



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA**

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE SOBREVIDA E EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA c-erbB-2, RECEPTORES DE
PROGESTERONA E RECEPTORES DE ESTRÓGENO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

FLÁVIA ALEIXO FERREIRA

**ORIENTADOR: Prof^o. Dr. Flávio Monteiro Ayres
CO –ORIENTADORA: Prof^a Dra. Vera Aparecida Saddi**

**Goiânia-GO
2011**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA

AVALIAÇÃO DE SOBREVIDA E EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA c-erbB-2, RECEPTORES DE
PROGESTERONA E RECEPTORES DE ESTRÓGENO EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

FLÁVIA ALEIXO FERREIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Genética da Pontificia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

ORIENTADOR: Prof^o. Dr. Flávio Monteiro Ayres
CO –ORIENTADORA: Prof^a Dra. Vera Aparecida Saddi

Goiânia-GO
2011

Ferreira, Flávia Aleixo.

F383a Avaliação de sobrevivência e expressão da proteína *c-erbB-2*, receptores de progesterona e receptores de estrógeno em pacientes com câncer de mama [manuscrito] / Flávia Aleixo Ferreira. – 2011.

54 f.: il.; grafs.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Genética, 2011.

“Orientador: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres”.

1. Mamas - Câncer. 2. Imunohistoquímica. I. Título.

CDU: 618.19-006(043.2)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1359 • Setor Universitário
Cidade Universitária • CEP 74606-900
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3246.1000 • Fax: (62) 3246.1000
www.pucgoias.edu.br • pucgo@pucgoias.edu.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA EM 01 DE JULHO DE 2011 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

9,5 (NINE...NINE...NINE...NINE...NINE...)

Flávio Monteiro Ayres

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres - UEG
(presidente-orientador)

Isabela Lubc Wastowski

Prof. Dr. Isabela Lubc Wastowski - PUC Goiás
(membro interno)

Vera Aparecida Saddi

Prof. Dr. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás
(membro interno)

Anrália Juliana Leite Rodrigues

Prof. Dr. Anrália Juliana Leite Rodrigues / PUC Goiás
(membro externo)

Dedico este trabalho...

À minha mãe Ismerilda pelo incentivo e apoio incondicional, e a meu pai.

Dedico também a todos aqueles que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar o dom da vida.

Ao Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres, pelos conselhos, paciência, oportunidades de expressar meus conhecimentos. Obrigada por ter aceitado ser meu orientador, me ensinando a desvendar os caminhos da genética, e por ter se tornado um grande amigo.

À Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi, por sempre estar disposta a ensinar aquilo que parecia tão óbvio, mas que nem sempre eram fácil de ser compreendido.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, pela dedicação e amor ao ensino de qualidade.

Aos amigos e colegas pós-graduandos do Programa Pós-Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela companhia e amizade durante estes meses que passamos juntos, em especial a Flaviane, Suelene e Ariane.

À equipe do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge de Goiânia

SUMÁRIO

FIGURAS E TABELAS	vii
LISTA DE SIGLAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1 História Natural do Câncer de Mama.....	17
2 Epidemiologia.....	18
3 Fatores de Risco	20
4 Classificação Histológica do Câncer de Mama.....	21
5 Estadiamento Clínico.....	22
6 Anatomia da Mama	22
7 Gene e Proteína c-erbB-2	25
8 Análise da Proteína c-erbB-2 por Imuno- Histoquímica.....	28
METODOLOGIA	31
1 Coleta de Dados Clínicos	31
2 Análise Imuno-Histoquímica de c-erbB-2.....	31
3 Análise Estatística	32
4 Critérios de Inclusão e Exclusão	32
RESULTADOS	34
1 Dados Clinicopatológicos.....	34
2 Análise Imuno-Histoquímica de c-erbB-2.....	37
3 Sobrevida Global	38

4 Associação entre Imunodeteção de c-erbB-2 e Parâmetros Clinicopatológicos.....	43
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Diagrama esquemático de um seio.	23
Figura 2	Localização do gene <i>c-erbB-2</i> .	24
Figura 3	Representação esquemática da proteína <i>c-erbB-2</i> .	25
Figura 4	Distribuição das pacientes de acordo com a faixa etária.	32
Figura 5	Distribuição das pacientes de acordo com o estadiamento clínico.	33
Figura 6	Distribuição das pacientes de acordo com o comprometimento de linfonodos axilares.	33
Figura 7	Distribuição das pacientes de acordo com o grau de anaplasia.	34
Figura 8	Distribuição das pacientes de acordo com o tipo histológico da neoplasia.	34
Figura 9	Distribuição das pacientes de acordo com o local da metastástase.	35
Figura 10	Distribuição das pacientes de acordo com a imunodeteção da proteína <i>c-erbB-2</i> .	35
Figura 11	Distribuição das pacientes de acordo com a imunodeteção do receptor de progesterona.	36
Figura 12	Distribuição das pacientes de acordo com a imunodeteção do receptor de estrógeno.	36
Figura 13	Sobrevida global em cinco anos para grupo de pacientes estudadas.	37
Figura 14	Sobrevida em cinco anos avaliada de acordo com o estadiamento clínico.	37
Figura 15	Sobrevida em cinco anos avaliada de acordo com o número de linfonodos comprometidos.	38
Figura 16	Sobrevida em cinco anos avaliada de acordo com a presença de metastástase à distancia.	39
Figura 17	Sobrevida em cinco anos avaliada de acordo com a imunoexpressão da proteína <i>c-erbB-2</i> .	40
Tabela 01	Classificação dos tumores de mama segundo estágio clínico.	21
Tabela 02	Correlação entre a imunodeteção da proteína <i>c-erbB-2</i> e as variáveis prognósticas clinicopatológicas.	

LISTA DE SIGLAS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
BRCA1	Gene supressor de tumor “ <i>breast cancer type I</i> ”
BRCA2	Gene supressor de tumor “ <i>breast cancer type II</i> ”
c-erbB-2	Membro da família ErbB, do inglês: “ <i>epidermal growth factor receptor family</i> ”
CID-O	Classificação Internacional de Doenças para Oncologia
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico, do inglês: “ <i>epidermal growth factor receptor</i> ”
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> , do inglês: “ <i>fluorescence in situ hybridization</i> ”
HAJ	Hospital Araújo Jorge
HDL	Lipoproteína do inglês: “ <i>high density lipoproteins</i> ”
HDL-C	HDL colesterol
IARC	Do inglês: “ <i>International Agency of Research on Cancer</i> ”
INCA	Instituto Nacional de Câncer
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Proteína p53
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês: “ <i>polymerase chain reaction</i> ”
PTEN	Gene supressor de tumor do inglês: “ <i>phosphatase and tensin homolog</i> ”
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona

TGF-alpha	Transformador do fator de crescimento, do inglês: “ <i>transforming growth factor alpha</i> ”
TNM	Classificação dos Tumores Malignos, do inglês: “ <i>classification of malignant tumors</i> ”
TP53	Gene supressor TP 53
UICC	União Internacional Contra o Câncer

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo e o mais comum entre as mulheres, corresponde por 22% dos casos novos a cada ano. Esses tumores apresentam-se heterogêneos quanto a evolução e resposta às diferentes opções terapêuticas disponíveis, cujos fatores prognósticos e preditivos norteiam a conduta terapêutica a ser utilizada. A detecção da proteína oncogênica c-erbB-2 por imunohistoquímica é um fator prognóstico auxiliar para avaliação diagnóstica e, na maioria dos casos, associa-se a um pior prognóstico. O presente estudo teve como objetivo levantar os dados clinicopatológicos de pacientes com câncer de mama, bem como avaliar a expressão de c-erbB-2 nas amostras de tecido tumoral parafinadas dessas pacientes. Prontuários de 286 pacientes do sexo feminino com carcinoma de mama atendidas no Hospital Araújo Jorge (Associação de Combate ao Câncer em Goiás), entre 1979 e 2002, foram coletados e tabulados juntamente com os dados de imunohistoquímica para detecção da proteína c-erbB-2. Em nossa casuística a imunodetecção positiva de c-erbB-2 nas células tumorais não demonstrou associação com os parâmetros clinicopatológicos convencionais. A imunodetecção da proteína c-erbB-2 não influenciou significativamente a sobrevida das pacientes analisadas em nossa série, condizendo com dados obtidos por outros estudos. Assim concluímos que os métodos moleculares devem se tornar mais sensíveis

Palavras chave: imunohistoquímica, análise de sobrevida, HER-2/neu, neoplasias da mama.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most frequent type of cancer worldwide and more common among women, accounting for 22% of new cases each year. These tumors appear as heterogeneous evolution and response to different treatment available whose prognostic and predictive factors guiding the therapeutic approach being used. The detection of oncogenic protein c-erbB-2 by immunohistochemistry is a prognostic factor for diagnostic, and in most cases, is associated with a worse prognosis. This study aimed to raise clinicopathological data of patients with breast cancer, as well as evaluating the expression c-erbB-2 in tumor tissue paraffin samples of these patients. Medical records of 286 female patients with breast carcinoma treated at Hospital Araújo Jorge (Association of Cancer Combat of Goiás), between 1979 and 2002 were collected and tabulated together with data from immunohistochemical detection of c-erbB protein -2. In our series the positive immunodetection of c-erbB-2 in tumor cells showed no association with conventional parameters clinicopathologic. The immunodetection of the protein c-erbB-2 did not significantly affect the survival of patients analyzed in our series, consistent with data obtained by other studies. We conclude that molecular methods should become more sensitive.

Key words: immunohistochemistry, survival analysis, Neu gene, carcinoma.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia com maior proporção de incidência e mortalidade entre as mulheres (Pinho e Coutinho, 2005). As populações de maior risco se encontram na Europa Ocidental e nos Estados Unidos da América, enquanto as populações asiáticas apresentam taxas cinco vezes menores. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer (World Cancer Report, 2008). A distribuição dos casos novos de câncer segundo localização primária mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país, essa heterogeneidade fica em evidência ao observar-se a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2009).

A mama feminina é uma glândula secretora. Durante a lactação as glândulas mamárias produzem leite, que enche e aumenta o sistema multirramificado de dutos. Cerca de 90% de todos os cânceres de mama originam-se de células epiteliais dos dutos secretores. Inicialmente, os tumores de mama formam-se dentro dos dutos, embora algumas células cancerosas possam mais tarde deixar o interior de um ducto e formar massas de células no exterior do epitélio do ducto. Após metástase dos tumores de mama, sítios secundários podem incluir parede do tórax, pulmão, fígado, cérebro, ossos e outros locais. Metade dos cânceres de mama é detectada no quadrante superior, lateral (externo) da mama. Cânceres dos lobos e da pele da mama são raros (Pasternak, 2007).

