

Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos

Assesment of apoptosis in breast cancer: association with histological grade and prognostic factors

Rogério Estevam Farias,¹ Andrezza Rodrigues Souza,² Fernando Monteiro Aarestrup³

Resumo

A apoptose é um importante fator no crescimento do câncer de mama, tendo sido associada à progressão tumoral. Neste estudo, a presença de células apoptóticas em carcinoma ductal infiltrante (CDI) graus histológicos I, II e III foi investigada e comparada com outros fatores prognósticos do câncer de mama. A detecção *in situ* da apoptose em células tumorais foi investigada pelo método TUNEL (*Terminaldeoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC nick end-labeling*). A proliferação celular, receptores hormonais, *c-erbB-2* e *p53* foram analisados utilizando-se procedimento imunoistoquímico. Nossos dados demonstraram que alto índice apoptótico está associado a maiores níveis de proliferação, à expressão aumentada de *p53*, a tumores pouco diferenciados e a negatividade para receptores hormonais. Estes achados indicam que em carcinomas ductais da mama o número de células em apoptose está diretamente associado à progressão histológica e de outros fatores de mal prognósticos, influenciando no comportamento biológico desses tumores.

Palavras-chave: Neoplasias mamárias; Carcinoma de ductos infiltrante; Apoptose; Estadiamento de neoplasias; Prognóstico.

Abstract

Apoptosis is an important factor of breast cancer growth and is associated to tumoral development. In the present study, the presence of apoptotic cells tumor was investigated in grade I, II and III invasive breast cancer and compared with another prognostic factors. *In situ* detection of tumor apoptotic cells was investigated by the TUNEL method. Tumor cell proliferation, hormonal receptor, *c-erbB-2* and *p53* was investigated using immunohistochemical procedure. Our data demonstrated that patients with high apoptotic rate are associated with higher levels of cell proliferation, positive *p53* overexpression, negative hormonal expression and high grade breast cancer. Taken together, the results suggested that the rate of apoptosis reflect degrees of histological breast cancer and is associated with another prognostic factors playing an important role in breast cancer biological behavior.

Key words: Breast neoplasms; Infiltrating duct carcinoma; Apoptosis; Neoplasm staging; Prognosis.

¹ Doutor em Patologia Experimental, Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental, Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

² Mestranda em Biologia, Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental, Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

³ Doutor em Patologia Experimental, Departamento de Patologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

Correspondência: Prof. Fernando Monteiro Aarestrup. Centro de Biologia da Reprodução - CBR Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro Martelos, Cep 36036-330. *Email:* fmastrup@excite.com

INTRODUÇÃO

O crescimento tumoral está relacionado a um balanço resultante do somatório entre proliferação e morte celular. A medida combinada de morte celular e proliferação é uma importante arma na predição mais realista do comportamento tumoral. O mecanismo geneticamente controlado de morte celular é chamado de apoptose, que é fundamental para a eliminação de células danificadas. Estudos recentes demonstram a relevância da morte celular programada na homeostase tecidual, na organogênese e na patogenia dos tumores.¹⁻⁴

A apoptose depende de processos bioquimicamente regulados contingenciados por eventos de estimulação do meio ambiente tecidual. Do ponto de vista morfológico, podemos observar, a partir da clivagem do DNA pelas endonucleases, alterações como picnose, fragmentação nuclear e proteólise do citoesqueleto. Os detalhes da regulação da apoptose por oncogenes e genes supressores ainda não são totalmente entendidos, embora saiba-se da participação do gene *p53*.⁵⁻⁷ A sua expressão imunohistoquímica parece estar relacionada a fenótipos agressivos e à resistência a quimioterápicos.⁸⁻¹⁰

Os receptores hormonais também apresentam características de fator preditivo à resposta terapêutica, exibindo associação com o curso clínico dos carcinomas da mama. A positividade para receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) é um excelente marcador de diferenciação dos carcinomas mamários. Outro importante fator preditivo é a expressão do gene *c-erbB-2*, cuja amplificação ocorre em um terço dos carcinomas mamários e está associado ao alto grau histológico, e à redução da sobrevida.¹¹⁻¹⁴

Do ponto de vista morfológico, a maioria dos tumores malignos da mama é classificada como carcinoma ductal infiltrante. Sua graduação histológica aplicada por Bloom e Richardson modificada por Elston e Ellis,¹⁵ foi capaz de diminuir os problemas de reprodutibilidade e mostrar forte associação entre graus histológicos e prognóstico. O Grau I tem sobrevida melhor que grau II e III ($P < 0,0001$).¹⁶

No câncer de mama muito embora o número de células apoptóticas cresçam com o tamanho tumoral, a apoptose é pouco detectada em tumores com receptor de estrogênio positivo.¹⁷ Além disso o Índice Apoptótico (I.A.) está associado com a atividade mitótica, alto grau histológico, tumores pouco diferenciados e com superexpressão do gene *p53*.¹⁸ Observa-se portanto uma associação direta entre o número de células apoptóticas e comportamento biológico agressivo.

