer Res. Treat.**, **30**:117-26, 1994.

COLLETT, D. – **Modelling survival data in medical research**. Editora Chapman & Hall., 1994. 384p.

COLLEONI, M.; ORVIETO, E.; NOLÉ, F.; ORLANDO, L.; MINCHELLA, I.; VIALE, G.; PERUZZOTTI, G.; ROBERTSON, C.; NOBERASCO, C.; GALIMBERTI, V.; VERONESI, P.; ZURRIDA, S.; ORECCHIA, R. and GOLDHIRSCH, A. - Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. **Eur. J. Cancer**, **35**:574-9, 1999.

COOKE, T.; REEVES, J.; LANNIGAN, A.; STANTON, P. – The value of the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) as a prognostic marker. **Eur. J. Cancer**, **37(Suppl.)**:S3-S10, 2001.

COPPOLA, D.; CATALANO, E.; NICOSIA, S. V. – Significance of p53 and Bcl-2 protein expression in human breast ductal carcinoma. **JMCC**, **6**:181-7, 1999.

CUMMINGS, M. C.; FURNIVAL, C. M.; PARSONS, P. G.; TOWNSEND, E. – PCNA immunostaining in breast cancer. **Aust. N. Z. J. Surg.**, **63**:630-6, 1993.

- DABBS, D. J. – Correlations of morphology, proliferation indices, and oncogene activation in ductal breast carcinoma: nuclear grade, S-phase, proliferating cell nuclear antigen, p53, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2. **Mod. Pathol.**, **8**:637-42, 1995.
- DALTON, L. W.; PAGE, D. L.; DUPONT, W. D. - Histologic grading of breast carcinoma. **Cancer**, **73**:2765-70, 1994.
- DENOIX, P. – New trends in the diagnosis and treatment of cancer. **Rer. Inst. Nac. Cancerol.**, **22**:674-80, 1970.
- ELLEDGE, R. M. & McGUIRE, W. L. – Prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. In: DICKSON, R. B. & LIPPMAN, M. E. (eds.) -**Genes, oncogenes and hormones: advances in cellular and molecular biology of breast cancer**. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1991. p.3-19.
- ELSTON, C. W. & ELLIS, J. O. – Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** , **19**:403-10, 1991.
- EL-TAMER, M. B. & WAIT, R. B. – Age at presentation of african-american and caucasian breast cancer patients. **J. Am. Coll. Surg.**, **188**:237-40, 1999.
- ERNBERG, I. T. – Oncogenes and tumor growth factors in breast cancer. **Acta Oncol.**, **29**:331-4, 1990.
- FENTIMAN, I.S.; CUZICK, J.; MILLIS, R. R.; HAYWARD, J.L. -Which patients are cured of breast cancer? **Br. Med. J.**, **289**:1108-11, 1984.
- FENTIMAN, I. S. –Breast conservation. In: FENTIMAN, I. S. ed.) **Detection and treatment of early breast cancer**. London, Martin Dunitz, 1990. p.73-87.

