

VILMAR MARQUES DE OLIVEIRA<sup>1</sup>

MARIA MARTA MARTINS<sup>1</sup>

ADRIENNE PRATTI LUCARELLI<sup>2</sup>

GIULIANA CÁSSIA MORRONE TAROMARU<sup>3</sup>

JOSÉ FRANCISCO RINALDI<sup>1</sup>

MARIA ANTONIETA LONGO GALVÃO SILVA<sup>4</sup>

SEBASTIÃO PIATO<sup>5</sup>

# Ciclooxigenase-2 nos carcinomas ductais de mama invasivos com componente ductal *in situ* e no epitélio adjacente

*Cyclooxygenase-2 in invasive ductal carcinoma with ductal component in situ and in adjacent epithelium*

## Artigos originais

### Palavras-chave

Neoplasias mamárias  
Carcinoma ductal da mama  
Carcinoma intraductal não infiltrante  
Ciclooxigenase 2  
Imunohistoquímica

### Keywords

Breast neoplasms  
Carcinoma, ductal, breast  
Carcinoma, intraductal, noninfiltrating  
Cyclooxygenase 2  
Immunohistochemistry

### Resumo

**OBJETIVO:** avaliar a presença da ciclooxigenase-2 (COX-2) nos carcinomas de mama ductal *in situ* (CDIS) e ductal invasivo (CDI), no estroma adjacente normal e no epitélio. A correlação entre os níveis de expressão com os graus nuclear e histológico, tamanho do tumor e idade da paciente foi também analisada. **MÉTODOS:** foram incluídos 47 espécimes cirúrgicos provenientes de mastectomias e quadrantectomias com CDI e CDIS concomitantes, estádios clínicos I e II. Foram utilizados anticorpos policlonais anti-COX-2 para determinar a expressão da enzima. As amostras foram categorizadas em escores de zero a três, de acordo com a intensidade e o número de células coradas. **RESULTADOS:** COX-2 foi positivamente expressa em CDI, CDIS e epitélio normal em 86,7, 84,4 e 73,3% dos casos, respectivamente. Quanto ao grau nuclear (GN), a expressão da COX-2 foi positiva em 80% dos casos de GN-I; 81,5 e 78,9% de GN-II; e 88,5 e 96,1% de GN-III no CDIS e CDI, respectivamente. A expressão da COX-2 ocorreu em 78,9% dos CDIS com comedonecrose e em 89,3% sem comedonecrose. Quanto ao grau histológico (GH) do CDI, a COX-2 foi positiva em 83,3% de GH-I; 89,9% de GH-II e 80% de GH-III. Em relação ao diâmetro tumoral, COX-2 esteve presente em 86,1% de CDI e 83,3% de CDIS em tumores com >2 cm de diâmetro e 11% em CDI; e CDIS em tumores ≤2 cm. A faixa etária ≥50 anos apresentou 90% de expressão para CDI e 86,7% para CDIS, e 92,5% de COX-2 para ambos CDI e CDIS em pacientes com idade <50 anos. **CONCLUSÕES:** nossos resultados demonstram alta correlação entre as expressões da COX-2 nos CDI, CDIS e epitélio normal, o que é consistente com a hipótese de que a superexpressão da COX-2 é um evento precoce na carcinogênese mamária. Não houve diferença quando da análise do grau histológico, presença de comedonecrose, grupo etário e tamanho do tumor.