Através deste estudo, deparamos, sem dúvida, com problemas complexos, abertos e com uma resultante

entrópica que é a morte celular. Este fenômeno está integrado a outras variáveis biológicas como a expressão de genes supressores e a fatores proliferativos. Neste estudo a carcinogênese mamária foi avaliada a partir dos vários estágios morfológicos da doença, comparando-a com os índices apoptóticos e com outros fatores prognósticos.

MATERIAL E MÉTODO

AMOSTRA

Este foi um estudo retrospectivo, descritivo, que avaliou 39 amostras de pacientes portadores de carcinoma ductal infiltrante divididos em 3 grupos (I, II, III). As amostras de câncer de mama foram obtidas no Serviço de Imunoistoquímica do Laboratório Anticorpos, Niterói, RJ. O material produto de lumpectomia, fixado em formaldeído, emblocado em parafina e submetido ao estudo das variáveis: revisão histopatológica, estudo imunohistoquímico de marcadores prognósticos e detecção *in situ* da apoptose. Os casos de carcinoma ductal infiltrante, foram separados em três grupos, de acordo com os critérios de graduação de Bloom e Richardson (Modificada por Elston e Ellis).¹⁵

Grupo I - 13 pacientes classificados como grau histológico I.

Grupo II - 14 pacientes classificados como grau histológico II.

Grupo III - 12 pacientes classificados como grau histológico III.

Foram excluídos os casos em que houve tratamento químico ou radioterápico prévio à biópsia ou material sem condições técnicas para análise.

Estudo histopatológico: as amostras, em blocos de parafina, foram submetidas a cortes histológicos de 4 micras de espessuras e montadas em lâminas para coloração de rotina em hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram revisadas e graduadas de acordo com os critérios de Bloom e Richardson (modificado por Elston e Ellis), apresentados na tabela 1.¹⁵

Tabela 1. Graduação Bloom e Richardson (modificada por Elston e Ellis)

	Escore
1. Formação tubular	
Maioria do tumor (>75%)	1
Grau moderado (10-75%)	2
Pouca formação (<10%)	3
2. Pleomorfismo Nuclear	
Núcleos pequenos, regulares e uniformes	1
Aumento moderado de tamanho e variabilidade	2
Marcada variação e pleomorfismo	3
3. Contagem mitótica	
0-5 mitoses	1
6-10 mitoses	2
>11 mitoses	3

Gradação:

3-5 pontos: Grau I -Bem diferenciado

6-7 pontos: Grau II -Moderadamente diferenciado

8-9 pontos: Grau III-Pouco diferenciado

Figuras de mitose foram contadas na periferia do tumor em 10 campos de grande aumento (objetiva 40x).

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Cortes de 4 mm de espessura foram aplicados em lâminas silanizadas (3-aminopropiltriétoxi-silane; Sigma Chemical, Co; USA), desparafinados em estufa a 60°C, hidratados em passagens de xilol, álcool absoluto, álcool a 70% e água destilada. O método do complexo avidina-biotina peroxidase anti-peroxidase foi utilizado no estudo das amostras. Sucintamente, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica, com imersão dos fragmentos em tampão citrato 0,001M, PH 6.0, bloqueio da peroxidase com água oxigenada a 3% e posteriormente incubados em anticorpos primários (Quadro 1) por 1 hora, anticorpos secundários biotinilados 30min e aplicados ao complexo avidina-biotina por mais 30min. A coloração foi feita com adição de substrato cromógeno diaminobenzidina por cerca de 1 minuto. O

procedimento foi finalizado com contracoloração, utilizando-se a Hematoxilina de Harris (Merck). Em cada caso, cortes foram utilizados para controle de coloração, pela omissão do anticorpo primário ou do secundário.

A análise imunoistoquímica da expressão da proteína Ki67 e p53 foi considerada positiva quando um padrão nuclear distinto foi observado em mais de 15% das células.¹⁷ A percentagem de células positivas foi analisada em 10 campos de maior aumento do microscópio (400x) em áreas aleatórias e adequadas à interpretação. Os receptores de estrogênio e progesterona também foram considerados positivos quando apresentavam padrão de coloração nuclear. Os pontos de corte utilizados para quantificar o número de células RE e RP positivas foram: <10% de células coradas, 10-25%, 25-50%, 50-75% e >75% de células positivas. Foi considerado negativo valor menor que 10%, de acordo com outros trabalhos.^{19,20}

Para análise do *c-erbB-2*, utilizamos o sistema de interpretação do Hercept system da DAKO Co. USA (Quadro 2).