Os fatores prognósticos mais difundidos para o câncer de mama são o tamanho do tumor, o comprometimento dos linfonodos axilares, o *status* dos receptores de

hormônio (estrógeno e progesterona) e a superexpressão de c-erbB-2. Existem também os fatores com menor peso prognóstico incluindo *status* de p53, ploidia do DNA, atividade mitótica entre outros. Quanto maior o número de fatores clinicopatológicos analisados melhor o estabelecimento de uma conduta terapêutica adequada (Onitilo *et al.*, 2009).

A c-erbB-2 é uma proteína transmembrana tipo I, que pertence ao receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, ErbB1). Dois membros adicionais, HER3 e 4 completam essa família. Quando a extremidade de ligação do EGFR se une à HER1, HER3 ou HER4, o domínio extracelular de c-erbB-2 adota uma conformação aberta, que permite a formação de um homo ou heterodímero. Apesar de não ter uma região ligante, HER2 se interage facilmente com os outros receptores de HER porque o seu domínio extracelular assume constitutivamente uma conformação aberta (Pedersen *et al.*, 2009).

Esse trabalho é justificado pelo câncer de mama ser a terceira neoplasia mais incidente entre as mulheres no mundo (INCA, 2009). A c-erbB-2 é uma oncoproteína pertencente à família dos EGFR que é superexpressa em cerca de 25% a 30% dos cânceres de mama (Darb-Esfahani *et al.*, 2009; Veiga *et al.*, 2009; Vaidyanathan *et al.*, 2010; Hsiao *et al.*, 2010). A hiperexpressão de c-erbB-2 é um parâmetro importante na conduta terapêutica de pacientes com câncer de mama. Associados a outros fatores clinicohistopatológicos, principalmente com os receptores de hormônio (estrógeno e progesterona), c-erbB-2 é citado como um pior fator prognóstico (Tan *et al.*, 2009; Koninki *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Panjwani *et al.*, 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o valor prognóstico da detecção imuno-histoquímica da proteína c-erbB-2 em pacientes com carcinoma de mama atendidas no Hospital Araújo Jorge (HAJ), Associação de Combate ao Câncer em Goiás

(ACCG), em Goiânia – GO; investigar a expressão da proteína c-erbB-2 por imunohistoquímica em 286 amostras de câncer de mama; avaliar a sobrevida das pacientes conforme expressão da proteína c-erbB-2; avaliar a associação da imunodeteção de c-erbB-2 com fatores clínico patológicos (idade, estadiamento clínico, comprometimento linfonodal, grau de anaplasia, presença de metástase à distância, imunodeteção de receptor de estrógeno e de progesterona).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 HISTÓRIA NATURAL DO CÂNCER DE MAMA

A proliferação inespecífica das células, que geralmente ocorre de forma lenta, pode levar vários anos para que um oncócito prolifere e dê origem a um tumor visível. A carcinogênese epitelial acontece em várias etapas com alterações moleculares e celulares, podendo ser descrita didaticamente em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, as células sofrem o efeito dos agentes carcinógenos que modificam alguns de seus genes. Durante a promoção, a célula iniciada é transformada em célula maligna, geralmente reversível, e envolve mecanismos primariamente epigenéticos. Por fim a progressão, que se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, envolve mecanismos primariamente genéticos (Pecorino, 2008).

A carcinogênese depende da proliferação celular. Sem a proliferação, há menos probabilidade de fixar mutações causadas por danos no DNA, esses danos podem ser expressos pela ativação ou inativação gênica. Os danos ao DNA são comuns, mas a maioria das células danificadas pode reparar seus danos ou então entrar num processo de apoptose. Se uma célula com danos no material genético sobreviver e proliferar rapidamente (ex: células durante o ciclo menstrual e o desenvolvimento mamário), uma maior probabilidade de ocorrências de erros irreparáveis é verificada. Acredita-se que os hormônios estrógeno e progesterona sejam um estímulo para a proliferação celular e a promoção do tumor (Griffiths *et al.*, 2006).

A carcinogênese mamária é mais frequente no período entre a menarca e a primeira gestação. As estruturas lobulares pouco diferenciadas da mama se desenvolvem rapidamente ao serem estimuladas pelos hormônios ovulatórios, estrógeno

e progesterona (Silva *et al.*, 2004; Hedau *et al.*, 2011). Durante a gravidez, os lóbulos mamários alcançam o grau máximo de desenvolvimento e diferenciação, diminuindo o risco e a susceptibilidade ao desenvolvimento da neoplasia. A gravidez precoce e a multiparidade fecham a janela de risco, enquanto a gestação tardia e a nuliparidade a estendem (Hedau *et al.*, 2011).

2 EPIDEMIOLOGIA

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (Organização Mundial de Saúde), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhão de casos novos), mama (1,29 milhão) e cólon e reto (1,15 milhão). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhão), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, América Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (World Cancer Report, 2008).

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado, além de ser o tipo de câncer com maior índice de mortalidade entre as mulheres de todo o mundo, representa 23% (1,38 milhão) do total de novos casos de câncer e 14% (458.400 mil) do total de mortes por câncer em 2008. As taxas de incidência são mais elevadas na Europa Ocidental e do Norte, Austrália, Nova Zelândia e América do Norte; intermediárias na América do Sul, Caribe e África do Norte; e baixa na África

Subsariana, África e Ásia. Esse fato pode ser explicado pelas diferenças nos fatores reprodutivos e hormonais, detecção precoce da neoplasia, fatores reprodutivos que aumentam o risco como o longo período menstrual, nuliparidade, uso recente de terapias hormonais pós-menopausa ou anticoncepcionais orais, idade e consumo de bebida alcoólica (Jemal *et al.*, 2011). Nas últimas duas décadas, pôde ser constatada redução nas taxas de mortalidade por câncer de mama em países da Europa e da América do Norte. Entretanto, a situação é diferente nos países em desenvolvimento. Na América Latina, a mortalidade por câncer de mama aumentou. As regiões com maior mortalidade são o norte da Europa e o oeste e sul da África, com taxas de 17,8, 18,9 e 19,3 por 100mil (ano), respectivamente. As áreas de mais baixa taxas são a Ásia e América Central, com valores de 9,5 e 9,6 por 100 mil (Rodrigues e Bustanante - Teixeira, 2011).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, são de 49.240 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. A doença é mais incidente na região Sudeste com o risco estimado de 65 casos novos por 100.000 mulheres, seguida pela região Sul (64/100.000), Centro-Oeste (38/100.000), Nordeste (30/100.000) e Norte (17/100.000). No Estado de Goiás, 1.070 novos casos de câncer de mama são esperados, em que o terceiro tipo de câncer mais incidente no Estado após os cânceres de pele não melanoma e o de próstata. Em Goiânia, 360 novos casos de câncer de mama são esperados, com estimativa e risco de 51,87 casos para cada 100 mil habitantes (INCA, 2009).

A análise da mortalidade por grupos etários ratificou a premissa do incremento da mortalidade por câncer com o envelhecimento (Rodrigues e Bustanante - Teixeira, 2011). A ocorrência de câncer de mama em mulheres jovens é um evento infrequente.

Cerca de 6,5% dos casos desta neoplasia ocorrem em mulheres com menos de 40 anos e 0,6%, em mulheres com menos de 30 anos (Clagnan *et al.*, 2008).

3 FATORES DE RISCO

O câncer de mama é uma doença com múltiplos fatores associados, engloba uma interação entre os chamados fatores genéticos, ambientais e comportamentais. Para Hankinson *et al.* (2004), os fatores de risco confirmados pela literatura incluem história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau, predisposição genética (mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* e outros), doenças benignas prévias como adenose esclerosante, doenças proliferativas da mama, mamas densas à mamografia, nuliparidade, idade da primeira gestação à termo após os 30 anos, uso de hormônios na pós-menopausa, exposição à radiação ionizante na infância, menarca antes dos 12 anos, alto índice de massa corpórea e o uso de bebidas alcoólicas, sedentarismo, alimentação.

Concentrações elevadas de High Density Lipoproteins colesterol (HDL-C) foram associados com maior risco de câncer de mama, que pode ser devido ao seu efeito sobre a proliferação celular na mama. Entretanto, estudos desta associação relatam resultados inconsistentes. A densidade mamográfica é associada positivamente com o câncer de mama, que pode ser útil como um marcador intermediário de risco de câncer de mama. Os níveis de lipídeos são correlacionados com níveis de hormônios sexuais endógenos, que podem estar envolvidos na proliferação do estroma da mama. A obesidade aumenta o risco de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa por um mecanismo hormonal que envolve o metabolismo de um precursor androgênico ao estrogênio no tecido adiposo. Além disso a proliferação do parênquima mamário é influenciada pelo estrógeno (Sung *eta l.*, 2011).

Acredita-se que o mecanismo da carcinogênese mamária seja o resultado da estimulação estrogênica do crescimento tecidual (proliferação) e do potencial genotóxico dos metabólitos resultantes do metabolismo do estrogênio sérico. A idade e o sexo são considerados os dois mais importantes fatores de risco não hormonais para o câncer de mama (Pruthi *et al.*, 2007). As pacientes jovens têm uma incidência baixa de câncer de mama. A partir dos 30 anos, o risco estimado de desenvolvimento de câncer de mama é de 1 em 250 mulheres; aos 40 anos é de 1 em 77 mulheres, enquanto que em idades mais avançadas, este risco supera 1 em 34 mulheres (Cébrían, 2005). Algumas lesões mamárias também são consideradas marcadoras de alto risco para o desenvolvimento do câncer de mama invasivo, como as lesões proliferativas com ou sem atipia e a neoplasia lobular *in situ*. Outras lesões comportam-se como precursoras diretas do câncer invasivo como o carcinoma ductal *in situ* (Calvo, 2005).

4 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA

A classificação histológica dos tumores de mama é resultante de um consenso, coordenado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (CID-O, 2000) que classifica os tumores epiteliais em:

- 1- Carcinomas ductais invasivos;
- 2- Carcinomas lobulares invasivos;
- 3- Carcinomas tubulares;
- 4- Carcinomas medulares;
- 5- Carcinomas mucinosos;
- 6- Carcinomas micropapilíferos;
- 7- Outros carcinomas invasivos: adenóide, cístico, sebáceo, neuroendócrino e outros;

8- Lesões *in situ* de mama: neoplasia lobular *in situ*, carcinoma ductal *in situ*.

5 ESTADIAMENTO CLÍNICO

A classificação dos tumores malignos de mama segue a classificação com agrupamentos por estádios, publicada pela UICC (União Internacional Contra o Câncer) (UICC, 2004). A classificação é aplicável somente para carcinomas, tanto para mama feminina quanto a masculina em que a doença deve ser confirmada histologicamente, conforme descrito no quadro 1.

6 ANATOMIA DA MAMA

As mamas são estruturas anexas à pele especializadas na produção de leite. Elas existem em ambos os sexos, mas são rudimentares nos homens. Nas mulheres, as mamas desenvolvem-se e diferenciam-se na puberdade, e atingem seu maior desenvolvimento na gravidez e lactação (Órfão e Gouveia, 2009).

