

Carcinoma Ductal *in situ* Associado a Carcinoma Invasivo na mesma Mama: Análise do Grau Nuclear e da Expressão das Proteínas p53 e C-erbB-2 e dos Receptores de Estrógeno

Ductal Carcinoma *in situ* and Invasive Carcinoma in the Same Breast: Evaluation of the Nuclear Grade and the Expressions of Proteins p53 and C-erbB-2 and Estrogen Receptors

Orlando José de Almeida, Luis Carlos Zeferino, Marcelo Alvarenga, Gustavo Antônio de Souza, Glauce Aparecida Pinto, Anna Letícia de Oliveira Cestari

RESUMO

Objetivos: avaliar a variação do grau nuclear e da expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 e dos receptores de estrógeno (RE) no carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e no carcinoma invasivo, presentes na mesma mama.

Métodos: estudo descritivo retrospectivo com 38 mulheres com CDIS associado a carcinoma invasivo da mama. Foi avaliado o grau nuclear e o realizado estudo imunohistoquímico para expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 e para os RE. Os casos considerados positivos para a expressão das proteínas e dos RE foram aqueles com contagem de células positivas igual ou superior a 10%. A concordância entre estas variáveis no componente *in situ* e invasivo foi avaliada pelo coeficiente kappa (k), interpretado de acordo com os critérios de Landis e Koch. O teste de MacNemar foi usado para testar diferenças entre os dois grupos.

Resultados: a concordância entre o grau nuclear e a expressão dos RE nos componentes *in situ* e invasivo foi de 0,89 para ambos, quase perfeita. A concordância para a expressão da proteína c-erbB-2 também foi considerada quase perfeita, com coeficiente de 0,84. Já a concordância entre a expressão da proteína p53 no componente *in situ* e no invasivo foi de 1,0, considerada perfeita. Não houve diferenças significativas entre o grau nuclear e as expressões das proteínas e dos RE nos componentes *in situ* e invasivo na mesma mama.

Conclusões: existe concordância alta do grau nuclear e da expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 no CDIS e no carcinoma invasivo presentes na mesma mama.

PALAVRAS-CHAVE: Mama: câncer. Carcinoma ductal *in situ*. Estrógeno. Proteína p53. Oncogenes.

Introdução

O estudo do carcinoma ductal *in situ* (CDIS) da mama associado ao carcinoma invasivo pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da doença até a invasão. Há evidên-

cias de que algumas células do carcinoma *in situ* sofreriam alterações genéticas adicionais que permitiriam a sua passagem através da membrana basal, o que as transformaria em carcinoma invasivo¹. Desta forma, o CDIS que está associado ao carcinoma invasivo seria composto pelas células remanescentes que não adquiriram a capacidade de invadir. Compreender como este processo ocorre pode ter importância e utilidade clínica.

O grau nuclear, a expressão de proteínas dos genes p53 e HER-2/neu e os receptores de estrógeno (RE) são fatores associados à proliferação celular e ao prognóstico do carcinoma da

Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Correspondência:
Orlando José de Almeida
Rua Barão Geraldo de Rezende, 282/74 - Vila Itapura
13020-440 - Campinas - SP
Tel: (19) 3232-1230, Fax: (19) 3251-4586
e-mail: orla@directnet.com.br

mama². Portanto, interessaria analisar a associação desses fatores com os mecanismos envolvidos na transformação de um carcinoma *in situ* em invasivo.

A avaliação do grau nuclear, usado na graduação do CDIS, se baseia na análise microscópica de características nucleares das células neoplásicas e pode fornecer informações importantes sobre o seu comportamento. Tumores de baixo grau nuclear, ou seja 1 e 2, parecem ser menos propensos à recidiva local quando de tratamentos conservadores e menos agressivos do que aqueles com grau nuclear 3^{3,4}.

O gene *p53* localiza-se no cromossomo 17 e produz uma fosfoproteína nuclear com vida média de 20 a 30 minutos. A sua forma selvagem é ativada nas células normais quando ocorre dano ao DNA. A proteína produzida pelo gene *p53* mutado, ou proteína *p53* "mutada", se comparada com a sua forma selvagem, é menos ativa ou inativa, mais estável e tem vida média mais prolongada⁵. A proteína *p53* mutada pode perder a sua função reparadora do DNA e indutora da apoptose, provocando aumento do número de mutações celulares, com conseqüente perpetuação de clones celulares anormais⁶. A expressão da proteína *p53* mutada no carcinoma invasivo da mama pode ser considerada um fator de mau prognóstico para sobrevida livre de doença e global⁷.