Quadro 1. Anticorpos para imunoistoquímica

Anticorpo	Antígeno	Clone	Marca
α -p53	Proteína p53 tipo selvagem e mutante	DO7	Dako
α -Ki67	Proteína Ki67	MIB-1	Dako
α -RE	Receptor de estrogênio	6F11+1D5	Dako/Novocastra
α -RP	Receptor de progesterona	312	Novocastra
α -erbB-2	Oncoproteína c-erbB-2	Policlonal	Dako

Quadro 2. Sistema de interpretação Herceptest DAKO

Padrão de imunomarcacão	Pontuação	Conclusão (presença de superexpressão da oncoproteína HER2 -neu/c-erbB-2)
Ausência ou menos de 10% de imunopositividade na membrana das células tumorais	0	Negativo
Imunopositividade fraca em parte da membrana em mais de 10% das células tumorais	1+	Negativo
Imunopositividade fraca a moderada em toda a membrana em mais de 10% das células tumorais	2+	Fracamente positivo
Imunopositividade intensa em toda a membrana em mais de 10% das células tumorais	3+	Fortemente positivo

DETECÇÃO *IN SITU* DE APOPTOSE

A presença de células em apoptose foi investigada pelo método TUNEL (*TdT mediated dUTP nick end labeling*), em cortes histológicos, com 4 mm de espessura, de tecido com carcinoma da mama. Foi utilizado o "Kit" comercial ApopTag Plus (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) com a finalidade de identificar as células em processo de apoptose via marcação de fragmentos terminais de DNA (porção 3' -OH), caracteristicamente relacionado com a fragmentação do DNA nuclear, possibilitando a identificação morfológica de células em apoptose. As etapas do método empregado são descritas abaixo:

- Desparafinação dos cortes em solução xilol (2 banhos de 5 min)
- Lavagem em álcool absoluto (2 banhos de 5 min)
- Lavagem em álcool a 95% e 70% (1 banho por 3 min)
- Lavagem em PBS (5 min)
- Incubação em solução de proteínas k (20 µg/ml) por 15 minutos à temperatura ambiente
- Lavagem em água destilada (4 banhos de 2 min)
- Incubação em peróxido de hidrogênio a 2%, diluído em PBS (5 min)
- Lavagem em PBS (2 banhos de 5 min)
- Incubação em solução tampão de equilíbrio *ApopTag Plus* utilizando lamínula de plástico (1 min)
- Incubação em enzima TdT a 37°, em câmara úmida (1 hora)
- Incubação em solução tampão *Stop/Wash ApopTag Plus* a temperatura ambiente (10 min)
- Incubação com Anti-Digoxigenina-Peroxidase em câmara úmida à temperatura ambiente (30 min)
- Lavagem em PBS (4 banhos de 5 min)
- Incubação com DAB à temperatura ambiente (5 min)
- Contracoloração com hematoxilina de Harris (5 min)
- Lavagem em água destilada (3 banhos por 30 seg)
- Lavagem em butanol 100% (3 banhos de 30 seg)
- Montagem da lâmina.

O controle positivo da reação foi realizado, utilizando-se cortes histológicos de glândula mamária de camundongos (fixação em solução de formol tamponado a 10% e impregnação em parafina) fornecidos em conjunto com os outros reagentes do "kit" *ApopTag Plus*. Como controle negativo foram utilizados cortes histológicos de carcinoma mamário, sendo omitida a etapa de incubação com o anticorpo anti-digoxigenina. As medidas quantitativas foram expressas em porcentagem de células apoptóticas contadas em objetivas de maior aumento (40x). Áreas tumorais necróticas ou com intenso infiltrado inflamatório foram

evitadas. Áreas periféricas, respeitando os limites tumorais, foram priorizadas na análise.

CAPTURA DE IMAGEM E CONTAGEM DE CÉLULAS

As imagens histopatológicas dos cortes corados por imunistoquímica e detecção *in situ* da apoptose foram capturadas e avaliadas por sistema computadorizado de captura de imagens Axion Vision (Zeiss, Berhlim, Germany). Foi realizada captura de imagem com câmara digital, obtida pelas objetivas de 10x, 20x e 40x do microscópio modelo AXIOSTAR PLUS (Zeiss, Berhlim, Germany). As imagens foram arquivadas e submetidas a contagens de células tumorais e inflamatórias com auxílio de marcação digital.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram comparadas, utilizando-se teste *t* de *Student* ou pelo teste ANOVA (programa de computador *Origin for windows*). Qualquer valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Os carcinomas ductais estudados apresentaram invasão estromal, variações arquiteturais e citológicas nas amostras avaliadas. Segundo o tipo histológico, observou-se maior ou menor quantidade de estroma, formação de túbulos, acúmulos celulares bem ou mal definidos e fileiras de células malignas. Morfológicamente, as células tumorais também variavam segundo o grau histológico, apresentando graus de pleomorfismo, anisocariose, hiperchromasia nuclear, presença de nucléolos, figuras mitóticas e corpos apoptóticos. Observou-se ainda, na maioria dos tumores avaliados, áreas de necrose, calcificação e infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade variável. A ocorrência de componente intraductal não foi incomum, notando-se padrão tipo comedo, sólido, cribriforme e papilífero.

Os carcinomas ductais grau I, em geral, apresentavam estruturas epiteliais em padrão glandular/tubular (Figura 1A), ocupando mais de 75% do tumor. Essas estruturas exibiam conformação levemente irregular, freqüentemente exibindo angulação e lume. Não observou-se a presença de células mioepiteliais em torno das estruturas glandulares malignas. Poucas figuras mitóticas, foram observadas, e houve pequena variação do tamanho nuclear das células malignas. O componente intraductal observado nessa classe de tumores, em geral, era do tipo cribriforme.