A mama localiza-se ventralmente aos músculos peitoral maior, serrátil anterior e oblíquo externo. Estende-se da 2^a à 6^a costela e do osso esterno à linha axilar média, na mulher. A extensão do tecido glandular (glândula mamária) é maior do que a da mama, na mulher. O tecido pode atingir a axila em graus variáveis (a chamada “cauda axilar” ou processo lateral axilar), chegar até a clavícula em seu limite superior à fossa epigástrica no inferior, medialmente à região esternal e lateralmente à borda do grande dorsal (Sobotta, 1984).

Tabela 1: Classificação dos tumores de mama segundo estágio clínico.

TNM	Grupamento por estágio
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, N0, N1, N2, M0
Estádio IIIC	Qualquer T, N3, M0
Estádio IV	Qualquer T, qualquer N, M1

Fonte: UICC – 6ª edição, 2004

Em que:

Tumor primário (T): TX: tumor primário não pode ser avaliado; T0: sem evidência de tumor primário; Tis: carcinoma Intraductal, Carcinoma Lobular *in situ*, ou Doença de Paget do mamilo com ou sem associação de invasão de tecido mamário normal; T1: tumor ≤ 2 cm em sua maior dimensão; T2: tumor > 2 cm a 5 cm em sua maior dimensão; T3: tumor > 5 cm em sua maior dimensão; T4: tumor de qualquer tamanho

com extensão direta a parede torácica(a) ou a pele(b) ou ambas(c) e carcinoma inflamatório(d). **Linfonodos Regionais (N):** NX: linfonodos regionais não podem ser avaliados; N0: sem evidência de metástase linfonodal; N1: metástase para linfonodo axilar móvel ipsilateral; N2: metástase para linfonodo axilar fixo ipsilateral, ou linfonodo da cadeia mamária interna, clinicamente aparente ipsilateral na ausência de evidentes metástases linfonodais clinicamente evidentes; N3: metástase em linfonodos infraclaviculares ipsilaterais com ou sem envolvimento axilar evidente, ou metástase em linfonodos supraclaviculares ipsilaterais com ou sem envolvimento axilar ou envolvimento de cadeia mamária interna. **Metástase à distância (M)** MX: presença de metástase à distância que não pode ser avaliada; M0: Sem metástase à distância; M1: metástase à distância.

O volume ocupado pela mama é composto de glândula mamária, gordura, vasos sanguíneos, nervos e tecidos linfáticos (Sobotta, 1984). O tecido glandular é composto pelas células produtoras de leite e está na sua maioria localizado a cerca de 3 cm da base do mamilo. O tecido adiposo distribui-se imediatamente abaixo da pele (tecido adiposo subcutâneo), no interior da glândula mamária (intra-glandular) e atrás do tecido glandular (retro-mamário) à frente do músculo peitoral. O tecido subcutâneo na base do mamilo é mínimo. Quanto à forma, podem ser hemisféricas, cônicas, piriformes, cilíndricas ou discóides, são ligeiramente assimétricas e separadas pelo sulco intermamário e limitadas inferiormente pelo sulco inframamário. Os ácinos ou alvéolos mamários são constituídos por células secretoras rodeadas por tecido mioepitelial, organizados em 7 a 10 lobos que se dividem em lóbulos e estão separados por septos fibrosos (ligamento de Cooper) que se estendem da faixa profunda à pele. Cada um dos ductos excretores termina de forma independente no mamilo. O mamilo ou papila mamária é constituído por fibras mamárias lisas, é proeminente, cilíndrico e circundado por uma zona mais escura de tamanho variável e pele pigmentada que pode apresentar alguns pêlos, chamada aréola. Na aréola, pequenas papilas com 1 ou 2 milímetros de diâmetro constituídas por uma glândula sebácea e algum tecido mamário, são ainda observáveis, e correspondem às glândulas de Montgomery (Figura:1) (Órfão e Gouveia, 2009).

A drenagem linfática da mama é complexa e de particular interesse devido ao seu potencial de disseminação à distância e a seu valor prognóstico e terapêutico na evolução do câncer de mama. Uma rede linfática é formada sobre a superfície inteira do tórax, pescoço e abdômem e se torna densa sob a aréola. Existem 3 padrões de drenagem linfática na base da mama: a) a drenagem principal ou axilar (ou retropeitoral) que passa pelas metades superior e inferior da mama para a cadeia lateral de linfonodos situadas entre o segundo e terceiro espaço intercostal; b) a drenagem transpeitoral que passa através do músculo peitoral maior para os linfonodos supraclaviculares e c) a drenagem mamária interna que passa através da linha média, pelo músculo peitoral maior, frequentemente próximo do esterno, para os linfonodos paraesternais (ou torácicos internos ou ainda, da cadeia mamária interna) (Sobotta, 1984).

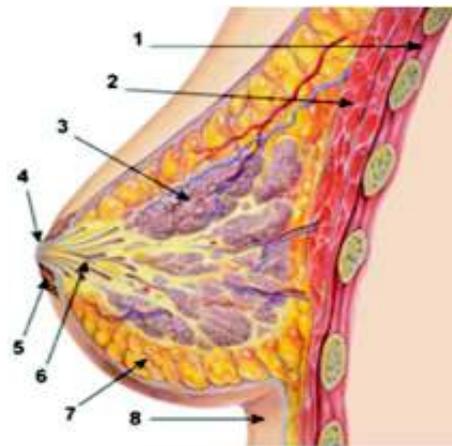


Figura 1: Diagrama esquemático de uma mama.

Legenda: 1. Caixa torácica; 2. Músculo peitoral; 3. Lóbulos; 4. Mamilo; 5. Aréola; 6. Ductos; 7. Tecido adiposo; 8. Pele. Fonte: [HTTP://pt.encydia.com/es/mama](http://pt.encydia.com/es/mama)

7 GENE E PROTEÍNA C-ERBB-2

O oncogene *c-erbB-2* foi primeiramente descrito em 1985 como um receptor celular da família da tirosina quinase, com uma sequência primária semelhante ao

EGFR (Tan *et al.*, 2009), desde então sua expressão é estudada em diferentes tipos de câncer, como: pulmão, mama, colorretal e outros. A superexpressão desse gene é atualmente considerado não só como um importante marcador de possível mau prognóstico, mas também como um fator determinante para aplicação da quimioterapia (Belengeanu *et al.*, 2010).

A proteína c-erbB-2 é um receptor glicoprotéico transmembrânico pertencente ao tipo I do receptor de tirosina quinase, e apresenta alta homologia com os outros membros da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico (Veiga *et al.*, 2009). O oncogene c-erbB-2 está localizado no cromossomo 17q21 que codifica uma proteína com 1.255 amino-ácidos altamente fosforilada de peso molecular 185 kDa (Figura: 2) (Vaidyanathan *et al.*, 2010).

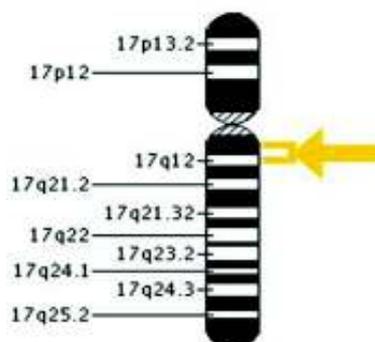


Figura 2: Localização do gene *c-erbB-2* no cromossomo. (Retirado do site: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ERBB2>)

A proto-oncoproteína c-erbB-2 funcional é um dímero que contém um domínio extracelular de ligação e um domínio de atividade intracelular de tirosina quinase. O aumento da expressão da oncoproteína c-erbB-2 acarreta autofosforilação do receptor específico e subsequente ativação de cinases envolvidas em mecanismos de transdução de sinais, que podem afetar a transcrição de genes reguladores da progressão do ciclo celular (Silva *et al.*, 2002). Por isso, a ativação anômala do gene *c-erbB-2* leva à

exacerbação das funções sinalizadas pela proteína c-erbB-2 (Figura:3) (Veiga *et al.*, 2009).

Na superfície das células, a dimerização dos domínios extracelulares leva a interação entre as quinases intracelulares dos receptores de HER e a uma subsequente transfosforilação de resíduos de tirosina da porção C-terminal. Circuitos de sinalização controlam a expressão de genes alvo que atuam de forma coordenada para modificar aspectos fundamentais da biologia celular, como: proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação (Figura: 3) (Pedersen *et al.*, 2009).

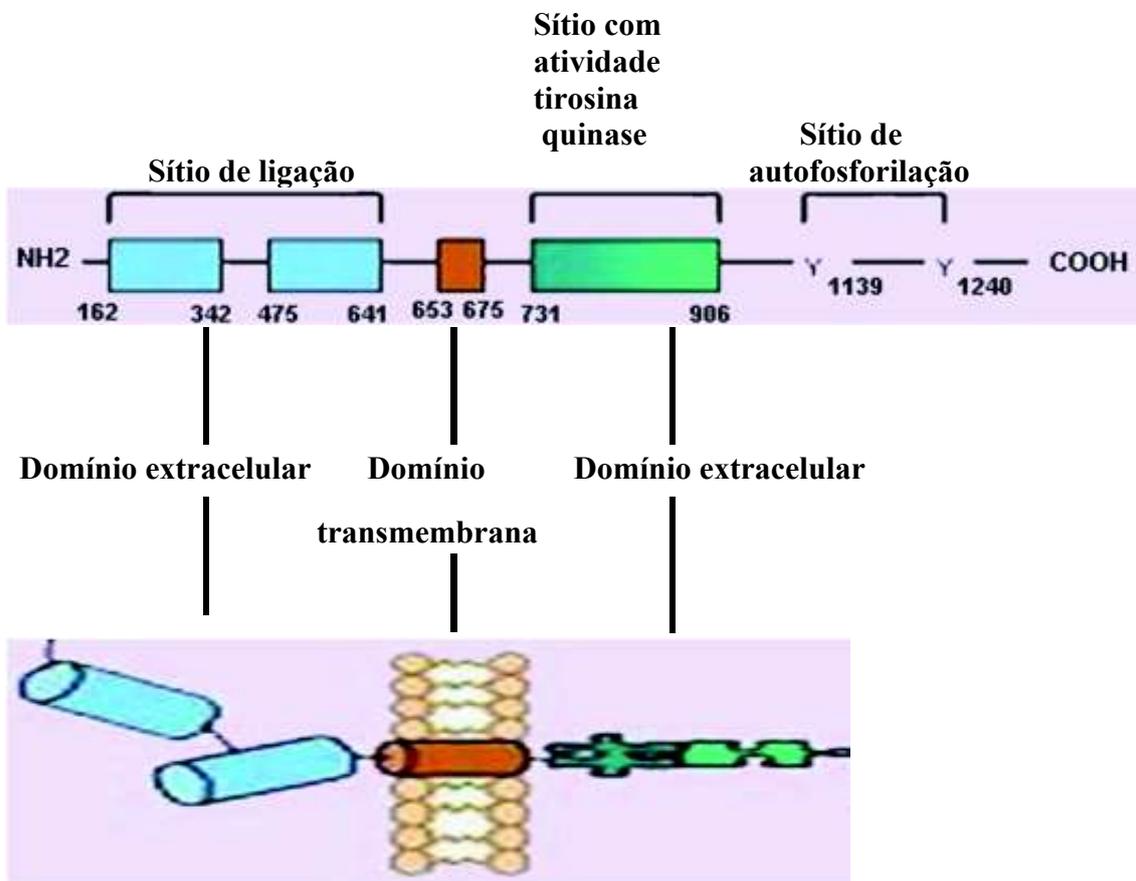


Figura 3: Representação esquemática da proteína c-erbB-2. (Modificado do site: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ERBB2ID162ch17q11.html>).

