

CÂNCER DE MAMA: MARCADORES TUMORAIS (REVISÃO DE LITERATURA)

Breast Cancer: Tumor Markers (Literature Review)

Ana Lucia Amaral Eisenberg¹ e Sérgio Koifman²

RESUMO

A identificação de marcadores que possam predizer o comportamento dos tumores é especialmente importante em câncer de mama devido, sobretudo, à variabilidade na progressão clínica da doença. Alguns marcadores tumorais e suas relações com o prognóstico são discutidos, dando-se ênfase àqueles que utilizam, para sua detecção, o método imuno-histoquímico e onde possa ser empregado material fixado em formol e embebido em parafina (material de arquivo). Os receptores hormonais (RH) são os menos polêmicos e os tumores positivos para estes marcadores, geralmente, apresentam menor tamanho, menor grau histológico e nuclear, uma melhor resposta à terapia hormonal e um melhor prognóstico. Para os outros marcadores tumorais aqui apresentados (*c-erbB-2*, catepsina D, MIB-1, PCNA, p53) existem muitas controvérsias, mas parte da literatura associa sua presença com tumores de alto grau histológico e com um pior prognóstico. As divergências existentes na literatura são discutidas e chega-se a conclusão que mais estudos são necessários antes que os marcadores tumorais possam ser utilizados como fatores prognósticos do câncer de mama.

Palavras-chave: neoplasias mamárias; marcadores biológicos de tumor; receptores hormonais; *c-erbB-2*; PCNA; p53.

ABSTRACT

The identification of markers which could predict the behaviour of tumors, specially breast malignancies, is important mainly because of the variability of progression of the disease. Some tumour markers and their prognostic power are discussed mainly those that use immunohistochemical method and a specimen fixed in formaldehyde and imbedded in parafine. Hormonal receptors are less subject to doubt and those tumours which are positive for these markers are, generally, smaller, with a lower histologic and nuclear grade, a better response to hormone therapy and a better prognosis. Other tumour markers present controversies about their efficacy, but many papers link their presence to high histological grade malignancies and a poor prognosis. Different opinions found in the literature are discussed and it may be concluded that more studies are needed before tumour markers could be used as prognostic factors in breast cancer.

Key words: breast neoplasms; tumor markers, biological; hormonal receptors; *c-erbB-2*; PCNA; p53.

¹Médica Patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro. Enviar correspondência para A.L.A.E. Rua das Acácias, 101/ 704, Gávea; 22451-060 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: alamaral@inca.org.br

²Médico Epidemiologista do Serviço de Epidemiologia Geral e Métodos Quantitativos da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os avanços no conhecimento da Biologia Molecular têm proporcionado melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação e diferenciação celulares, bem como o desenvolvimento de metástases tumorais.¹

Os marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor. É importante que esta substância possa ser utilizada para diferenciar tecidos normais de neoplásicos e que possa ser caracterizada ou quantificada por procedimentos relativamente práticos.¹

A utilização dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico do câncer de mama tem crescido muito nos últimos anos. Muitos desses marcadores, os quais foram inicialmente identificados através de estudos moleculares ou bioquímicos, podem agora ser localizados em cortes de tecido pelo uso da imuno-histoquímica ou da hibridização *in situ*. Incluem-se nesta ampla categoria uma variedade de proteínas, algumas das quais estão associadas aos oncogenes e medidores da atividade proliferativa do tumor.²

Os principais marcadores tumorais estão agrupados na Tabela 1.

MARCADORES TUMORAIS

Neste trabalho serão discutidos alguns marcadores tumorais, que, segundo a literatura, são importantes em prever o prognóstico do câncer de mama: receptores hormonais (receptores de estrogênio e receptores de progesterona); *c-erbB-2*; catepsina D; MIB-1; PCNA e p53.