Nos carcinomas ductais grau II, notou-se menor quantidade de estruturas tubulares, com presença de ninhos ou acúmulos celulares (Figura 1B). Havia moderada variação da forma e tamanho das células e de núcleos. Os núcleos das células tumorais exibiam aspecto vesiculoso, por vezes com hipercromasia, irregularidade da membrana e nucléolo visível.

Os tumores classificados como grau III exibiam arquitetura com poucas formações glandulares ou tubulares, observando-se acúmulos ou fileiras de células infiltrando o tecido conjuntivo (Figura 1C). Houve marcada variação da forma e tamanho das células e dos núcleos. Estes últimos exibiam, por vezes, padrão bizarro, com nucléolo evidente, por vezes, múltiplos. Havia grande número de mitoses atípicas, presença de necrose e de corpos apoptóticos.

Numa análise morfológica, as células apoptóticas apareceram nas biópsias tumorais como células isoladas, pequenos grupos de células apoptóticas ou elementos fagocitados por células macrofágicas. Nas fases iniciais, as células apoptóticas apresentavam-se com citoplasma acentuadamente acidófilo, e com núcleos ora exibindo a cromatina marcadamente condensada, ora marginando o núcleo. Nas fases intermediárias da apoptose, o núcleo apresentava-se fragmentado em estruturas esféricas e, nas fases tardias, como remanescentes nucleares isolados, formando os corpos apoptóticos. (Figura 1D). Não se observou infiltrado inflamatório em torno destes elementos descritos.

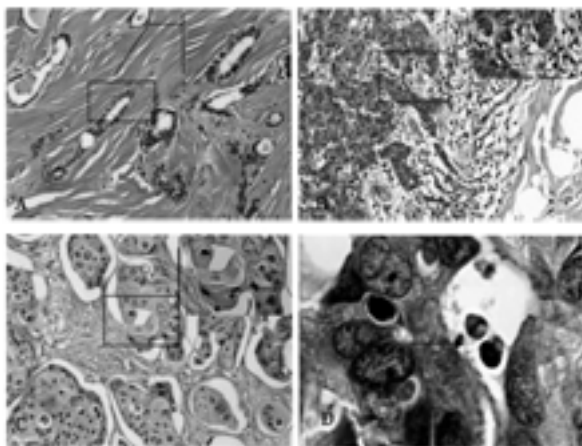


Figura 1

DETECÇÃO *IN SITU* DA APOPTOSE E FATORES PROGNÓSTICOS USUAIS NO CÂNCER DE MAMA

Através do método TUNEL, evidenciamos *in situ* a presença de células apoptóticas em todas as lesões avaliadas. Uma nítida marcação foi observada nas células

tumorais apoptóticas, evidenciando maior número de células positivas nos tumores pouco diferenciados, quando comparados com os tumores bem diferenciados (Figura 2A, 2B e 2C). Vários padrões morfológicos foram observados, notando-se núcleos condensados, fragmentados, e com presença de corpos apoptóticos marcados no interior de macrófagos (Figura 2D). Quando comparadas (análise multivariada), a contagem em porcentagem de células apoptóticas em relação a células tumorais, notou-se diferença estatística entre os grupos I, II e III (CDI graus I, II, III) ($p=0,020$). Os CDI grau histológico III mostraram ser o de maior índice apoptótico (IA) (Gráfico 1).

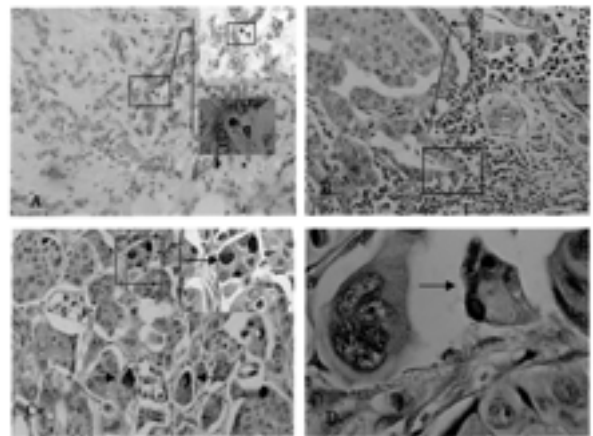


Figura 2

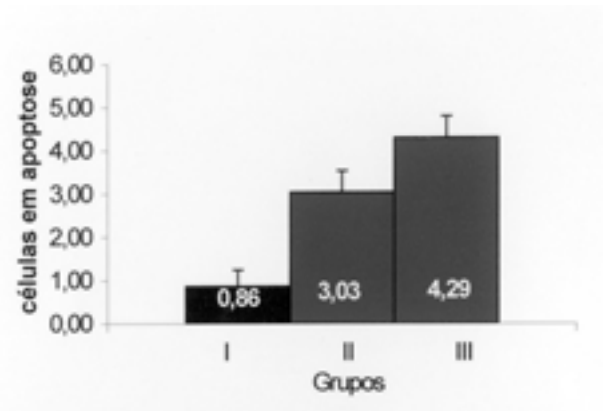


Gráfico 1

A marcação para RE e RP revelou o padrão habitual de coloração nuclear. Nos carcinomas grau histológico I observou-se forte marcação imunohistoquímica na maioria das células tumorais. Nos tumores graus histológicos II e III houve maior variação da marcação nuclear, observando-se células coradas ao lado de elementos não corados e ainda, tumores sem qualquer