- FISHER, B. ? SLACK, N.H. - Number of lymph nodes examined and the prognosis of breast carcinoma. ***Surg. Gynecol. Obstet.*, 132:79-88, 1970.**
- FITZGIBBONS, P. L.; PAGE, D. L.; WEAVER, D.; THOR, A. D.; ALLRED, D. C.; CLARK, G. M.; RUBY, S. G.; O'MALLEY, F.; SIMPSON, J.F.; CONNOLLY, J. L.; HAYES, D. F.; EDGE, S. B.; LICHTER, A.; SCHNITT, S. J. – Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. ***Arch. Pathol. Lab. Med.*, 124:966-78, 2000.**
- FUQUA, S. A. W. – Estrogen receptor mutagenesis and hormone resistance. ***Cancer*, 74:1026-9, 1994.**
- GADELHA, M. I. P.; SALTZ, E.; REZENDE, M. C. R.; PINHEIRO, L. R. – Câncer Um problema de saúde pública no Brasil. ***JBM*, 63:38-45, 1992.**
- GARCIA, R. L.; COLTRERA, M.D.; GOWN, A. M. – Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. ***Am. J. Pathol.*, 134:733-9, 1989.**
- GASPARINI, S.; MELI, S.; POZZA, S.; CAZZAVILLAN, S.; BELIACQUA, P. – PC-10 antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is not related to prognosis in human breast carcinomas. ***Growth Reg.*, 2:145-50, 1992.**
- GELMANN, E. P. & LIPPMAN, M. E. - Papel dos oncogenes no câncer mamário humano. In: BLAND, K. I. & COPELAND III, E. M., (eds.) - **A mama**. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1994. p. 401-14.
- GERSHON-COHEN, J.; BERGER, S. M.; KLICKSTEIN, H. S. – Roentgenography of breast cancer moderating concept of “biologic predeterminism”. ***Cancer*, 16:961-4, 1963.**

GREENOUGH, R. B. – Varying degrees of malignancy in cancer of the breast.

J. Cancer Res., 9:452-63, 1925.

GUSTERSON, B. A.; GELBER, R. D.; GOLDBIRSCH, A.; PRICE, K. N.; SÄVE-SÖDERBORGH, J.; ANBAZHAGAN, R.; STYLES, J.; RUDENSTAM, C.

M.; GOLOUH, R. ; REED, R.; MARTINEZ-TELLO, F.; TILTMAN, A.;

TORHORST, J.; GRIGOLATO, P.; BETTELHEIM, R.; NEVILLE, A.M.;

BÜRKI, K.; CASTIGLIONE, M.; COLLINS, J.; LINDTNER, J.; SENN, H. J.

– Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. **J. Clin.**

Oncol., 10: 1049-56, 1992.

HAERSLEV, T.H. & JACOBSEN, G. K. –Proliferating cell nuclear antigen in breast carcinomas. An immunohistochemical study with correlation to histopathological features and prognostic factors. **Virchows Archiv.**,

424:39-46, 1994.

HAERSLEV, T.H. & JACOBSEN, G. K. - An immunohistochemical study of p53 with correlations to histopathological parameters, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen, and prognosis. **Hum. Pathol.**, 26:295-301, 1995.

HALL, P. A.; LEVISON, D. A.; WOODS, A. L.; YU, C. C. W.; KELLOCK, D. B.;

WATKINS, J. A.; BARNES, D. M.; GILLETT, C. E.; CAMPLEJOHN R.;

DOVER, R.; WASEEM, N. H.; LANE D. P. – Proliferating cell nuclear

antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expressiion in some neoplasms.

J. Pathol., 162:285-94, 1990.

HAN, S.;YUN, I. J.; NOH, D. Y.; CHOE, K. J.; SONG, S. Y.; CHI, J. G. -

Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. **J. Surg. Oncol.**, 65:22-7, 1997.

- HERCHENHORN, D.; REZENDE, L. M.; THULER, L. C.; MAIA, R. C.; MEDINA, M.; COSTA, M. D. C. – Quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama localmente avançado: análise imuno-histoquímica é preditiva da resposta à quimioterapia. **Rev. Bras. Cancerol.**, **46**: 163-71, 2000.
- HORTZ, J.L.; BOZKO, L.P.; MAHFUS, M.A.; BETAT, R.; MAESTRI, T.; BIAZUS, J.V.; MENKE, C.H.; CAVALHEIRO, J.A. - Câncer de mama: análise clínico-epidemiológica de 892 casos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **RBGO**, **16**:220-5, 1994.
- HOST, H. & LUND, E. – Age as a prognostic factor in breast cancer. **Cancer** **57**: 2217-21, 1986.
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde.
Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil.
<<http://www.inca.org.br>> [2001 julho 25].
- ISOBE, M. J.; EMANUEL, B. S.; GIVOL, D.; OREN, M.; CROCE, C. M. – Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature**, **320**:84-5, 1986.
- JENSEN, E.V.; BLOCK, G.E.; SMITH, S.; KYSER, K.; DE SOMBRE, E.R. – Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. **Natl. Cancer Inst. Monogr.**, **34**:55-79, 1971.
- KEMP, C. – **Valor prognóstico do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA/ ciclina) em pacientes com câncer de mama (T2 N0,1 M0).** São Paulo, 1995. [Tese – Doutorado - Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina].