RECEPTORES HORMONAIS

Definição

Os receptores hormonais (RH) são proteínas que se ligam aos hormônios circulantes, mediando seus efeitos celulares. Os mais estudados em carcinomas de mama são os receptores de estrogênio (RE) e os receptores de progesterona (RP).²

A observação de que o crescimento de certos tumores, principalmente aqueles derivados dos órgãos reprodutivos (mama, próstata, endométrio, ovário), é regulado pelos hormônios esteróides (estrógenos e andrôgenos) tem tido um impacto fundamental na abordagem terapêutica desse grupo de tumores.³

Desde que foi demonstrado que o crescimento dos carcinomas de mama é regulado por estrógenos, a presença de receptores específicos para o estrogênio em tumores mamários e a terapia ablativa desse hormônio tem produzido remissão clínica em pacientes com carcinoma de mama. Os tumores que respondem à terapia hormonal expressam altos níveis de receptores de estrogênio, enquanto que os tumores que não respondem têm níveis baixos ou indetectáveis.³

Tabela 1 - Principais marcadores tumorais
Marcadores no sangue e no tecido
CEA (antígeno cárcino-embriônico), SP-1 (glicoproteína β_1 específica da gravidez)
Marcadores associados aos tecidos
α -lactalbumina, β HCG (hormônio gonadotrofina coriônica), componente secretório, isoantígenos de grupos sanguíneos, glicoproteína complexa TAG 72, proteína S-100, GCDFP-15: proteína líquida da doença cística macrosscópica, receptores hormonais, catepsina D
Filamento do citoesqueleto citoplasmático
vimentina
Proteínas transmembrana de adesão celular
caderinas, integrinas
Proteínas da matriz extracelular
fibronectinas, tenascina
Marcadores genéticos
principais oncogenes: <i>c-erbB-2</i> ou HER2 (HER2/ <i>neu</i>), <i>c-erbB-3</i> e heregulina, mutações do proto-oncogene "ras" – p21, p53, <i>c-myc</i> , PRAD1/ciclinaD1 ou BCL-1, HST1, INT2, Bcl-2 (proto-oncogene), BRCA I, BRCA II
Fatores de crescimento
EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico, TGF α : transformador do fator α de crescimento
Avaliação imuno-histoquímica de proliferação
BrdU: bromodeoxiuridina, Ki-67, PCNA, KiS1 ou MIB-1
Produto do gene anti-metastático
<i>nucleoside diphosphate kinase (NDP kinase)</i> , nm23 (níveis reduzidos do produto do gene nm23 leva a um aumento da capacidade metastática do tumor) ¹⁶

Métodos para detecção

Dois métodos são mais comumente usados para a determinação dos RH: *a)* método bioquímico (*dextran-coated charcoal* – DCC) em tecido a fresco e *b)* método imuno-histoquímico, através da utilização de anticorpos monoclonais, em cortes de tecido congelado (sigla em inglês: ER-ICA e PR-ICA)^{2,4} ou em cortes obtidos de tecido embebido em parafina.^{2,5}

O método imuno-histoquímico utilizando material parafinado oferece algumas vantagens sobre o bioquímico: *a)* a possibilidade de se trabalhar com material de arquivo; *b)* a vantagem de se poder detectar RH em espécimes pequenos; *c)* por permitir uma análise visual da célula positiva para o RH (se ela é neoplásica ou não neoplásica ou se a lesão é *in situ* ou invasora); *d)* é o método mais econômico.^{1,5,6}

Uma alta taxa de concordância tem sido relatada entre as medidas obtidas pelos dois métodos. Os resultados discordantes são geralmente conseqüência da heterogeneidade na expressão do receptor, da ausência de tumor na amostra analisada bioquimicamente ou da pouca preservação da amostra.^{2,7} Os RH são lábeis ao calor e a reatividade é progressivamente degradada em tecidos que não são corretamente refrigerados ou prontamente fixados.²

Wilkins et al.⁴ e Masood et al.⁷ concluíram que o método imuno-histoquímico é o método ideal para a análise de tumores de pequeno tamanho, inclusive biopsias por agulha fina, quando não se dispõe de tecido a fresco.

Freqüência de aparecimento dos receptores

Cerca de dois terços dos cânceres de mama são positivos para RH.⁸ Segundo a literatura consultada, a positividade dos tumores para os RE varia de 60 a 81%, enquanto que para os RP, de 44 a 61%.^{6,9-11}

Associação com câncer

Existe uma associação significativa entre os RH e a histologia dos carcinomas de mama: geralmente, os carcinomas medulares são negativos para os RH, enquanto que os carcinomas mucinosos e papilíferos tendem a ser positivos. A freqüência de positividade para os RH em carcinoma ductal infiltrante (CDI) e carcinoma lobular (CL) infiltrante não é

significativamente diferente. Nos CDI existe uma relação inversa entre o grau histológico e nuclear e a positividade para os RE e os RP.^{2,12}