### Abstract

**PURPOSE:** to evaluate the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in ductal carcinoma *in situ* (DCIS), invasive ductal carcinoma (IDC), adjacent normal stroma, and epithelium. The correlation of expression levels with nuclear grade, histological grade, presence or absence of comedonecrosis, tumor size, and patient age was also analyzed. **METHODS:** forty-seven surgical samples obtained from mastectomy and quadrantectomy with simultaneous DCIS and IDC, stages I and II were included. Anti-COX-2 polyclonal antibodies were used to determine enzyme expression. Samples were classified from zero to three, in accordance with number and intensity of stained cells. **RESULTS:** COX-2 was positively expressed in IDC, DCIS, and normal epithelium in 86.7, 84.4, and 73.3% of the cases, respectively. Concerning nuclear grade (NG), COX-2 expression was positive in 80% of cases of NG-I; in 81.5 and 78.9% of NG II, and in 88.5 and 96.1% of NG III in DCIS and IDC, respectively. COX-2 expression occurred in 78.9% of DCIS with comedonecrosis and in 89.3% without comedonecrosis. As to histological grade (HG) of IDC, COX-2 was positive in 83.3% of HG-I; 89.9% of HG-II and 80% of HG-III. Concerning tumor diameter, COX-2 was present in 86.1% of IDC cases and in 83.3% of DCIS larger than 2 cm and in 11% of IDC and DCIS tumors ≤2 cm. The age range ≥50 years presented 90% expression for IDC and 86.7% for DCIS, and the expression was 92.5% for both IDC and DCIS in patients <50 years. **CONCLUSIONS:** our results demonstrated high correlation between COX-2 expression in IDC, DCIS and in the normal epithelium, which is consistent with the hypothesis that COX-2 over expression is an early event in breast carcinogenesis. There was no significant correlation between COX-2 expression in IDC and DCIS and nuclear grade, histological grade, presence of comedonecrosis, age group and tumor size.

### Correspondência:

Vilmar Marques de Oliveira  
Rua América Alves Pereira Filho, 194, apto. 32  
CEP 05688-000 – São Paulo/SP  
Fone: (11) 3222-4254 / Fax: (11) 2176-7384  
E-mail: vilmarmarques@uol.com.br

### Recebido

07/03/2007

### Aceito com modificações

29/05/2007

Departamento de Obstetria e Ginecologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Doutor, Professor da Faculdade de Ciências Médicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil; Clínica de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Doutor, Médico Assistente da Clínica de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Pós-Graduanda em Tocoginecologia do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Doutor, Professor da Faculdade de Ciências Médicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil; Departamento de Anatomia Patológica da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Livre Docente, Professor Titular da Faculdade de Ciências Médicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil.

## Introdução

Quimioprevenção é definida como o uso sistêmico de agentes químicos, naturais ou sintéticos, para suprimir ou reverter a passagem de lesões pré-malignas para carcinomas infiltrativos<sup>1</sup>. Entre esses, destacam-se os moduladores seletivos de receptor de estrogênio (SERM), os inibidores da aromatase, os fitoestrogênios e os agonistas do GnRH, possivelmente eficazes na prevenção dos tumores com receptor de estrogênio positivo. Já os inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2) também se apresentam como potenciais agentes quimiopreventivos para os tumores receptores de estrogênio negativo, bem como os retinóides, estatinas, inibidores do receptor tirosina quinase, anticorpo monoclonal contra HER-2 e os inibidores da telomerase<sup>2,3</sup>.

A eficácia dos SERMs, tamoxifeno e raloxifeno, já está bem estabelecida por ensaios clínicos com grau de evidência I, endossando o seu uso<sup>3</sup>. Nos últimos anos, a atenção dos pesquisadores tem se voltado para a avaliação do uso dos inibidores da COX-2, com o propósito de verificar a capacidade dos mesmos em promover diminuição do risco para o câncer mamário.

As prostaglandinas (PG) são mediadores lipídicos de processos fisiológicos normais. A maioria das células tem a capacidade de sintetizá-las, sendo o primeiro passo a hidrólise de fosfolípidos para produzir ácido araquidônico livre, pela ação catalisadora da fosfolipase A<sub>2</sub>. O próximo passo desta via metabólica depende da ação catalisadora da COX, que insere uma molécula de oxigênio no ácido araquidônico, produzindo PGG<sub>2</sub>; esta é rapidamente convertida em PGH<sub>2</sub>, pela ação peroxidativa da COX. A PGH<sub>2</sub> é, então, convertida por isomerases tecido-específicas em outras PG (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGI<sub>2</sub>), assim como em tromboxano e prostacilinas<sup>4</sup>.

