

GIULIANA CÁSSIA MORRONE TAROMARU

RELAÇÃO ENTRE A ENZIMA CICLOOXIGENASE-2
E MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E
APOPTOSE NOS CARCINOMAS DUCTAIS *IN SITU*
E INFILTRATIVO PRESENTES NA MESMA MAMA

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Santa Casa de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Medicina

São Paulo
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GIULIANA CÁSSIA MORRONE TAROMARU

**RELAÇÃO ENTRE A ENZIMA CICLOOXIGENASE 2
E MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E
APOPTOSE NOS CARCINOMAS DUCTAIS *IN SITU*
E INFILTRATIVO PRESENTES NA MESMA MAMA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Santa Casa de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Medicina

Área de concentração: Tocoginecologia
Orientador: Prof. Dr. Vilmar Marques de Oliveira
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão da Silva

São Paulo
2010

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Taromaru, Giuliana Cássia Morrone

Relação entre a enzima ciclooxigenase-2 e marcadores de proliferação celular e apoptose nos carcinomas ductais *in situ* e infiltrativo presentes na mesma mama./ Giuliana Cassia Morrone Taromaru. São Paulo, 2010. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Vilmar Marques de Oliveira

Co-Orientador: Maria Antonieta Longo Galvão da Silva

1. Neoplasias da mama 2. Ciclooxigenase 2 3. Receptor IGF tipo1 4.

Antígeno Ki-67 5. Apoptose 6. Carcinoma ductal de mama 7. Carcinoma

intraductal não infiltrante

BC-FCMSCSP/47-10

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, **Eduardo** pelo amor, carinho, compreensão, nunca questionando a minha ausência e dedicação para o término deste trabalho.

Aos meus pais **Luiz Carlos e Maria Tereza**,
alicerces da minha existência, sempre me incentivando a crescer!

À minha querida irmã **Ana Luiza**, pelo incentivo e ajuda com o inglês.

“A melhor de todas as coisas é aprender.
O dinheiro pode ser perdido ou roubado,
a saúde e força podem falhar, mas o que você
dedicou à sua mente é seu para sempre.”

Louis L. Amour

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Vilmar Marques de Oliveira, meu grande mestre, fazendo parte da minha formação como Mastologista desde o início da minha especialização, por seus ensinamentos científicos e cirúrgicos, incentivando-me a sempre buscar novas fontes de conhecimento, pela dedicação, atenção, disponibilidade e carinho, conduzindo-me na elaboração e execução desta tese.

À Prof^a. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão Silva, grande conhecedora da Anatomia Patológica mamária, pelo carinho, dedicação e atenção especial à execução deste estudo, mostrando sempre disposição e otimismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tsutomu Aoki, pelo incentivo, apoio e orientações.

Ao Prof. Dr. Sebastião Piato, pelos sábios conselhos e orientações quanto à elaboração deste estudo.

À Profa. Dra. Maria Marta Martins, pelas suas orientações sempre com muito carinho e atenção desde o início do meu ingresso na Mastologia da Santa Casa.

Ao Prof. Dr. Gil Facina, pelas orientações e análise crítica do nosso estudo.

Ao Prof. Dr. Manoel Carlos Sampaio de Almeida Ribeiro, pela análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. José Francisco Rinaldi, pelos ensinamentos transmitidos durante a minha especialização em Mastologia.

Ao Prof. Dr. Antonio Pedro Flores Auge, pelo seu carinho e atenção desde o tempo da Faculdade.

Ao Prof. Dr. Wagner Ricardo Montor pela paciência, orientações e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Dino Martini Filho, Diretor do Departamento de Ciências Patológicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, por permitir a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fabiano de Franco, professor titular da UNIFESP, por ter permitido a confecção do TMA nesta instituição.

Aos meus “irmãozinhos” Fábio Bagnoli, Andrey e Lectícia pelo trabalho em conjunto durante a execução desta tese.

Às minhas amigas Thalita, Priscila, Juzinha que desde a faculdade sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida profissional.

À toda equipe da Mastologia, aos residentes e ex-residentes que me apoiaram e vivenciaram todo período de execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Patológicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, D. Eunice Honório, Antônio Aguiar de Paula, Sandra Regina Franco pela ajuda no levantamento dos casos.

Ao José Francisco Martins, técnico de histologia do Departamento de Ciências Patológicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela realização das reações imunoistoquímicas

Ao Joaquim Soares de Almeida, biólogo e coordenador do controle de qualidade no Serviço de Anatomia Patológica da UNIFESP, e técnico de histologia do hospital Albert Einstein, pela confecção do TMA.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e a Irmandade da Santa Casa de São Paulo pela minha formação como médica e por me proporcionar continuar estudando.

Às queridas pacientes que participaram de nosso estudo. Sem elas, nada teria sido possível.

ABREVIACOES

BAX: *B-cell lymphoma 2 associated protein X*

BCL-2: *B-cell lymphoma/ leukemia-2*

CDI: Carcinoma ductal infiltrativo

CDIS: Carcinoma ductal *in situ*

COX-2: Ciclooxygenase-2

HER-2: *human epidermal receptor-2*

IA: Inibidor de aromatase

IGFBP3: *Insulin-like growth factor binding*

IGF1: Fator de insulina *like 1*

IGF2: Fator de insulina *like 2*

IGF1-R: receptor do fator de insulina *like 1*

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IR: Receptor de insulina

Ki67/MIB: Molecular immunology borstel

PCNA: *proliferation cell nuclear antigen*

PGE2: Prostaglandina E2

RE: Receptor de estrogênio

RH: Receptor hormonal

RP: Receptor de progesterona

SERM: Modulador seletivo de receptor de estrogênio

TMA: *Tissue microarray*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Ciclooxigenase-2.....	5
1.2. Bax e Bcl-2.....	8
1.3. Ki67.....	12
1.4. IGF1-R.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
3.1. Casuística.....	21
3.1.2. Critérios de Exclusão.....	21
3.2. Métodos.....	22
3.2.1. Análise histopatológica.....	22
3.2.2. <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	23
3.2.3. Estudo imunoistoquímico.....	25
3.3. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÕES.....	43
7. ANEXOS.....	46
7.1. Termo de consentimento livre esclarecido.....	48
7.2. Classificação do CDI e CDIS.....	49
7.3. Reação imunoistoquímica.....	50
7.4. Tabelas de correlação entre CDI e CDIS nos diversos biomarcadores	54
7.5. Figuras das expressões imunoistoquímicas.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
FONTES CONSULTADAS.....	72
RESUMO.....	74
ABSTRACT.....	77
LISTAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum no sexo feminino nos países industrializados constituindo a segunda causa de morte neste grupo. No Reino Unido aproximadamente 40.000 mulheres desenvolverão a doença a cada ano (Mazhar *et al*, 2006). Nos Estados Unidos, durante os anos de 1990 a 2000 a taxa de incidência do câncer de mama vinha aumentando cerca de 3% ao ano, no entanto a partir de 2003 a incidência da doença iniciou leve declínio. Esta redução deve-se principalmente a dois motivos: a melhoria dos programas de rastreamento da doença nas mulheres acima de 45 anos de idade e, principalmente, devido à redução do uso indiscriminado da terapia de reposição hormonal no grupo de mulheres entre 50 e 69 anos de idade (Jemal, Ward , 2007; Jemal, Siegel, 2008; Brewster *et al*, 2009).

No Brasil, segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), constitui a segunda neoplasia maligna de maior incidência no sexo feminino, perdendo apenas para os tumores de pele do tipo não melanoma. Para o ano de 2010 a estimativa é de 49.240 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado em 49 casos a cada 100.000 mulheres, acarretando a maior mortalidade entre os cânceres que acometem o sexo feminino. É o câncer mais incidente entre as mulheres na região sudeste do país, com taxa bruta de 65 casos por 100.000 mulheres. (INCA, 2010).

A despeito do diagnóstico precoce e dos avanços no tratamento do câncer de mama, a morbidade e mortalidade associadas a esta doença permanecem elevadas; a prevenção primária, portanto, parece oferecer as melhores chances de impacto sobre esta neoplasia, sendo esta embasada na quimioprevenção, assim como na modificação de estilo de vida e nas cirurgias redutoras de risco (mastectomia e ooforectomia bilaterais) (Prichard *et al*, 2003; Thomsen *et al*, 2008).

Quimioprevenção é definida como o uso sistêmico de agentes químicos naturais ou sintéticos, para reverter ou suprimir a passagem de lesões pré-malignas para carcinomas infiltrativos (Sporn *et al*, 1976). Entre estes se destacam os moduladores seletivos de receptor de estrogênio (SERM), os retinóides e os inibidores da aromatase (IA) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) (Prichard *et al*, 2003).

Ao que tudo indica, o câncer de mama é o resultado da interação de fatores gênicos com estilo de vida, hábitos reprodutivos e o meio ambiente (Johnson-Thompson, Guthrie, 2000). Todos os cânceres de mama têm origem gênica; acredita-se que 90%-95% deles sejam esporádicos (não-familiares) e decorram de mutações somáticas que se verificam durante a vida, e que 5%-10% sejam hereditários (familiares) devido à herança de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estas mulheres suscetibilidade ao câncer de mama (Bilimoria *et al*, 1995).

No grupo de mulheres com alto risco familiar para o desenvolvimento do câncer de mama podemos citar a presença de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (Dufloth *et al*, 2005). Segundo o estudo metanálítico realizado por Chen, Parmigiani (2007) pacientes que apresentam estas mutações têm um risco de desenvolvimento do câncer de mama de 57% e 49% respectivamente.

Ainda que o processo carcinogênico deva ser conduzido por mutações gênicas, existem, claramente, muitas variáveis epigenéticas, particularmente aquelas relacionadas com ações autócrinas, parácrinas e endócrinas de moléculas reguladoras. As modulações farmacológicas destas vias reguladoras oferecem grande potencial para a prevenção do câncer (Badawi *et al*, 2002).

Conforme assinalado, uma das estratégias relacionadas com a quimioprevenção consiste no emprego dos inibidores da COX-2. Harris *et al* (2007), em estudo caso-controle analisou o papel dos inibidores da COX-2 na quimioprevenção em carcinomas de mama, próstata, colon e pulmão observando redução significativa no risco de desenvolvimento destas neoplasias em 71%, 55%, 70% e 79% respectivamente. Em estudo semelhante observou-se que o risco de câncer de mama pode ser reduzido de forma significativa em pacientes que utilizam de maneira rotineira anti-inflamatórios não esteroidais, tais como aspirina ou inibidores da ciclooxigenase, em 25% (Harris *et al*, 2009).

A COX-2 pode estar expressa no carcinoma ductal infiltrativo (CDI), carcinoma ductal *in situ* (CDIS), assim como nas hiperplasias atípicas. Visscher *et al* (2008), realizaram análise por meio de imunohistoquímica da expressão da COX-2 em 235 mulheres com hiperplasia atípica, e observaram que o risco do desenvolvimento do câncer de mama foi estatisticamente significativo nas mulheres que apresentavam expressão da COX-2, concluindo que a quimioprevenção com inibidores da COX-2 pode ser benéfica neste grupo de pacientes (Visscher *et al*, 2008).

1.1. CICLOOXIGENASE-2

A ciclooxigenase é enzima que catalisa a conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas e se apresenta como duas isoenzimas: a COX-1 e a COX-2 (Shim, Jung, 2003). A primeira é constitutiva e medeia funções fisiológicas normais e a segunda é indetectável na maioria dos tecidos normais sendo induzida por citocinas, fatores de crescimento, oncogenes e promotores tumorais, assim contribuindo para a síntese de prostaglandinas (PGs) em quadros inflamatórios e em tecidos tumorais (Fosslie, 2000; Dempke *et al*, 2001).

Half *et al* (2002) avaliaram, por meio de análise imunoistoquímica, a presença da COX-2 no carcinoma ductal infiltrativo (CDI), assim como em carcinoma ductal *in situ* (CDIS) em 57 casos de câncer de mama. Constataram que a COX-2 estava presente em 43% dos tumores infiltrativos e em 63% dos CDIS.

Shim, Gauthier (2003), analisaram a expressão da COX-2, por meio de análise imunoistoquímica, empregando anticorpos policlonais, em 46 casos de CDIS e no epitélio normal adjacente a este, assim como sua relação com o grau nuclear. 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. Em estudo subsequente, estes mesmos autores encontraram positividade para a COX-2 em 72% dos casos analisados de tumores mamários e demonstraram que a supreexpressão da COX-2 está relacionada com tumores infiltrativos de estádios mais avançados, e quando analisaram somente os casos de CDIS encontraram 76% de positividade, sugerindo que a superexpressão da COX-2 esteja envolvida na progressão para o tumor infiltrativo (Shim, Jung, 2003).

Oliveira *et al* (2006), analisaram a expressão da COX-2 nos CDI, CDIS e epitélio normal e correlacionaram estas expressões com grau nuclear, grau histológico e presença de comedonecrose. Como resultados encontraram a positividade da COX-2 em 87% dos casos de CDI, em 85% dos casos de CDIS e em 74,5% dos casos epitélio normal. Estes dados mostraram alta correlação entre a expressão da COX-2 no CDI, CDIS e epitélio normal ($p < 0,001$).

A COX-2 contribui para o desenvolvimento de várias neoplasias malignas, dentre as quais podemos citar o carcinoma de colon, estômago, próstata, bexiga e mama, atuando na carcinogênese de várias formas, incluindo efeitos sobre apoptose, proliferação celular, imunomodulação, agressão do tumor, neo angiogênese e invasão tumoral. (Shim, Jung, 2003; Hawk *et al*, 2003).

No câncer de mama a COX-2 desempenha vários papéis dentre os quais podemos citar: inibição da apoptose por meio da indução da prostaglandina E2 (PGE2) levando a aumento da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2*) e diminuição da proteína pró-apoptótica Bax (*B-cell lymphoma 2-associated protein X*) e promoção da neoangiogênese (Krcova *et al*, 2008).

A apoptose é dependente da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e também da Bax e Bak, que são proteínas promotoras da apoptose celular. No câncer de mama a Bax desempenha papel essencial como um facilitador da apoptose, função esta que assegura o balanço entre o principal membro antiapoptótico desta família, o Bcl-2 (Martínez-Arribas *et al*, 2008).

Alguns autores têm estudado a correlação entre a expressão da COX-2 e sua relação com as proteínas Bcl-2 e Bax. Shing *et al* (2008), observaram que em cultura de células MCF-7 de câncer de mama com hiperexpressão da COX-2, também apresentavam níveis altos da proteína BCL-2 chegando à conclusão que estes tumores têm uma maior agressividade e um pior prognóstico.

Zhu *et al* (2008), analisaram o efeito do inibidor de COX-1 e COX-2 derivado do ácido acetil salicílico em cultura celular de câncer de mama. Como resultados observaram que este anti-inflamatório aumenta a expressão da Bax e diminui a expressão da COX-2 e do Bcl-2. Concluíram que esta medicação tem um efeito antitumoral nas células do câncer de mama mediada pela indução da apoptose por meio de supressão da COX-2 e do Bcl-2 e conseqüentemente aumento na expressão da Bax.

Ristimäki *et al* (2002), observaram que a COX-2 se correlaciona de forma positiva com o antígeno de proliferação celular Ki-67/MIB (*Molecular Immunology Borstel*). Analisando a expressão da COX-2 em 1576 casos de CDI observaram que nos casos de superexpressão da COX-2 (37,4% dos casos) os índices de Ki67 estavam altos ($p < 0,0001$), caracterizando uma maior agressividade tumoral.

Boland *et al* (2004) estudaram a expressão da COX-2 no CDIS e observaram que naqueles tumores que apresentavam altos índices de Ki67 houve associação positiva com a superexpressão da COX-2 em 79% dos casos; já nos casos onde o Ki67 estava baixo a COX-2 estava superexpressa em apenas 55% dos casos ($p < 0,0001$). O autores concluíram que esta associação do Ki67 com a COX-2 nos CDIS confere um maior potencial de invasão.

Pöld *et al* (2004) em cultura celular de câncer de pulmão que superexpressam COX-2 observaram que as mesmas apresentam um incremento dos mecanismos anti apoptóticos e mitogênicos induzidos pelo IGF-1 (fator de insulina *like* 1).

Levitt *et al* (2004), realizaram estudo avaliando a ação de um inibidor seletivo da COX-2 (celecoxibe) em cultura celular de câncer de mama, observando que a diminuição da expressão da COX-2 determina a diminuição da expressão do IGF-1 e

consequentemente da proliferação celular por mecanismo envolvendo a indução da expressão da IGFBP3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*).

1.2. Bax e Bcl-2

A Bax, *B-cell lymphoma 2-associated protein X*, e o Bcl-2, *B-cell lymphoma 2*, referem-se a uma família de genes relacionados ao controle da apoptose celular. Suas proteínas regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e podem ser pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bak e Bok, entre outros) e anti-apoptóticas (Bcl-2 propriamente dito, Bcl-xL, e Bcl-w, entre outros) (Chao *et al*, 1998).

A apoptose é, em geral, caracterizada pela condensação da cromatina e pela degradação do DNA genômico em fragmentos oligonucleossomais. Caracteriza-se pela retração celular, perda da aderência com matriz extracelular e células vizinhas e fragmentação celular em corpos apoptóticos (Amarante-Mendes 2003; Grivicich *et al* 2007).

Existem duas vias principais que levam a célula à apoptose, a extrínseca (citoplasmática) e a intrínseca (mitocondrial). A primeira delas, a extrínseca, é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNF), cuja ligação ativa a via das caspases. A outra via, a intrínseca ou mitocondrial, é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria, que integra os estímulos de morte celular que levam a liberação de moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bid e Bak) nela presentes (Grivicich *et al*, 2007).