expressão celular dos marcadores (Figura 3A). Todos os casos (n=13) avaliados do grupo I (CDI grau I) mostraram-se positivos para receptores hormonais, enquanto, no grupo III (CDI grau III, n=12), 8 casos foram negativos, evidenciando o predomínio absoluto desses casos nos tumores pouco diferenciados. Quando comparamos (teste *t* de *Student*), índice apoptótico e grupos de tumores RE - e RE + (subdivididos como subgrupo A: RE negativo, menor do que 10% de positividade no tumor e B: RE positivo, maior do que 10% de positividade no tumor), evidenciaram-se maiores índices apoptóticos nos tumores considerados RE negativos (p=0,0123) (Gráfico 2).

O anticorpo anti-Ki67, que indica os níveis de proliferação celular, índice proliferativo (I.P.), também exibiu típica marcação nuclear (Figura 3B) apresentando maiores índices de proliferação nos tumores pouco diferenciados, GIII, em comparação com os outros dois grupos I e II (teste estatístico: análise multivariada, p<0,0001) (Gráfico 3). Quando subdivididos em grupos por níveis de proliferação, (subgrupo A: índice proliferativo maior que 15%, subgrupo B: índice proliferativo menor que 15%) e comparados (teste *t* *students*), com o índice apoptótico, o grupo de tumores com maiores índices proliferativos (Ki67 maior que 15%) exibiu significativamente maiores índices apoptóticos (p=0,0045) (Gráfico 4).

O anticorpo anti-*p53* que revela as alterações referentes ao acúmulo do oncogene *p53*, exibiu coloração nuclear e maior número de células coradas nos tumores pouco diferenciados, GIII (Figura 3C). Os tumores grau histológico I exibiram marcação ocasional com menor número de células coradas. Quando comparados, análise multivariada, os grupos I, II e III (CDI graus I, II e III) não mostraram diferença estatisticamente significativa (p=0,113) (Gráfico 5). Entretanto, quando comparados ao índice apoptótico (teste *t* de *Student*), os casos *p53*- (Subgrupo A: tumores com menos que 15% de células positivas) demonstraram ter menores níveis de apoptose que os casos *p53*+ (Subgrupo B: tumores com mais que 15% de células positivas) (p=0,0356) (Gráfico 6).

Os casos positivos para *c-erbB-2* demonstraram grande número de células exibindo moderada ou forte marcação de membrana citoplasmática (Figura 3D). Apenas um caso de tumor grau I revelou a positividade membranar descrita, exibindo marcação em intensidade moderada. Ocasionalmente observou-se marcação incompleta da membrana citoplasmática. A maioria dos casos positivos com forte marcação esteve no grupo III (tumores pouco diferenciados). Não houve diferença

significativa na análise comparativa (teste *t* de *Student*), entre os casos positivos (subgrupo A) ou negativos (subgrupo B) para *c-erbB-2* e o índice apoptótico dos tumores (p=0,714) (Gráfico 7).