Existem duas isoenzimas COX: a COX-1 e a COX-2. A primeira delas é constitutiva e expressa pela maioria dos tecidos, além de parecer responsável pela produção das prostaglandinas (PGs) que mediam funções fisiológicas<sup>4</sup>. A COX-2, que é induzida por citoquinas, fatores de crescimento, oncogenes e promotores tumorais, não é detectável na maioria dos tecidos normais; nos quadros inflamatórios e, em tecidos tumorais, contribui para a síntese de PGs<sup>5</sup>.

Estudos experimentais têm mostrado resultados promissores com o uso de inibidores seletivos da COX-2 para supressão da carcinogênese mamária<sup>6</sup>. Em estudo que envolveu ratas que tiveram a carcinogênese mamária induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno, Harris et al.<sup>7</sup> avaliaram a atuação do ibuprofeno, inibidor não seletivo de COX, e do celecoxibe, inibidor específico de

COX-2. No grupo tratado com celecoxibe, observou-se importante redução na incidência, multiplicidade e volume dos tumores mamários, quando comparado com o grupo controle (68, 86 e 81%, respectivamente). Já no grupo tratado com ibuprofeno, os resultados também foram significantes, porém de menor magnitude (40, 52 e 57%, respectivamente).

Recentemente, foi publicado o primeiro estudo caso-controle no qual se compararam inibidores seletivos e não seletivos de COX-2 para a prevenção do câncer de mama<sup>8</sup>. Foram avaliados 323 casos de câncer de mama incidentais, pareados com 649 pacientes que não apresentavam a doença. Os resultados mostraram significativa redução de risco no grupo das usuárias de inibidores seletivos de COX-2, aspirina e ibuprofeno ou naproxeno, sinalizando, assim, importante ação quimioprotetora dos inibidores de COX-2.

A COX-2 parece atuar na carcinogênese de várias formas, incluindo efeitos sobre apoptose, proliferação celular, imunomodulação, agressão do tumor, neo-angiogênese e invasão tumoral. Provavelmente, a PGE<sub>2</sub> é mediadora destes efeitos, particularmente de apoptose e de neo-angiogênese<sup>9</sup>.

Os efeitos da COX-2 sobre apoptose parecem se dar por meio da ação sobre a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2*), pois existe aumento nos níveis desta proteína em linhagem celular de câncer colorretal tratada com PGE<sub>2</sub><sup>10</sup>. Em experimento utilizando epitélio intestinal de ratas, observou-se que a COX-2 atua também de forma importante sobre a apoptose, por meio da diminuição da proteína apoptótica BAX (*B-cell lymphoma 2-associated protein X*)<sup>11</sup>.

Estudo experimental com células cancerosas (cólon, próstata, pulmão e mama) confirmou a existência de ações mútuas entre p53 e COX-2, com possível influência de interações físicas entre estas proteínas. Não se observou ação da COX-2 no *turn over* ou localização citoplasmática da p53. Os autores observaram que a p53 determina aumento local da síntese da COX-2; esta, por sua vez, parece afetar negativamente a transcrição dependente da p53, favorecendo o crescimento tumoral e bloqueando a capacidade da p53 de indução da apoptose; não puderam esclarecer se a COX-2 é alvo de transcrição direta da p53<sup>12</sup>.

Admite-se a possibilidade de que a superexpressão anormal da COX-2, observada em vários cânceres, continue a afetar negativamente a função da p53 nos tumores que albergam esta proteína não mutada. Além disso, os inibidores seletivos da COX-2 potencializam a apoptose induzida pela proteína p53, o que suporta a hipótese de que a atividade da COX-2 parece interferir na função da p53<sup>13</sup>.

Alguns estudos têm demonstrado que as prostaglandinas PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>α podem ser mitogênicas em fibroblastos e células epiteliais *in vitro*. A PGE<sub>2</sub> também parece apresentar variedade de efeitos imunossupressores, incluindo a inibição do crescimento de linfócitos T e B, decréscimo na produção de citocinas, inibição do fator de necrose tumoral alfa, indução da síntese da interleucina 10 e inibição da atividade citotóxica das células *natural killer*<sup>4</sup>.