O gene é expresso em uma ampla variedade de tecidos e está envolvido em uma série de processos biológicos importantes, como: ciclo celular, apoptose, migração e

adesão celular (Peres *et al.*, 2009). A *c-erbB-2* pode tanto homo como heterodimerizar com os outros membros da família EGFR e ativar um conjunto de vias de transdução de sinal (Vaidyanathan *et al.*, 2010).

O mecanismo de função de *c-erbB-2* depende de um ligante, o fator de crescimento epidérmico (EGF) ou o transformador do fator de crescimento-alfa (TGF-*alpha*), atingindo a porção extracelular da proteína, levando à dimerização desse receptor (Hussein *et al.*, 2008). Por não possuir uma porção receptora conhecida, a proteína *c-erbB-2* dimeriza-se ao EGFR para ocorrer a transdução de sinal, desencadeando a via da MAP-quinase, envolvendo outras proteínas que agem fosforilando os fatores de transcrição para genes alvo nas vias de transdução de sinal de fatores de crescimento e seus receptores (Caffarel *et al.*, 2010). A amplificação do gene *c-erbB-2* está correlacionada com necrose e com o acúmulo de mutações do gene *TP53*. A expressão aumentada de *c-erbB-2* em carcinomas *in situ* da mama está associada à aneuploidia e a índices aumentados de proliferação celular. A diferença de expressão nas porcentagens de *c-erbB-2* nos carcinomas invasivo e *in situ*, indicam que há perda da expressão durante a progressão de um estado para o outro (Peres *et al.*, 2009).

8 ANÁLISE DA PROTEÍNA C-ERBB-2 POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

A amplificação do gene *c-erbB-2* pode ser detectada por vários métodos o que inclui a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), reação em cadeia da polimerase (PCR), e a superexpressão do receptor é detectada por imunohistoquímica (Sircoulomb *et al.*, 2010).

O estudo imuno-histoquímico é utilizado em diferentes situações da patologia mamária, como: avaliação de fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama,

pesquisa de células epiteliais metastáticas em linfonodo sentinela, diagnóstico diferencial de lesões mamárias e determinação de possível origem de neoplasias metastáticas (Salles *et al.*, 2009).

A técnica de imuno-histoquímica consiste na marcação de anticorpos com enzimas. Assim, a técnica de imuno-histoquímica se baseia na capacidade que têm os anticorpos específicos de se ligarem a antígenos correspondentes. O complexo enzima-anticorpo é capaz de se ligar ao antígeno específico no tecido. A peroxidase e a fosfatase alcalina são as enzimas mais usadas. Os anticorpos reconhecem antígenos que são expressos por células de histogênese específica (Zuccari *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, a imuno-histoquímica revolucionou a prática da Anatomia Patológica, o que permitiu a identificação de diferentes tipos de marcadores (enzimas, receptores, produtos de genes, etc.) que estão relacionados ao comportamento biológico das neoplasias. A disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama se expande progressivamente e permite que se conheça melhor a biologia da referida neoplasia, oferecendo, com isso, um prognóstico, um diagnóstico e um tratamento mais estruturado para o controle dessa classe tumoral (Zuccari *et al.*, 2008).

No ano de 1989, pesquisadores confirmaram que anticorpos contra c-erbB-2 poderiam inibir o crescimento de linhagem de carcinoma mamário *in vitro* (Ross e Fletcher, 1998). A partir desse estudo foi desenvolvida uma droga denominada Trastuzumab (Herceptin) usada como uma alternativa terapêutica às pacientes que apresentam amplificação ou superexpressão de *c-erbB-2* (Eisemberg e Koifman, 2001). O resultado da imunohistoquímica é expresso em um sistema de 4 classes (0 para negativo, 1+, 2+ e 3+). A positividade imunohistoquímica a esse marcador é considerada como um fator prognóstico desfavorável diminuindo o tempo de remissão da doença e diminuição da

sobrevida (Pedersen *et al.*, 2009). Estudos demonstram que a sobrevida média é reduzida em 50% para pacientes que expressam c-erbB-2, quando comparados com aqueles que são c-erbB-2 negativos (Thomas e Berner, 2000; Climent *et al.*, 2001; Eisemberg e Koifman, 2001).

METODOLOGIA

1 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Foram selecionadas 286 pacientes do sexo feminino atendidas no HAJ/ACCG, independente do estadiamento clínico, com carcinomas de mama comprovados histologicamente. Um levantamento inicial nos livros de registro, que contém cópias dos laudos imuno-histoquímicos, foi realizado selecionando – se os casos no período de 1979 a 2002. Blocos de parafina que continha espécimes tumorais destas pacientes foram obtidas dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do HAJ - ACCG.

A análise dos prontuários possibilitou a coleta de dados, tais como: idade na época do diagnóstico, evolução da doença, óbito (quando registrado), características tumorais relativas ao tipo e graduação histológica (Bloom e Richardson, 1957), bem como dados de tamanho de tumor, expressão de receptores hormonais e c-erbB-2. Essas informações foram inseridas em uma planilha de banco de dados. O seguimento desejado foi de no mínimo cinco anos para que fossem analisados os dados de sobrevida.

2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE C-ERBB-2

As análises imuno-histoquímicas realizadas no Laboratório de Imuno-Histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica do HAJ, empregaram espécimes tumorais fixados em formalina e incluídos em parafina. Cortes de espessura de 3 micras foram preparados e montados em lâminas. A reação de imuno-histoquímica foi conduzida conforme descrito por Silva *et al.*(2002).

A análise imuno-histoquímica empregou o método de estreptoavidinabiotina-
imunoperoxidase (Super ABC, kite universal, Novo Crasta) e a imunodeteção da

proteína c-erbB-2 foi feita com anticorpo policlonal produzido em coelho (DAKO; 1/8000) conforme especificações técnicas do fabricante.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de prontuários e resultados experimentais foram tabulados em planilhas de um banco de dados para análise estatística. Todas as frequências observadas foram confrontadas com a finalidade de testar a hipótese da pesquisa, ou seja, que a imunodeteção de c-erbB-2 teria associação com fatores clinicopatológicos clássicos (idade, grau de anaplasia, estadiamento clínico, comprometimento linfonodal e c-erbB-2) e que sua imunodeteção positiva influencia na sobrevida das pacientes por ser um mal fator prognóstico.

As pacientes foram agrupadas, de acordo com a expressão da proteína c-erbB-2, para cálculo da curva de sobrevida pelo método de Kaplan e Meier (1958). Estas curvas foram construídas em algumas situações distintas, conforme categorizações das variáveis independentes, e posteriormente comparadas através do teste de X^2 . Em todos os testes estatísticos de hipóteses considerados neste estudo, obteve-se como significativos aqueles resultados associados a um valor de p menor que 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico Bio Estat 3.0.

4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Alguns critérios foram utilizados para que o trabalho pudesse ter continuidade, destes: (1) todas as amostras deveriam ser de pacientes do sexo feminino; (2) que o diagnóstico de câncer de mama fosse confirmado por um médico patologista; (3) que os pacientes fossem procedentes do Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao

Câncer em Goiás. Caso alguns desses critérios não fossem observados as amostras eram desconsiderados para esta pesquisa.

RESULTADOS

1 DADOS CLINICOPATOLÓGICOS

Foram analisados 286 casos de mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama atendidas na Associação de Combate ao Câncer do Estado de Goiás (HAJ) entre 1979 e 2002. A idade das pacientes variou de 23 a 90 anos, com uma média de 52 anos e mediana de 50 anos e 5 meses. Vinte e quatro (8,4%) apresentavam idade abaixo de 35 anos, 119 (41,6%) tinham idades entre 35 e 50 anos, 141 (49,3%) tinham idades acima de 50 anos e duas (0,7%) não tiveram a idade relatada (Figura: 4).

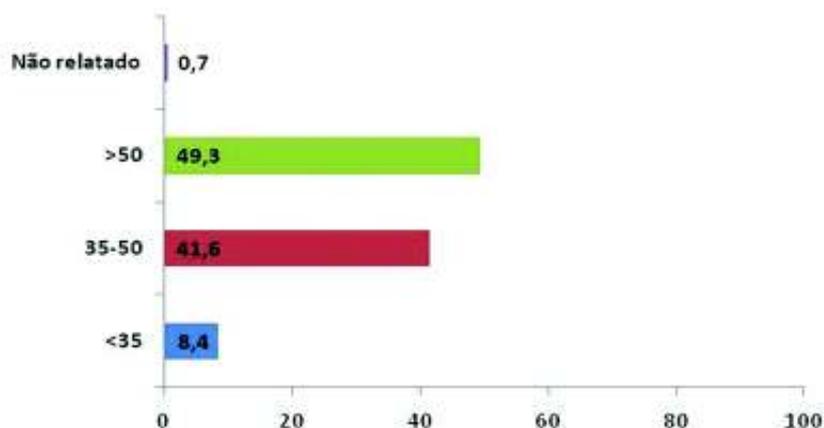


Figura 4: Distribuição das pacientes de acordo com a faixa etária.

Segundo a classificação TNM da UICC (União Internacional Contra o Câncer), três pacientes (1%) apresentaram estágio clínico 0, 28 pacientes (9,8%) apresentaram estágio clínico I, 138 pacientes (48,3%) apresentaram estágio clínico II, 63 pacientes (22,1%) apresentaram estágio clínico III, 15 pacientes (5,2%) apresentaram estágio clínico IV e 39 pacientes (13,6%) não tiveram estadiamento relatado (Figura 5).