O protooncogene *HER-2/neu* (*human epidermal growth factor receptor 2*) está presente no cromossomo 17 e codifica uma glicoproteína receptora de membrana, a p185, chamada de proteína ou receptor do *HER-2* ou *c-erbB-2*. Ele faz parte de uma família de genes que têm papel chave na proliferação, adesão, diferenciação e motilidade celular⁸. A expressão desse protooncogene é regulada por fatores de crescimento e a sua transformação até oncogene ocorre geralmente por amplificação gênica (ocorrência de 10 cópias ou mais do gene por célula), o que origina a superexpressão de sua proteína⁹. Geralmente os carcinomas que superexpressam essa proteína têm alto grau histológico e nuclear, alta taxa de proliferação celular e baixa expressão dos RE¹⁰.

O estrógeno atravessa a membrana das células-alvo por difusão passiva e liga-se ao RE no núcleo celular, provocando a sua ativação. O complexo hormônio-receptor, que tem maior afinidade com o DNA, passa a controlar a velocidade de transcrição dos genes-alvo. Com essa interação ocorrem mudanças na síntese do RNA mensageiro e de proteínas envolvidas na regulação da diferenciação e da proliferação celular¹¹.

Estudos que compararam o carcinoma invasivo e o CDIS mostraram, por exemplo, maior

expressão da proteína *p53* e menor expressão da proteína *c-erbB-2* no primeiro grupo, porém esses dados foram obtidos comparando-se tumores de mulheres diferentes^{10,12}. Pouco se conhece sobre estas características quando ambas as lesões ocorrem na mesma mama. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar as diferenças do grau nuclear e das expressões das proteínas *p53* e *c-erbB-2* e dos RE no CDIS e no carcinoma invasivo presentes na mesma mama.

Material e Métodos

Este estudo foi descritivo retrospectivo e incluiu 38 mulheres com CDIS associado a carcinoma invasivo da mama. Todos os casos foram classificados no estágio I. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e na Maternidade de Campinas.

Os blocos de parafina, com tecidos fixados em formol a 10%, foram recortados e corados pela HE para localização dos espécimes com CDIS e carcinoma invasivo da mama. Essas lâminas também serviram para a avaliação do grau nuclear e do tipo de CDIS.

O grau nuclear foi classificado nas seguintes categorias: 1) células com núcleos monótonos, com tamanhos de 1,5 a 2 vezes o do núcleo de uma célula epitelial normal, cromatina finamente dispersa, raros nucléolos e figuras de mitose, geralmente com polarização dos componentes celulares), 2) células com núcleos de forma e tamanho moderadamente irregulares, cromatina grosseiramente agrupada ou aspecto nuclear vacuolado ou 3) núcleos com intenso pleomorfismo, de tamanho acima de 2,5 vezes o núcleo de uma célula epitelial normal, distribuição irregular da cromatina, nucléolos proeminentes, mitoses frequente). Os CDIS foram classificados em: comedocarcinomas e não-comedocarcinomas. Os não-comedocarcinomas foram dos tipos: cribriforme, sólido, micropapilífero ou intracístico. Os CDIS com mais de dois componentes diferentes (tipos mistos) foram agrupados com os comedocarcinomas, quando possuíam esse tipo de carcinoma *in situ*¹³.

Para o estudo imuno-histoquímico foram utilizados anticorpos monoclonais e policlonais específicos para *p53* (MxH, clone D07, DAKO, código M7001-1, diluição 1:100), *c-erbB-2* (RxH, DAKO, código A0485-1, diluição 1:300) e RE (MxH, clone 1D5 ascite, Delsol, diluição 1:2000).

Os cortes das peças cirúrgicas foram desparafinizadas em banho de xilol. Depois as lâminas foram hidratadas em álcool etílico em concentrações decrescentes. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos em água oxigenada a 10 volumes, seguidos de lavagem em água corrente e destilada. A recuperação antigênica foi feita em panela a vapor tipo T-fall. As lâminas foram imersas em tampão de citrato de sódio e, a seguir, resfriadas em temperatura ambiente.