Os RE e os RP estão altamente associados com a idade da paciente no diagnóstico, sendo significativamente mais positivos em tumores de mulheres pós-menopausa. Os RH não estão relacionados com a história familiar, paridade ou idade da menarca. A maioria dos tumores positivos para RP são também positivos para RE.²

Prognóstico e sobrevida

A maioria dos autores mostra que existe uma associação positiva entre a presença de RH e um prognóstico mais favorável.^{6,8,12-15}

O impacto do estado dos RE do tumor primário no prognóstico é maior em pacientes com metástases para linfonodos axilares, principalmente quando múltiplos linfonodos são afetados. Os resultados são semelhantes para os RP.²

Em alguns estudos a vantagem prognóstica da positividade dos receptores hormonais extinguiu-se após 4-5 anos de seguimento.^{16,17} Shimizu et al.¹⁷ encontraram positividade de 50 e 60% para RE e RP, respectivamente, no tumor primário e somente 25 e 30% nas lesões recidivadas, respectivamente.

O valor prognóstico dos RH é maior nas mulheres pós-menopausa.^{14,18} As pacientes com tumores positivos para RP mostram um maior intervalo de tempo livre da doença e maior sobrevida.^{14,18} Os tumores positivos para RE estão associados a uma maior sobrevida livre de doença e também a uma maior probabilidade de resposta à terapia hormonal.¹⁹ Pacientes com negatividade para ambos os receptores (RE e RP) mostraram pior prognóstico do que aquelas pacientes com negatividade para apenas um dos receptores.²⁰

Stierer et al.¹¹ mostraram uma associação significativa entre tumores positivos para RH e baixo grau histológico, baixo pleomorfismo nuclear, baixa atividade mitótica e pacientes pós-menopausa. O estado dos RH não estava associado significativamente com a condição dos linfonodos axilares. Stierer et al.²¹ encontraram que a determinação de RE, o tamanho do tumor, o estado dos linfonodos axilares, o grau histológico, a atividade mitótica e o pleomorfismo nuclear foram de valor prognóstico para sobrevida livre de

doença e também para sobrevida geral das pacientes. Na análise multivariada o estado dos linfonodos axilares, o tamanho do tumor e a atividade mitótica, provaram ser fatores prognósticos independentes, enquanto que a determinação dos RE pelo método imuno-histoquímico mostrou significância apenas na análise univariada.

MacGrogan et al.⁶ estudando 942 casos de CDI de mama, encontraram na análise univariada, associação significativa entre tumores positivos para RP e outros indicadores de bom prognóstico (tumores menores que 2 cm e de baixo grau histológico). Os tumores positivos para RP também estavam significativamente associados, na análise univariada, com a sobrevida geral e com a sobrevida livre de recidiva e de metástase. Na análise multivariada com o grupo inteiro de pacientes, o estado dos linfonodos axilares (positivos), o grau histológico (grau III), o estado dos RP (fracamente positivo ou negativo) e o tamanho dos tumores (> 2 cm) foram fatores prognósticos independentes (mau prognóstico). No grupo de pacientes com linfonodos axilares negativos, o estado dos RP (fracamente positivo ou negativo) foi o único fator preditor (mau prognóstico) independente para a sobrevida geral. Para a sobrevida livre de doença e de metástase, o estado dos RP (fracamente positivo ou negativo), juntamente com o tamanho dos tumores (> 2 cm) e o grau histológico (grau III), foram fatores prognósticos independentes (mau prognóstico). No grupo de pacientes com linfonodos axilares positivos, o grau histológico (grau III), o tamanho do tumor (> 2 cm) e o estado dos RP (fracamente positivo ou negativo), foram fatores prognósticos independentes (mau prognóstico) para a sobrevida geral e para a sobrevida livre de recidiva e de metástase.