A Bax é uma proteína pró-apoptótica que em conjunto com a Bcl-2 (proteína antiapoptótica que inibe a apoptose através da inibição da liberação do citocromo c mitocondrial) são responsáveis pelo equilíbrio celular. Após um estímulo de morte celular, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo

sequestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial (Adams *et al*, 1998).

A ação de inibir a apoptose do Bcl-2 ocorre através inibição da ação do citocromo c na mitocôndria, evitando a cascata de eventos que resulta no comprometimento do potencial de membrana externo da mitocôndria que, em contrapartida, ativa a caspase 9 e subsequentemente a apoptose (Nadler *et al*, 2008).

A proteína Bcl-2 regula a apoptose estando presente na membrana mitocondrial, apresentando ampla distribuição tecidual. No câncer de mama tem papel fundamental na facilitação da apoptose, assegurando uma harmonia entre os principais membros de sua família. Atua como um protooncogene estando presente em vários tipos de tumores. No câncer de mama sua expressão está associada com prognóstico favorável, tumores de baixo grau, positividade para receptores hormonais e baixo *status* de proliferação celular (Callagy *et al* 2006; Callagy *et al* 2008; Martínez-Arribas *et al* 2008).

A apoptose tem sido reconhecida pela sua importante ação tanto na formação do tumor quanto na resposta ao tratamento. A Bax tem a função de acelerar a apoptose e a perda da sua função tem sido observada nos tumores de pior prognóstico, associando-se também com a resistência a quimioterapia e piora no prognóstico em pacientes com câncer de pâncreas e ovário. Inversamente, o protooncogene Bcl-2 deveria realizar o papel antiapoptótico de neutralizar a ação pro-apoptótica da Bax. O gene Bcl-2 é também conhecido pelo seu papel na sobrevivência celular e na prevenção da apoptose induzida por agentes quimioterápicos (Kim *et al*, 2008).

A expressão do Bcl-2 é associado com prognóstico favorável quando temos tumores de tamanho pequeno, baixo grau nuclear e positividade de receptores de estrogênio. Linjawi *et al* (2004), em estudo retrospectivo com 75 pacientes com carcinoma ductal infiltrativo estágio IA, identificaram que nem a expressão do Bcl-2 nem da Bax associaram-se com aumento da sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Os tumores que apresentaram-se *status* hormonal positivo foram 64 dos 75 pacientes, e dentre os casos com receptor positivos e que expressaram Bcl-2 73% foram receptor de estrogênio (RE) positivos ($p=0,017$) e 45% foram receptor de progesterona (RP) positivos ($p = 0,027$).

Bachmann *et al* (2007), em estudo prospectivo, investigaram 274 pacientes com carcinoma infiltrativo unilateral e analisaram a expressão da Bcl-2 correlacionando-a com a sobrevida. Observaram que a expressão aumentada do Bcl-2 teve associação significativa com sobrevida em 215 casos ($p=0,009$) e com metástases axilares ($p=0,008$).

Madjd *et al* (2009), estudaram o aumento da expressão do Bcl-2 nos tumores mamários e identificaram que os altos índices do Bcl-2 correlacionaram-se com tumores de baixo grau ($P < 0,001$) e com baixo comprometimento linfonodal axilar ($P < 0,05$). Desta forma concluíram que os tumores mamários que apresentam aumento da expressão da Bcl-2 são aqueles com baixas taxas de proliferação e morte celular, enquanto os tumores com deficiência desta proteína apresentam elevado *turnover* celular pela ausência da proteína antiapoptótica Bcl-2, podendo considerá-lo como fator prognóstico independente.

O aumento da expressão do Bcl-2 tem sido observado em tumores mamários receptores de estrogênio e de progesterona positivos, o que pode estar associado a melhora na sobrevida da doença (Nadler *et al*, 2008). Em estudo de casuística expressiva conduzido por Callagy *et al* (2006), incluindo 930 casos, mostraram que o aumento da expressão do Bcl-2 é um forte preditor de sobrevida, independente do índice prognóstico de Nottingham, índice este que classifica as pacientes com tumores infiltrativos da mama em três grupos distintos de acordo com o tamanho do tumor, grau histológico e *status* linfonodal axilar, e também pode estar associada a um melhor prognóstico mesmo entre pacientes com alto risco de desenvolverem metástases a distância, com mais de dez linfonodos comprometidos (Galea *et al*, 1992).

Pacientes que apresentam aumento na expressão do Bcl-2 tem um prognóstico melhor do que aquelas que apresentam baixa expressão. Segundo estudo realizado por Jung *et al*, 2009, que avaliaram 1080 pacientes com câncer de mama estágio clínico I, encontraram que a hiperexpressão do Bcl-2 foi associada a melhora na sobrevida global quando comparados com os casos com baixa expressão do Bcl-2.

Yang *et al* (2007), estudaram a correlação entre a expressão do HER-2, PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), Bcl-2 e Bax no prognóstico das pacientes com carcinoma mamário em relação a sobrevida. Como resultados encontraram taxas de sobrevida global em 5 anos de 82% e sobrevida livre de doença de 38%. Observaram ainda que a Her-2 e a Bax tem significativa influência na recorrência tumoral ($P < 0,001$) e correlacionam-se com recorrência local e metástases a distância ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) e que a Bcl-2 e a Bax são fatores preditores independentes de sobrevida global ($P < 0,05$). Concluiu que a HER-2 e a Bax se relacionam com pior prognóstico no câncer de mama, enquanto a Bcl-2 está relacionada com melhor prognóstico.

1.3. Ki67/MIB

Gerdes *et al* (1983) descreveram o anticorpo monoclonal murino denominado Ki-67, capaz de reconhecer um antígeno nuclear associado à proliferação. O Ki-67/MIB (*Molecular Immunology Borstel*) é um anticorpo monoclonal de camundongo da classe IgG1, obtido da fração nuclear bruta das células de Sternberg-Reed da doença de Hodgkin, derivado da linhagem celular L-428. (Gerdes *et al.*,1984; Brown *et al* 1990). Está localizado no núcleo, possivelmente associado ao nucléolo ou a componentes fibrilares, estando presente em todas as fases ativas do ciclo celular, ou seja, G1, S, G2 e M, mas ausente na fase G0. (Gerdes *et al.*,1984; Brown *et al* 1990; Parrado *et al.*,1996; Goodson *et al.*,1998)

O Ki-67 foi extensamente estudado no carcinoma mamário, sendo destacado como fator prognóstico independente de sobrevida e recorrência tumoral. Estes estudos envolveram juntos mais de 4600 casos, provando que o Ki-67 é um fator prognóstico significativo, inclusive em análises multivariáveis. Sua expressão está relacionada com o número de células em proliferação e não ao tempo necessário para completar um ciclo intermitótico, definindo um estado e não uma taxa de proliferação, pois o Ki-67 informa se uma célula está no ciclo, mas não à sua duração (Scholzen, Gerdes, 2000).

Alguns autores referem aumento da expressão do antígeno Ki-67 com a progressão das fases do ciclo celular, tanto em tecidos normais quanto nos neoplásicos. A maior expressão é observada durante a fase G2/M, enquanto células no início do ciclo celular, fases G0/G1(G1T) e G1 têm pouca ou nenhuma expressão do Ki-67. (Gerdes *et al* 1984; Guillaud *et al* 1989; Verheijen *et al* 1989; Dettmar *et al* 1997).

Jalava *et al* (2006), em estudo com 2.065 casos de CDI observaram que o Ki67 pode ser considerado um fator prognóstico independente, assim como *status* linfonodal axilar, tamanho do tumor, idade e grau histológico. Corroborando o exposto, Viale *et al* (2008) avaliaram o valor preditivo e prognóstico do Ki67 em pacientes que utilizavam terapia hormonal para o tratamento do câncer de mama e observaram que altos níveis de Ki67 estavam associados a fatores prognósticos desfavoráveis e menor sobrevida livre de doença.

Harris *et al* (2008), em estudo metanalítico envolvendo 85 estudos com 32.825 pacientes com carcinoma mamário em estágio inicial, verificaram que altos índices do Ki67 estão relacionados com piora na sobrevida global concluindo que estes tumores têm uma agressividade maior. Também verificaram que tumores com alto índice de Ki67 podem estar relacionados com uma maior probabilidade destas pacientes apresentarem metástases linfonodal.

Um estudo conduzido por Santisteban *et al* (2009) avaliando a expressão do Ki67 em casos de hiperplasia atípica da mama e observaram que a incidência do câncer de mama em um período de dez anos após o diagnóstico foi maior nos casos onde houve alta expressão do Ki67 (14%) comparado com somente 3% nos casos de baixo índice do Ki67, entretanto em um período superior a dez anos não houve diferença entre os dois grupos. Concluíram então que o Ki67 pode ser considerado um biomarcador de risco de câncer de mama nos casos de hiperplasia atípica que está relacionado com o tempo.

O Ki67 pode ser utilizado como marcador de eficácia terapêutica em pacientes com câncer de mama que se submetem a tratamento neoadjuvante. Dowsett *et al* (2007), estudaram a expressão do Ki67 em 158 pacientes com receptores hormonais positivos, mensurando o nível do Ki67 nas amostras de tumores antes e após duas semanas de terapia endócrina. Observaram que alta expressão do Ki67 após duas semanas de terapia endócrina foi associada com menor sobrevida livre de doença

concluindo que o nível do Ki67 após curto período de terapia endócrina neoadjuvante pode ser considerado um marcador prognóstico nestas pacientes.

Altos níveis de proliferação celular podem ser considerados como um valor preditivo de resposta ao tratamento. Mudanças na proporção de células com Ki67 positivas tem sido observada após duas semanas de tratamento neoadjuvante, sendo que uma queda do Ki67 nestes casos mostram uma melhor evolução no tratamento destes tumores. (Dowsett *et al* 2004; Makris *et al* 1999). Minckwitz *et al* (2008) avaliaram a resposta clínica ao tamoxifeno após duas semanas de tratamento neoadjuvante e observaram que os tumores com baixa expressão do Ki67 tiveram melhor resposta ao tratamento do que os tumores com alto índice do Ki67.

De acordo com o consenso de St Gallen de 2009, onde foi discutido o tratamento do câncer de mama, o Ki67 foi considerado importante na determinação do prognóstico e para a decisão da utilização de quimioterapia sistêmica (quando o Ki67 for alto) ou somente com hormonioterapia (quando o Ki67 for baixo) nos casos onde houver positividade dos receptores hormonais (Goldhirsch *et al*, 2009).

1.4. IGF1-R

Outro fator prognóstico importante nos estudos sobre câncer de mama é o IGF1-R (receptor do fator de crescimento insulina like 1) que medeia ações biológicas do IGF-1 e IGF-2 (fator de insulina *like 2*) estando expresso na maioria das células epiteliais do câncer de mama, sendo importante para a aquisição do fenótipo de malignidade (Sheen-Chen *et al* 2007; Werner & Bruchim 2009).

Os fatores de crescimento insulina-like 1 e 2 são reguladores de ações endócrinas, parácrinas ou autócrinas em vários processos biológicos tanto em células normais, quanto nas células neoplásicas. As ações do IGF-1 são mediadas principalmente pelo IGF1-R, enquanto que o IGF-2 estimula o IGF1-R e também o receptor de insulina (IR). Já está bem estabelecido que em vários tipos celulares a ativação do IGF1-R tem como função regular processos biológicos tais como a proliferação, diferenciação, sobrevivência celular, interação célula-célula e célula-substrato, assim como crescimento tumoral independente do estímulo estrogênico, processos estes que promovem a tumorigênese. Existem fortes evidências de que a hiperexpressão do IGF1-R esteja relacionada com a etiologia do câncer de mama e prognóstico desfavorável (Surmacz 2000).

Ellis *et al* (1998), descreveram que o IGF-1 é um peptídeo hormonal que atua localmente como fator de crescimento nas determinadas vias autócrinas e parácrinas da célula, promovendo mitoses, sobrevivência celular e ação da insulina, sendo essencial para a embriogênese, fisiologia pós-natal e desenvolvimento do câncer. A ação do IGF-1 está regulada por uma rede de proteínas ligantes e mecanismos de degradação que estão interrompidos no câncer de mama fazendo com que ocorra uma superexpressão de células malignas epiteliais, alteração no mecanismo da apoptose maior sensibilidade à ação estrogênica.

Deming *et al* (2007), estudando o papel do IGF-1 na sobrevida por câncer de mama, identificaram que o desequilíbrio no IGF-1 pode estar implicado na etiologia e progressão do câncer de mama. Demonstraram ainda que existe relação entre a sobrevida livre de doença em mulheres com câncer de mama e *status* menopausal definido, onde encontraram que há maior risco de morte em mulheres com superexpressão do IGF-1 na pós-menopausa. Por outro lado, Sheen-Chen *et al* (2007), analisaram espécimes cirúrgicos de 106 pacientes com carcinoma infiltrativo da mama que expressavam IGF-1 não observando relação significativa entre a expressão do IGF-1 e a taxa de sobrevida também não encontraram associação com o *status* do receptor de estrogênio.

Wu *et al* (2010), demonstraram que o estrogênio, substância importantíssima para a carcinogênese mamária, regula e é influenciado pelo IGF-1. Em estudo caso controle visando para avaliar o papel do IGF-1 como biomarcador para o câncer de mama, analisaram o efeito em conjunto dos níveis de IGF-1 e do período de exposição ao estrogênio e identificaram que o risco de câncer de mama relacionado ao IGF-1 difere de acordo com o *status* menopausal. Concluíram ainda que altos níveis de IGF-1 aumentam o risco na pré-menopausa, mas não na pós-menopausa do desenvolvimento da doença. Além disso, elevadas concentrações de IGF-1 em conjunto com um prolongado período de exposição ao estrogênio estão associados significativamente com o aumento do risco para o câncer de mama, particularmente tumores receptor de estrogênio positivos.

O bloqueio do IGF1-R reduz a proliferação tumoral e outros fatores de progressão tumoral. Análise imunoistoquímica de tumores primários da mama revelaram que altos níveis de IGF1-R estão relacionados a aumento da recidiva local em pacientes submetidas a cirurgia conservadora e resistência ao uso do trastuzumabe (anticorpo monoclonal utilizado no tratamento do câncer de mama em pacientes que superexpressão o Her2-neu). Além disso, o *status* hormonal tem mostrado apresentar grande influência nos níveis e ação do IGF1-R (Werner & Bruchim 2009).

O IGF1-R está emergindo como um dos mais promissores como terapia molecular no tratamento do câncer. Múltiplos caminhos podem ser utilizados tais como: anticorpos contra o IGF1-R, inibidores da molécula quinase, ligação com proteínas IGF, combinação de terapias anti-IGF1-R e anticorpos contra IGF-1 e IGF-2 dentre outros (Werner, Bruchim, 2009).

Estudos prévios mostraram que a aquisição do fenótipo maligno em carcinomas mamários iniciais se relacionam com o IGF1-R demonstrando seu papel na iniciação e promoção tumoral. Tumores em estágio inicial usualmente apresentam hiperexpressão do IGF1-R, enquanto tumores metastáticos apresentam baixa expressão (Sarfstein *et al*, 2006).

Shin *et al* (2007), realizaram estudo comparando a expressão do IGF1-R em doença mamária benigna e maligna em comparação com o tecido mamário normal adjacente. Verificaram que no grupo com doença mamária benigna houve hiperexpressão do IGF1-R tanto no tecido normal quanto no tecido com a doença benigna, e no grupo com tumores malignos a hiperexpressão do IGF-1R ocorreu principalmente nos locais de tecido mamário normal. Observaram ainda que pacientes com alta expressão do IGF1-R apresentam melhor prognóstico e maior período de sobrevida livre de doença, concluindo que a expressão do IGF1-R pode ser um fator prognóstico importante dentro do câncer de mama.

Tendo em vista a escassez de estudos avaliando a interação entre a enzima COX-2 e os marcadores de apoptose Bcl-2 e Bax e os marcadores de proliferação Ki67 e IGF1-R idealizamos este estudo para avaliar a interrelação entre estes biomarcadores nos carcinomas mamários ductais *in situ* e infiltrativos a fim de obter informações que possam a nos auxiliar na prevenção e tratamento do carcinoma mamário.

2. OBJETIVOS

Desta forma, objetivamos avaliar em nosso trabalho:

1. A correlação entre a reação imunoistoquímica da enzima Ciclooxigenase-2 e Bcl-2, Bax, IGF1-R e Ki67 nos carcinomas ductais in situ e infiltrativo presentes no mesmo espécime cirúrgico.
2. Relacionar a presença destes biomarcadores com idade, tamanho do tumor, grau histológico, grau nuclear, *status* axilar linfonodal e *status* hormonal.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foi realizado estudo transversal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP (Lista 1), na clínica de Mastologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP) em conjunto com o Serviço de Ciências Patológicas da mesma instituição, no período de agosto de 2002 a janeiro de 2008. As pacientes que consentiram em participar do estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

No recrutamento, 885 pacientes com câncer de mama foram diagnosticadas e tratadas cirurgicamente. Dentre estas, foram selecionadas 110 pacientes com câncer de mama estágio clínico I, II e III que apresentavam carcinoma ductal infiltrativo e carcinoma ductal *in situ* concomitantes e satisfizeram nossos critérios de inclusão e exclusão; 46 foram submetidas a cirurgia conservadora e 64 à mastectomia (Lista 2).