Na próxima etapa, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico a 4°C, durante a noite. Após a incubação, as lâminas passaram por três lavagens em PBS. Depois disso foram secas e incubadas com o *Envision Labeled Polymer Component* (DAKO, código K1491) a 37°C e, a seguir, feitas três lavagens em PBS com agitação. A revelação foi feita com o substrato cromógeno DAB (3-3'-diaminobenzidina, Sigma, código D5637). As lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Mayer. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico e diafanizados em xilol, e em seguida montadas em Entellan (Merck). Todas as reações imuno-histoquímicas foram realizadas utilizando-se controles externos positivos: tumor *borderline* de ovário para a proteína *p53* e carcinoma ductal invasivo para a proteína *c-erbB-2* e para os RE.

Foram considerados positivos os casos cuja contagem de células tumorais positivas foi igual ou superior a 10% do total em 10 campos na periferia dos tumores, com aumento de 40 vezes (microscópio Nikkon Labphot).

A concordância entre o grau nuclear e as expressões das proteínas do componente *in situ* e invasivo da mesma mama foi feita pelo coeficiente kappa¹⁴, interpretada de acordo com os critérios de Landis e Koch, classificada em: pobre (<0,001), pequena (0,001-0,20), regular (0,21-0,40), moderada (0,41-0,60), substancial (0,61-0,80), quase perfeita (0,81-<1,00) e perfeita (1,00)¹⁵. O teste de MacNemar foi usado para testar a associação entre duas variáveis, porque as amostras de carcinoma invasivo e de CDIS foram consideradas como pareadas por tratar-se das mesmas mulheres. As diferenças foram consideradas significativas se o valor de *p* foi igual ou menor de 0,05.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, atendendo a todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97.

Resultados

A média de idade das 38 mulheres avaliadas no estudo foi de 58,8 anos, variando entre 32 e 89 anos. Observou-se que 66% dos casos (n=25) eram dos tipos não-comedocarcinoma. Metade dos casos avaliados foi classificada como grau nuclear 1 ou 2 e metade grau nuclear 3 (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição porcentual do grau nuclear e do tipo comedocarcinoma no carcinoma ductal *in situ* associado a carcinoma invasivo.

Grau nuclear	n	(%)
1	7	18
2	12	32
3	19	50
Tipo		
comedocarcinoma	13	34
não-comedocarcinoma	25	66
Total	38	100

A concordância entre o grau nuclear dos componentes *in situ* e invasivo foi considerada quase perfeita, com coeficiente kappa de 0,89, o que significou que em apenas dois casos houve discordância. A avaliação pelo teste de MacNemar não mostrou diferença estatisticamente significativa, com *p*=1,00 (Tabela 2).

Tabela 2 - Concordância entre o grau nuclear do carcinoma ductal *in situ* e do carcinoma invasivo na mesma mama.

CDIS	Carcinoma invasivo		n	%
	Grau nuclear			
Grau nuclear	1 e 2	3		
1 e 2	18	1	19	50
3	1	18	19	50
n (%)	19 (50)	19 (50)	38	100

Coeficiente kappa (IC 95%) = 0,89 (0,75-1,00) *p*=1,00
CDIS = carcinoma ductal *in situ*.

A expressão da proteína *p53* foi positiva em 13% dos casos (n=5) e foi concordante no CDIS e carcinoma invasivo em todas as mulheres, o que foi considerada concordância perfeita pelo coeficiente kappa de 1,0 (Tabela 3).

A expressão da proteína *c-erbB-2* foi divergente entre os componentes *in situ* e invasivo em apenas três casos, o que significou concordância quase perfeita para ambos, de acordo com o coeficiente kappa. Observou-se que 55% dos CDIS

(n=21) e 47% dos carcinomas invasivos (n=18) apresentaram expressão positiva para essa proteína, porém esta diferença não foi significativa, com $p=0,08$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Concordância entre as expressões das proteínas p53 e c-erbB-2 e dos receptores de estrógeno (RE) no carcinoma ductal *in situ* e no carcinoma invasivo na mesma mama.

CDIS	Carcinoma invasivo		Coeficiente kappa (IC 95%)	p
	positivo	Negativo		
<i>p53</i>				
Positivo	5	0	1,00	1,00
Negativo	0	33		
<i>c-erbB-2</i>				
Positivo	18	3	0,84 (0,67-1,00)	0,08
Negativo	0	17		
RE				
Positivo	23	2	0,89 (0,74-1,00)	0,16
Negativo	0	13		

CDIS = carcinoma ductal *in situ*.

A presença dos RE nos componentes *in situ* e invasivo foi discordante somente em dois casos, o que significou concordância quase perfeita, de acordo com o coeficiente kappa. Observou-se que 66% dos CDIS (n=25) e 60% dos carcinomas invasivos (n=23) eram RE positivos, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,16$) (Tabela 3).