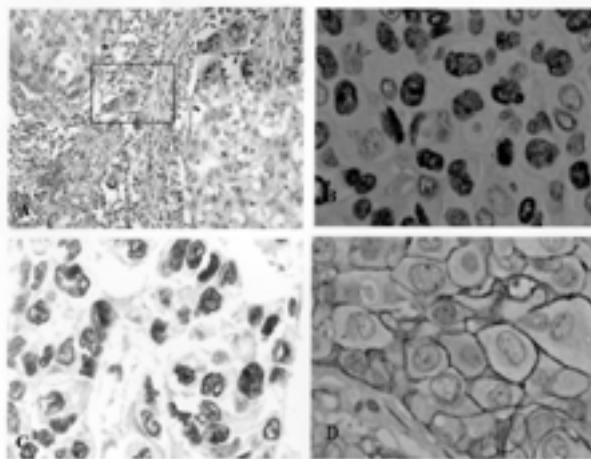


Figura 3

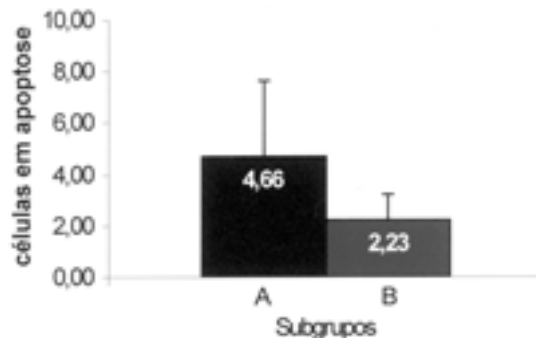


Gráfico 2

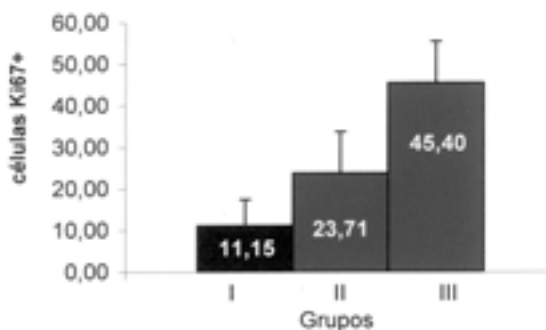


Gráfico 3

DISCUSSÃO

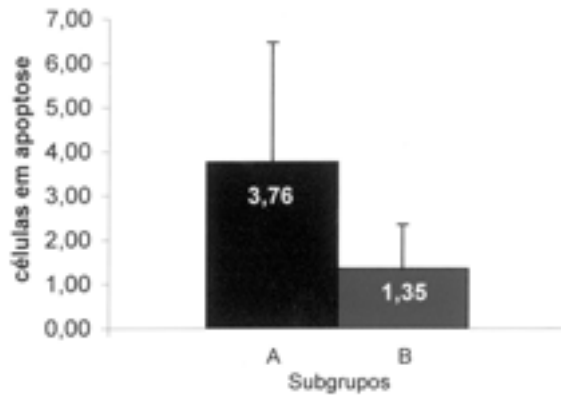


Gráfico 4

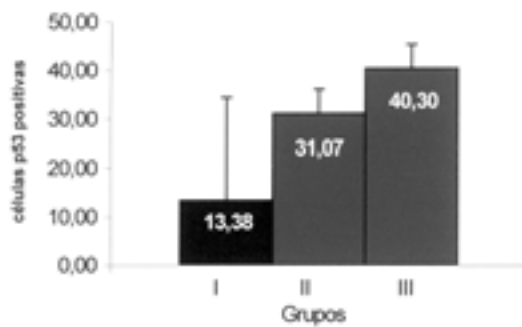


Gráfico 5

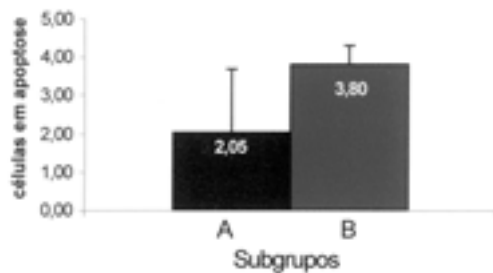


Gráfico 6

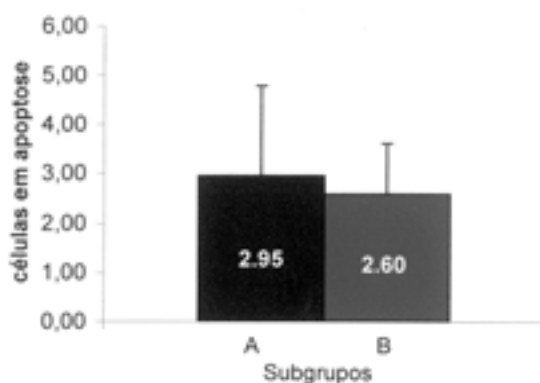


Gráfico 7

O curso clínico do carcinoma mamário ainda é bastante imprevisível, refletindo processos relacionados à progressão de tumor, taxa de crescimento e heterogeneidade tumoral. Algumas mulheres morrem de doença metastática dentro de um ano, outras, várias décadas depois do diagnóstico. Em face da grande variabilidade de comportamento clínico, da incidência crescente, e da alta taxa de mortalidade dessa doença tornou-se necessário estabelecer e identificar fatores que, ao diagnóstico, possam prever o comportamento biológico destes tumores.²¹

Na última década, ficou evidente que a apoptose tem um papel determinante na carcinogênese, no crescimento tumoral e na agressividade do câncer de mama. A taxa de crescimento tumoral é resultado não apenas dos níveis de proliferação, mas também de morte celular.¹⁸

Até recentemente, devido aos problemas de reprodutibilidade, a graduação histológica teve seus resultados questionados e até mesmo seu uso como procedimento de rotina era pouco aceito. A classificação proposta por Bloom e Richardson, depois modificada por Elston e Ellis,¹⁵ criou critérios mais objetivos, avaliando de modo semiquantitativo três importantes aspectos morfológicos: a porcentagem de formação tubular, o grau nuclear e a contagem mitótica em áreas definidas. Esses aspectos, em conjunto, constituíram uma graduação capaz de relacionar fortemente a morfologia tumoral com prognóstico. Ficou demonstrado que tumor grau histológico II e III têm pior curva de sobrevivência que tumor grau histológico I.¹⁵

Neste estudo, apresentamos a associação do índice apoptótico (IA) com a graduação histológica, e com outros fatores prognósticos do câncer de mama.