3.1.1 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

As pacientes que apresentavam as seguintes condições foram excluídas do nosso estudo: uso de qualquer terapia neoadjuvante prévia; uso de tamoxifeno ou raloxifeno para quimioprevenção; utilização de terapia hormonal nas últimas oito semanas; grávidas ou que estivessem amamentando; uso de antiinflamatórios nos últimos 15 dias; submetidas a biópsia prévia com intervalo inferior a um mês da obtenção do espécime cirúrgico; que apresentavam obesidade mórbida e pacientes com doenças metabólicas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Foi realizada a fixação do material do estudo em solução de formaldeído tamponado a 10% sendo a seguir encaminhado ao Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP.

Após o estudo macroscópico dos espécimes, os fragmentos selecionados foram desidratados em álcool etílico, clareados pelo xilol e embebidos em parafina, para confecção dos blocos. Os blocos foram cortados por meio de micrótomo calibrado para cortes de 4 µm de espessura. Os cortes histológicos foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e foi realizada a leitura em microscópio óptico comum.

Os casos foram avaliados por dois examinadores, MALGS e GCMT, e os laudos emitidos de acordo com a padronização da Organização Mundial de Saúde, pelo Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP.

Os CDIS foram classificados de acordo com a presença ou ausência de comedonecrose, em comedocarcinomas e não-comedocarcinomas. Utilizamos os critérios propostos por Dabbs *et al* (1993) e Elston & Ellis (1991) para a classificação dos CDI e CDIS quanto ao grau nuclear e histológico respectivamente. (Anexo 2)

Os casos que apresentavam CDI e CDIS adjacentes foram selecionados para a confecção do arranjo tecidual em matriz, consagradamente conhecido como *tissue microarray* (TMA), constando a marcação de dois locais nas lâminas de cada um dos tipos histológicos a serem estudados e seus os locais correspondentes a estas marcações nos blocos de parafina. Desta forma, para cada caso obtivemos quatro áreas marcadas, sendo duas delas com a presença de CDIS e duas com CDI totalizando 440 áreas visando a confecção do TMA.

3.2.2 – *Tissue Microarray* (TMA)

A técnica de TMA constitui tecnologia eficiente proposta para determinar a expressão de proteínas ou genes por meio da junção de várias espécimes de tecido em uma única lâmina de microscópio sendo, portanto, uma técnica eficaz e econômica. Desta forma permite a homogeneização das reações imunoistoquímicas diminuindo vieses resultantes desses processos, outrossim otimiza a execução do estudo por permitir a inclusão de múltiplos casos em um único bloco de parafina. Outra vantagem da técnica é que cada espécime é tratada de maneira idêntica a outra, conseqüentemente a quantidade dos reagentes, o período de incubação e a temperatura são iguais em toda a lâmina e assim os resultados de sua coloração são perfeitamente comparáveis (Battifora 1986; Chen & Foran 2005; Hassan *et al* 2008).

Cabe assinalar que são reconhecidas como desvantagens do TMA a significativa heterogeneidade entre as células tumorais e dentro dos tecidos, necessidade do emprego de padrão técnico adequado, que permita a obtenção de células puras, e a necessidade de repetição nos casos negativos quando a quantidade de tumor é pequena (Lakhani *et al* 2001; Sapino *et al* 2006).

Descrição da técnica de TMA (Packerisen *et al* 2003, Rijn & Gilks 2004) (Figuras 1 e 2)

1. Separação dos blocos de parafina previamente marcados com 4 pontos (blocos doadores) descritos acima, correspondentes às áreas de interesse ao estudo imunoistoquímico (Anexo 3).
2. Utilização do aparelho para criar espaço vasado (“casela”) no bloco receptor;
3. Extração, do bloco doador, de um cilindro tecidual de 1,0 mm de diâmetro da respectiva área de interesse previamente selecionada;
4. Transferência do cilindro tecidual obtido do bloco doador para a “casela” previamente criada no bloco receptor com agulha de 1 mm;

- Progressão, em frações de milímetros, a novas posições dentro do bloco receptor, de modo a criar coletânea de amostras teciduais seguindo disposição matricial;
- Avaliação da qualidade do bloco final para armazenamento.

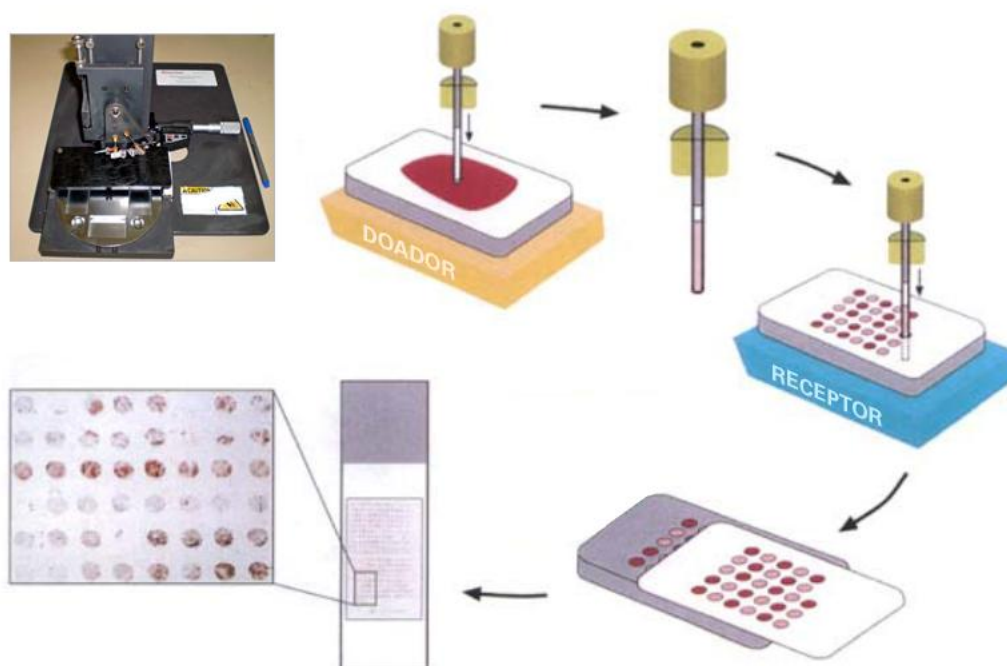


Figura 1 – Confeccção do TMA

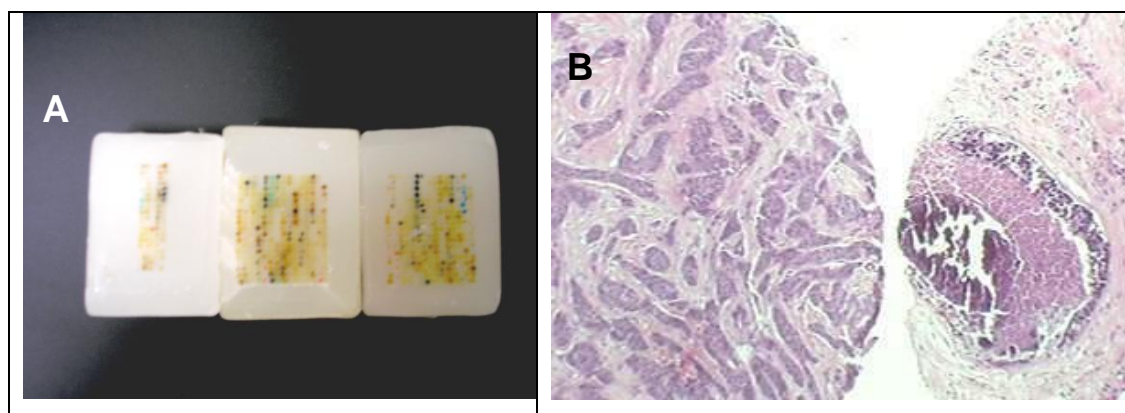


Figura 2: A- 3 blocos de TMA com os pontos referentes aos 110 casos. B- CDI/ CDIS com comedonecrose corados pelo HE em cortes de TMA -20X AO (aumento original).

As lâminas foram confeccionadas através de corte em micrótomo convencional calibrados para cortes de 4mm e o material depositado em lâminas silanizadas a 10% para a reação de imunohistoquímica (Figura 3).

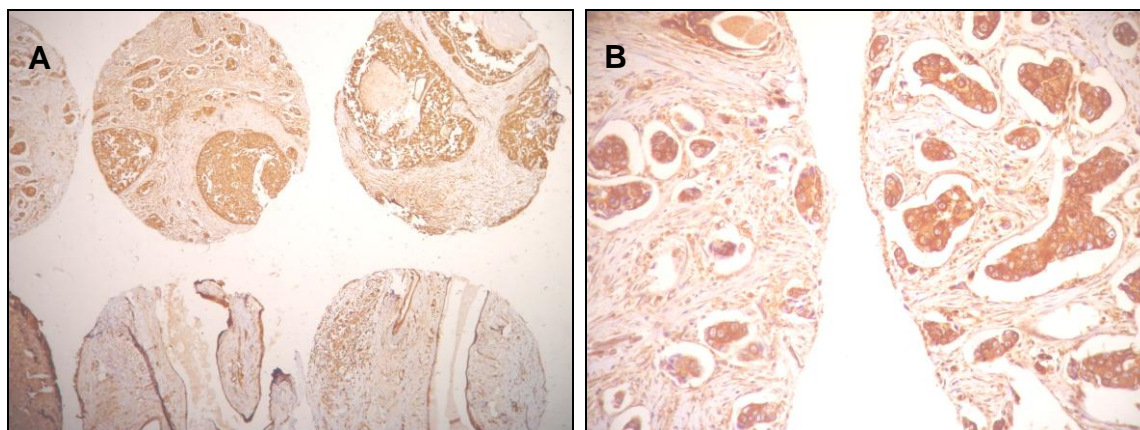


Figura 3. Casos imunomarcados com a COX-2 escore 3: A 100 X Aumento Original; B 200 X Aumento Original.

3.2.3. ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Na análise da imunohistoquímica foram avaliadas as expressões dos seguintes anticorpos monoclonais COX2 e Bcl-2, o anticorpo policlonal Bax, o índice de proliferação Ki67 e o IGF1-R. A técnica imunohistoquímica utilizada no presente estudo foi realizada no Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP, obedecendo aos protocolos para as reações realizadas (Boenisch T, 2001) (Anexo 3).

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários preparados em solução previamente otimizada, de camundongos na COX-2, Bcl-2, Ki67 e IGF1-R e em coelhos na Bax. Para visualização da reação, os cortes foram tratados com substrato cromogênico (diaminobenzidina a 60 mg% em PBS associado a 1,5 ml de peróxido de hidrogênio a 20 volumes), por cinco minutos, a 37°C. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, seguiu-se desidratação e montagem em entellan com lamínula.

A positividade da reação para identificação das células tumorais e os marcadores analisados foram sinalizados pela cor marrom (substrato cromogênico). Os anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímica foram: Cox-2 clone CX-294 DAKO®, Bcl-2 clone 124 DAKO®, Bax clone 43-61 DAKO®, Ki67 clone MIB-1 DAKO® e IGF1-R clone 24-31 DBS® nas de diluições 1/80, 1/2000, 1/3000, 1/80 e 1/80 respectivamente.

A expressão do complexo antígeno-anticorpo determinou a presença de coloração sépia nas áreas de positividade, podendo ser estas nuclear, citoplasmática ou de membrana a depender do marcador avaliado. Os cortes foram também corados em hematoxilina e eosina e a análise foi realizada pelo método semi quantitativo, de acordo com os escores abaixo especificados.

Os critérios utilizados, para a avaliação em escore das expressões imunoistoquímicas das enzimas COX-2 foram os mesmos empregados por Ristimäki *et al* (2002) (Tab. 1)

TABELA 1. Escore utilizado para avaliação das expressão da COX-2.

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

Os critérios para classificarmos a expressão imunoistoquímica da Bcl-2, Bax, IGF1-R e Ki67 foram os mesmos utilizados para a determinação do escore do HER-2 de acordo com o Herceptest® (Dako), (tabela 2). As células e núcleos positivos foram identificadas pela coloração marrom. (Ellis *et al* 2006)

TABELA 2. Escore utilizado para avaliação das expressões da Bcl-2, Bax, IGF1-R e Ki67

Score	Critérios avaliados para determinação do escore
0 e 1	Menos de 10% de células
2	Menos que 30% das células marcadas com coloração fraca completa ou forte incompleta
3	Mais que 30% das células marcadas com coloração forte e completa nas células

Quando realizamos a análise em subgrupos (faixa etária, tamanho do tumor, grau histológico e nuclear, *status* axilar e receptores hormonais) utilizamos os mesmos critérios adotados por Ristimäki *et al* (2002) para classificarmos a expressão imunoistoquímica em positiva ou negativa; desta forma, foram classificadas como negativas as pacientes com escores zero ou um e positivas as com escores dois ou três.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Procedemos a análise descritiva dos dados encontrados e a tabulação dos mesmos, para realização de testes paramétricos e não paramétricos. Os dados foram dispostos em tabelas explicativas, visando tornar fácil sua avaliação e interpretação.

Os dados avaliados foram a expressão imunoistoquímica da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF1-R e Ki67 no CDI e CDIS. Avaliamos ainda, a relação destas expressões com o grau nuclear, grau histológico, tamanho tumoral (tumores menores ou iguais a 2cm e tumores maiores de 2cm), idade das pacientes (pacientes com menos de 50 anos e aquelas com 50 anos ou mais de idade), comprometimento axilar e *status* hormonal.

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

As variáveis não paramétricas foram avaliadas, utilizando-se a *análise de correlação de Spearman*, sempre se comparando a proporção entre duas variáveis.

Aplicamos o teste de Qui-quadrado, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os dois grupos etários (pacientes com menos de 50 anos de idade e com 50 anos de idade ou mais), os grupos constituídos por tumores menores ou iguais a 2cm e aquele com tumores maiores de 2cm, as variáveis grau nuclear, grau histológico, comprometimento axilar e *status* hormonal.

Fixamos 5% como nível de rejeição da hipótese de nulidade para todos os parâmetros por nós avaliados (Bernard, 1986).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Apresentamos a seguir nossos resultados obtidos a partir da análise estatística da pesquisa da expressão da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1 e Ki67 nos CDI e CDIS que satisfizeram os critérios por nós adotados.

As pacientes do estudo encontravam-se entre 26 a 90 anos de idade, com média etária de 56,4 anos, apresentando desvio padrão de 12,81, e idade mediana de 55 anos.

De acordo com a análise imunoistoquímica da expressão da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1 e Ki67 nos 110 casos encontramos os seguintes resultados como positivos: 96 casos (87%) em COX-2 no CDI e CDIS; 60 casos (55%) em Bcl-2 no CDI e CDIS; na Bax 25 casos (23%) em CDI e 21 casos (19%) em CDIS; no IGF-1 26 casos (24%) em CDI e em CDIS; e no Ki67 96 casos (87%) em CDI e CDIS.

Realizando a análise estatística destes dados encontramos alta correlação entre a expressão da COX-2 presente no CDI com aquela observada no CDIS, o mesmo sendo observado para os outros biomarcadores analisados ($p < 0,001$) (Anexo 4). Observamos ainda correlação positiva entre as expressões da COX-2 e IGF1-R ($p=0,045$) e negativa do Ki67 com o IGF1-R ($p= 0,013$) (Tabelas 3 e 4).

TABELA 3 – Correlação entre as expressões da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1 e Ki67 nos CDI nos 110 casos.

Variável	Teste Estatístico	COX-2	Bcl-2	Bax	IGF1-R	Ki67
COX-2	Correlação	1	0,138	0,113	0,191*	0,029
	Significância (p)	--	0,152	0,241	0,045	0,766
Bcl-2	Correlação	0,138	1	-0,036	0,065	0,007
	Significância (p)	0,152	--	0,712	0,497	0,940
Bax	Correlação	0,113	-0,036	1	-0,055	-0,019
	Significância (p)	0,241	0,712	--	0,570	0,847
IGF1-R	Correlação	0,191*	0,065	-0,055	1	-0,236*
	Significância (p)	0,045	0,497	0,570	--	0,013
Ki67	Correlação	0,029	0,007	-0,019	-0,236*	1
	Significância (p)	0,766	0,940	0,847	0,013	--

(*) Correlação estatisticamente significante com $p < 0,05$. Teste estatístico: correlação de Spearman

TABELA 4 - Correlação entre as expressões da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF1-R e Ki67 nos CDIS nos 110 casos.

Variável	Teste Estatístico	COX-2	Bcl-2	Bax	IGF1-R	Ki67
COX-2	Correlação	1	0,138	0,131	0,191*	0,029
	Significância (p)	--	0,152	0,172	0,045	0,766
Bcl-2	Correlação	0,138	1	0,039	0,065	0,007
	Significância (p)	0,152	--	0,688	0,497	0,940
Bax	Correlação	0,131	0,039	1	-0,018	0,124
	Significância (p)	0,172	0,688	--	0,221	0,198
IGF1-R	Correlação	0,191*	0,065	-0,018	1	-0,236*
	Significância (p)	0,045	0,497	0,221	--	0,013
Ki67	Correlação	0,029	0,007	0,124	-0,236*	1
	Significância (p)	0,766	0,940	0,198	0,013	--

(*) Correlação estatisticamente significativa com $p < 0,05$. Teste estatístico: correlação de Spearman

Quando avaliamos a correlação da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1 e Ki67 no CDI em subgrupos de acordo com o grau nuclear, grau histológico, grupo etário, tamanho do tumor e *status* linfonodal axilar não encontramos diferença no coeficiente de correlação quando da análise de todos os casos em conjunto.

Quando analisamos a relação da expressão da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1 e Ki67 no CDI em subgrupos de acordo com o grau nuclear e grau histológico, nos CDIS de acordo com o grau nuclear de não observamos diferença estatisticamente significativa. (Tabelas 5, 6 e 7).