- KESARI, A. L.; CHELLAM, V. G.; NAIR, P. P.; MADHAVAN, J.; NAIR, P.; NAIR, M.K.; PILLAI, M.R. – Tumor proliferative fraction in infiltrating duct carcinoma. – **Gen. Diagn. Pathol.**, **143**:219-24, 1997a.
- KESARI, A. L.; CHELLAM, V. G.; NAIR, P. P.; AHMED, I.; MADHAVAN, J.; THOMAS, P.A.; NAIR, M.K.; PILLAI, M.R. – p53 tumor suppressor protein and tissue proliferative fraction in infiltrating duct carcinoma. **J. Surg. Oncol.**, **65**:159-63, 1997b.
- LAMPE, B.; HANTSCHMANN, P.; DIMPFL, T.H. – Prognostic relevance of immunohistology, tumor size and vascular space involvement in axillary node negative breast cancer. **Arch. Gynecol. Obstet.**, **261**:139-46, 1998.
- LANE, D. P. – p53 and human cancers. **Br. Med. Bull.**, **50**:582-99, 1994.
- LEIS Jr., H.P. - Fatores de risco e epidemiologia do carcinoma de mama. In: MONTORO, A. F. (ed.) **Mastologia**. São Paulo, Sarvier, 1984. p. 79-88.
- LESEC, G.; COULET, E.R.; COULLET, J.F.; MAUBLANC, M.A; MERLE, S.; SALMON, R.J.; REMVIKOS, Y. –The p53-positive phenotype of breast cancers: Correlation with other parameters and consequences on its biological significance. **Int. J. Oncol.**, **10**:747-52, 1997.
- LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. - The p53 tumour suppressor gene. **Nature**, **351**:453-6, 1991.
- LOVEKIN, C.; ELLIS, I. O.; LOCKER, A.; ROBERTSON, J. F. R.; BELL, J.; NICHOLSON, R.; GULLICK, W. J.; ELSTON, C. W.; BLAMEY, R. W. – c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. **Br. J. Cancer**, **63**:439-43, 1991.

MADDEN, J. L. – Modified radical mastectomy. ***Surg. Gynecol. Obstet.*, 121:** 1221-30, 1965.

MAMEDE, M.V.; SOUZA, L.; RODRIGUES, R.A.P.; SHIMO, A.K.K.; NAKAMO, A.M.S.; ALMEIDA, A.M.; RAVAGNANI, M.J.C.; SILVA, R.M.; MATUO, Y.K.; BIFFI, E.F.; FELIPE, M.V.; MESSIAS, D.K.H. - Menarca-menopausa: quando ocorrem? ***J. Bras. Ginecol.*, 102:**441-4, 1992.

MANT, D. & VESSEY, M. P. - Epidemiologia do câncer de mama. In: BLAND, K. I. & COPELAND III, E. M., (eds.) - **A mama**. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1994. p. 265-78.

MASCAREL, I.; SOUBEYRAN, I.; MACGROGAN, G.; WAFFLART, J.; BONICHON, F.; DURANT, M.; AVRIL, A; MAURIAC, L.; TROJANI, M.; COINDRE, J. M. – Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in 938 breast carcinomas. ***Appl. Immunohist.*, 3:**222-32, 1995.

MATHEWS, M. B.; BERNSTEIN, R. M.; FRANZA JR, B. R.; GARRELS, J. I. – Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. ***Nature* 309:**374-6, 1984.