A isomerização da PGH<sub>2</sub> leva à formação de malondialdeído, potente mutagênico que pode causar danos no DNA. Outros carcinógenos podem ser formados pela atividade peroxidativa da COX-2, agindo sobre uma variedade de substratos, como aminas aromáticas, aminas heterocíclicas e derivados de hidrocarbonetos policíclicos<sup>14</sup>.

A COX-2 está expressa nos vasos neoformados no interior dos tumores mamários, assim como na vasculatura pré-existente ao redor destes tumores. Possivelmente existe relação entre a αVβ3 integrina, um receptor de adesão altamente envolvido na mediação da angiogênese tumoral, e a COX-2. Isto porque a inibição da COX-2 por anti-inflamatórios não hormonais suprime a αVβ3 integrina e, conseqüentemente, as proteínas da família das GTPases envolvidas na progressão do ciclo celular (Cdc42-/Rac). Tal fato resulta na inibição da propagação e migração *in vitro* das células endoteliais, assim como na supressão da indução da angiogênese *in vivo*, pelo fator de crescimento de fibroblastos<sup>215</sup>.

A proteína COX-2 pode ser importante na modulação das propriedades invasivas das células cancerosas humanas. A inibição da COX-2 resulta em secreção alterada das metaloproteinases de matriz (MMP) 2 e 9, assim como de inibidores teciduais de metaloproteinases, sugerindo que a COX-2 deva exercer papel controlador sobre a atividade destas enzimas<sup>16</sup>.

Vários pesquisadores têm avaliado a expressão da enzima COX-2 em carcinomas ductal invasivo (CDI), carcinomas ductal *in situ* (CDIS) e tecidos adjacentes a estas formas de câncer mamário, utilizando diferentes métodos de análise. Estudo que avaliou 1.567 amostras de tumores mamários encontrou elevação da expressão da COX-2 em 37,4% dos casos; observou-se ainda significativa associação com desfavorável sobrevida livre de doença, tumores de grandes dimensões, grau histológico maior, receptores hormonais negativos e índices proliferativos elevados<sup>17</sup>.

A presença da COX-2 no CDI, assim como em CDIS e epitélio normal adjacente ao mesmo, foi avaliada em 57 casos de câncer de mama. Constatou-se que a COX-2 estava presente em 43% dos tumores invasivos, 63%

dos CDIS e em 81% dos epitélios normais adjacentes aos tumores<sup>18</sup>.

A análise da expressão da COX-2, empregando anticorpos policlonais, em 46 casos de CDIS e no epitélio normal adjacente a este, assim como sua relação com o grau nuclear, foi realizada. A expressão da COX-2 foi observada em 85% dos CDIS, mostrando relação direta com o grau nuclear (p=0,048). Observaram ainda que a expressão no epitélio normal adjacente era sempre mais intensa que a observada no CDIS<sup>19</sup>.

Além de o processo neoplásico ser conduzido por mutações de genes, muitas variáveis epigenéticas atuam na carcinogênese e nos fenótipos tumorais. Nesta oportunidade, analisamos os estudos mais expressivos em que a avaliação da COX-2 foi feita com auxílio de técnica de imunohistoquímica. O estudo do câncer de mama ductal invasivo associado ao componente *in situ* concomitante traz possível auxílio do entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de progressão, pois existem células remanescentes que não adquiriram a capacidade de invasão. Assim, uma vez proposto que a COX-2 desempenha papel relevante na carcinogênese mamária, propusemo-nos, no presente estudo, a avaliar a imunoexpressão desta enzima em espécimes mamários que apresentassem, no mesmo corte histológico, CDIS, CDI e epitélio normal.

## Métodos

O presente estudo retrospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSp). Foram selecionados 285 casos diagnosticados e tratados cirurgicamente por câncer de mama no Hospital Central da ISCMSp, entre o período de junho de 2003 a abril de 2005.

Foram excluídas deste estudo as pacientes que foram submetidas à quimioterapia, radioterapia e/ou hormonioterapia; receberam terapia hormonal nas últimas oito semanas; grávidas ou lactantes; haviam usado qualquer medicação hormonal ou anti-inflamatórios nos últimos 15 dias; submetidas a biópsia prévia com intervalo inferior a um mês da obtenção do espécime cirúrgico; com obesidade mórbida ou com doenças metabólicas.