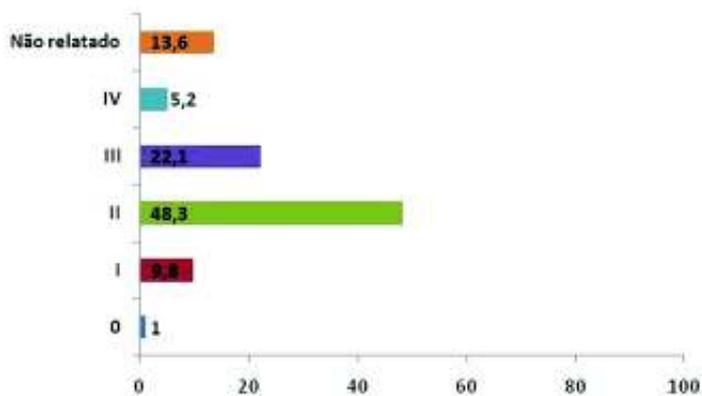


Figura 5: Distribuição das pacientes de acordo com o estadiamento clínico.

Quanto ao comprometimento de linfonodos axilares, 138 pacientes (48,3%) não tiveram comprometimento linfonodal, 57 pacientes (19,9%) apresentaram de 1 a 3 linfonodos comprometidos, 32 pacientes (11,2%) apresentaram de 4 a 9 linfonodos comprometidos, 35 pacientes (12,2%) apresentaram mais de 10 linfonodos comprometidos e 24 pacientes (8,4%) não tiveram o número de linfonodos comprometidos relatados (Figura6).

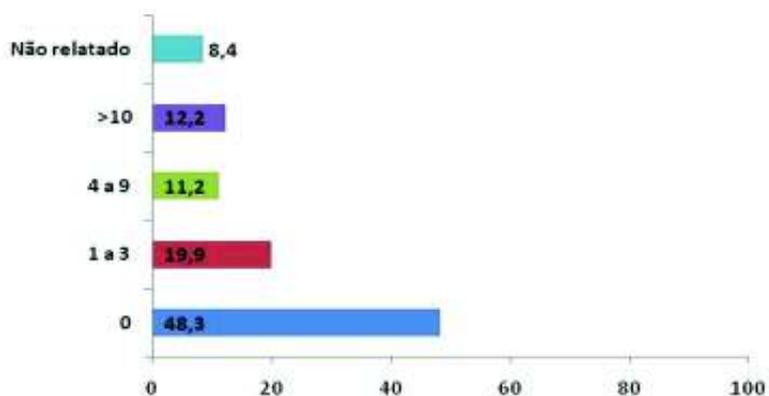


Figura 6: Distribuição das pacientes de acordo com o comprometimento de linfonodos axilares.

Quanto ao grau de anaplasia do tumor, 15 tumores (6%) foram classificados com grau histológico I, 189 tumores (65%) com grau histológico II, 51 tumores (18%) com grau histológico III e 30 tumores (11%) não tiveram graduação histológica determinada (Figura 7).

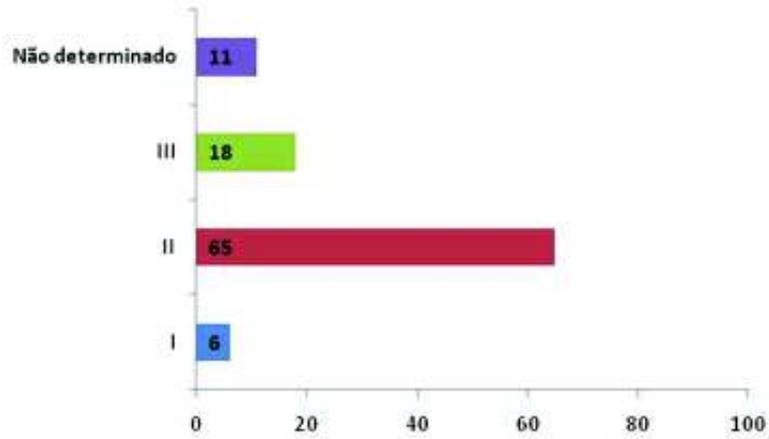


Figura 7: Distribuição das pacientes de acordo com o grau de anaplasia.

Quanto ao tipo histológico, o carcinoma ductal infiltrante foi o mais freqüente, com 254 casos (89%), seguido do carcinoma lobular infiltrante com 16 casos (6%), carcinoma medular com 3 casos (1%) e outros tipos histológicos com 13 casos (4%) (Figura 8).

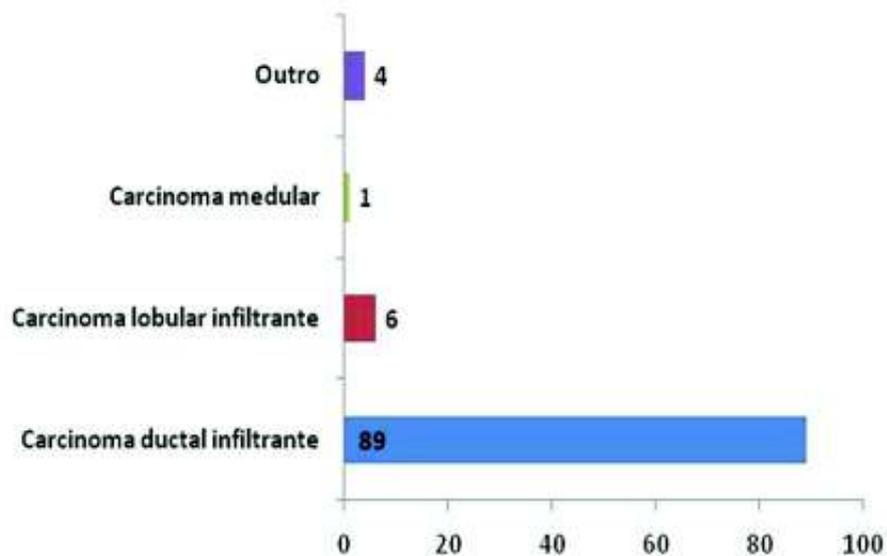


Figura 8: Distribuição das pacientes de acordo com o tipo histológico da neoplasia.

As metástases à distância foram descritas em 121 pacientes perfazendo 43% dos casos. A localização mais frequente de metástases foi no pulmão (19%), ossos (18%), linfonodos não axilares (18%), fígado (13%) e outros locais (32%). A recidiva local foi observada em 61 pacientes (22%) (Figura 9).

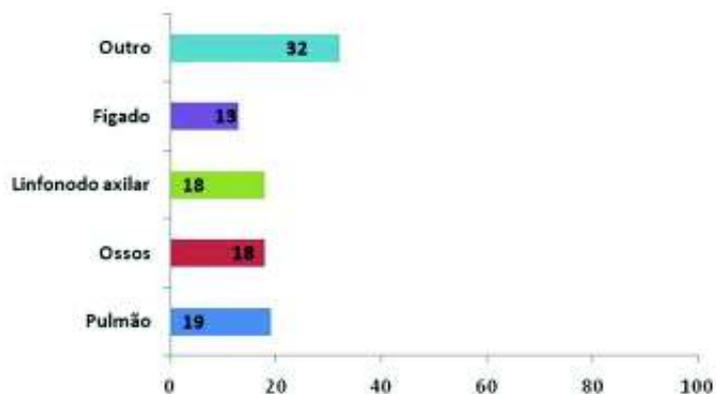


Figura9: Distribuição das pacientes de acordo com o local de metástase.

2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE C-ERBB-2

Todos os 286 casos foram avaliados quanto à imunodeteção de receptores de estrógeno, receptores de progesterona e c-erbB-2. A superexpressão de c-erbB-2 foi normal em 2 casos (0,7%), positiva em 47 casos (16,4%), negativa em 235 casos (82,2%) e inconclusiva em 2 casos (0,7%) (Figura 10). Quanto à imunodeteção do receptor de progesterona, 114 casos (40%) foram negativos, 171 casos (59%) foram positivos e um caso (1%) foi inconclusivo (Figura 11). A imunodeteção do receptor de estrógeno foi positiva em 190 casos (66,5%), negativa em 94 casos (32,5%) e um caso (1%) inconclusivo (Figura 12).

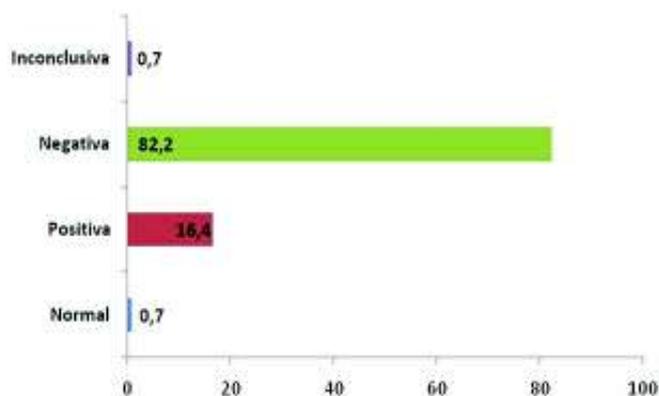


Figura 10: Distribuição das pacientes de acordo com imunodeteção da proteína c-erbB-2.

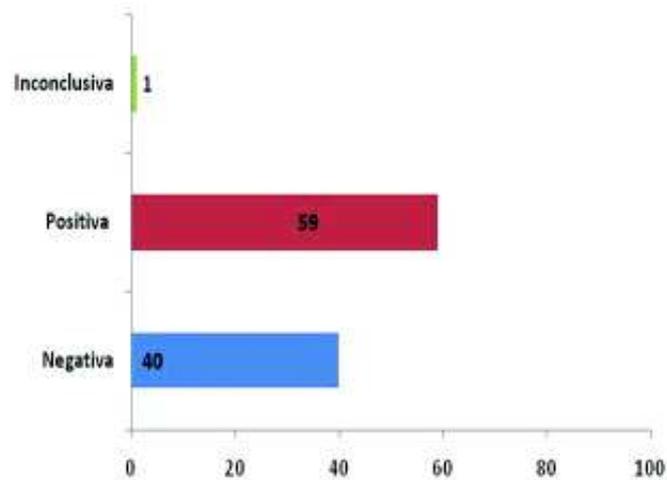


Figura 11: Distribuição das pacientes de acordo com a imunodeteccção do receptor de progesterona.

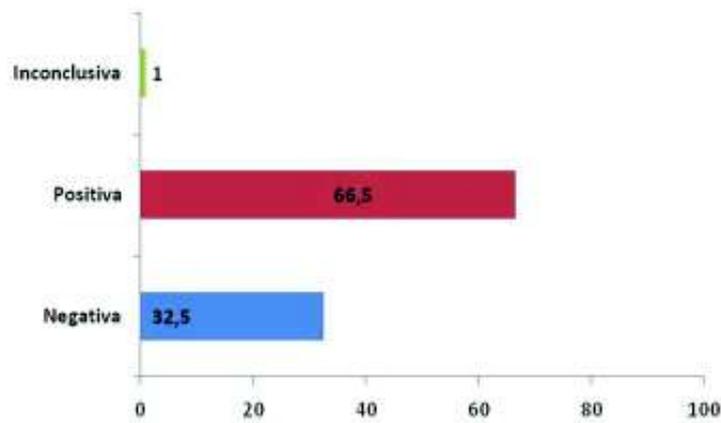


Figura 12: Distribuição das pacientes de acordo com a imunodeteccção do receptor de estrógeno.