NISKANEN, E.; BLOMQVIST, C.; FRANSSILA, K.; HIETANEN, P.; WASENIUS, V-M. – Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of primary tumour in metastatic breast cancer. ***Br. J. Cancer*, 76:**917-22, 1997.

OREN, M. – p53 the ultimate tumor suppressor gene? ***Faseb J.* 6:**3169-76, 1992.

OSBORNE, C. K. – Steroid hormone receptors in breast cancer management. ***Breast Cancer Res. Treat.*, 51:**227-38, 1998.

- PAIK, S.; BURKHARD, E.; LIPPMAN, M. E. - Clinical significance of erb B2 protein overexpression. In: DICKSON, R. B. & LIPPMAN, M. E. (eds.) - **Genes, oncogenes and hormones: advances in cellular and molecular biology of breast cancer**. Kluwer Academic Publishers. Boston. 1991. p. 181-91.
- PARKER, M. G.; ARBUCKLE, N.; DAUVOIS, S.; DANIELIAN, P.; WHITE, R. – Structure and function of the estrogen receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 119-26, 1993.
- PATEY, D. H. & DYSON, W. H. – The prognosis of carcinoma of the breast in relation to the type of operation performed. *Br. J. Cancer*, 2:7-13, 1948.
- PAVELIC, Z. P.; PAVELIC, L.; LOWER, E. E. ; GAPANY, S; BARKER, E. A.; PREISLER, H.D. - c.myc, c-erb-B2, and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma. *Cancer Res.*, 52: 2597-602, 1992.
- PERREN, T. J. – c-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 63: 328-32, 1991.
- PINDER, S. E.; ELLIS, I. O.; ELSTON, C. W. – Prognostic factors in primary breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 48: 981-3, 1995.
- PINHEIRO, J.C.L. - Câncer de mama feminina. Algumas considerações. *Femina*, 14:41-8, 1986.
- PINOTTI, J. A.; TEIXEIRA, L.C.; MONTI, C. R. – Quadrantectomia, axilectomia e radioterapia: Experiência do “Centro de Assistência Integral à Saúde da mulher” – UNICAMP. In: PINOTTI, J. A. (ed.) – **Compêndio de mastologia**. São Paulo, Manole, 1991. p.351-70.

- PISANI, R.C.B. - Receptores de estrógeno em mastologia. In: PINOTTI, J.A. (ed.), **Compêndio de mastologia**. São Paulo: Manole, 1991. p.187-94.
- PUGLISI, F.; DI LORETO, C.; BELTRAMI, C. A. – Fattori prognostico-predittivi e scelte terapeutiche nel carcinoma invasivo della mammella. **Ann. Ital. Chir.**, **3**:335-41, 1999.
- QUÉNEL, N.; WAFFLART, J.; BONICHON, F.; MASCAREL, I.; TROJANI, M.; DURANT, M.; AVRIL, A; COINDRE, J. M. - The prognostic value of c-erb-B2 in primary breast carcinomas: A study on 942 cases. **Breast Cancer Res. Treat.**, **35**:283-91, 1995.
- QUERZOLI, P.; ALBONICO, G.; FERRETTI, S.; RINALDI, R.; BECCATI, D.; CORCIONE, S.; INDELI, M.; NENCI, I. – Modulation of biomarkers in minimal breast carcinoma. A model for human breast carcinoma progression. **Cancer**, **83**:89-97, 1998.
- QUESNEL, S. & MALKIN, D. – Genetic predisposition to cancer and familial cancer syndromes. **Pediat. Clin. North Am.**, **44**:791-808, 1997.
- RÉVILLION, F.; BONNETERRE, J.; PEYRAT, J. P. – ErbB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. **Eur. J. Cancer**, **34**:791-808, 1998.
- SANTINHO, M. J.; SOUZA, A. Z.; FARIA, R. M.; SALVATORE, C. A. - Aspectos imunohistológicos e prognósticos do carcinoma da mama. **Ginecol. Obstet. Bras.**, **5**:307-25, 1982.
- SCHMITT, F.C. – Marcadores prognósticos em carcinoma mamário. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E. ; VASSALO, J. (eds.) – **Manual de imuno-histoquímica**. Sociedade brasileira de Patologia, 1999. p. 30-46.