Do total de espécimes cirúrgicos selecionados, 47 oriundos de pacientes com câncer de mama estádios clínicos I e II, e que apresentaram CDI, CDIS e epitélio normal no mesmo corte histológico foram incluídos.

Destas, 24 amostras (51,1%) foram obtidas após cirurgia conservadora, quadrantectomia ou setorectomia, e 23 (48,9%) após mastectomia. Foram incluídas pacientes

com idade entre 31 e 85. A média das idades das pacientes ( $\pm$  desvio padrão) foi igual a 54,3 $\pm$ 12,7 anos, sendo que 28 (62,2%) apresentavam idade igual ou superior a 50 anos.

A técnica imunohistoquímica utilizada no estudo foi realizada no Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP. Foram feitos cortes histológicos com 3  $\mu$ m de espessura, desparafinizados com xilol e posteriormente re-hidratados com etanol absoluto seguido por lavagem em água corrente e água destilada.

Depois da primeira etapa, 1.600 mL do tampão citrato de sódio foram adicionados, com a finalidade de recuperação do epítipo antigênico e restituição da antigenicidade à proteína afetada pela fixação dos tecidos em formalina, seguida de reação de inibição da peroxidase endógena, por meio de lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio a 3%. O processo foi finalizado com a lavagem das lâminas em tampão fosfato salino (PBS - pH 7.4).

Para a pesquisa da COX-2, os cortes histológicos foram incubados com anticorpos primários policlonais obtidos a partir do soro de cabras (3362-100, *Biovision Research Products*), diluídos conforme as orientações do fabricante (1:70).

O material foi mantido em geladeira por 18 horas. Transcorrido este período, foi lavado em tampão PBS e incubado com anticorpos secundários (anticorpos de ligação biotinilado universal), por 30 minutos, em estufa a 37°C, e novamente incubado em anticorpo terciário (estreptavidina-biotina-peroxidase), em câmara úmida, por 30 minutos, em estufa a 37°C.

Depois disso, foi realizada a colocação das lâminas para reação cromógena em 3,3',5,5' tetrahidrocloreto de

diaminobenzidina, por três a cinco minutos, ocorrendo a reação que resulta no aparecimento da cor sépia, característica do anticorpo fixado à proteína. Também foi feita contra-coloração com hematoxilina de Mayer para obtenção de coloração azulada do citoplasma e do núcleo, e a desidratação dos cortes com série de etanol (50-70-100° GL) e xilol. A montagem das lâminas com fixação sobre Entellan Merck, a fim de que a preparação pudesse ter conservação permanente, seguiu protocolos convencionais estipulados pela técnica<sup>20</sup>.

Os principais resultados avaliados neste estudo foram as expressões da COX-2 por imunohistoquímica no CDI, CDIS, epitélio normal e estromas normal e tumoral com base no escore exposto na Tabela 1.

Foram avaliadas também as relações entre estas expressões e o grau nuclear, grau histológico, presença ou não de comedonecrose, tamanho tumoral (tumores menores ou iguais a 2 cm e tumores maiores de 2 cm) e a idade das pacientes (pacientes com menos de 50 anos e aquelas com 50 anos ou mais de idade).

A avaliação das expressões semiquantitativas da COX-2 foi realizada de forma cega por dois examinadores. A área avaliada foi previamente demarcada na lâmina, para que a expressão imunohistoquímica fosse sempre aferida nos mesmos campos ópticos. Foram classificadas como negativas as pacientes com escores zero ou um, e positivas aquelas com escores dois ou três<sup>17</sup>.

Todos os dados foram avaliados pelo programa de estatística Statistical Package for Social Sciences® (SPSS), versão 14.0, para Microsoft Windows. A única variável paramétrica avaliada foi idade, sendo calculada sua mediana, variação média e desvio padrão.

As variáveis não paramétricas foram avaliadas pela análise de correlação de Spearman. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para a avaliação dos graus nuclear e histológico, e o teste de Mann-Whitney para a variável presença ou não de comedonecrose, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre os percentuais positivos das categorias delineadas.