3 SOBREVIDA GLOBAL

Das 286 pacientes, a sobrevida global em cinco anos foi de 72,7%, em que 208 pacientes estavam vivas ao final do período (Figura 13). Utilizando o teste de Log-Rank, foi verificado que os fatores que influenciaram significativamente a sobrevida das pacientes foram: o estadiamento clínico, o comprometimento dos linfonodos axilares e a presença de metástases à distância.

O estadiamento clínico representou um fator prognóstico estatisticamente significativo para as pacientes estudadas. A sobrevida global para o grupo foi de 89,8% nas pacientes com estágio I, 83,5% nas pacientes com estágio II, 59,2% para as de estágio III e 51,8% para as de estágio IV ($p = 0,01$) (Figura 14).

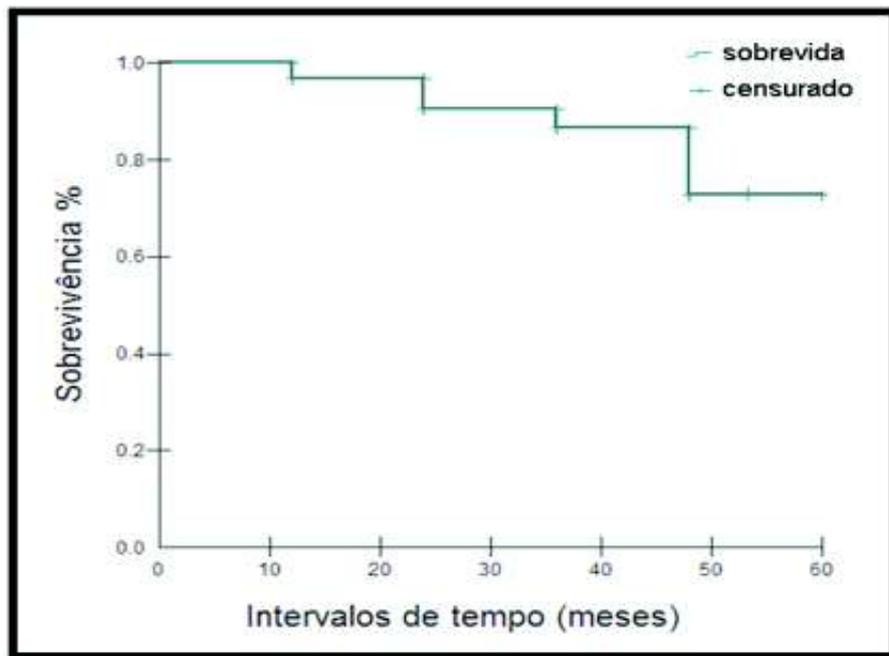


Figura 13: Sobrevida global em cinco anos para grupo de pacientes.

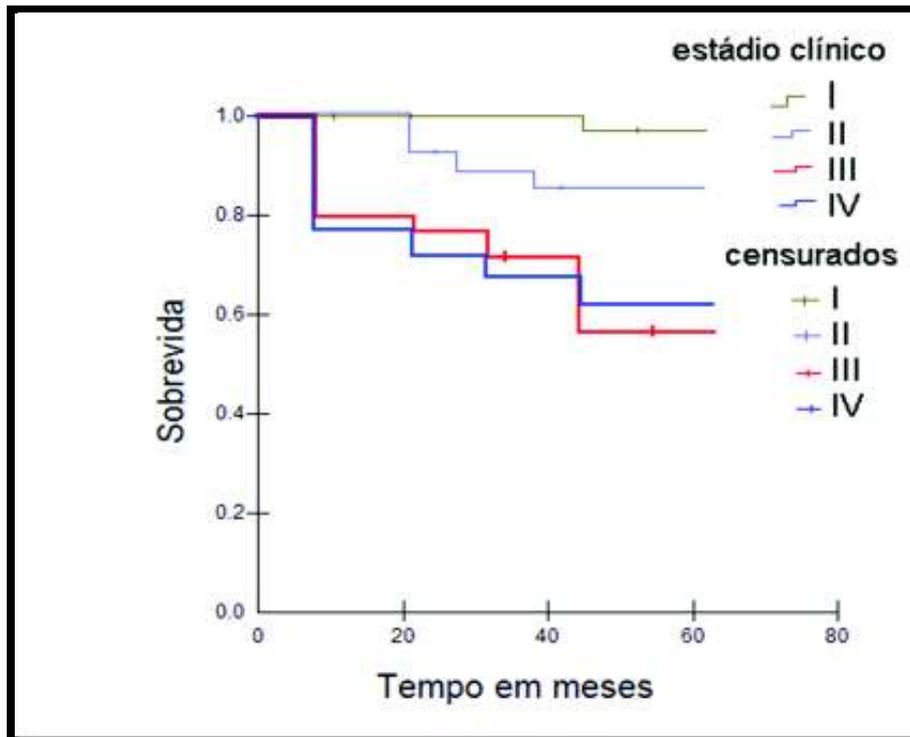


Figura 14: Sobrevida em cinco anos avaliada de acordo com o estadiamento clínico.

O comprometimento dos linfonodos axilares mostrou-se um fator de prognóstico significativo uma vez que a sobrevivida das pacientes com câncer de mama sem comprometimento da axila foi de 92,6% em 5 anos, 80,8% para as pacientes com 1-3 linfonodos comprometidos, 87,4% para o grupo com 4-9 linfonodos comprometidos e 42,9% para as que tinham 10 ou mais linfonodos comprometidos ($p = 0,003$) (Figura 15).

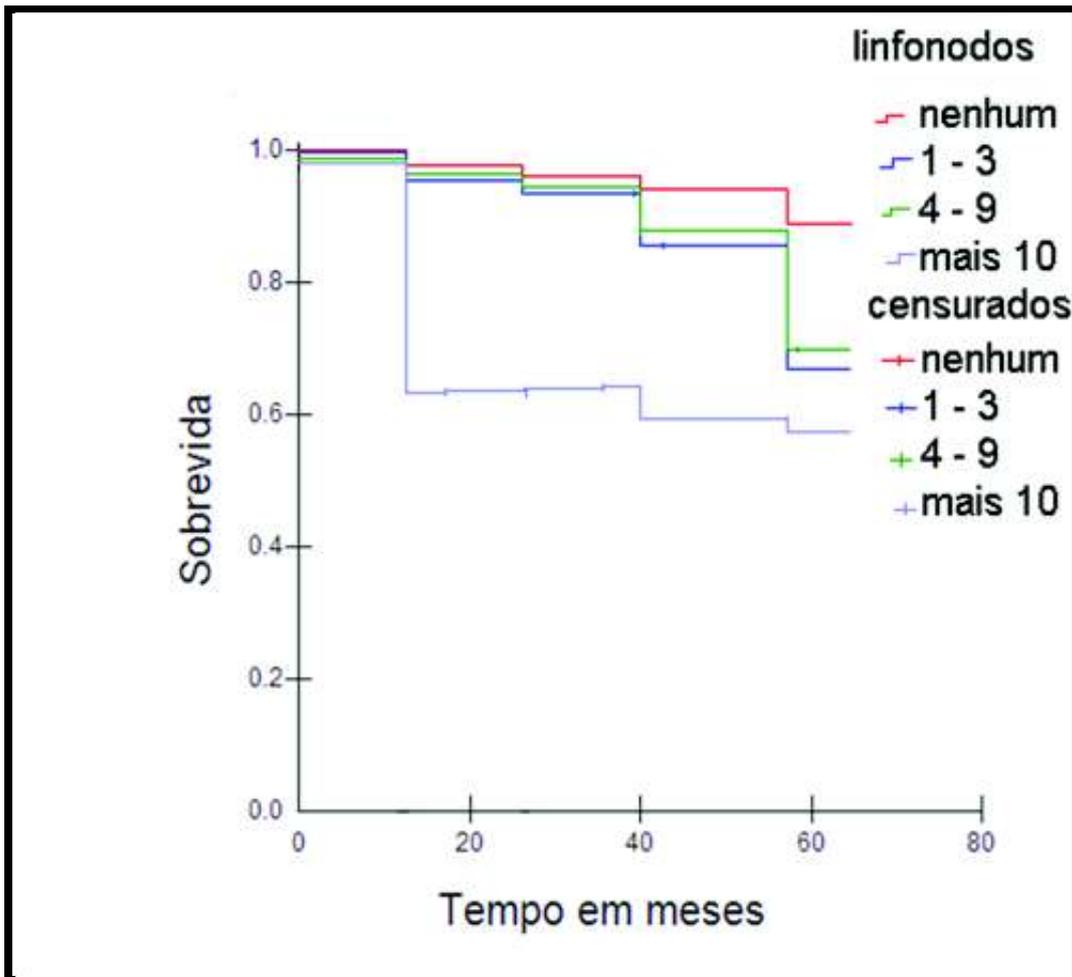


Figura 15: Sobrevida em cinco anos avaliada de acordo com o número de linfonodos comprometidos

A presença de metástases à distância influenciou significativamente a sobrevida. A sobrevida global em 60 meses nos casos em que houve relato de metástase foi de 50,8% contra 86,3% nas pacientes sem metástase ($p = 0,002$) (Figura 16).

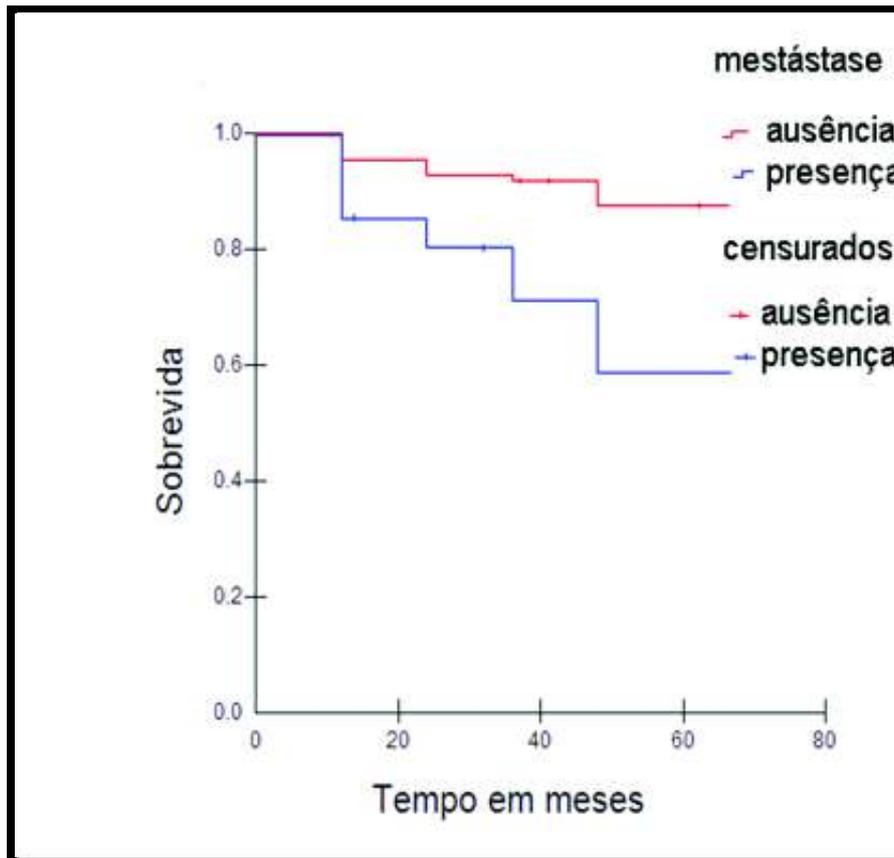


Figura 16: Sobrevivida em cinco anos avaliada de acordo com a presença de metástase à distância.