TABELA 5. Expressão imunoistoquímica da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1 e Ki67 nos 110 casos de CDI em relação ao grau nuclear.

	GN I (%)	GN II (%)	GN III (%)	p
COX-2				
positivo	4 (80)	63 (86,5)	29 (90,5)	0,516
negativo	1 (20)	10 (13,5)	3 (9,5)	
Bcl-2				
positivo	2 (40)	39 (53,5)	19 (59,5)	0,725
negativo	3 (60)	34 (46,5)	13 (40,5)	
Bax				
positivo	1 (20)	17 (23)	7 (22)	0,510
negativo	4 (80)	56 (77)	25 (78)	
Ki67				
positivo	1 (25)	63 (86,5)	32 (100)	0,518
negativo	3 (75)	10 (13,5)	0 (0)	
IGF1-R				
positivo	3 (60)	11 (15)	12 (37,5)	0,062
negativo	2 (40)	62 (85)	20 (62,3)	

Teste estatístico: qui quadrado. GN Grau Nuclear

TABELA 6. Expressão imunoistoquímica da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1 e Ki67 nos 110 casos de CDI em relação ao grau histológico.

	GH I (%)	GH II (%)	GH III (%)	p
COX-2				
positivo	8 (89)	64 (86,5)	24 (89)	0,128
negativo	1 (11)	10 (13,5)	3 (11)	
Bcl-2				
positivo	6 (66,5)	40 (54)	14 (52)	0,624
negativo	3 (33,5)	34 (46)	13 (48)	
Bax				
positivo	2 (22)	15 (20)	8 (29,5)	0,621
negativo	7 (78)	59 (80)	19 (70,5)	
Ki67				
positivo	2 (22)	67 (90,5)	27 (100)	0,075
negativo	7 (78)	7 (9,5)	0 (0)	
IGF1-R				
positivo	4 (44,5)	15 (20)	7 (26)	0,417
negativo	5 (55,5)	59 (80)	20 (74)	

Teste estatístico: qui quadrado. GH Grau Histológico

TABELA 7 – Expressão imunoistoquímica da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1 e Ki67 nos 110 casos de CDIS em relação ao grau nuclear.

	GN I (%)	GN II (%)	GN III (%)	p
COX-2				
positivo	4 (80)	63 (77)	29 (90)	0,375
negativo	1 (20)	19 (23)	3 (10)	
Bcl-2				
positivo	2 (40)	39 (53,5)	19 (59,5)	0,428
negativo	3 (60)	34 (46,5)	13 (40,5)	
Bax				
positivo	0 (0)	16 (22)	5 (15,5)	0,360
negativo	5 (100)	57 (78)	27 (84,5)	
Ki67				
positivo	1 (20)	63 (86,5)	32 (100)	0,405
negativo	4 (80)	10 (13,5)	0 (0)	
IGF1-R				
positivo	3 (60)	11 (15)	12 (37,5)	0,519
negativo	2 (40)	62 (85)	20 (62,5)	

Teste estatístico: qui quadrado. GN: Grau Nuclear

Analisando as expressões da COX-2, Bcl-2, Bax, IGF-1R e Ki67 e correlacionando-as com os receptores hormonais, encontramos correlação estatisticamente significativa entre Ki67 e RE/RP com $p < 0,01$ e correlação negativa estatisticamente significativa entre IGF1-R e RE/RP com $p < 0,05$. Estes dados foram semelhantes tanto no CDI quanto no CDIS (Tabela 8).

TABELA 8. - Expressão imunoistoquímica da COX-2, BCL-2, BAX, IGF-1 e Ki67 de acordo com os receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP) nos 110 casos.

Variável	Teste Estatístico	IGF1-R	Ki67	RE	RP
IGF1-R	Correlação	1	-0,236*	-0,193*	-0,213
	Significância (p)	--	0,013	0,043	0,025
Ki67	Correlação	-0,236*	1	0,373**	0,247**
	Significância (p)	0,013	--	0,000	0,009
RE	Correlação	-0,193*	0,373**	1	0,708**
	Significância (p)	0,043	0,000	--	0,000
RP	Correlação	-0,213*	0,247**	0,708**	1
	Significância (p)	0,025	0,009	0,000	--

(*) Correlação inversa estatisticamente significativa com $p < 0,05$; (**) Correlação estatisticamente significativa com $p < 0,01$. Teste estatístico: correlação de Spearman

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A prevenção primária do câncer de mama é uma realidade. Vários estudos demonstraram a efetividade de drogas como os SERMs e inibidores de aromatase (IA) na quimioprevenção do câncer de mama (Fisher *et al*, 1998; Powles *et al*, 1998; Veronesi *et al*, 2002; IBIS-1, 2002; ATAC, 2008).

Já está consagrado que a utilização de SERMs é efetiva na redução do risco de câncer de mama; e estudos recentes com IA sugerem que estes podem ser muito mais efetivos que os SERMs. Estes agentes são úteis no casos de tumores mamários que apresentam receptor hormonal (RH) positivo, entretanto nos casos com RH negativo não observamos este benefício (Li, Brown 2009).

Li, Brown (2009), realizaram estudo em camundongos transgênicos que desenvolveram câncer de mama RE negativo, demonstrando que os rexinóides (análogo dos retinóides), inibidores da tirosino-quinase e inibidores da COX-2 apresentam propriedades quimioprolifáticas.

A enzima COX-2 está superexpressa nos de tumores mamários, constituindo importante marcador biológico. Tem sido alvo de inúmeros estudos buscando mostrar seu papel na carcinogênese e história natural do câncer de mama, através de mecanismos que envolvem citocinas, fatores de crescimento, agentes apoptóticos e promotores tumorais (Huang *et al*, 1998; Shim *et al*, 2003; Buskens, 2003).

Encontramos, em nosso estudo, a expressão imunoistoquímica da enzima COX-2 em 87% dos casos de CDI avaliados. Half *et al* (2002), encontraram a presença da COX-2 em 43% dos 42 casos de CDI puros avaliados. Números semelhantes foram observados por Ristimäki *et al* (2002), quando da análise de 1576 casos de CDI, onde estes pesquisadores encontraram expressão positiva da COX-2 em 39,9% dos casos. Já Daives *et al* (2003), observaram esta expressão em 79% dos 80 casos de carcinoma

infiltrativo avaliados. Esta diferença com os nossos resultados poderia ser explicada pela ausência do componente *in situ* nos casos avaliados nestes estudos. Jeong *et al* (2003) constataram a presença da COX-2 tanto no CDI como no CDIS em 81,6% de 38 casos estudados, sendo estes resultados semelhantes aos encontrados por nós.

Na análise da expressão imunoistoquímica da COX-2 no CDIS encontramos taxa de positividade de 87%. Esta taxa é semelhante à encontrada por outros autores. Shim *et al* (2003), analisando 46 casos de CDIS puros, observaram taxa de expressão positiva da COX-2 em 85%. Half *et al* (2002), Jeong *et al* (2003), Tan *et al* (2004), Boland *et al* (2004) e Perrone *et al* (2005), encontraram as seguintes taxas de positividade respectivamente: 63%, 67%, 80%, 76% e 88%. Demonstrando, assim, homogeneidade na expressão da COX-2 no CDIS, sendo o mesmo não observado na doença invasora.

Os mecanismos pelos quais a COX-2 está regulada para cima no câncer de mama são desconhecidos, mas uma possibilidade é que as células deste tumor passem a expressar de maneira mais ativa esta enzima devido a mecanismos intrínsecos, quando em comparação com o tecido normal. Envolvidas nestes mecanismos estaria a inativação de genes supressores, como a p53, e a ativação de proto-oncogenes, como o Ras e HER-2/neu (Howe *et al*, 2001; Ristimäki *et al*, 2002; Benoit *et al*, 2004).

Em estudo semelhante ao nosso Martins *et al* (2008) avaliaram a correlação entre a COX-2 e p53 em 107 casos de CDI e CDIS simultâneos. Como resultados positivos obtiveram para a COX-2 87% dos casos no CDI e 85% no CDIS, resultados estes muito semelhantes aos encontrados por nós; na p53 observaram como positivos 42,6% dos casos no CDI e 47% dos casos no CDIS. Não observaram correlação positiva entre a COX-2 e a p53, e quando da análise da correlação destas enzimas com grau nuclear, grau histológico, idade e tamanho do tumor não observaram resultados estatisticamente significantes, assim como nós.

Estudos recentes indicam que os anti-inflamatórios não hormonais podem inibir a proliferação celular e induzir a apoptose em células tumorais. Wang *et al* (2009), em estudo experimental analisou como o celecoxibe, um inibidor da COX-2, associado com a via NF-KappaB (fator de transcrição que está ativado na maioria das células cancerosas, cuja ativação por carcinógenos promove o crescimento celular, diferenciação e metástases), e a apoptose em cultura de células de câncer de mama tratadas com celecoxibe. Como resultados obtiveram que a proliferação celular teve diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo tratado com celecoxibe, em comparação com o outro grupo que não recebeu a medicação, concluindo que o celecoxibe pode inibir a proliferação celular e induzir a apoptose através da *down regulation* sinalizada pela via NF-KappaB.

Percebemos que, quando da presença dos dois componentes tumorais no mesmo espécime cirúrgico (CDI e CDIS), a taxa de positividade no CDI e CDIS foi semelhante, provavelmente pela ação parácrina de um dos componentes sobre o outro. Os nossos achados denotam correlação positiva entre a expressão da COX-2 no CDIS e CDI, parecendo que a expressão da COX-2 no componente *in situ* regula para cima (*up-regulation*) a presença desta enzima no carcinoma infiltrativo, uma vez que seus níveis são geralmente maiores no CDIS.

Avaliando a expressão da COX-2 no CDIS frente à agressividade tumoral, observamos que esta apresentou maior expressão nos tumores com grau nuclear III, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. Estes dados também foram observados por Shim *et al* (2003) e Boland *et al* (2004).

No CDI a expressão da COX-2 também foi maior no grau nuclear III e no grau histológico III, dados estes semelhantes aos encontrados por Ristimäki *et al* (2002) e Jeong *et al* (2003), que encontraram taxas mais elevadas da expressão da COX-2 no grau histológico III.

Comparando a expressão da COX-2 de acordo com o tamanho do tumor, não observamos em nosso estudo diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos avaliados, dados semelhantes aos obtidos por Half *et al* (2002); todavia, não são congruentes com os obtidos por Ristimäki *et al* (2002) e Jeong *et al* (2003), que encontraram maior expressão diretamente proporcional ao tamanho do tumor. Estes resultados podem ser explicados pela análise exclusiva de tumores invasores por estes autores, enquanto no nosso estudo e no estudo de Half *et al* (2002) foram avaliados tumores com CDI e CDIS no mesmo espécime.

Avaliando a expressão da COX-2 de acordo com a idade da paciente não observamos diferenças quando da comparação dos grupos compostos por pacientes que apresentavam 50 anos de idade ou mais e aquelas com menos de 50 anos de idade, tanto no CDI como no CDIS. Estes dados foram semelhantes aos obtidos por Ristimäki *et al* (2002).

Analisando a relação entre a expressão da COX-2 e *status* linfonodal axilar não observamos diferença entre o comprometimento linfonodal nos grupos de pacientes com COX-2 hiperexpressa ou negativa, dados estes que foram concordantes com os de Shim *et al* 2003. Já Li *et al* (2008) analisaram a relação entre a expressão da COX-2 e metástases axilares e encontraram maior taxa de comprometimento axilar no grupo de pacientes com COX-2 hiperexpressa ($p=0,012$). Esta diferença de resultados podem ser explicada pela pequena amostra no nosso estudo de pacientes com COX-2 negativa.

Quando comparamos a expressão da COX-2 com receptores hormonais não observamos diferença significativa entre os dois grupos, o que foi semelhante com os dados encontrados por Half *et al* (2002) e Shim *et al* (2003).

Analisando a expressão da Bcl-2 e da Bax observamos que a Bcl-2 estava positiva em 55% dos casos tanto no CDI quanto no CDIS, já a Bax esteve presente no CDI em 23% dos casos e no CDIS 19% dos casos. Nossa taxa de positividade no CDI para a Bcl-2 foi semelhante àquela encontrada por Yang *et al* (2007) que observaram

48% de hiperexpressão do Bcl-2, porém difere quando da análise da Bax onde encontraram 54% de positividade.

Observamos alta significância entre as expressões da Bcl-2 no CDI e CDIS, assim como na Bax ($p < 0,001$). Estes dados diferem dos encontrados por Mintz *et al* (2008) que obtiveram maior expressão da Bcl-2 no CDIS que no CDI.

O balanço entre a expressão do gene antiapoptótico Bcl-2 e do gene proapoptótico Bax é considerado um bom indicador da atividade apoptótica nas células tumorais. Martinez-arribas *et al* (2003) estudaram a apoptose associada a estas duas proteínas em 86 espécimes de tumores de mama, onde 14 pacientes haviam recebido quimioterapia prévia. Obtiveram como resultados, que a superexpressão da Bcl-2 correlacionou-se com a presença de receptores de estrogênio e progesterona nos casos sem tratamento prévio, e altos índices de apoptose foram relacionados significativamente com a expressão do receptor de progesterona ($P = 0,037$). Nossos resultados não encontraram relação entre a expressão da Bcl-2 e Bax com os receptores hormonais.

Não houve correlação entre as expressões da COX-2 com a Bcl-2 e com a Bax, o que é semelhante aos dados encontrados por Arun *et al* (2005). Já Michael *et al* (2003) em seu estudo sobre indução da apoptose em células humanas de câncer de mama, encontraram associação entre a alta expressão da COX-2 com baixa expressão da Bcl-2.

Na análise da Bax encontramos 23% de positividade no CDI e 19% no CDIS, sendo esta relação significativa ($p < 0,001$). Não encontramos correlação entre a expressão da Bcl-2 com a expressão da Bax, o que difere dos resultados encontrados por Martínez-Arribas *et al* (2003) que encontraram associação estatisticamente significativa entre estas duas proteínas com $p = 0,0063$.

Observamos alta expressão do Ki67 (87%) tanto no CDI quanto no CDIS ($p=0,001$). Esta correlação de positividade é concordante com os resultados encontrados por Hoque *et al* (2001), que concluíram que não há aumento da expressão do Ki67 nos CDI associados ao CDIS, entretanto Mylonas *et al* (2005) observaram que o Ki67 está mais expresso nos CDI ($p=0,05$) que nos CDIS e atribuem este achado ao fato de que o CDIS tem um menor potencial de malignidade que o CDI.

Não observamos correlação entre a expressão do Ki67 e da COX-2 o que não é concordante com o estudo de Boland *et al* (2004), que encontrou associação positiva entre o grupo com alta positividade para o Ki67 e a COX-2 ($p<0,001$) tanto no CDI quanto no CDIS.

Observamos correlação positiva entre a expressão do Ki67 e *status* hormonal ($p<0,01$) no CDI e CDIS, dados estes que são concordantes com os encontrados por Faratian *et al* (2009), porém Boland *et al* (2004) observaram o inverso, que os casos com alta expressão correlacionaram-se positivamente com RH negativos ($p=0,003$).

Quando analisamos a expressão do IGF1-R observamos 26% de positividade tanto no CDI quanto no CDIS ($p<0,001$). Quando da análise da expressão do IGF1-R nos casos RH positivos observamos queda na expressão do IGF1-R para 20% nos casos RE positivos e para 19% nos casos RP positivos. Assim como em nosso estudo, Shimizu *et al* (2004) não observaram relação entre a hiperexpressão de IGF1-R com as variáveis, idade, *status* linfonodal axilar, grau histológico e *status* hormonal, concluindo que seu valor prognóstico é limitado.

Em nosso estudo quando comparamos a expressão do IGF1-R com *status* hormonal obtivemos correlação negativa, entretanto os dados da literatura não mostram ocorrer associação entre o IGF1-R e RH. Shimizu *et al* (2004) e Law *et al* (2008) não encontraram associação entre a hiperexpressão do IGF1-R e RE/RP.

Quando correlacionamos a COX-2 com o IGF1-R encontramos associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Este nosso achado é concordante com o encontrado por Hemriksen *et al* (2007), que utilizando o método semi-quantitativo de acordo com o preconizado pelo Herceptest®, quantificando seus resultados em scores 0, 1, 2 e 3, encontraram correlação positiva entre a COX-2 e IGF1-R com $p < 0,01$.

Pöld *et al* (2004) descreveram que elevados níveis sistêmicos tanto de IGF-1 quanto da relação com IGFBP-3 tem surgido como um potencial marcador de risco para tumores com hiperexpressão da COX-2.

Há uma hipótese de que a COX-2 incremente a viabilidade e proliferação de células tumorais que expressam IGF, sendo acompanhadas pelos seguintes processos: facilitação da autofosforilação do IGF1-R e diminuição da expressão de IGFBP-3. Todas estas ações podem ser interpretadas como amplificadoras do processo mitogênico e mantenedora da atividade de imortalidade celular determinada pelo IGF-1 e IGF-2, sendo consistentes, portanto, para explicar a interrelação entre a COX-2 e IGF1-R Pöld *et al* (2004).

Devido a interrelação entre a COX-2 e IGF1-R como demonstrado por Pöld *et al* (2004) por mecanismos acima descritos, a utilização de terapia combinada com inibidores da COX-2 e inibidores da tirosino-quinase relacionadas ao IGF1-R podem ser promissoras.