Também foi utilizado o teste de  $\chi^2$ , com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os dois grupos etários (pacientes com menos de 50 anos e com 50 ou mais de idade) e os grupos constituídos por tumores com diâmetros menores ou iguais a 2 cm e aquele com maiores que 2 cm.

## Resultados

Os resultados encontrados nas 47 análises realizadas com o propósito de avaliar a expressão da enzima COX-2 são expostos na Tabela 2. Entre os CDI, a expressão foi positiva em 39 casos (86,7%); no CDIS, em 38 (84,4%);

**Tabela 1** - Escore utilizado para avaliação da imunexpressão da COX-2.

Escore	Crítérios avaliados para determinação do escore
Escore 0	Não se observam células coradas
Escore 1	Citoplasma e membrana celular coradas difusa e fracamente (deve apresentar até 10% das células coradas com intensidade forte)
Escore 2	Coloração citoplasmática granular e da membrana celular de moderada a forte em 10-90% das células
Escore 3	Mais de 90% das células coradas com intensidade forte

**Tabela 2** - Expressão da COX-2 por imunohistoquímica nos diversos compartimentos histológicos dos tumores.

Compartimento histológico	COX-2 número amostras (%)
CDI	39 86,7
CDIS	38 84,4
Epitélio normal	33 73,3
Estroma tumoral	1 2,2
Estroma normal	1 2,2

COX-2=enziima ciclooxigenase-2; CDI=carcinoma ductal invasivo; CDIS=carcinoma ductal *in situ*.

no epitélio normal, em 33 (73,3%); no estroma tumoral, em um (2,2%); e no estroma adjacente ao epitélio normal, em um (2,2%), conforme Tabela 2.

Não foi notada correlação quando a expressão da COX-2 expressa nos CDI, CDIS e epitélio normal foi comparada com o estroma tanto tumoral quanto adjacente ao epitélio normal. Forte correlação foi notada entre a expressão da COX-2 no CDI, no CDIS e no epitélio normal ( $p < 0,01$ ) (Tabela 3).

Quanto ao grau nuclear (GN), a COX-2 foi positiva em 80% dos casos GN I; 81,5 e 78,9% de GN II, e 88,5 e 96,1% de GN III no CDIS e CDI, respectivamente. A expressão ocorreu em 78,9% dos casos de CDIS com comedonecrose e em 89,3% sem comedonecrose. Quanto ao grau histológico (GH) do CDI, a COX-2 foi positiva em 83,3% dos casos GH-I; 89,9% de GH-II e 80% de GH-III.

Em relação ao diâmetro tumoral, foi detectada COX-2 em 86,1% de CDI e 83,3% de CDIS em tumores com mais de 2 cm de diâmetro, e 11% em CDI e CDIS em tumores  $\leq 2$  cm. Para a faixa etária superior a 50 anos, observou-se 90% para o CDI e 86,7% para o CDIS; naquelas com idade  $< 50$  anos a expressão foi de 92,5% de COX-2 para CDI e CDIS. Assim, a expressão da COX-2 nos CDI e CDIS não se relacionou de forma significativa com o grau nuclear, grau histológico e presença ou não de comedonecrose. Também não foram observadas correlações quando da análise de acordo com o tamanho tumoral e grupo etário das pacientes.

## Discussão

A enzima COX-2 está superexpressa nos tumores malignos, incluindo o câncer de mama. Esta enzima está emergindo como importante marcador biológico e tem sido alvo de inúmeros estudos buscando mostrar seu papel na carcinogênese e história natural do câncer de

mama, por meio de mecanismos que envolvem fatores de crescimento, citocinas e promotores tumorais<sup>6,12</sup>.

Existem discrepâncias nos resultados dos estudos até hoje realizados acerca da presença de expressão da enzima COX-2 nos CDI e CDIS, assim como no epitélio mamário normal e no estroma, tanto adjacente ao câncer quanto ao tecido normal, nos estudos endereçados a esta pesquisa.