- SCHÖNBORN, I.; ZSCHIESCHE, W.; MINGUILLON, C.; SPITZER, E.; MÖHNER, M.; EBELING, K.; GORSSE, R. – Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen and c-erbB-2 compared with conventional histopathological factors in breast cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, **121**:115-22, 1995.
- SHEEN-CHEN, S. M.; ENG, H. L.; CHOU, F. F.; CHEN, W. J. – The prognostic significance of Proliferating Cell Nuclear Antigen in patients with lymph node positive breast cancer. **Arch. Surg.**, **132**:264-7, 1997.
- SILVA, H. M. S. & COELHO Jr, J. L. - Fatores prognósticos do câncer de mama. Aplicações clínicas. **J. Bras. Ginec.**, **97**:371-4, 1987.
- SILVA, H.M.S.; COELHO Jr, J.L.; VIANNA, L. L.; COSTA, B. R. M.; MIRANDA, D.; TAFURI, C. P.; CABRAL FILHO, S. - Fatores prognósticos - estudo em 90 casos de câncer de mama. **J. Bras. Ginec.**, **101**:109-13, 1991.
- SJÖGREN, S.; INGANÄS, M.; LINDGREN, A.; HOLMBERG, L.; BERGH, J. – Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. **J. Clin. Oncol.**, **16**:462-69, 1998.
- SOBREIRA, T.T.; DAMASCENO, R.N.; SIMÕES, M.M.M.; OLIVEIRA, Z.R.; XIMENES, A.M.; GURGEL, A.H.; CARVALHO, F.A.M.; ARRAIS, F.M.A.; FORTE, B.P.; FERNANDES, A.F.C.; BRAGA, V.A.B. - Investigação sobre a idade da menarca e da menopausa em mulheres de Fortaleza-Ce. **Femina**, **20**:97-103, 1992.
- SUNDBLAD, A. S.; AHN, C.; MEHTA, P.; CAPRARULO, L.; BATTIFORA, H. – Determinacion inmunohistoquimica de receptores hormonales en cancer de mama. **Medicina**, **52**:333-40, 1992.

- STRAX, P. - Controle do câncer de mamário por triagem populacional. In PINOTTI, J.A. (ed). **Compêndio de mastologia**. São Paulo, Manole, 1991. p.297-302.
- TAHAN, S. R.; NEUBERG, D. S.; DIEFFENBACH, A.; YACOUN, L. – Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. **Cancer**, **71**:3552-9, 1993.
- TOMA, S.; BONASSI, S.; PUNTONI, R.; NICOLÒ, G. - Primary tumor site, size, patients age and axillary lymph node in breast cancer. **Tumori**, **72**:259-65, 1986.
- TORRES, L. F. B.; COLLAÇO, L. M.; WERNER, B. – Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação do carcinoma de mama: análise dos receptores de estrogênio, progesterona e antígeno carcinoembrionário em 320 casos. **Rev. Med. Paraná** **53**:28-34, 1996.
- U.I.C.C. – UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER. **TNM Classification of malignant tumors**. 4.ed., Springer, Verlag, 1987.
- VALAGUSSA, P.; BONADONNA, G.; VERONESI, U. - Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. **Cancer**, **41**:1170-8, 1978.
- VAN DE VIJVER, M. J. – Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). **Eur. J. Cancer**, **37**(Suppl.):S11-S17, 2001.
- VERONESI, U.; SACCOZZI, R.; DEL VECCHIO, M.; BANFI, A.; CLEMENTE, C.; DE LENA, M.; GALLUS, G.; GRECCO, M.; LUINI, A.; MARUBIN, E.; MUSCOLINO, G.; RILKE, F.; SALVADORI, B.; ZECCHINI, A.; ZUCALI, R. – Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. **N. Engl. J. Med.**, **305**:6-11, 1981.