Vários estudos experimentais e epidemiológicos tem demonstrado o papel dos inibidores da COX-2 na prevenção do carcinoma mamário. Levitt, Pollak (2002), em estudo que analisaram a inibição do crescimento em células epiteliais de câncer de mama tratados com o inibidor da COX-2, celecoxibe, observaram que após a administração desta medicação, ocorreu indução da apoptose nestas células e uma

diminuição do IGF-1, concluindo que estes dois biomarcadores estão intimamente relacionados e podem nos auxiliar na prevenção e tratamento no câncer de mama.

O desenvolvimento de medicações eficazes que modulem a carcinogênese dos tumores mamários é a meta mais importante para a prevenção e tratamento do câncer de mama. Dados recentes sugerem que a utilização de inibidores da tirosina-quinase, inibidores do HER-2 e inibidores do IGF1-R são boas estratégias para o tratamento do câncer de mama (Jin, Esteva, 2008).

Novos estudos sugerem que o uso de metformina inibe o crescimento tumoral, em células *in vitro*, porém existem poucos estudos populacionais com esta droga. Jiralerspong *et al* (2009), avaliaram pacientes que foram submetidas a quimioterapia neoadjuvante e que utilizaram metformina e observaram que houve uma melhor resposta quando compararam com o grupo que não utilizaram a metformina, constatando desta forma, o efeito anti-tumoral da metformina.

Devido à escassez de estudos envolvendo inibidores da COX-2 e drogas que inibam a ativação de IGF1-R e, de acordo com os nossos resultados que demonstram a interrelação COX-2/IGF1-R, novos estudos são necessários visando a comprovação da eficácia e elucidação dos mecanismos e vias metabólicas envolvidas quando da utilização de inibidores da COX-2, em conjunto com a metformina e inibidores do IGF1-R para que possam ser úteis na prevenção e tratamento do câncer de mama.

6. CONCLUSÕES

1. Encontramos correlação positiva entre a expressão da COX-2 presente no CDI com aquela observada no CDIS, o mesmo sendo observado para os outros biomarcadores analisados.
2. Encontramos correlação positiva entre a expressão da COX-2 presente no CDI e CDIS com a expressão do IGF1-R presentes no CDI e CDIS.
3. Não observamos diferença na expressão dos biomarcadores avaliados quando na análise dos subgrupos.

7. ANEXOS

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Participação na pesquisa: “Relação entre as expressões da ciclooxigenase-2 e marcadores de proliferação celular e apoptose nos carcinomas ductais in situ e infiltrativo presentes na mesma mama”

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa médica. Nesta pesquisa, o material utilizado foi o retirado da peça do tumor no ato operatório e iremos dosar alguns anticorpos e proteínas para estudarmos formas de melhorar o prognóstico e tratamento das pacientes com câncer de mama.

A sua participação ou não neste estudo em nada irá mudar o curso de seu tratamento ou o seu relacionamento com seu médico, não havendo benefício direto algum na sua participação.

Os procedimentos aos quais a senhora irá ser submetida serão os mesmos, quer participe ou não do estudo, e caso concorde em participar, todo o procedimento realizado será mantido em sigilo e confidencialidade.

Caso resolva participar deste estudo a senhora deve assiná-lo após ter todas suas dúvidas sanadas.

Qualquer dúvida quanto o estudo a senhora pode ligar para o responsável pela pesquisa: Dra Giuliana Cássia Morrone Taromaru no telefone 3224-0122 ramal 5535.

Mesmo tendo aceitado a participar do estudo, poderei a qualquer momento desistir de minha participação.

Este documento foi lido em voz alta para mim pela Dra. Giuliana Cássia Morrone Taromaru, que me esclareceu as dúvidas. A minha assinatura indica que concordei em fornecer meus exames para o estudo.

São Paulo, ___ / ___ / ___

Nome da paciente voluntária

Assinatura da voluntária

Eu certifico que expliquei todos os passos acima, bem como os riscos e benefícios da participação da pesquisa.

Assinatura do pesquisador

ANEXO 2: Classificação do CDI e CDIS

Critérios propostos por Dabbs (1993) para avaliação do grau nuclear no CDIS.

Grau nuclear	Critérios avaliados
Grau I	Núcleos discretamente hipercromáticos, com diâmetro menor que 1,5 hemácia.
Grau II	Formas intermediárias.
Grau III	Núcleos volumosos, maiores que três hemácias, pleomórficos, geralmente vesiculosos, com macronúcleo eosinófilo de contornos irregulares.

Classificação dos CDI de acordo com a graduação histológica proposta por Elston & Ellis 1991

Os CDI foram classificados de acordo com a graduação histológica proposta por Elston & Ellis 1991, em Nottingham, os quais atribuíram índices de um a três a cada uma das características estudadas: arranjo tubular, pleomorfismo nuclear e contagem de figuras de mitose. O arranjo tubular é avaliado de acordo com a presença de estruturas tubulares na lesão; assim, teremos índice um, quando da presença de mais de 75% de estruturas tubulares presentes, índice dois, de 10% a 75% e índice três, quando observarmos menos de 10% de estruturas tubulares. A avaliação do pleomorfismo nuclear é feita pela análise do tamanho, forma e contornos do núcleo, e pela uniformidade da cromatina. A atividade mitótica é avaliada através da contagem do número de figuras de mitose na periferia da neoplasia, em dez campos contíguos de grande aumento. O índice um é atribuído na presença de até cinco figuras de mitose, o dois na presença de seis a dez e o índice três quando observa-se mais de dez figuras de mitose. Assim, da somatória dos índices, teremos escore variando de três a nove e a graduação realizada desta forma: Grau I, de três a cinco pontos; Grau II, seis ou sete pontos e Grau III, oito ou nove pontos. A avaliação do grau nuclear seguiu os mesmos critérios adotados para o CDIS (Dabbs, 1993).

ANEXO 3: Reação imunoistoquímica

1. Cortes histológicos dos tecidos, com 4µm de espessura. Montagem dos cortes em lâminas silanizadas, com retirada da parafina em estufa a 55° C, e manutenção dos mesmos em temperatura ambiente.
2. Desparafização dos cortes com xilol a 60° C, durante 30 minutos, seguida por mais dois banhos em xilol à temperatura ambiente, durando quinze minutos cada.
3. Reidratação dos cortes com etanol absoluto (etanol absoluto I, etanol absoluto II, etanol absoluto III, etanol 95°GL e etanol 80°GL [Gay-Lussac]), cada banho durando dois minutos, seguida por lavagem em água corrente e finalizada em passagem por água destilada.
4. Adição de 1.600 ml do tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0) aos cortes, com exposição ao vapor durante 30 minutos, com a finalidade de recuperação do epítipo antigênico, com a finalidade de restituir antigenicidade à proteína afetada pela fixação dos tecidos em formalina. Manutenção das lâminas em vapor, por 30 minutos. Após a retirada das lâminas, conservação das mesmas em solução tamponada, à temperatura ambiente, durante 20 minutos.
5. Reação de inibição da peroxidase endógena, através de lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio a 3%, por quatro vezes, por dez minutos cada, e lavagem em água parada, por cinco minutos.
6. Lavagem das lâminas no tampão salino PBS (pH 7.4), por duas vezes, por 15 minutos.

7. Incubação das lâminas com os anticorpos primários citados anteriormente, nas diluições especificadas pelo fabricante (Cox-2: 1/80; Bcl-2: 1/2000; Bax: 1/3000; Ki67: 1/80; e IGF1-R: 1/80), em geladeira, por 18 horas.
8. Lavagem das lâminas, por duas vezes, em tampão PBS (pH: 7,4), por dez minutos.
9. Incubação dos cortes teciduais com anticorpos, por 30 minutos em estufa a 37°C. No estudo foi utilizado anticorpo secundário biotilado universal [Kit DAKO LSAB Systems, Peroxidase (DakoCorp., Carpinteria, CA, USA)].
10. Lavagem das lâminas em tampão PBS, duas vezes, por dez minutos.
11. Incubação das lâminas em anticorpo terciário, estreptavidina–biotina-peroxidase (Kit DAKO LSAB Systems, Peroxidase-universal), em câmara úmida, por 30 minutos, em estufa a 37°C.
12. Lavagem das lâminas em solução tampão, duas vezes, por dez minutos.
13. Colocação das lâminas para reação cromógena em 3,3',5,5' tetrahydrocloro de diaminobenzidina (DAB), por três a cinco minutos, ocorrendo a reação que resulta no aparecimento da cor sépia, característica do anticorpo fixado à proteína.
14. Lavagem em água corrente, duas vezes, por dez minutos.

15. Contra-coloração rotineira com hematoxilina de Mayer, por três minutos, em temperatura ambiente, para obtenção de coloração azulada do citoplasma e do núcleo.

16. Desidratação dos cortes com série de etanol (50-70-100°. GL) e xilol.

17. Montagem das lâminas através de sua fixação sobre Entellan Merck, a fim de que a preparação passe a ter conservação permanente.

Anexo 4 – Tabelas de correlação entre CDI e CDIS nos diversos biomarcadores

TABELA A - Correlação da COX-2 entre CDI e CDIS nos 110 casos

	Teste estatístico	COX-2 CDI	COX-2 CDIS
COX-2 CDI	Correlação	1	1 **
	Significância	--	--
COX-2 CDIS	Correlação	1**	1
	Significância	--	--

(**) Correlação estatisticamente significativa com $p < 0,001$. Teste estatístico: correlação de Spearman

TABELA B - Correlação da Bcl-2 entre CDI e CDIS nos 110 casos.

	Teste estatístico	Bcl-2 CDI	Bcl-2 CDIS
Bcl-2 CDI	Correlação	1	0,979**
	Significância	--	0,0001
Bcl-2 CDIS	Correlação	0,979**	1
	Significância	0,0001	--

(**) Correlação estatisticamente significativa com $p < 0,001$. Teste estatístico: correlação de Spearman

TABELA C - Correlação da Bax entre CDI e CDIS nos 110 casos.

	Teste estatístico	Bax CDI	Bax CDIS
Bax CDI	Correlação	1	0,740**
	Significância	--	0,0001
Bax CDIS	Correlação	0,740**	1
	Significância	0,0001	--

(**) Correlação estatisticamente significativa com $p < 0,001$. Teste estatístico: correlação de Spearman

TABELA D - Correlação da IGF1-R entre CDI e CDIS nos 110 casos.

	Teste estatístico	IGF1-R CDI	IGF1-R CDIS
IGF1-R CDI	Correlação	1	1**
	Significância	--	--
IGF1-R CDIS	Correlação	1**	1
	Significância	--	--

(**) Correlação estatisticamente significativa com $p < 0,001$. Teste estatístico: correlação de Spearman

TABELA E - Correlação da Ki67 entre CDI e CDIS nos 110 casos.

	Teste estatístico	Ki67 CDI	Ki67 CDIS
Ki67 CDI	Correlação	1	1**
	Significância	--	--
Ki67 CDIS	Correlação	1**	1
	Significância	--	--

(**) Correlação estatisticamente significativa com $p < 0,001$. Teste estatístico: correlação de Spearman.

ANEXO 5: Figuras das expressões imunoistoquímicas em 400 X aumento original.

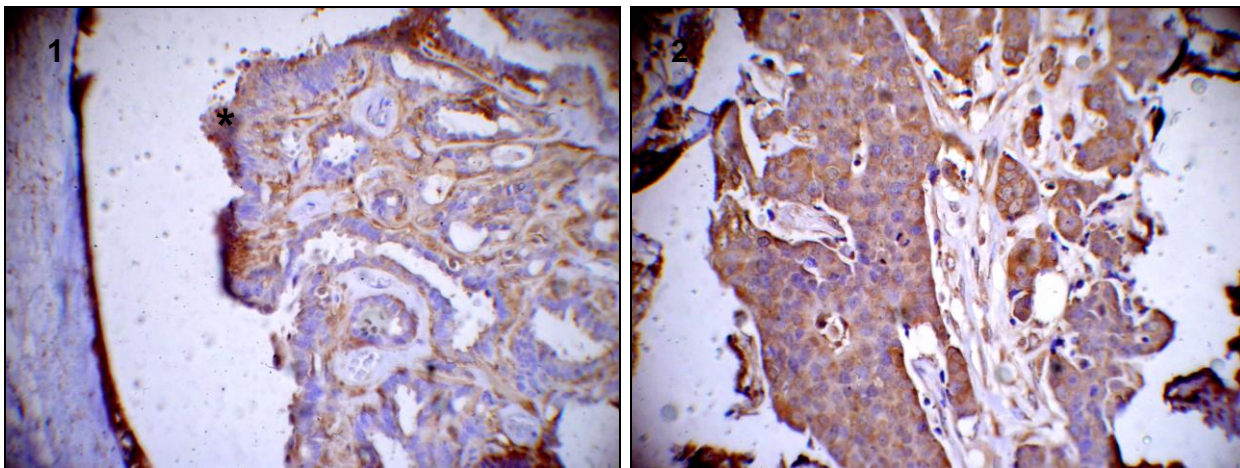


Figura 1: COX-2 escore 1 CDIS; Figura 2: COX-2 escore 1 CDI

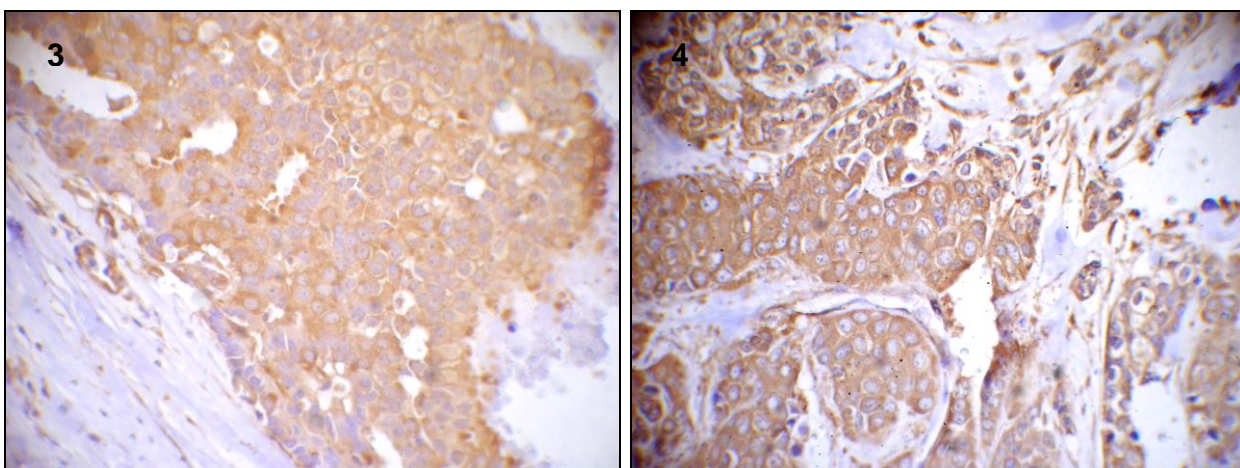


Figura 3: COX-2 escore 2 CDIS; Figura 4: COX-2 escore 2 CDI

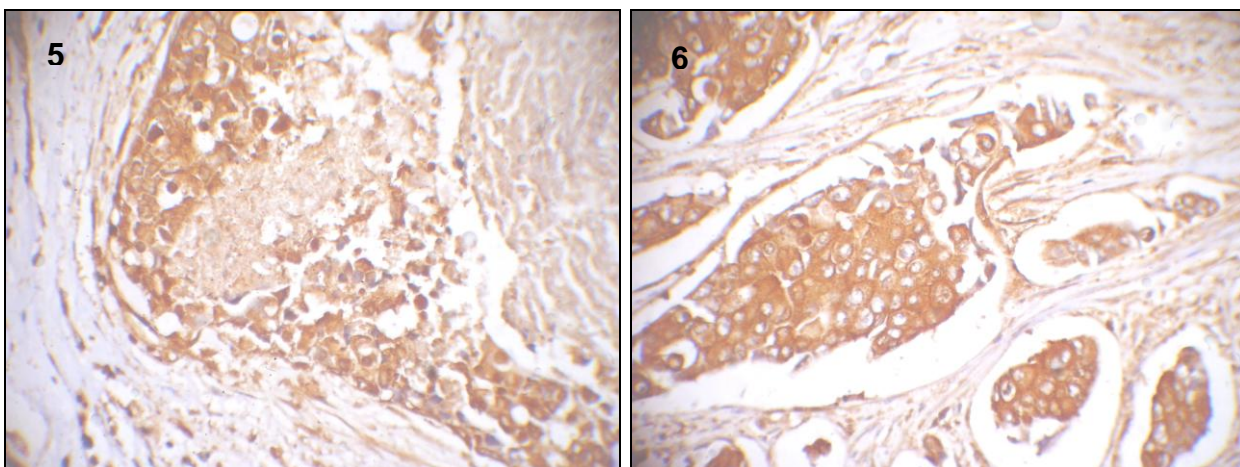


Figura 5: COX-2 escore 3 CDIS; Figura 6: COX-2 escore 3 CDI

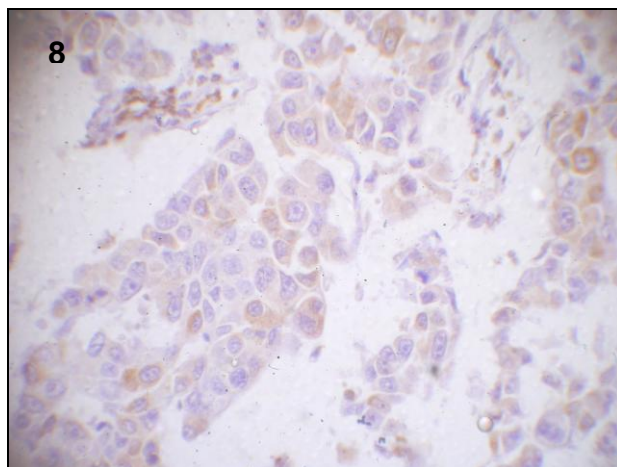
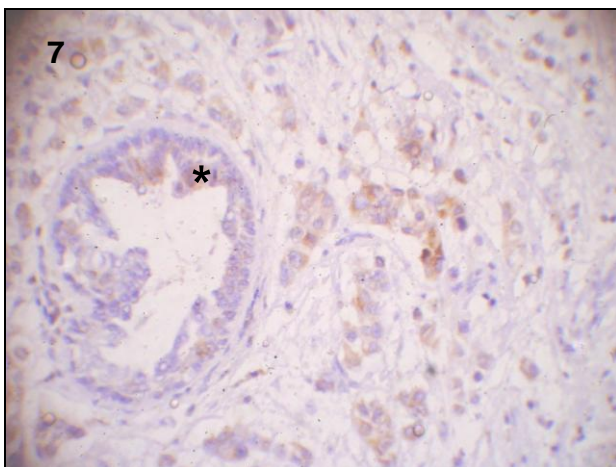