Discussão

De acordo com os resultados deste estudo, o grau nuclear e as expressões das proteínas p53 e c-erbB-2 e dos RE são muito semelhantes no CDIS e no carcinoma invasivo presentes na mesma mama. Assim, os eventos genéticos que provocariam a proliferação epitelial e a instalação de um CDIS, incluindo a determinação do grau nuclear, se manteriam estáveis ao longo do processo de transformação para carcinoma invasivo, ou pelo menos não apresentariam alterações detectáveis pela imuno-histoquímica¹⁶.

Sabe-se que a associação entre as características histológicas do componente *in situ* e do invasivo na mesma mama parece ser bastante significativa¹⁷. Nosso estudo mostrou concordância quase perfeita entre o grau nuclear dos dois componentes.

Com relação à expressão das proteínas p53 e

c-erbB-2 e dos RE, há estudos que também mostraram que, quando o carcinoma invasivo tem CDIS associado, há elevada concordância no seu perfil imuno-histoquímico^{12,18,19}. Querzoli et al.¹⁸, num dos poucos estudos que abordaram CDIS e carcinoma invasivo na mesma mama, observaram que um terço dos casos foi positivo para a expressão da proteína c-erbB-2 nos dois componentes, porcentual um pouco menor do que o encontrado no nosso estudo. A diferença na positividade entre esse estudo e o nosso pode ser atribuída a fatores relacionados à técnica de imuno-histoquímica, como também à variabilidade nas características desse carcinoma entre diferentes populações.

Uma meta-análise com 97 estudos publicados entre 1978 e 1996, nos quais se empregaram métodos diferentes para avaliar a expressão do HER-2/*neu* no carcinoma da mama, como Southern, Northern e Western blot, PCR (*polymerase chain reaction*), imuno-histoquímica, citometria de fluxo e FISH (*fluorescent in situ hybridization*), mostrou média de positividade de 26%, variando de 5 a 55%. Também esta meta-análise mostrou maior positividade no CDIS do que no carcinoma invasivo¹⁰. No nosso estudo a positividade para a proteína c-erbB-2 foi maior do que a média obtida naquela meta-análise, e o componente *in situ* foi mais positivo do que o invasivo, porém esta diferença não foi significativa. Isso pode ter ocorrido porque analisamos o CDIS e o carcinoma invasivo na mesma mama, o que não corresponde aos estudos que compuseram essa meta-análise.

Alguns autores observaram que o carcinoma invasivo apresenta mais freqüentemente RE positivos do que o CDIS, quando presentes na mesma mama; já outros mostraram associação inversa^{20,21}. Nenhum deles, porém, mostrou diferenças significativas. No nosso estudo, a positividade do CDIS foi semelhante à do carcinoma invasivo.

A positividade de expressão da proteína p53 foi baixa em nosso estudo, tanto nos casos *in situ* quanto nos invasivos, o que também foi observado por outros pesquisadores²²⁻²⁴. Também não houve associação entre a expressão da proteína p53 e o estágio do carcinoma, *in situ* ou invasivo, como mostraram outros estudos^{12,25}.

Portanto, pelo menos a expressão da proteína c-erbB-2 observada no nosso estudo difere do que foi descrito por outros autores, que analisaram tumores em mamas diferentes. Concluímos que é muito elevada a concordância do grau nuclear e da expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 e dos RE nos componentes *in situ* e invasivo presentes na mesma mama.

ABSTRACT

Objectives: *The aim of the present study was to evaluate the nuclear grade, the expressions of p53 and c-erbB-2 proteins, and the estrogen receptors (ER) of 38 women with ductal carcinoma in situ (DCIS) and invasive carcinoma of the same breast.*

Methods: *the protein profile of 38 women was investigated in a descriptive and retrospective study, through the immunohistochemical technique. The cut-off limit for positive staining was chosen at 10% or more of positive cells for p53 and c-erbB-2 proteins and for ER. The analysis of the concordance between the expressions of proteins and the nuclear grade was done by the kappa coefficient, according to Landis and Koch's criteria. MacNemar's test was used to assess the differences between the two groups.*

Results: *there was a perfect concordance in the expression of p53 proteins (kappa coefficient = 1.00) and almost a perfect concordance for c-erbB-2 proteins, ER and nuclear grade (kappa coefficients = 0.84, 0.89 and 0.89) between in situ and invasive elements of the same tumor.*