Resposta terapêutica

O valor do estudo dos RE e dos RP na previsão da resposta ao tratamento hormonal do câncer de mama avançado tem forte embasamento: a taxa de resposta positiva é de 77% para os tumores positivos para ambos; 46% para os tumores negativos para RE e positivos para RP; 27% para os tumores positivos para RE e negativos para RP e, 11% para os tumores negativos para ambos.²²

Segundo Nicholson et al.²³ a percentagem de células positivas para RE em uma série de 118 casos de câncer de mama, relacionou-se com a resposta do paciente à terapia endócrina. A taxa de resposta ao tratamento foi significativamente mais alta em mulheres com tumores positivos para RE, especialmente quando o tumor apresentava mais de 70% das células positivas. Nos tumores negativos para RE raramente houve resposta ao tratamento hormonal.

Os RE são também determinantes importantes na resposta à terapia hormonal em pacientes com doença recidivada. Se possível, a análise dos RH deve ser feita também na lesão recidivada, já que ocorrem variações da expressão dos RE do tumor primário e metástases em 25% dos casos. A probabilidade de se encontrar uma diferença é menor quando o tumor primário e as metástases ocorrem simultaneamente ou se o tumor primário é negativo para RE. A probabilidade de resultados discrepantes aumenta com o aumento do intervalo entre os espécimes e se o tumor primário é positivo para RE.^{2,10}

C-ERBB-2

A literatura mostra para este marcador vários nomes e também algumas grafias diferentes: *c-erbB-2*; *cerbB-2*; *C-erbB-2*; *HER-2*; *HER-2/neu*; *ERBB2*; *erbB2*; *erbB-2*; *neu/c-erbB-2*; *oncogene neu*; *proteína neu*; *neu*. Neste trabalho será adotado o termo “*c-erbB-2*”.

O *c-erbB-2* tem sido extensamente estudado em carcinomas de mama desde que Slamon et al. (1987)²⁴ demonstraram uma associação entre a sua amplificação e um mau prognóstico.^{25,26}

Métodos de detecção

O método imuno-histoquímico é atualmente o método mais empregado para a detecção de *c-erbB-2*, sendo mais conveniente que outras análises, não somente porque a técnica é mais fácil, mas também porque existem evidências de que a despeito da alta correlação entre a amplificação do gene e a expressão aumentada de *c-erbB-2*, esta última pode estar presente sem a amplificação do gene.²⁷

A imuno-histoquímica pode ser afetada por uma variedade de fatores, incluindo diferentes métodos de fixação do tecido, o uso de diferentes métodos de recuperação

(*retrieval*) de antígenos, o uso de diferentes anticorpos, e diferentes critérios para a avaliação da coloração nos cortes.²⁸ Ao se investigar a expressão aumentada de *c-erbB-2* por imuno-histoquímica, a coloração da membrana deve ser considerada como um sinal confiável dessa expressão aumentada.²⁹

Ocorrência no câncer de mama

A amplificação do gene tem sido descrita em 10-40% dos carcinomas de mama. A expressão aumentada de *c-erbB-2*, detectada por imuno-histoquímica, ocorre em cerca de 20% de todos os cânceres de mama e em 25% dos CDI. Nenhum aumento de expressão tem sido descrito no CL *in situ*.²⁹ Segundo Rosen et al.³⁰ somente 10% dos carcinomas medulares expressam o *c-erbB-2* (contra 49% dos CDI).

A associação da expressão aumentada de *c-erbB-2* com a sobrevida geral e a sobrevida livre de doença, segundo De Potter e Schelfhout,²⁹ seria devida ao aumento da atividade metastática das células tumorais que o expressam. A molécula desempenharia um papel chave na patogênese da doença de Paget mamária. No carcinoma ductal *in situ* (CDIS), a expressão aumentada de *c-erbB-2* poderia ser um marcador preditivo para a recidiva da doença após a ressecção tumoral.²⁹

Como se tem uma alta proporção dos CDIS, principalmente os do tipo comedocarcinoma, com expressão aumentada de *c-erbB-2*, é sugerido que o *c-erbB-2* desempenharia um papel mais importante na iniciação do que na progressão do carcinoma ductal.³¹

Prognóstico

A relação entre o *c-erbB-2* e o prognóstico do câncer de mama tem sido extensivamente examinado, com considerável atenção à recidiva tumoral e à sobrevida das pacientes.^{15,30,32-35} Vários autores encontraram que a expressão aumentada de *c-erbB-2* é um indicador de prognóstico ruim.^{32,35} De acordo com alguns investigadores, as pacientes cujos tumores exibem expressão aumentada de *c-erbB-2* apresentam uma sobrevida livre de doença menor e também uma sobrevida geral menor.^{6,36-38} Entretanto, outros autores, na análise multivariada falharam em encontrar uma associação significativa entre a sobrevida geral, a sobrevida livre de doença e o *c-erbB-2*.³⁹