VIACAVA, P.; NACCARATO, A. G.; BEVILACQUA, G. – Different proliferative patterns characterize different preinvasive breast lesions. **J. Pathol.**, **188**:45-51, 1999.

WILLSHER, P. C.; BEAVER, J.; PINDER, S.; BELL, J. A.; ELLIS, I. O.; BLAMEY, R. W.; ROBERTSON, F. R. – Prognostic significance of serum c-erbB-2 protein in breast cancer patients. **Breast Cancer Res. Treat.**, **40**:251-5, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. – Research on the menopause. **WHO Technical Report**. Geneva, WHO, 1981.

WRIGHT, C.; ANGUS, B.; NICHOLSON, S.; SAINSBURY, J. R. C.; CAIRNS, J.; GULLICK, W. J.; KELLY, P.; HARRIS, A. L.; HORNE, W. – Expression of c-erbB-2 oncoprotein: A prognostic indicator in human breast cancer. **Cancer Res**, **49**:2087-90, 1989.

WRIGHT, C.; NICHOLSON, S.; ANGUS, B.; SAINSBURY, J. R. C.; FARNDON, J.; CAIRNS, J.; HARRIS, A. L.; HORNE, C. H. W. – Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. **Br. J. Cancer**, **65**: 118-21, 1992.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses.
BIREME, São Paulo, 1991. 45p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD - OF. CIR/ PRPG/06/95 -
Normas ABNT. 1995. 8p.

9. Anexos

9.1. ANEXO 1

Classificação Clínica TNM - UICC, 1987

T - tumor

TX - O tumor primário não pode ser avaliado.

T0 - Sem evidência de tumor primário.

Tis - Carcinoma *in situ*: carcinoma ductal ou lobular *in situ* ou doença de Paget do mamilo, sem tumor.

Nota: A doença de Paget, associada a um tumor, é classificada de acordo com o tamanho do tumor.

T1- Tumor com 2cm ou menos em sua maior dimensão.

T2- Tumor com mais de 2cm em sua maior dimensão, mas inferior a 5cm.

T3- Tumor com mais de 5cm em sua maior dimensão.

T4- Tumor de qualquer tamanho, acompanhado por comprometimento da parede torácica ou pele.

Nota: A parede torácica inclui as costelas, os músculos intercostais e o músculo serrátil anterior, mas não o músculo peitoral.

T4a - Extensão à parede torácica.

T4b - Edema (*incluindo **peau d'orange***) ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites, restritos a mesma mama.

T4c - T4a e T4b associados.

T4d - Carcinoma inflamatório.

N - linfonodos regionais

NX- Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (por exemplo, foram removidos previamente).

N0- Sem metástases nos linfonodos regionais.

N1- Metástases nos linfonodos axilares ipsolaterais móveis.

N2- Metástases nos linfonodos axilares ipsolaterais que estão fixos uns aos outros ou a outras estruturas.

N3- Metástases nos linfonodos mamários internos ipsolaterais.

M - metástases a distância

MX - A presença de metástases a distância não pode ser avaliada.

M0 - Sem metástase a distância.

M1 - Metástases a distância (incluindo as metástases nos linfonodos supraclaviculares).