A indução da apoptose por agentes quimioterápicos é um importante aspecto da terapia do câncer. Estímulos externos, genotóxicos com danos no DNA, em geral, levam à parada do ciclo celular e à morte da célula por apoptose.^{22,23} Entretanto, vários estudos têm demonstrado que a apoptose pode ser usada como indicador de pior prognóstico no câncer de mama. Nishimura *et al.*¹⁷ estudaram a relação entre apoptose e variáveis clínico-patológicas e prognósticas de câncer de mama. Eles concluíram que apoptose pode refletir um alto grau de agressividade biológica e prognóstico desfavorável. Marcadores de proliferação celular, índice mitótico e marcação com Ki67 correlacionou com índice apoptótico em carcinoma ductal *in situ* pouco diferenciado. Pacientes com carcinoma invasor no

estágio clínico I e estágio clínico II com altos índices apoptóticos mostraram curva de sobrevida global menor do que com baixo índice apoptótico.¹⁸ Em carcinoma ductal infiltrante as células apoptóticas investigadas pelo método TUNEL foram mais comuns em tumores com mais de 3 cm, grau histológico III, com altas contagens de células em mitose, alto nível de positividade para Ki67 e positividade para *p53*.²⁴

No presente estudo, observamos a associação entre grau histológico e níveis de apoptose. Graduamos os carcinomas ductais infiltrantes, como proposto pela classificação Bloom e Richardsom modificada, observou-se que tumores pouco diferenciados grau histológico III apresentavam maiores níveis de apoptose do que tumores bem diferenciados grau histológico I. Esses achados estão de acordo com o que foi apresentado pela literatura indicando o crescimento dos níveis de apoptose com a piora do grau histológico, apresentando altos níveis de apoptose nos tumores malignos pouco diferenciados.²⁴

Os resultados do presente trabalho confirmam ainda observações prévias que associam apoptose com proliferação.^{25,26} Foi possível, segundo a graduação histológica, identificar níveis crescentes de apoptose e índice proliferativo pelo Ki67. Segundo Lipponen *et al*,²⁷ um mecanismo regulatório comum pode justificar esta relação entre os níveis de apoptose e proliferação. Fatores de crescimento teriam um importante papel na ativação de oncogenes entre eles o *c-myc* e *c-erbB-2*, que poderiam atuar na dupla via apoptose e proliferação.^{27,28}

O papel do *p53*, segundo Jong *et al*,¹⁸ em mediar proliferação e apoptose não é claro. A expressão do tipo selvagem do *p53* (*wt-p53*) pode levar à parada do ciclo celular em G1, inibindo a proliferação. Além disto o *wt-p53* é capaz de regular positivamente o *bax* e regular negativamente o *bcl-2*, estimulando a apoptose. Em tumores invasivos de mama, grande número de casos mostram positividade imunohistoquímica para o *p53*, que reflete, na maioria das vezes, o aumento da meia vida da proteína mutada *p53* (*m-p53*) incapaz de induzir a expressão *bax* e a habilidade de induzir a apoptose. Em células tumorais ovarianas, foi possível demonstrar que a resistência a cisplatina foi consequência da perda da habilidade do *p53* ativar *bax*.^{18,29} No presente trabalho, constatamos maior expressão de *p53* nos tumores grau histológico III, indicando que, possivelmente, face o seu caráter supressor de tumor, o *p53* não é um fator diretamente envolvido na promoção da apoptose nesta classe de tumores.

Tumores bem diferenciados invariavelmente estão associados à positividade para o *bcl-2*, e ao receptor de estrogênio, ao baixo índice apoptótico e à negatividade para o *p53*.^{18,24,25,30} Paradoxalmente o *bcl-2*, segundo Sierra *et al*,³¹ prolonga a sobrevida celular, sem conferir vantagens proliferativas. Num contexto adverso, as células que expressam *bcl-2*, portanto com potencial de resistência à apoptose poderiam ter a supressão da morte celular programada, adquirir mutações e culminar com a progressão tumoral. Ele evidenciou maior número de metástase linfonodal em pacientes expressando *bcl-2*, com negatividade para *p53* e supressão apoptótica. Segundo Wu *et al*,²² a redução da apoptose pode favorecer o crescimento tumoral e a permanência de células geneticamente aberrantes, favorecendo a progressão tumoral.

Observamos, neste presente trabalho, maior número de casos negativos para RE nos tumores pouco diferenciados, grau III, grupo associado a índice apoptótico e índice proliferativo mais altos. Observamos ainda maior presença de superexpressão de *c-erbB-2* nos tumores II e III, onde podemos detectar maiores índices proliferativos. Esses achados sugerem que as altas taxas proliferativas devem ser RE independentes e possivelmente relacionadas a *c-erbB-2*, como demonstra o trabalho de Gandhi *et al*.²⁸ Os autores relatam que, em estudos *in vitro*, células tumorais mamárias superexpressando *c-erbB-2* têm significativamente maiores índices apoptóticos e índices proliferativos e sugerem uma associação entre estes fatores. Deshane *et al*.³² descrevem ainda que a administração de anticorpos anti-*c-erbB-2* diminuem os níveis proliferativos e aumentam os níveis de apoptose.^{23,33}

A apoptose, no presente trabalho, mostrou ter associação com graduação histológica do câncer de mama. Os tumores exibindo aspecto histológico pouco diferenciado evidenciaram maiores índices apoptóticos do que tumores bem diferenciados. Os índices apoptóticos ainda estão associados significativamente com negatividade para RE e com maiores índices proliferativos. Ainda observamos que a positividade para *c-erbB-2* e *p53* esteve mais presente em tumores grau histológico III do que em tumores grau histológico I. Esses achados indicam a associação de fatores prognósticos com os graus histológicos e aspectos da biologia tumoral.