Os resultados por nós observados no presente estudo diferem de outros autores<sup>17,18,21</sup>. Esta diferença poderia ser explicada pela ausência do componente *in situ* nos casos avaliados nos referidos estudos. Recentemente, constatou-se a presença da COX-2 tanto no CDI como no CDIS em 81,6% de 38 casos; estes resultados foram semelhantes aos encontrados por nós<sup>22</sup>.

A taxa de expressão da COX-2 no CDIS por nós encontrada é similar às observadas por outros autores<sup>18,19,22-24</sup>. Fica assim demonstrada homogeneidade na expressão da COX-2 no CDIS, diferentemente do que é observado na doença invasiva.

Observamos que, quando da presença dos dois componentes tumorais no mesmo espécime cirúrgico (CDI e CDIS), a taxa de positividade no componente invasivo é mais elevada que aquela observada nos tumores mamários que apresentam somente o câncer infiltrativo. Esses dados encontrados em nosso estudo confirmam outras publicações<sup>18,22</sup>.

Em nosso estudo, encontramos a presença da COX-2 no epitélio normal em 76% dos casos, diferentemente da positividade de 23% encontrada em estudo que avaliou a expressão da enzima COX-2 no epitélio mamário normal obtido de 60 espécimes cirúrgicos de mamoplastia redutora<sup>24</sup>. Parece, desta forma, que a presença da COX-2 no epitélio normal de mama com carcinoma possa desempenhar papel preponderante nos mecanismos parácrinos de regulação desta enzima.

Verificamos ausência da enzima COX-2 no estroma tumoral e naquele adjacente ao epitélio normal na quase

**Tabela 3** - Correlação de Spearman para presença da COX-2 nos compartimentos histológicos.

Variável	Estatística	COX-2 CDI	COX-2 CDIS	COX-2 estroma tumoral	COX-2 estroma normal
CDI	R	1,000	0,914	0,059	0,059
	P	-	<0,001	0,350	<0,350
	N	47	47	47	47
CDIS	R	0,914	1,000	0,065	0,065
	p	<0,001	-	0,336	0,336
	n	47	47	47	47
Epitélio	r	0,513	0,573	0,091	0,091
	p	<0,001	<0,001	0,276	0,276
	n	47	47	47	47

r=correlação de Spearman; p=significância; n=número da amostra; COX-2=enzima ciclooxigenase-2; CDI=carcinoma ductal invasivo; CDIS=carcinoma ductal *in situ*.

totalidade dos casos e, quando presente, sua expressão era sempre fraca. Esta constatação foi observada por outros autores<sup>17-19,21</sup>. Isto nos leva a inferir que a ação da enzima COX-2 na oncogênese mamária se processa exclusivamente sobre os componentes epiteliais.

Avaliando a expressão da COX-2 no CDIS frente à agressividade do tumor, observamos que esta apresentou maior expressão nos tumores com grau nuclear III e naqueles que apresentavam comedonecrose. Esta diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa. Estes dados também foram observados por outros autores<sup>19,24</sup>.

Já no CDI, a expressão da COX-2 também foi maior nos tumores com grau nuclear III. Todavia, na análise do grau histológico, nossos resultados não foram concordantes com os observados em outros estudos, que encontraram taxas mais elevadas da expressão da COX-2 no grau histológico III<sup>17,22,25</sup>. Esta diferença talvez se deva ao pequeno número de casos de grau nuclear III presente em nosso estudo.

Comparando a expressão da COX-2 de acordo com o tamanho do tumor, não observamos, em nosso estudo, diferenças significantes entre os dois grupos avaliados (com mais ou menos de 2 cm de diâmetro). Na literatura, há estudo que avaliou CDI e CDIS no mesmo espécime, e que obteve resultado semelhante.

Todavia, outros que estudaram apenas tumores invasivos são discordantes por encontrarem maior expressão diretamente proporcional ao tamanho do tumor<sup>17,18,22</sup>.

Avaliando a expressão da COX-2 de acordo com a idade da paciente, semelhante a estudo anterior, não observamos diferenças quando comparamos os grupos compostos por pacientes que apresentavam 50 anos ou mais e aquelas com menos de 50 anos, tanto no CDI como no CDIS e no epitélio normal<sup>17</sup>.