GRUPOS DOS ESTÁDIOS

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1- N2	M0
Estádio IIIB	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

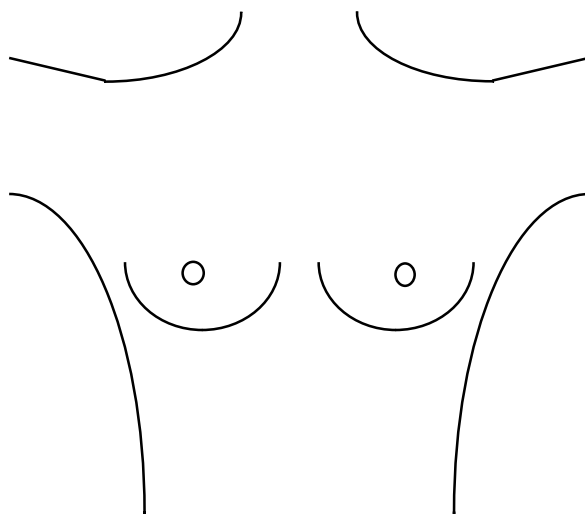
9.2. ANEXO 2

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO SÃO FRANCISCO

MASTOLOGIA

Nome:..... Registro:.....
Data de Nascimento:/...../..... Naturalidade:.....
Cor: Nacionalidade:
Endereço:..... Fone:.....
QD:.....
.....
HPMA:.....
.....
.....
.....
.....
Menarca:..... Telarca:..... DUM:.....
Menopausa:..... Natural?..... Cirúrgica?.....
Gesta: Para: Aborto:
Idade 1ª gestação: Início atividade sexual:
Amamentação:
Dispareunia: Sinussiorragia:
Método anticoncepcional:
Tratamento hormonal anterior:
Colpocitologia oncótica: Em:
Antecedentes pessoais:
Antecedentes familiares:

Exame físico:



Inspeção estática:

Inspeção dinâmica:

Linfonodos axilares e supraclaviculares:

Palpação:.....

Expressão:.....

Exames subsidiários:

HD:.....

Conduta:

Observador: Data:/...../.....

9.3. ANEXO 3

TABELA 1

		Tratamento complementar		p
		Sim (%)	Não (%)	
Pré menopausa		27 (54)	2 (8,3)	<0,01
Pós menopausa		23 (46)	22 (9,7)	
GH	I	6 (12)	4 (16,6)	0,82
	II	33 (66)	14 (58,4)	
	III	11 (22)	6 (25)	
axila	0	8 (16)	20 (83,4)	<0,01
	1-3	18 (36)	2 (8,3)	
	4-9	16 (32)	0 (0)	
	+ 10	8 (16)	2 (8,3)	
RE	+	16 (32)	12 (50)	0,20
	-	34 (68)	12 (50)	
P53	+	10 (20)	5 (20,9)	1,00
	-	40 (80)	19 (79,1)	
c-erbB	+	21 (42)	11 (45,8)	0,81
	-	29 (58)	13 (54,2)	
PCNA	+ / ++	16 (32)	8 (33,3)	1,00
	+++ / ++++	34 (68)	16 (66,7)	
n		50 (100)	24 (100)	

teste exato de Fisher

TABELA 2

		Recidiva local		p
		Sim (%)	Não (%)	
Pré menopausa		6 (85,7)	23 (34,3)	<0,01
Pós menopausa		1 (14,3)	44 (65,7)	
Grau final	I	1 (14,3)	9 (13,4)	1,00
	II	5 (71,4)	42 (62,7)	
	III	1 (14,3)	16 (23,9)	
axila	0	1 (14,3)	27 (40,3)	0,47
	1-3	3 (42,8)	17 (25,4)	
	4-9	2 (28,6)	14 (20,9)	
	+ 10	1 (14,3)	9 (13,4)	
RE	+	2 (28,6)	26 (38,8)	0,70
	-	5 (71,4)	41 (61,2)	
P53	+	2 (28,6)	13 (19,4)	0,62
	-	5 (71,4)	54 (80,6)	
c-erbB-2	+	2 (28,6)	30 (44,8)	0,69
	-	5 (71,4)	37 (55,2)	
PCNA	+ / ++	1 (14,3)	23 (34,3)	0,42
	+++ / ++++	6 (85,7)	44 (65,7)	
n		7 (100)	67 (100)	

teste exato de Fisher