A indução do processo de apoptose é de grande importância no entendimento da carcinogênese mamária. Níveis crescentes de apoptose estão associados à progressão histológica do carcinoma ductal infiltrante

da mama, sendo evidenciado altos índices de morte celular programada em tumores pouco diferenciados, portanto mais agressivos. Tal fato pode ser explicado como uma tentativa da resposta imune celular em induzir a apoptose em células tumorais com a finalidade de supressão tumoral. Estes aspectos implicam ainda em possíveis estratégias terapêuticas com finalidade de induzir apoptose nesses tumores.

REFERÊNCIAS

1. Story M, Kodym R. Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. *Front Biosci.* 1998;3:d365-75.
2. Hashimoto Y. A brief overview of apoptosis. *Hum Cell.* 1996;9:194-6.
3. Fotadar R, Diederich L, Fotadar A. Apoptosis and the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res.* 1996;2:147-63.
4. Villunger A, Strasser A. Does death receptor signaling play a role in tumorigenesis and cancer therapy? *Oncol Res.* 1998;10(11-12):541-50.
5. Keer JFR, Willie AH, Currie AP. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-57.
6. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994;73(8):2013-26.
7. Alberts B, Bray D, Lewys J, Raff M, Roberts K, Watson JD, et al. *Biologia molecular da célula.* Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
8. Schimitt FC. Prognóstico do câncer de mama, avaliação do impacto de novos métodos face aos fatores prognósticos tradicionais. *Arq Med.* 1994;8(5):319-24.
9. Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, et al. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol.* 1992;23(9):974-9.
10. Itaya M, Yoshimoto J, Kojima K, Kawasaki S. Immunohistochemistry of p53, Bcl-2 and Ki67 as predictors of chemosensitivity. *Methods Mol Med.* 2005;110:213-27.
11. Gasparini G, Pozza F, Harris AL. Evaluating the potencial usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:1206-19.
12. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, Mcquire WL. Human breast cancer, correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235:177-82.
13. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1992;7:1049-56.
14. Duffy J. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem.* 51(3):492-503. Epub 2005.
15. 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.
16. Page DL. Prognosis and breast cancer, recognition of lethal and favorable prognostic type. *Am J Surg Pathol.* 1991;15:334-49.
17. Nishimura R, Nagao K, Myayama H, Matsuda M, Baba K, Matuoka Y, et al. Apoptosis in breast cancer and its relationship to clinicopathological characteristics and prognosis. *J Surg Oncol.* 1999;71(4):226-34.
18. De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2000;82(2):368-73.
19. Hanna WM, Kahn HJ, Chapman AW. The correlation of Ki67 growth factor an ERICA in breast cancer. *Mod Pathol.* 1992;5:220-3.
20. Isola J, Weistz S, Visakorpi T, Holli K, Shea R, Khabbaz N, et al. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 1993;11(1):36-43.
21. Sunderland MC, Mcguire WL. Prognostic indicators in invasive breast cancer. *Surg Clin North Am.* 1990;5(70):989-1004.
22. Wu J, Lu JS, Jiang M, Han OX, Fontana JA, Barsky SH, et al. Prognostic role of p27Kip1 and apoptosis in human breast cancer. *Br J Cancer.* 1999;79(9-10):1572-8.
23. Mohsin SK, Weiss HL, Gutierrez MC, Chammess GC, Schiff R, Digiovanna MP, et al. Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol.* 2005;23(11):2460-8. Epub 2003 Feb 14.
24. Gonzalez-Campora R, Galera Ruiz MR, Vasquez Ramirez F, Rios Martin JJ, Fernandez Santos JM, Ramos MM, et al. Apoptosis in breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2000;196:167-74.
25. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer.* 1994;30A(14):2068-73.
26. Van Slooten HJ, Van De Vijver MJ, Van De Velde CJ, Van Dierendonck JH. Loss of Bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death, but also with increased proliferative activity. *Br J Cancer.* 1998;77(5):789-96.
27. Lipponen P, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994;73(8):2013-26.
28. Gandhi A, Holland PA, Knox F, Potten CS, Bundred NJ.

- Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer*. 1998;78(6):788-94.
29. Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, et al. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell system. *Cancer Res*. 1996;56:556-62.
30. Vakkala M, Lahteenmaki K, Raunio H, Paakko P, Soini Y. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*. 1999;5:319-24.
31. Sierra A, Castellsague X, Tortola S, Escobedo A, Lloveras B, Peinado MA, et al. Apoptosis loss and bcl-2 expression: key determinants of lymph node metastases in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1996;2(11):1887-94.
32. Deshane J, Grim J, Loechel S, Siegal GP, Alvarez RD, Curiel DT. Intracellular antibody against erbB-2 mediates targeted tumor cell eradication by apoptosis. *Cancer Gene Ther*. 1996;3(2):89-98.
33. Faltus T, Yuan J, Zimmer B, Kramer A, Loibl S, Kaufmann M, et al. Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia*. 2004;6(6):786-95.