Figura 7: Bcl-2 escore 1 CDIS; Figura 8: Bcl-2 escore 1 CDI

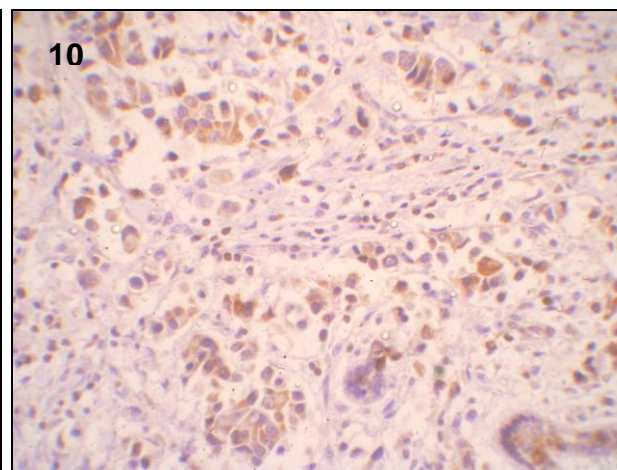
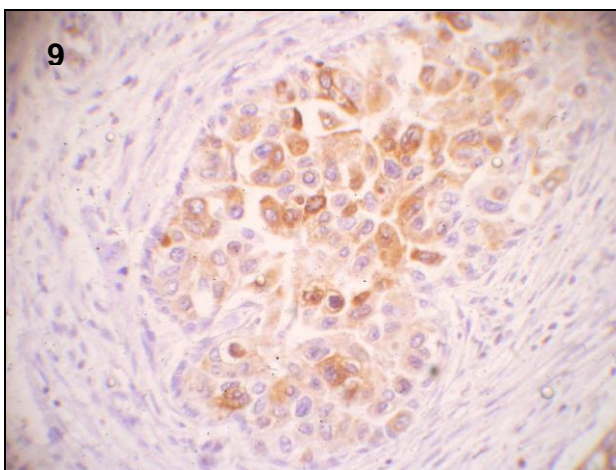


Figura 9: Bcl-2 escore 2 CDIS; Figura 10: Bcl-2 escore 2 CDI

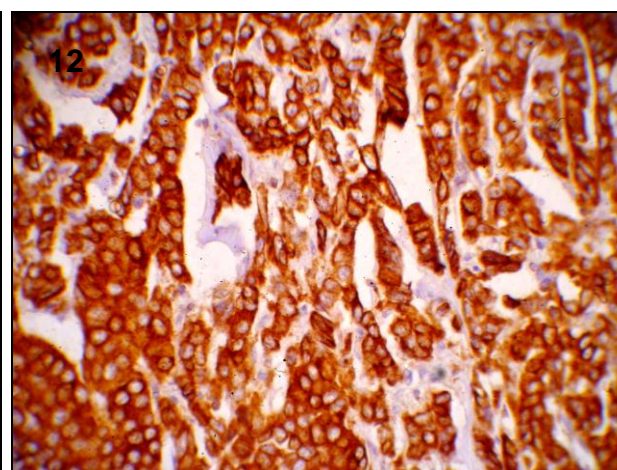
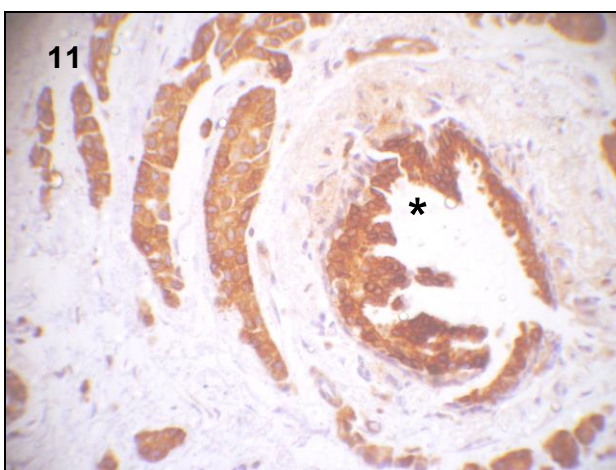


Figura 11: Bcl-2 escore 3 CDIS; Figura 12: Bcl-2 escore 3 CDI

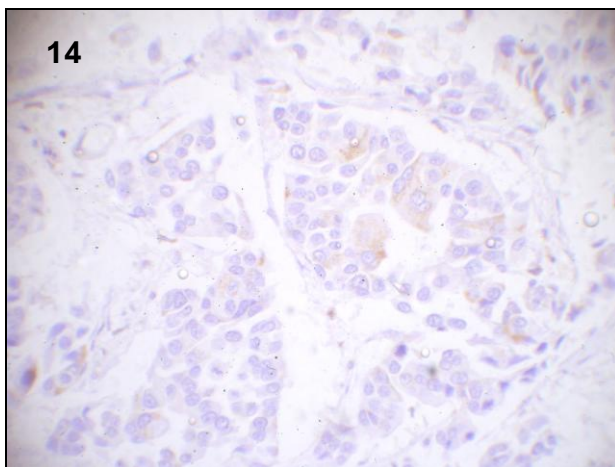
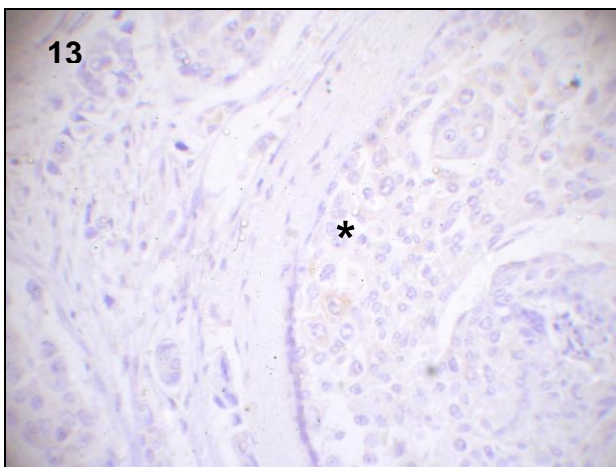


Figura 13: BAX escore 1 CDIS; Figura 14: BAX escore 1 CDI

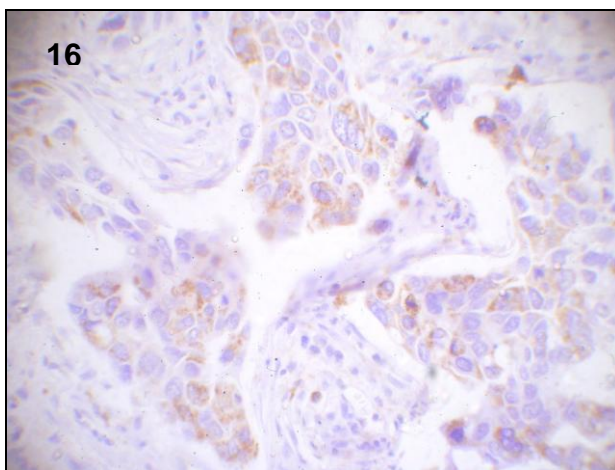
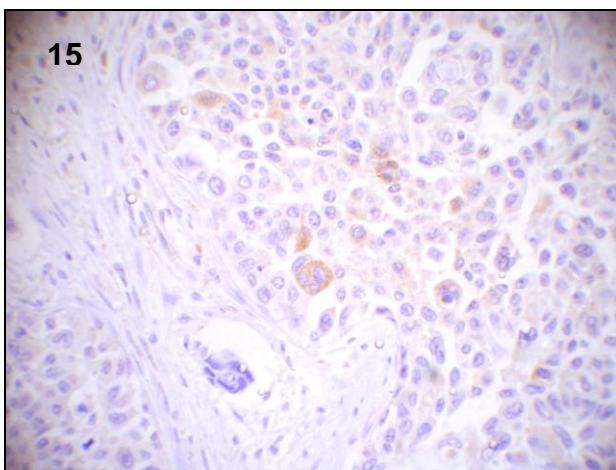


Figura 15: BAX escore 2 CDIS; Figura 16: BAX escore 2 CDI

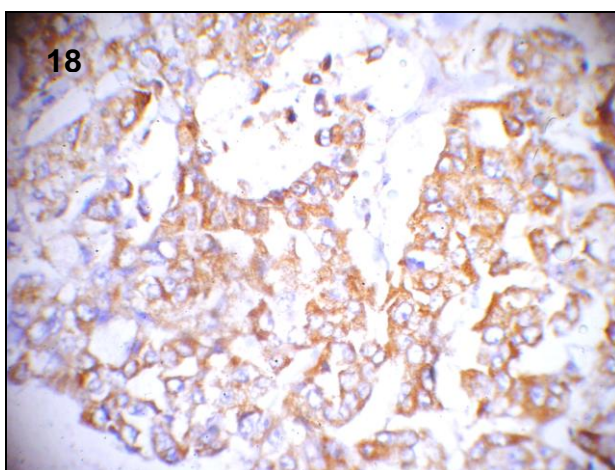
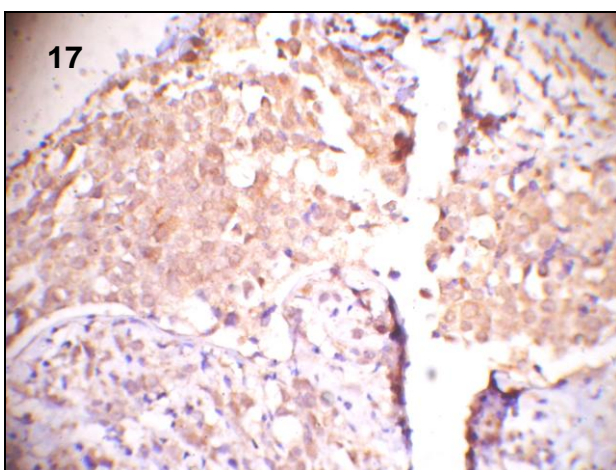


Figura 17: BAX escore 3 CDIS; Figura 18: BAX escore 3 CDI

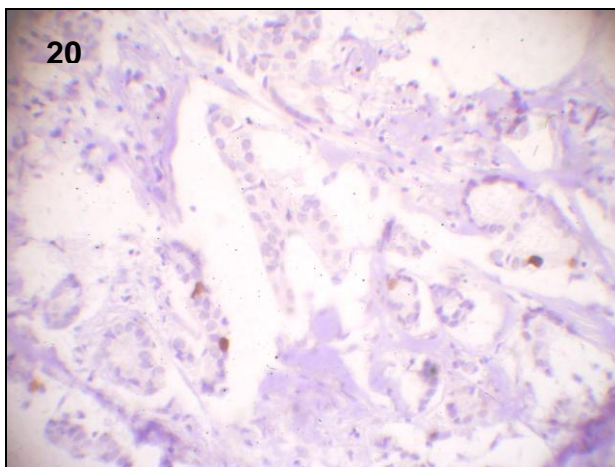
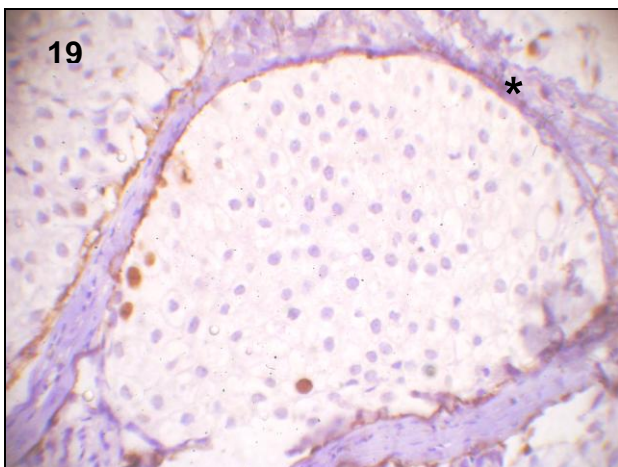


Figura 19: Ki67 escore 1 CDIS; Figura 20: Ki67 escore 1 CDI

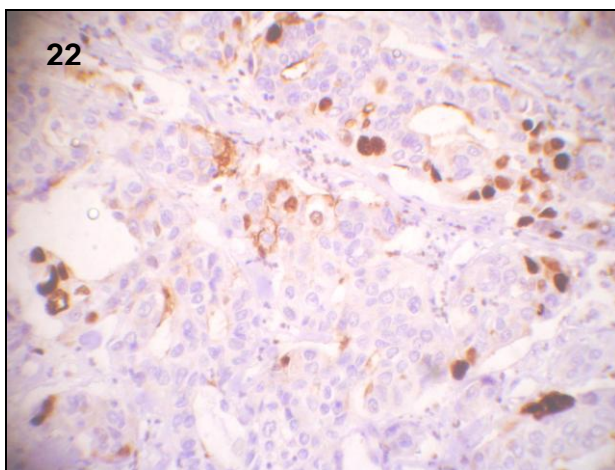
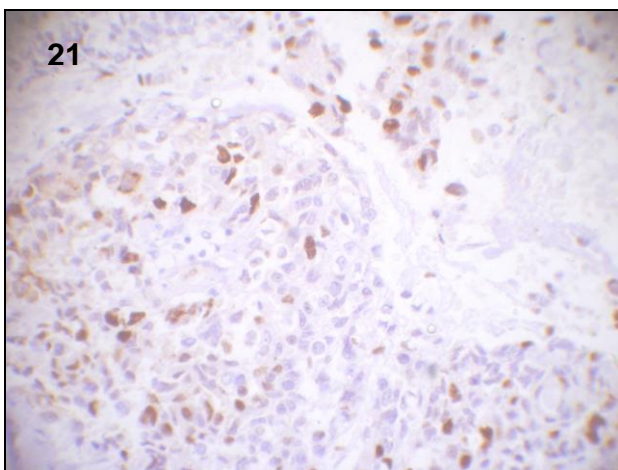


Figura 21: Ki67 escore 2 CDIS; Figura 22: Ki67 escore 2 CDI

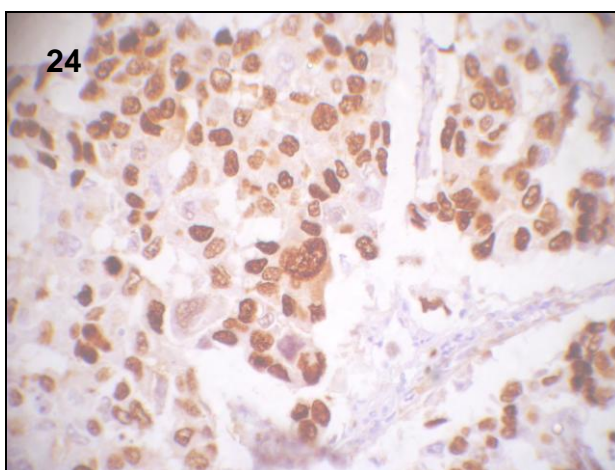
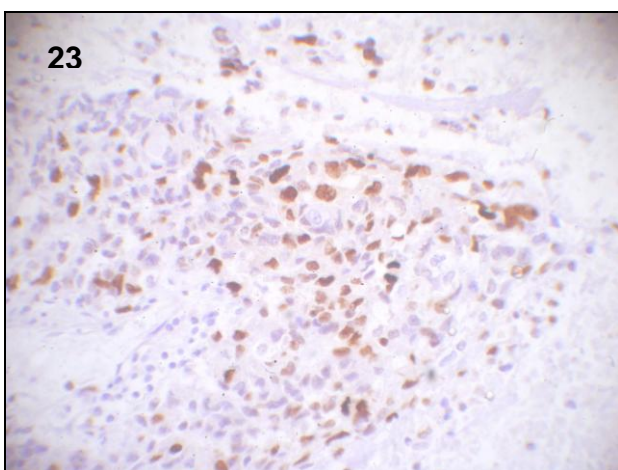