Os marcadores imuno-histoquímicos para o receptor de estrógeno e progesterona apresentaram influência significativa para a sobrevivida do grupo estudado ($p = 0,017$) e ($p = 0,002$), respectivamente. A expressão de c-erbB-2 foi avaliada em 286 casos, entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada na sobrevivida das pacientes com imunodeteção positiva ou negativa ($p = 0,68$) (Figura 17).

Das 286 amostras analisadas, 51 (17,8%) amostras eram triplo negativas. Ao relacionar os triplo negativos com os outros marcadores imuno-histoquímicos (RE, RP, c-erbB-2) separadamente, pode-se observar que RE+, RP+, c-erbB-2 – apresentaram significância para o cálculo da sobrevivida ($p = 0,007$), ($p = 0,0009$) e ($p = 0,0028$) respectivamente.

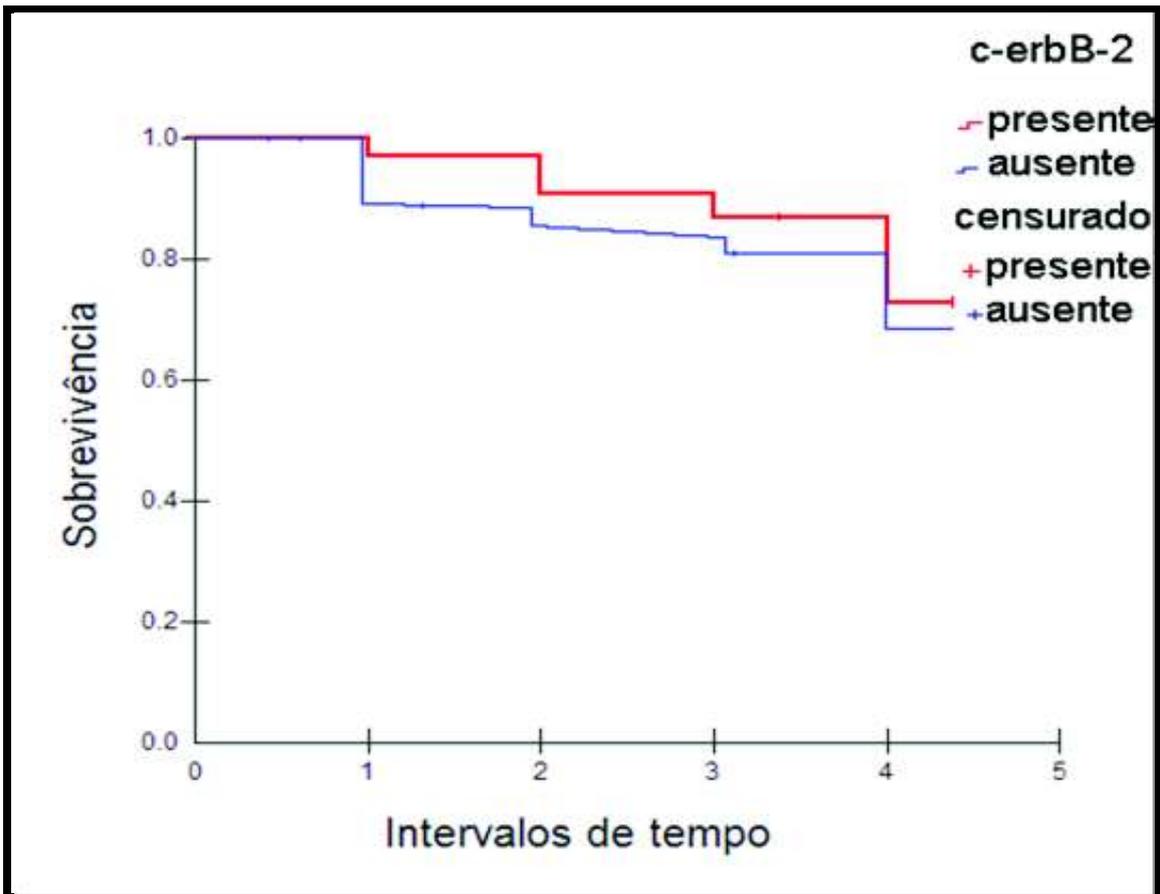


Figura 17: Sobrevivência em cinco anos avaliada de acordo com a imunopresença da proteína c-erbB-2.

4 ASSOCIAÇÃO ENTRE IMUNODETECÇÃO DE C-ERBB-2 E PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS

Utilizando o teste do qui-quadrado, foram investigadas as possíveis associações entre a imunodeteção de c-erbB-2 com: idade, estadiamento clínico, comprometimento linfonodal, grau de anaplasia, presença de metástase à distância, imunodeteção do receptor de estrogênio e progesterona. Dentre estes parâmetros, verificou-se que nenhuma associação foi estatisticamente significativa. Entretanto, houve uma associação significativa entre a imunodeteção positiva de c-erbB-2 e os receptores de estrogênio ($p = 0,0001$) e progesterona ($p = 0,005$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Correlação entre a imunodeteção da proteína c-erbB-2 e as variáveis prognósticas clinicopatológicas.

Parâmetros	c-erbB-2					
	Negativo			Positivo		
	N	N	%	N	%	P
Idade ao Diagnóstico						
≤ 50	144	116	80,5	28	19,5	0,4
≥ 50	142	119	83,8	23	19,2	
Estadiamento						
0	5	4	80	1	20	0,3
I	26	23	88,4	3	11,5	
II	138	117	84,7	21	15,2	
III	63	49	77,7	14	22,2	
IV	15	12	80	3	20	
NR	39	29	74,3	10	25,6	
Anaplasia						
I	16	14	87,5	2	12,5	0,8
II	186	154	82,8	32	17,2	
III	52	42	80,7	10	19,3	
NR	32	26	81,2	6	18,7	
Linfonodos						
Nenhum	138	118	85,5	20	14,5	0,5
1 a 3	57	46	80,7	11	19,3	
4 a 9	32	25	78,1	7	21,9	
□ 10	35	28	80	7	20	
Metástase à distância						
Negativo	165	141	85,4	24	14,6	0,1
Positivo	120	94	78,3	26	21,7	
RE						
Negativo	95	64	67,3	31	32,6	0,0001
Positivo	190	171	95	19	5	
RP						
Negativo	114	85	74,6	29	25,4	0,005
Positivo	171	150	87,7	21	12,3	

Legenda: N: número total de pacientes, P: valor de significância, NR: não relatado, RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona.

DISCUSSÃO

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete as mulheres no mundo, sendo a principal causa de mortalidade entre as mulheres. Diversos fatores estão relacionados com o aumento no número de casos e a malignidade do câncer de mama, tais como dieta (obesidade), alcoolismo, exposição aos estrógenos, fatores hereditários, redução de atividades físicas, dentre outros (Abreu & Koifman, 2002; Cuzick, 2010). Esse estudo não dispunha de todos esses dados para uma melhor avaliação.

A idade é, com frequência, mencionada como um fator independente de mau prognóstico, embora esta conclusão não seja uniformemente aceita. Alguns autores concordam que pacientes jovens são mais susceptíveis a terem um pior prognóstico da doença principalmente quando associadas a outros fatores clinicopatológicos como o histórico familiar (Clagnan *et al.*, 2008). Em nosso estudo, não foi estabelecida correlação entre a idade e c-erbB-2 (teste de Log-Ranck $p=0,47$), o que está em conformidade com o apresentado por Vaidyanathan e colaboradores (2010). A falta dessa correlação pode ser explicada pelo fato de que somente 47 amostras apresentaram superexpressão para c-erbB-2. Dessas amostras, a maioria apresentavam idade abaixo de 50 anos.

As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, provavelmente, porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é 61% (INCA, 2011). No Brasil, 45,3% dos casos diagnosticados apresentam estadiamento III e IV (Thuler & Mendonça, 2005). Os resultados desse estudo mostram sobrevida em cinco anos de 59,2% e 51,8% para o estadiamento III e IV, respectivamente. Os dados relativos ao estadiamento diferem dos relatados por Vaidyanathan *et al.* (2010), $p=0,114$, e por Lee *et al.* (2010), $p=0,922$. Essa divergência de resultados entre nossos resultados e os resultados

discutidos anteriormente (Vaidyanathan *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010) são possivelmente devidos ao fato de que as amostras analisadas por aqueles autores foram predominantemente diagnosticadas em estadiamentos clínicos I e II.

A imunodeteção da proteína c-erbB-2 foi avaliada nos 286 casos desta casuística. Entretanto não foi observada diferença significativa na sobrevida global em cinco anos para as pacientes com imunodeteção negativa ou qualquer grau de expressão de c-erbB-2 ($p=0,68$), não se comportando como um fator de pior prognóstico para os casos estudados. Um estudo realizado com 1.995 pacientes com câncer de mama detectou a expressão de c-erbB-2 com o uso do anticorpo policlonal DAKO (Lee *et al.*, 2010), o mesmo utilizado em nosso estudo. A expressão de c-erbB-2 correlacionou-se significativamente com uma pior sobrevida ($p=0,038$), independente do tamanho do tumor, status de linfonodos, grau histológico e expressão de receptores hormonais (Lee *et al.*, 2010). Essas divergências entre os resultados deste trabalho e os resultados apresentados por Lee *et al.* (2010) podem ser explicados pela variação do tamanho das amostras analisadas em cada trabalho. Pelo fato de que das 47 pacientes que expressaram positividade para c-erbB-2, apenas 10 apresentaram sobrevida abaixo de 5 anos, esse pequeno número de amostras pode interferir no resultado estatístico. Peres *et al.* (2009) não observaram relação significativa de pior sobrevida ($p= 0,38$), ao analisar 107 casos com marcação pelo anticorpo anti-c-erbB-2 da NOVOCASTRA (clone CB11). A escolha de qual anticorpo utilizar na imunodeteção de c-erbB-2 pode interferir nos resultados apresentados devido a variação de especificidade de detecção de cada anticorpo. Além da escolha de qual anticorpo a ser utilizado, a escolha do método de detecção da proteína também interfere nos resultados como foi apresentado por Panjwani *et al.*, (2010).