A carcinogênese mamária, tanto em sua fase de iniciação, assim como nas de promoção e disseminação, está diretamente relacionada com fatores intrínsecos presentes no tecido mamário. Os mecanismos pelos quais a expressão da COX-2 está regulada para cima nesses processos ainda não estão claros; uma possibilidade é que as células do tumor passem a expressar de maneira mais ativa esta enzima, quando em comparação com o tecido normal. A avaliação da imunexpressão desta enzima em espécimes mamários que apresentaram, no mesmo corte histológico, CDIS, CDI e epitélio normal, mostra sua presença em todos os compartimentos, evidenciando a importância dos mecanismos parácrinos, autócrinos e intrácrinos, sugerindo inter-relação entre os componentes teciduais. Estes dados podem servir de subsídio para a pesquisa do uso de inibidores de COX-2 não só na prevenção, como também no tratamento do câncer de mama.

## Referências

1. Sporn MB. Approaches to prevention of the epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res.* 1976;36(7 Pt 2):2699-702.
2. Prichard RS, Hill AD, Dijkstra B, McDermott EW, O'Higgins NJ. The prevention of breast cancer. *Br J Surg.* 2003;90(7):772-83.
3. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, et al. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet.* 2003;361(9354):296-300.
4. Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci.* 2000;30(1):3-21.
5. Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(6):455-60.
6. Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs.* 2002;13(2):127-37.
7. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res.* 2000;60(8):2101-3.
8. Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer.* 2006;6:27. doi:10.1186/1471-2407-6-27.
9. Umar A, Viner JL, Anderson WF, Hawk ET. Development of COX inhibitors in cancer prevention and therapy. *Am J Clin Oncol.* 2003;26(4):S48-57.
10. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58(2):362-6.
11. Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995;83(3):493-501.
12. Corcoran CA, He Q, Huang Y, Sheikh MS. Cyclooxygenase-2 interacts with p53 and interferes with p53-dependent transcription and apoptosis. *Oncogene.* 2005;24(9):1634-40.
13. Lee JS, Choi YD, Lee JH, Nam JH, Choi C, Lee MC, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian tumors and its relation to vascular endothelial growth factor and p53 expression. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16 Suppl 1:247-53.
14. Marnett JL. Aspirin and related nonsteroidal anti-inflammatory drugs as chemopreventive agents against colon cancer. *Prev Med.* 1995;24(2):103-6.
15. Dormond O, Foletti A, Paroz C, Ruegg C. NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med.* 2001;7(9):1041-7.

16. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res.* 2000;60(16):4629-37.
17. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62(3):632-5.
18. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma *in situ*. *Cancer Res.* 2002;62(6):1676-81.
19. Shim V, Gauthier ML, Sudilovsky D, Mantei K, Chew KL, Moore DH, et al. Cyclooxygenase-2 expression is related to nuclear grade in ductal carcinoma *in situ* and is increased in its normal adjacent epithelium. *Cancer Res.* 2003;63(5):2347-50.
20. Boenish T. Handbook: immunochemical staining methods. 3rd ed. Califórnia: Dakocytomation; 2001. p. 64-5.
21. Davies G, Salter J, Hills M, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Correlation of cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(7):2651-6.
22. Shim JY, An HJ, Lee YH, Kim SK, Lee KP, Lee KS. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma its poor prognostic factors. *Mod Pathol.* 2003;16(12):1199-204.
23. Tan KB, Yong WP, Putti TC. Cyclooxygenase-2 expression: a potential prognostic and predictive marker for high-grade ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Histopathology.* 2004;44(1):24-8.
24. Boland GP, Butt IS, Prasad R, Knox WF, Bundred NJ. COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma *in situ*. *Br J Cancer.* 2004;90(2):423-9.
25. Zerkowski MP, Camp RL, Burtness BA, Rimm DL, Chung GG. Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows high COX-2 expression is associated with poor outcome. *Cancer Invest.* 2007;25(1):19-26.