Figura 23: Ki67 escore 3 CDIS; Figura 24: Ki67 escore 3 CDI

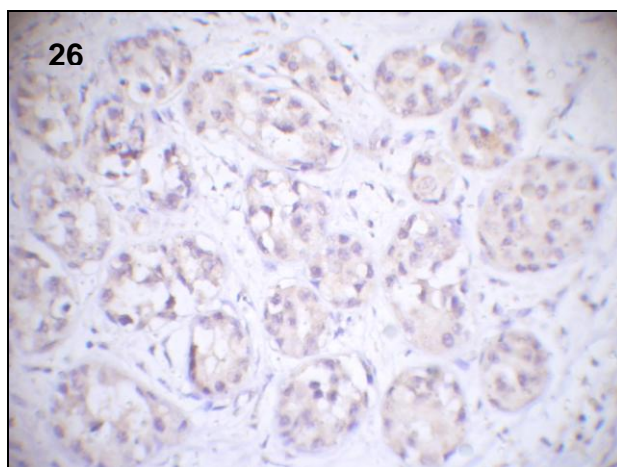
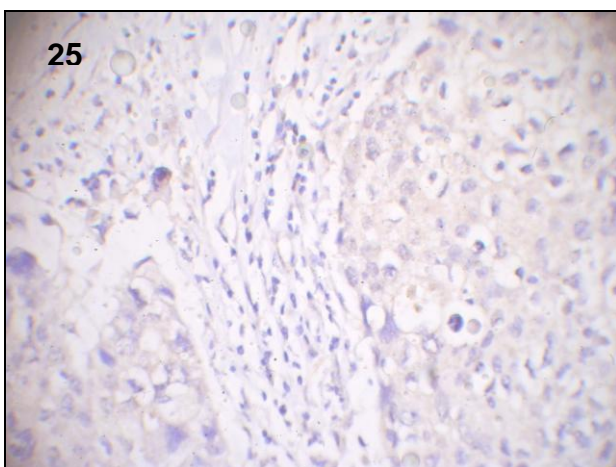


Figura 25: IGF1-R score 1 CDIS; Figura 26: IGF1-R score 1 CDI

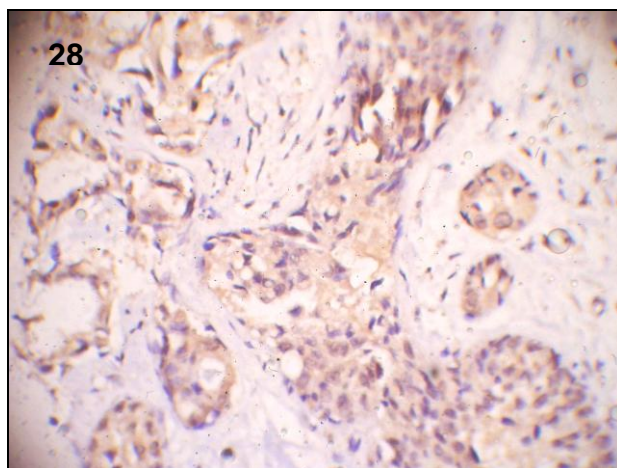
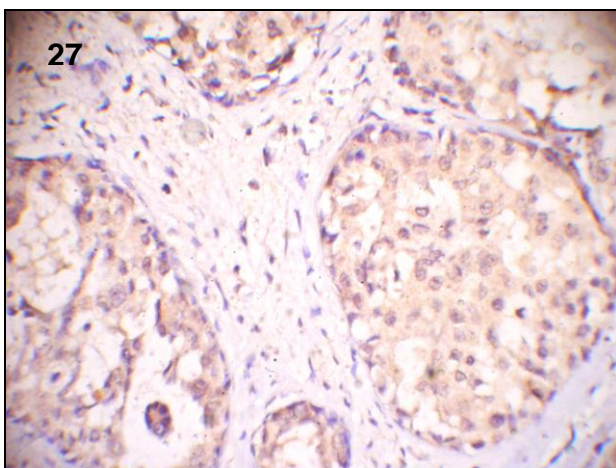


Figura 27: IGF1-R score 2 CDIS; Figura 28: IGF1-R score 2 CDI

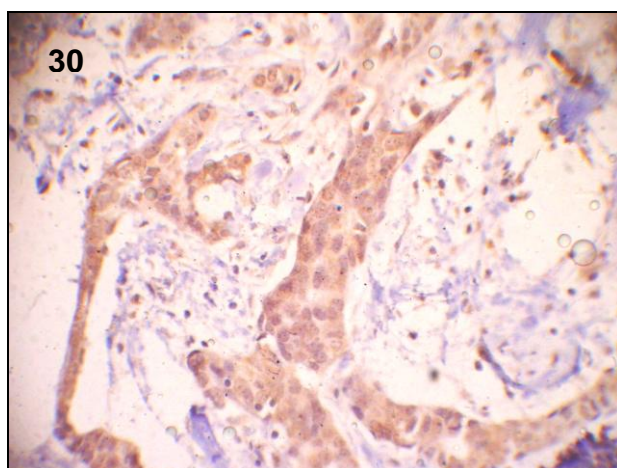
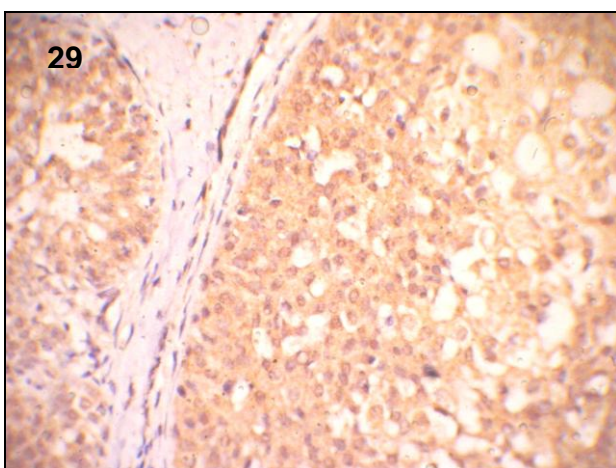


Figura 29: IGF1-R score 3 CDIS; Figura 30: IGF1-R score 3 CDI

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arimidex, tamoxifen, alone or in combination (ATAC) trialists' group, Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, Howell A, Tobias JS, Baum M. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol.* 2008 Jan;(9):45-53.

Adams JM; Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998, 281: 1322-1326.

Amarante-Mendes GP. Apoptose: programa molecular de morte celular. Einstein. 2003; 1:15.

Arun B, Kilic G, Yen C, Foster B, Yardley DA, Gaynor R, et al. Loss of FHIT expression in breast cancer is correlated with poor prognostic markers. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention.* 2005;14 (7), 1681-85.

Bachmann HS; Otterbach F; Callies R; Nüchel H; Bau M; Schmid KW et al. The AA genotype of the regulatory BCL-2 promoter polymorphism (938C>A) is associated with a favorable outcome in lymph node negative invasive breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007; 1;13(19):5790-7.

Badawi AF, Badr MZ. Chemoprevention of breast cancer by targeting cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Intl. J. onco,* 20: 1109-22, 2002.

Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986 Aug;55(2):244-8.

Bernard R. Fundamentals of biostatistics. 2^a ed. Boston: Buxbury Press, 1986. 453p.

Benoit V, Relic B, Leval X, Chariot A, Merville MP, Bours V. Regulation of HER-2 oncogene expression by cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oncogene* 2004;23:1631-35.

Bilimoria, M.M. - The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *Cancer,* 45:263-78, 1995.

Boenisch T. Handbook: Immunochemical staining methods. 3^a ed. Carpinteria: Dakocytomation Corporation, 2001. 64p.

Boland GP, Butt IS, Prasad R, Knox WF, Bundred NJ. COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *British Journal of Cancer.* 2004 (90), 423-29.

Brasil. Ministério da Saúde INCA / Comprev. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009.

Brewter DH; Sharpe KH; Clark DI; Collins J. Declining breast cancer incidence and decreased HTR use. *Lancet*. 2009;373(9662):459-60.

Brown DC , Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67; its use in histopathology. *Histopathol*.1990; 17: 489-503.

Buskens CJ, Sivula A, Van Rens BP, Haglund C, Offerhaus GJA, Van Lanschot JJB, et al. Comparison of cyclooxygenase 2 expression in adenocarcinomas of the gastric cardia and distal oesophagus. *Gut* 2003;52:1678-83.

Callagy GM; Pharoah PD; Pinder SE; Hsu FD; Nielsen TO; Ragaz J et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res*. 2006;12(8) 2468-75.

Callagy GM; Webber MJ; Pharoah PDP; Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BCM Cancer*. 2008 May 29; 8:153.

Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395-419. Review

Chen W, Foran DJ. Advances in cancer tissue microarray technology: Towards improved understanding and diagnostics. *Analytica Chimica ACTA*. 2005

Chen S; Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 25(11):1329-1333.

Dabbs DJ. Ductal carcinoma of the breast: nuclear grade as a predictor of S-phase fraction. *Human Pathol* 1993;24(6):652-56.

Davies G, Salter J, Hills M, Martin L, Sacks N, Dowset M. Correlation of cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2652-56.

Deming SL, Ren Z, Wen W, Shu XO, Cai Q, Gao Yt, et al. Genetic variation in IGF1, IGF-1R, IGFALS, and IGFBP3 in breast cancer survival among Chinese women: a report from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res treat*. 1007 Sep;104(3):309-19.

Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll H. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127: 411-17.

- Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, Pache L, Ziffer P, Fizi K et al. Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB-1(Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 1997; 75(10): 1525-33.
- Dowsett M. Biomarker investigation from the ATAC trial: the role of TA01. *Breast Cancer Res Treat*. 2004, 87(1) 11-18.
- Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R et al. Prognostic value of Ki67 after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Jan 17;99(2):167-70.
- Dufloth RM, Carvalho S, Shinzato JK, Santos CC, Zeferino LC et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *São Paulo Med J*. 2005; 123(4):192-7.
- Ellis IO, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline For Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer. *Journal Clinical Oncology*, 2006 (25);1 118-45.
- Ellis ML, Jenkins S, Hanfelt J, Redington ME, Taylor M, Leek R, et al. Insulin-like growth factors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):175-84.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
- Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JM. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. *Histopathology*. 2009 Jan; 54(2):254-7.
- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1371-88.
- Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30: 3-21.
- Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992; 22(3):207-19.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984; 133(4): 1710-15

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983; 31: 13-20.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009 Aug;20(8):1319-29.

Goodson WH, Moore DH, Ljung BM, Chew K, Florendo C, Mayall B et al. The functional relationship between in vivo bromodeoxyuridine labeling index and Ki-67 proliferation index in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998; 49(2): 155-64.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Revista brasileira de cancerologia*. 2007; 53(3): 335-343.

Guillaud P, Dumanoir S, Seigneurin D. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labeling during the cell cycle of normal fibroblastic (mrc-5) and mammary tumor cell lines (mcf-7). *Anal Cell Pathol*. 1989; 1(1): 25-39.

Half E, Tang XT, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma *in situ*. *Cancer Res* 2002;62:1676–1681.

Harris RE; Beebe-Donk J; Alshafie GA. Cancer chemoprevention by cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies. *Subcell Biochem*. 2007;42:193-212.

Harris RS, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32.825 patients. *The breast* 2008: (17) 323-334.

Harris RE. Cyclooxygenase-2(cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology*. 2009 Apr; 17(2):55-67.

Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008, 19:19-25.

Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:455-60.

Hawk ET, Viner JL, Asad Umar A, William F, Anderson WF, Sigman CC, et al. Development of COX inhibitors in cancer prevention and therapy. *Am J Cancer* 2003;2:27-55.

Henriksen KL, Rasmussen BB, Lykkesfeldt AE, Moller S, Ejlersen B, Mouridsen HT. Semi-quantitative scoring of potentially predictive markers for endocrine treatment of

breast cancer: a comparison between whole sections and tissue microarrays. *J Clin Pathol.* 2007; 60; 397-404.

Hoque A, Menter DG, Sahin AA, Sneige N, Lippman SM. No increased Ki67 expression in ductal carcinoma in situ associated with invasive breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2001, 10 153-154.

Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:97-114.

Hug JW; Kim HR; Lee JH; Kim YJ. Comparison of cyclooxygenase-2 and CD44 mRNA expression in colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Virchows Arch.* 2009 Apr;454(4):381-7.

Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology,* 2006 May; 48(6):674-82.

Jemal A; Siegel R; Ward E; Hao Y; Xu J; Murray T et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):71-96.

Jemal A; Ward E; Thun MJ. Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S.women. *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R28.

Jeong YS, Hee JA, Yoo HL, Seung KK, Kiyog PL, Kiong SL. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma its poor prognostic factors. *Mod Pathol* 2003;16(12):1199-204.

Jin Q, Esteva FJ. Cross-Talk Between the ErbB/HER Family and the Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Signaling Pathway in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008; 13 485-498.

Johnson-Thompson MC, Guthrie J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer* 2000;88:1224-9.

Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CH, et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(20):3297-3302.

Jung SY, Han W, Lee JW, Ko E, Kim E, Yu JH, et al. Ki-67 expression gives additional prognostic information on St Gallen 2007 and Adjuvant! Online risk categories in early breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:1112-1121.

Kim H, Chung H, Kim HJ, Lee JY, Oh MY, Kim Y, et al. Id-1 regulates Bcl-2 and Bax expression through p53 and NF- κ B in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 (112):287-96.

Krcova Z, Ehrmann J, Krejci V, Eliopoulos A, Kolar Z. TPL-2/COT and COX-2 in breast cancer. *Biomed pop med fac univ palacky Olomouc Czech repub.* 2008, 152(1):21-25.

Lakhani SR, Ashworth A. Microarray an histopathological analysis of tumors: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001; 1(2): 151-7.

Law JH, Habibi G, Hu K, Masoudi H, Wang MYC, Stratford AL, et al. Phosphorylated insulin-like growth factor-1/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival. *Cancer Res.* 2008; 68 (24), 10238-46.

Levitt R, Pollak M. Insulin-like growth factor-I antagonizes the antiproliferative effects of cyclooxygenase-2 inhibitors on BxPC-3 pancreatic cancer cells. *Cancer Research.* 2002. 62 (15): 7372-76.

Levitt RJ, Buckley J, Blouin MJ, Schaub B, Triche TJ, Pollak M. Growth inhibition of breast epithelial cells by celecoxib is associated with upregulation of insulin-like growth factor binding protein-3 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004. 316: 421-428.

Linjawi A, Kontogiannea M, Halwani F, Edwards M, Meterissian S. Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. *Journal of the American College of Surgeons* 2004 Jan;198(1):83-90.

Li RX, Shi F, Wu YY, Wu Y, Guo JJ, Dong DF. The relationship between lymphatic metastasis and serum vascular endothelial growth factor C and cyclooxygenase 2 expression in breast cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008 Jan 8;88(2):88-91.

Li Y; Brown PH. Prevention of ER-negative breast cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2009: 181:121-34.

Madjd Z; Mehrjerdi AZ; Sharifi AM; Molanaei S; Shahzadi SZ; Asadi-Lari M. CD44 cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immunity* 2009. Apr 23; 9:4.

Martínez-Arribas F, Nuñez-Villar MJ, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, Schneider J. Immunofluorometric study of Bcl-2 and BAX expression in clinical fresh tumor samples from breast cancer patients. *Anticancer Res* 2003 Jan-Feb;23(1B):565-8.

Martínez-Arribas F, Martin-Garabato E, Zapardiel Martinez-Arribas I, Sánchez J, Lucas AR, Tejerina a, Shineider J. Bax expression in untreated breast cancer: an immunocytometric study of 255 cases. *Anticancer Res* 2008 Sep-Oct; 28(5A):2595-8.

Martins MM, Oliveira VM, Lucarelli AP, Silva MAGL, Piato S, Rinaldi JF, Aoki T. Cyclooxygenase-2 and p53 immunohistochemical expression in simultaneous ductal carcinoma *in situ* and invasive ductal carcinoma. *Applied Cancer Research.* 2008; 28(3): 99-105.

Mazhar D, Ang R, J Waxman. COX inhibitors and breast cancer. *British Journal of Cancer* 2006; 94, 346-350.

Michael MS, Badr MZ, Badawi AF. Inhibition of cyclooxygenase-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma synergistically induces apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2003. Jun; 11(6):733-6.

Mintz PJ, Habib NA, Jones JL, Giamas G, Lewis JS, Bowen RL, et al. The phosphorylated membrane estrogen receptor and cytoplasmic signaling and apoptosis proteins in human breast cancer. *Cancer* . 2008; 113:1489-95.

Mskris A, Powles TJ, Allred DC, Asheley SE, Trott PA, Ormerod MG et al. Quantitative changes in cytological molecular markers during primary medical treatment of breast cancer: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat*. 1999; 53:51-59.

Mylonas I, Makovitzky J, Jeschke U, Briese U, Friese K, Gerber B. Expression of Her2/neu, steroid receptors (ER and PR), Ki67 and p53 in invasive mammary ductal carcinoma associated with ductal carcinoma in situ (DCIS) versus invasive breast cancer alone. *Anticancer Res*. 2005; 25(3A): 1719-23.

Nadler Y, Camp RL, Giltnane JM, Moeder C, Rimm DL, Kluger HM, Kluger Y. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. *Breast cancer research* 2008. 10:R35.

Oliveira VM, Piato S, Silva MALG. Correlation of cyclooxygenase-2 and aromatase immunohistochemical expression in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma *in situ*, and adjacent normal epithelium. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95(3):235-41.

Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified Tissue microarray technology. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 2003; 56:198-204.

Parrado C, Falkmer UG, Hoog A, Falkmer S, Ahrens O, Rius F et al. A technique for automatic/interactive assessment of the proliferating fraction of neoplastic cells in solid tumors. A methodological study on the Ki-67 immunoreactive cells in human mammary carcinomas, including a comparison with the results of conventional S-phase fraction assessments by means of DNA cytometry. *Gen Diagn Pathol*. 1996; 141(3-4): 215-27.

Prichard RS, Hill ADK, Dijkstra B, Mcdermott EW, O'higgins NJ. The chemoprevention of breast cancer. *British J Surg* 2003;90:772-83.

Perrone G, Santini D, Vincenci B, Zagami M, La Cesa A, Bianchi A, et al. COX-2 expression in DCIS: correlation with VEGF, HER-2/neu, prognostic molecular markers and clinicopathological features. *Histopathology* 2005;46(5):561-8.