As metástases à distância foram relatadas em 120 pacientes (41,9%). Desses casos, 94 (78,7%) não apresentaram expressão da proteína c-erbB-2. A superexpressão da proteína c-erbB-2 não correlacionou-se significativamente com a presença de metástases ($\chi^2 = 0,1$). Segundo Lantz e colaboradores (2009), mulheres que apresentam superexpressão de c-erbB-2 tem maior probabilidade de desenvolverem metástases à distância e conseqüentemente serem mais resistentes aos tratamentos com quimioterápicos.

Neste trabalho, as curvas de sobrevida foram afetadas significativamente pelo comprometimento dos linfonodos. Nas pacientes que tinham mais de 10 linfonodos axilares comprometidos foi de 42,9%, enquanto que naquelas em que os linfonodos estavam livres de células tumorais a sobrevida foi de 92,6% ($p=0,003$). Alguns trabalhos demonstraram o efeito negativo na sobrevida com o aumento do número de linfonodos axilares comprometidos por metástases (Tan *et al.*, 2009, Tambosco *et al.*, 2010).

Estudos investigam o perfil da expressão gênica sobre o câncer de mama, definindo assim diferentes subclasses, baseados nas características biológicas do tumor. A partir de modelos pré-clínicos, sugere-se a interação entre as vias de c-erbB-2 e os receptores de hormônio (HR) (Prat e Baselga, 2008, Darb-Esfahani *et al.*, 2009).

Este estudo verificou que, se analisado separadamente, c-erbB-2 não possui significância estatística relevante ($p=0,68$). No entanto, quando associado com o receptor de estrógeno e progesterona, o c-erbB-2 apresenta um alto grau de significância, $p=0,0001$ e $p=0,005$, respectivamente. De acordo com Onitilo *et al.* (2009), quanto maior o número de variáveis associadas melhor é o efeito prognóstico que as pacientes desenvolvem no tratamento do câncer de mama. Para Darb-Esfahani e colaboradores (2009), é possível que pacientes que co-expressem HR e c-erbB-2

constituam um grupo particular que se beneficiem com a quimioterapia neoadjuvante, o que contradiz com os tumores HR+/c-erbB-2-, estes raramente respondem a quimioterapia neoadjuvante, mas apresentam taxas de sobrevida favorável.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

- 1 – Dentre os 286 casos de carcinoma mamário submetidos à análise imuno-histoquímica para detecção da superexpressão de proteína c-erbB-2 foram normais em 2 (0,7%) casos, positivos em 47 (16,4%) casos, negativos em 235 (82,2%) casos e inconclusivos em 2 (0,7%) casos.
- 2 – A superexpressão da proteína c-erbB-2 não se correlacionou com a sobrevida global em cinco anos para as pacientes estudadas.
- 3 – Não houve correlação entre a expressão da proteína c-erbB-2 e a idade das pacientes, graduação histológica, grau de anaplasia, expressão de receptores de estrógeno, receptores de progesterona e p53.
- 4 – Os fatores prognósticos que influenciaram a sobrevida global foram: estadiamento clínico, comprometimento dos linfonodos axilares e a presença de metástase à distância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Rev Bras Cancerol.** 2002; 48:113-131.

Belengeanu A, Muresan A, Stoicanescu D, Lazar E. Amplification of HER-2 gene in breast cancer: immunohistochemical and FISH assessment. **Romanian Journal of Morphology and Embryology.** 2010; 51(2): 321-326.

Caffarel MM *et al.* Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through AKT inhibition. **Molecular Cancer.** 2010; 9:196.

Calvo JP. Marcadores moleculares de riesgo del cáncer de mama. **Boletin Del GEICAM** (Grupo Español de investigación em Câncer de Mama). 2005; 15:35-37.

Cébrian EA. Población de riesgo y beneficio de las manobras preventivas? Qué sabemos hoy? **Boletin Del GEICAM** (Grupo Español de investigación em Câncer de Mama). 2005; 15:41-3.

CID - O – Classificação International de Doenças para Oncologia. 3ª edição – Universidade de São Paulo (USP). 2000.

Clagnan WS *et al.* Idade como fator independente de prognóstico no câncer de mama. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2008; 30(2): 67-74.

Climent MA, Seguí MA, Peiró G, Molina R, Lerma E, Ojeda Bet al. Prognostic value of HER-2/neu and p53 expression innode-positive breast cancer.HER-2/neu effect on adjuvanttamoxifen treatment. *Breast* 2001;10(1):67-77.

Cuzick J. Breast cancer prevention in the developing world. **Breast Cancer Research.** 2010; 12(Suppl 4):S9.

Darb-Esfahani SD *et al.* Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. **Breast Cancer Research.** 2009; 11(5).

Eisenberg ALA, Koifman S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Rev Bras Cancerol*2001;47(4):377-88.

Griffiths AJF *et al.* Introdução à genética. 8ª edição – Guanabara. 2006.

Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, life style, and hormones. **Breast Cancer Res.** 2004; 6(5):213-8.

Hedau *et al.* Breast cancer and human papilovirus infection: no evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian woman. **BMC Cancer.** 2011; 11:27.

Hsiao YH *et al.* Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. **Journal of Cancer**. 2010; 1:6-13.

Hussein MR, Abd-Elwahed SR, Abdulwahed AR. Alterations of estrogen receptors, progesterone receptors and c-erbB2 oncogene protein expression in ductal carcinomas of the breast. **Cell Biol Int**. 2008;32(6):698-707.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2009. Disponível em www.inca.gov.br/estimativa/2010.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em http://www.inca.org.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteúdo_view.asp&ID=5 [Citado em março 2011].

Jemal A *et al.* Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**. 2011; 61(2): 69-90.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc**. 1958; 53: 457-81.

Koninki K, Tanner M, Auvinen A, Isola J. HER-2 positive breast cancer: decreasing proportion but stable incidence in Finnish population from 1982 to 2005. **Breast Cancer Research**. 2009; 11:3.

Lantz E, Cunningham I, Higa GM. Targeting HER2 in breast cancer: overview of long-term experience. **International Journal of Women's Health**. 2009; 1: 155-171.

Lee J-H, Park S, Park HS, Park B-W. Clinicopathological features of infiltrating lobular carcinomas comparing with infiltrating ductal carcinomas: a case control study. **World Journal of Surgical Oncology**. 2010; 8:34.

Onitilo AA *et al*. Breast cancer subtypes based on ER/PR and HER2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. **Clinical Medicine & Research**. 2009; 7(1/2): 4-13.

Órfão A, Gouveia C. Apontamentos de anatomia e fisiologia da lactação. **Ver Port Clin Geral**. 2009; 25:347-54.

Panjwani P *et al*. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer using fluorescence *in situ* hybridization & immunohistochemistry. Experience of a tertiary cancer referral centre in Indian. **Indian J Med Res**. 2010; 132:287-294.

Pasternak JJ. Uma introdução à genética molecular humana: Mecanismos de Doenças Hereditárias. 2ª Ed. – Rio de Janeiro, 2007. 337-67p.

Pecorino L. Molecular biology of cancer. 2ª ed. – Oxford University – 2008 . 95-112p.

Pedersen K *et al.* A naturally occurring HER2 carboxy –terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. **Molecular and Cellular Biology.** 2009; 29(12): 3319-3331.

Peres RMR, Derchain SFM, Heinrich JKR, Serra KP, Pinto GA, Soares FA, Sarian LOZ. Expressão da proteína erbB-2 e dos receptores de hormônios na transição das regiões *in situ* para invasora de tumores de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.** 2009; 31(9): 461-7.

Pinho VFS e Coutinho ESF. Risk factors for breast cancer: a systemic review of studies with female samples among the general population on Brazil. **Cad. Saúde Pública.** 2005; 21(2): 351-360.

Prat A, Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal – receptor – positive breast cancer with co-expression of HER. **Nature Clinical Practice Oncology.** 2008; 5(9): 531-42..

Pruthi S, Brandt KR, Degenim AC, Goetz MP, Perez EA, Reynolds CA *et al.* A multidisciplinary approach to the management of breast cancer, Part 1: prevention and diagnosis. **Mayo Clin Proc.** 2007; 82(8): 999-1012.

Rodrigues AD, Bustamante-Teixeira MT. Mortalidade por câncer de mama e câncer do colo de útero em município de porte médio da região Sudeste do Brasil, 1980-2006. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.** 2011; 27(2):241-248.

Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 1998;3(4):237-52.

Salles MA, Cúrcio VS, Perez AA, Gomes DS, Gobbi H. Contribuição da imunohistoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *J Bras Patol Med Lab*. 2009; 45(3): 213-222.

Silva AE, Serakides R, Cassali GD. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural*. 2004; 3(2): 625-633.

Silva DM, Saddi VA, Momotuk EG. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2002; 48(1): 39-48.

Sircoulomb F *et al*. Genomic profiling of ERBB2 – amplified breast cancers. *BMC Cancer*. 2010; 10:539.

Sobotta J. Atlas de anatomia humana/Johannes Sobotta; editado por Helmut Ferner e Jochen Staubesand; traduzido por Carlo Américo Fattini e José Geraldo Dangelo. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1984.

Sung J *et al*. High-density lipoprotein cholesterol, obesity and mammographic density in Korean women: the healthy twin study. *J Epidemiol*. 2011; 21(1):52-60.

Tambosco M, Eliasziw M, Magliocco AM. Morphologic complexity of epithelial architecture for predicting invasive breast cancer survival. **Journal of Translation Medicine.** 2010; 8:140.

Tan G-H, Choo W-Y, Taib NA, Yip C-H. Factors associated with HER2 overexpression in breast cancer: experience in an Asian developing country. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.** 2009; 10: 837-840.

Thomas E, Berner G. Prognostic and predictive implications of HER2 status for breast cancer patients. *Eur J Oncol Nurs* 2000;4(Sa):10-7.

Thuler LCS e Mendonça GA. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo uterino em mulheres brasileiras. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2005;27:656-660.

UICC. TNM Classificação de Tumores Malignos – 6ª edição. Rio de Janeiro. INCA 2004.

Vaidyanathan K, Kumar P, Reddy CO, Deshmane V, Somasundaram K, Mukherjee G. ErbB-2 expression and its association with other biological parameters of breast cancer among Indian women. **Indian Journal of Cancer.** 2010; 47(1): 8-15.

Veiga RKA, Melo Jr. MR, Araújo – Filho JLS, Lins C, Teles N. Avaliação digital comparativa da expressão tecidual da proteína c-erbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama. **J Bras Patol Med Lab.** 2009; 45(2): 131-137.

World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer; edited by Peter Boyle and Bernard Levin. Lyon, 2008.

Zuccari DAPC, Berton CR, Terzian AC, Ruiz CM. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arq Ciênc Saúde**. 2008; 15(4): 189-98.