Conclusion: *there was no difference between the expressions of p53 and c-erbB-2 proteins, ER and nuclear grade in the DCIS and invasive carcinoma of the same breast.*

KEYWORDS: *Intraductal carcinoma. p-53 Protein. Estrogens. Oncogens.*

Referências

1. Van Diest PJ. Ductal carcinoma in situ in breast carcinogenesis. *J Pathol* 1999; 187:383-4.
2. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966-78.
3. Hetelekidis S, Collins L, Silver B, et al. Predictors of local recurrence following excision alone for ductal carcinoma in situ. *Cancer* 1999; 85:427-31.
4. Ruiz A, Almenar S, Cerdá M, Hidalgo JJ, Puchades A, Llombart-Bosch A. Ductal carcinoma in situ of the breast: a comparative analysis of histology, nuclear area, ploidy, and neovascularization provides differentiation between low- and high-grade tumors. *Breast J* 2002; 8:139-44.
5. Moll UM, Ostermeyer AG, Ahomadegbe JC, Mathieu MC, Riou G. p53 mediated tumor cell response to chemotherapeutic DNA damage: a preliminary study in matches pairs of breast cancer biopsies. *Hum Pathol* 1995; 26:1293-301.
6. Done SJ, Arneson NC, Özçelik H, Redston M, Andrulic IL. p53 mutations in mammary ductal carcinoma in situ but not in epithelial hyperplasias. *Cancer Res* 1998; 58:785-9.
7. Gasparini G, Toi M, Verderio P, et al. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. *Int J Oncol* 1998; 12:1117-25.
8. Hayes DF, Thor AD. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol* 2002; 29:231-45.
9. Bacchi CE. HER-2/neu (C-erbB-2) e câncer da mama. *Rev Bras Mastol* 2001; 11:143-50.
10. Révillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ErbB-2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998; 34:791-808.
11. Rodrigues Lima G, Gebrim LH. Hormonioterapia. In: Abrão FS, editor. *Tratado de Oncologia Genital e Mamária*. 1ª ed. São Paulo: Roca; 1995. p.109-16.
12. Mommers EC, Leonhart AM, Falix F, et al. Similarity in expression of cell cycle proteins between in situ and invasive ductal breast lesions of same differentiation grade. *J Pathol* 2001; 194:327-33.
13. Souza GA, Alvarenga M. Carcinoma ductal in situ. *Rev Bras Mastol* 1999; 9:75-83.
14. Fisher LD, Van Belle G. *Biostatistics - a methodology for the health sciences*. 1st ed. New York: John Wiley & Sons; 1993.
15. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-74.
16. Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, Morgan JM, Mansel RE. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). *Cancer* 1997; 80:1740-5.
17. Goldstein NS, Murphy T. Intraductal carcinoma associated with invasive carcinoma of the breast. A comparison of the two lesions with implications for intraductal carcinoma classification systems. *Am J Clin Pathol* 1996; 106:312-8.
18. Querzoli P, Albonico G, Ferreti S, et al. Modulation of biomarkers in minimal breast carcinoma: a model for human breast carcinoma progression. *Cancer* 1998; 83:89-97.
19. Wörnberg F, Casalini P, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg GL, Ménard S. Ductal carcinoma in situ of the breast: a new phenotype classification system and its relation to prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 73:215-21.
20. Bur ME, Zimarowski MJ, Schnitt SJ, Baker S, Lew R. Estrogen receptor immunohistochemistry in carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1992; 69:1174-81.
21. Wörnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg GL. Tumor markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. *Br J Cancer* 2001; 85:869-74.
22. Albonico G, Querzoli P, Ferreti S, Rinaldi R, Nenci I. Biological profile of in situ breast cancer investigated by immunohistochemical technique. *Cancer Detect Prev* 1998; 22:313-8.
23. Tsuda H, Sakamaki C, Tsugane S, Fukutomi T, Hirohashi S. A prospective study of significance of gene and chromosome alterations as prognostic indicators of breast cancer patients with lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 48:21-32.
24. Rosen PP. Intraductal carcinoma. In: Rosen PP, editor. *Rosen's Breast Pathology*. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.257-323.
25. Viacava P, Naccarato AG, Bevilacqua G. Different proliferative patterns characterize different preinvasive breast lesions. *J Pathol* 1999; 188:245-51.

Recebido em: 14/4/2004

Aceito com modificações em: 24/5/2004