Pöld M, Kostyantyn K, Pöld A, Dohadwala M, Heuze-Vourc'h N, Mao JT, et al. Cyclooxygenase-2 modulates the insulin-like growth factor axis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Research* 2004 (64), September 15, 6549-55.

Powles T, Eeles R, Ashley SE, Easton D, Chang J, Dowsett L. Interim analysis of the incidence of breast cancer in the Royal Marsden Hospital tamoxifen randomized chemoprevention trial. *Lancet* 1998;352: 98–101.

Rijn MV & Gilks CB. Applications of microarrays to histopathology. *Histopathology*. 2004, 44, 97-108.

Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Hadglund C, et al. Prognostic Significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Research*. 2002. Feb (62):632-35.

Santisteban M, Reynolds C, Barr Fritcher EG, Frost MH, Vierkant RA, Anderson SS et al. Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast cancer in atypical hyperplasia. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 set 23.

Sapino A, Marchio C, Senetta R, Castellano I, Macri L, Cassoni P, et al. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray producer. *Virchows Arch*. 2006. 449(3): 288-96.

Sarfstein R; Maor S; Reizner N; Abramovich S; Werner H. Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor gene in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jun 27;252(1-2):241-6.

Scholzen T and Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182: 311-22.

Sheen-Chen SM, Chou FF, Hsu W, Huang CC, Eng HL, Tang RP. Lack of prognostic value of insulin-like growth factor-1 in patients with breast cancer: analysis with tissue microarray. *Anticancer Res* 2007; 27(5B):3541-4.

Sheng H, Shao J, Morrow JD. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 58 (2): 362-6, 1998.

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;63:2347-50.

Shim JY, Jung An H, Lee YH, Kim SK, Lee KP, Lee KS. Overexpression of Cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. *Mod Pathol* 2003; 16(12):1199-1204

- Shin A; Ren Z; Shu XO; Cai Q; Gao YT; Zheng W. Expression patterns of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its receptor in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Sep;105 (1):55-61.
- Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y, Takahashi F, Takeuchi M, Watanabe T, et al. Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum Pathol.* 2004 Dec;35(12):1537-42.
- Singh B, Cook KR, Vicent L, Hall CS, Berry JÁ, Multani AS, et al. Cyclooxygenase-2 induces genomic instability, BCL-2 expression, doxorubicin resistance, and altered cancer-initiating cell phenotype in MCF7 breast cancer cells. *J Surg Res* 2008 Jun 15;147(2):240-6.
- Sporn MB. Approaches to prevention of the epithelial cancer during the pre-neoplastic period. *Cancer Res* 1976;36:2699–702.
- Surmacz E. Function of the IGF-1 receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000 Jan;5(1):95-105.
- 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;44:24-8.
- Thomsen A, Kolesar JM. Chemoprevention of breast cancer. *Am J Health Syst Pharm.* 2008 Dec 1;65(23):2221-8.
- Verheijen R, Kuijpers HJH, van Driel R, Beck JLM, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ et al. Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation related antigen. In localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Science.* 1989; 92: 531-40.
- Veronesi U, Maisonneuve P, Sacchini V, Rotmensz N, Boyle P. Tamoxifen for breast cancer among hysterectomised women. *Lancet* 2002;359:1122–24.
- Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol.* 2008; 1; 26(34):5569-75.
- Visscher DW, Pankratz VS, Santisteban M, Reynolds C, Ristimäki A, Vierkant RA et al. Association between cyclooxygenase-2 expression in atypical hyperplasia and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Mar 19; 100(6):421-7.

Wang L, Liu LH, Shan BE, Zhang C, Sang MS, Li J. Celecoxib promotes apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231 through down-regulation of the NK-KappaB pathway. *Chinese Journal of Cancer*. 2009. 28 (6); 569-74.

Werner H, Bruchim I. The insulin-like growth factor-1 receptor as an oncogene. *Arch Physiol Biochem*. 2009; 115(2):58-71.

Wu MH, Chou YC, Chou WY, Hsu GC, Chu CH, Yu CP et al. Relationships between critical period of estrogen exposure and circulating levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in breast cancer: Evidence from a case-control study. *Int J Cancer* 2010; 115(2): 508-14.

Yang L, Zhu X, Ran L. Correlations of HER-2, PCNA, Bcl- 2, and Bax expression to prognosis of breast cancer. *Ai Zheng*. 2007; 26(7):756-61

Yurekli BS, Karara B, Cetinkalp S, Uslu R. Is it time for metformin to take place in adjuvant treatment of Her-2 positive breast cancer? Teaching new tricks to old dogs. *Medical Hypotheses*. 2009; 73: 606-607.

Zhu XG, Tao L, Mei ZR, Wu HP, Jiang ZW. Aspisol inhibits tumor growth and induces apoptosis in breast cancer. *Exp Oncol*. 2008; 30(4):289-94.

9. FONTES CONSULTADAS

Conover WJ. *Practical Nonparametric Statistics*. New York: John Wiley & Sons. 2^a ed., 1980.

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação. *Normatização para apresentação de dissertações e teses em estudos experimentais e observacionais*. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação; 2004. 26p.

Houaiss A. *Dicionário Eletrônico Houaiss da Língua Portuguesa* [CD ROM]. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.

National Library of Medicine Index Medicus. List of journals indexed in Index Medicus. [on line] Maryland: National Library of Medicine; 2002. Available from: Internet <<ftp://nlmplud.nlm.nih.gov/journalsd/ljiweb.pdf>> [Aug. 14 2002].

Magalhães MN, Lima ACP. *Noções de probabilidade e estatística*. São Paulo: IME-USP, 2^a ed. 2000. 379p.

Siegel S, Castellan NJ. *Nonparametric Statistics*. New York: McGraw-Hill. 2^a ed., 1988.

RESUMO

Introdução: O propósito do nosso estudo foi avaliar a correlação entre a expressão imunohistoquímica da ciclooxigenase-2 (COX-2) e índices de proliferação celular e de apoptose, dentre os quais selecionamos a Bcl-2, Bax, Ki67 e IGF1-R, no carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma ductal infiltrativo (CDI) presentes no mesmo espécime cirúrgico; correlacionamo-os ainda com o grau nuclear, grau histológico, faixa etária, tamanho do tumor, *status* linfonodal axilar e receptores hormonais. Material e métodos: Foram avaliados 110 casos através da técnica de *Tissue Microarray* (TMA) e utilizamos de anticorpos primários monoclonais ou policlonais, a depender do biomarcador pesquisados. Os casos foram classificados em scores de zero a três de acordo com a intensidade da coloração nuclear, citoplasmática ou da membrana celular a depender dos biomarcadores utilizados. Resultados: Os resultados que encontramos como positivos foram: COX-2 em 87% dos casos no CDI e CDIS; Bcl-2 em 55% casos no CDI e CDIS; Bax em 23% dos casos no CDI e 19% no CDIS; IGF-1 em 24% casos no CDI e no CDIS; Ki67 em 87% casos no CDI e CDIS. Encontramos alta correlação entre a expressão da COX-2 presente no CDI com aquela observada no CDIS, o mesmo sendo observado para os outros biomarcadores analisados ($p < 0,001$). Observamos ainda correlação positiva entre as expressões da COX-2 e IGF1-R ($p=0,045$) e negativa do Ki67 com o IGF1-R ($p= 0,013$). Avaliando a expressão destes biomarcadores com idade, tamanho do tumor, grau histológico, grau nuclear, *status* axilar linfonodal não encontramos diferenças estatisticamente significantes, entretanto quando os correlacionamos com os receptores hormonais encontramos correlação positiva entre Ki67 e RE/RP com $p < 0,01$ e correlação negativa entre IGF1-R e RE/RP com $p < 0,05$. Conclusão: Nossos resultados demonstram a correlação positiva entre a expressão da COX-2 presente no CDI e CDIS com a expressão do IGF1-R presentes no CDI e CDIS. Estudos recentes sugerem que o uso de metformina inibe o crescimento tumoral, em células *in vitro*, porém existem poucos estudos populacionais com esta droga. Devido a escassez de estudos envolvendo inibidores da COX-2 e drogas que inibam a ativação de IGF1-R e, de acordo com os nossos resultados que demonstram a interrelação COX-2/IGF1-R, novos estudos são necessários visando a comprovação da eficácia e elucidação dos mecanismos e vias metabólicas envolvidas quando da utilização de inibidores da COX-

2, em conjunto com a metformina e inibidores do IGF1-R para que possam ser úteis na prevenção e tratamento do câncer de mama.

ABSTRACT

Introduction: The purpose of our study was to evaluate the correlation between immuno histochemical expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and rates of cell proliferation and apoptosis, among which we selected the Bcl-2, Bax, Ki-67 and IGF1-R in the ductal carcinoma *in situ* (DCIS) and infiltrating ductal carcinoma (IDC) present in the same surgical specimen, correlate them even with nuclear grade, histological grade, age, tumor size, axillary lymph node *status* and hormone receptors. Material and methods: 110 cases were evaluated using the technique of Tissue Micro-array (TMA) and use of primary antibodies or polyclonal antibodies depending on the biomarker studied. The cases were classified in scores from zero to three according to the intensity of nuclear staining, cytoplasmatic or cell membrane dependent on the biomarkers used. Results: The results we found to be positive were: COX-2 in 87% of cases in the DCIS and IDC, Bcl-2 in 55% of cases in the DCIS and IDC, Bax in 23% of cases in IDC and 19% in DCIS, IGF-1 in 24% of cases in the IDC and DCIS, Ki67 in 87% of cases in the IDC and DCIS. A high correlation between the expression of COX-2 present in the IDC with those observed in DCIS, the same was observed for the other biomarkers analyzed ($p < 0.001$) observed positive correlation between the expression of COX-2 and IGF1-R ($p = 0.045$) and negative between Ki67 with the IGF1-R ($p = 0.013$). Assessing the expression of these biomarkers with age, tumor size, histological grade, nuclear grade, axillary lymph node *status* did not find statistically significant differences, however when correlate them with hormone receptor positive correlation was found between Ki67 and RE / RP with $p < 0.01$ and negative correlation between IGF1-R and RE / RP with $p < 0.05$. Conclusions: Our results demonstrate the positive correlation between the expression of COX-2 present in DCIS and IDC with the expression of IGF1-R present in DCIS and IDC. Recent studies suggest that the use of metformin inhibits tumor growth in cells *in vitro*, but there are few population studies with this drug. Due the lack of studies involving COX-2 and drugs that inhibit activation of IGF1-R and according to our results demonstrating the interrelation COX-2/IGF1-R, further studies are needed in order to confirm the efficacy and elucidation of the mechanisms and pathways involved in their use of COX-2 in combination with metformin and inhibitors of IGF1-R in order to be useful in the prevention and treatment of breast cancer.

LISTAS

LISTA 1



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
 Rua Santa Isabel, 305 - 4º andar Santa Cecília CEP: 01221-010 São Paulo - SP
 PABX: 21767000 Ramal: 8061 - Telefax: 33370188 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 15 de maio de 2008.

Projeto nº 013/08
 Informe este número para
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a) Sr.(a)

Dra. Giuliana Cássia Morrone Taromaru

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **30/01/2008** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"Relação entre as expressões da Ciclooxygenase-2 e marcadores de proliferação celular nos carcinomas ductais in situ e infiltrativo presentes na mesma mama"**, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

Aprovado (inclusive TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido);

Com pendências há modificações ou informações relevantes a serem atendida em 60 dias, (enviar as alterações em duas cópias);

Retirado, (por não ser reapresentado no prazo determinado);

Não aprovado: e

Aprovado (inclusive TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Nelson Keiske Ono

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - ISCMSP

JOF

LISTA 2

C	Id	COX-2		BCL-2		BAX		IGF1-R		Ki67		CDIS		CDI	Tamanho	
		CDI	CDIS	CDI	CDIS	CDI	CDIS	CDI	CDIS	CDI	CDIS	GN	TIPO		GH	GN
1	51	3	3	3	3	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
2	47	3	3	3	3	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
3	51	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	III	n-comedo	III	III	≥ 2 cm
4	43	3	3	2	2	1	2	2	2	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
5	37	3	3	2	2	1	1	2	2	1	1	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
6	85	2	2	3	3	1	2	1	1	3	3	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
7	66	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	I	II	< 2 cm
8	77	3	3	3	3	1	1	2	2	1	1	III	n-comedo	II	III	< 2 cm
9	42	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
10	67	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	III	comedo	II	III	≥ 2 cm
11	46	3	3	2	2	1	1	1	1	1	1	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
12	71	3	3	3	3	2	3	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
13	47	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	< 2 cm
14	50	3	3	1	1	1	1	2	2	1	1	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
15	79	3	3	1	1	3	3	1	1	3	3	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
16	35	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
17	60	2	2	2	2	1	1	1	1	3	3	II	comedo	II	II	< 2 cm
18	81	3	3	1	1	1	1	1	1	3	3	I	n-comedo	I	I	< 2 cm
19	65	2	2	3	3	1	1	2	2	2	2	III	n-comedo	II	III	< 2 cm
20	72	3	3	2	2	1	1	3	3	2	2	III	comedo	III	III	< 2 cm
21	52	3	3	1	1	1	1	3	3	2	2	III	n-comedo	II	III	< 2 cm
22	52	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
23	79	3	3	2	2	1	1	2	2	2	2	I	n-comedo	I	I	< 2 cm
24	55	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
25	45	3	3	1	1	1	1	2	2	1	1	II	comedo	II	II	< 2 cm
26	68	3	3	1	1	2	1	2	2	2	2	I	n-comedo	I	I	< 2 cm
27	59	3	3	3	3	2	2	1	1	2	2	II	n-comedo	III	II	≥ 2 cm
28	46	3	3	1	1	3	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
29	49	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	II	comedo	I	II	≥ 2 cm
30	53	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
31	51	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
32	66	3	3	1	1	3	3	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
33	50	3	3	2	2	1	1	2	2	2	2	III	n-comedo	II	III	≥ 2 cm
34	70	3	3	3	3	1	1	2	2	2	2	III	comedo	II	III	≥ 2 cm
35	48	2	2	1	1	3	2	1	1	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
36	31	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
37	50	3	3	1	1	1	1	2	2	1	1	II	comedo	I	II	≥ 2 cm
38	37	3	3	3	3	1	1	1	1	3	3	III	n-comedo	II	III	≥ 2 cm
39	65	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	III	n-comedo	III	III	≥ 2 cm
40	63	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
41	46	3	3	3	3	2	2	1	1	1	1	II	n-comedo	I	II	≥ 2 cm
42	51	3	3	1	1	1	1	2	2	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
43	55	3	3	3	3	1	1	3	3	1	1	I	n-comedo	I	I	≥ 2 cm
44	52	3	3	1	1	2	1	2	2	1	1	III	comedo	II	III	≥ 2 cm
45	70	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	< 2 cm

46	44	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
47	36	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	III	comedo	II	III	≥ 2 cm
48	71	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	II	n-comedo	III	II	≥ 2 cm
49	51	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
50	74	3	3	2	2	1	1	2	2	2	2	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
51	54	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
52	58	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
53	49	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
54	50	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
55	78	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
56	68	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
57	50	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
58	55	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	III	n-comedo	III	III	≥ 2 cm
59	57	3	3	2	2	1	2	1	1	3	3	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
60	64	3	3	3	3	1	1	1	1	3	3	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
61	66	1	1	3	3	2	1	3	3	1	1	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
62	63	2	2	3	3	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
63	61	3	3	1	1	2	2	1	1	2	2	III	comedo	II	III	≥ 2 cm
64	63	3	3	1	1	3	3	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
65	62	2	2	3	3	1	1	1	1	2	2	III	n-comedo	II	III	≥ 2 cm
66	58	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	I	comedo	II	I	≥ 2 cm
67	67	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	II	n-comedo	III	II	≥ 2 cm
68	32	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
69	44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
70	63	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
71	57	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
72	56	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	III	n-comedo	II	III	≥ 2 cm
73	73	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
74	52	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	< 2 cm
75	51	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
76	43	3	3	2	2	2	1	1	1	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
77	70	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
78	49	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
79	55	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
80	39	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	II	comedo	III	II	≥ 2 cm
81	48	3	3	3	3	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
82	59	3	3	2	2	2	2	1	1	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
83	68	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
84	67	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
85	63	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	III	II	≥ 2 cm
86	71	3	3	2	2	2	2	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
87	59	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	I	II	< 2 cm
88	39	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	II	n-comedo	III	II	≥ 2 cm
89	61	1	1	3	3	1	1	1	1	2	2	III	comedo	II	III	≥ 2 cm
90	26	3	3	3	3	1	1	1	1	3	3	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
91	59	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
92	43	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
93	70	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
94	34	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	II	comedo	II	II	< 2 cm

95	42	3	3	1	1	2	2	2	2	2	2	II	Comedo	III	II	≥ 2 cm
96	51	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	III	II	≥ 2 cm
97	55	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
98	72	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
99	48	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
100	55	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	II	comedo	II	II	≥ 2 cm
101	90	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	II	n-comedo	II	II	< 2 cm
102	77	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	II	comedo	II	II	< 2 cm
103	79	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
104	44	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
105	46	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
106	44	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
107	68	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	III	n-comedo	III	III	< 2 cm
108	46	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	III	comedo	III	III	≥ 2 cm
109	51	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	II	n-comedo	II	II	≥ 2 cm
110	46	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	III	comedo	III	III	≥ 2 cm

GN: grau nuclear; GH: grau histológico; comedo: comedocarcinoma; n-comedo: não comedocarcinoma.
C: caso; Id: Idade

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)