O papel do oncogene *c-erbB-2* no câncer de mama tem sido extensamente investigado;

entretanto, os resultados permanecem controversos. A associação da expressão aumentada de *c-erbB-2* ou sua amplificação com um pior prognóstico é muito mais forte em pacientes com linfonodos positivos do que em paciente com linfonodos negativos.³⁸

Alguns autores não encontraram associação significativa entre o *c-erbB-2* e o estado dos linfonodos axilares.^{34,40,41} Para outros investigadores esta associação foi significativa.^{27,42,43}

Mitra et al.,⁴³ concluíram que a influência prognóstica da expressão aumentada do *c-erbB-2* aumentava aritmeticamente com o número de linfonodos axilares envolvidos. Aryandono et al.⁴⁴ encontraram que a positividade para *c-erbB-2* estava associada significativamente com o número de linfonodos axilares comprometidos.

Uma associação negativa e forte entre o *c-erbB-2* e os RE e os RP também tem sido descrita.^{27,31,40}

A expressão aumentada dos oncogenes p53 mutado e *c-erbB-2* são as duas anormalidades genéticas mais associadas ao carcinoma de mama. Os tumores que expressam essas duas proteínas teriam um pior prognóstico, possivelmente pela perda de um mecanismo de controle inibidor da proliferação celular e pelo ganho de um ativador de potencial maligno.⁴⁵ Uma coloração positiva para ambos, p53 e *c-erbB-2*, indica uma anormalidade genética subjacente: mutações localizadas no gene p53 e amplificação do *c-erbB-2*.^{33,37,38}

Importância no tratamento

A medida dos fatores prognósticos desempenha um papel importante na terapia do câncer de mama, especialmente no manejo de tumores com axila negativa. O *c-erbB-2* é um dos marcadores que se mostra promissor neste sentido.^{26,29,33}

O estudo do *c-erbB-2* em pacientes com câncer de mama, do ponto de vista clínico, pode tornar-se importante para uma posterior quimioterapia. Aparentemente as pacientes cujos tumores exibem uma expressão aumentada de *c-erbB-2* podem ter um maior benefício com altas doses de quimioterapia. A expressão aumentada de *c-erbB-2* poderia, portanto, ser um marcador útil para identificar as pacientes que iriam provavelmente mais se beneficiar de altas doses de quimioterapia adjuvante.²⁹

Barnes²⁶ relatou que os tumores *c-erbB-2* positivos falharam em responder à terapia endócrina e à quimioterapia. Carlomagno et al.³³ e Houston et al.,⁴⁶ estudando carcinomas de mama, encontraram que a expressão aumentada de *c-erbB-2* define um subgrupo que, provavelmente, responde pouco à terapia endócrina.

Críticas e controvérsias

Numerosos estudos têm examinado o significado prognóstico da expressão aumentada de *c-erbB-2* em pacientes com câncer de mama, tanto com axila positiva quanto com axila negativa.^{27,30,32,33,38,43} Embora muitos investigadores sugiram que a presença da expressão de *c-erbB-2* alterada seja um sinal de prognóstico desfavorável, o assunto permanece controverso.³⁰

Segundo Press et al.⁴⁷ a revisão desses estudos revelou a presença de considerável variabilidade metodológica, incluindo: grandes diferenças no tamanho das amostras, diferentes tempos de seguimento das pacientes, utilização de diferentes técnicas, uso de diferentes reagentes e uma grande variabilidade de anticorpos usados em imuno-histoquímica em material arquivado (a grande maioria utilizou material arquivado). Esses autores em seu estudo com o *c-erbB-2*, utilizando material arquivado de 187 carcinomas de mama, empregaram 4 diferentes técnicas: *Southern blot*, *Northern blot*, *Western blot* e imuno-histoquímica. Utilizaram, ainda, na imuno-histoquímica, 7 anticorpos policlonais e 21 anticorpos monoclonais. Eles concluíram que a habilidade desses anticorpos em detectar a expressão aumentada de *c-erbB-2* foi extremamente variável e não comparável, dando uma explicação importante para a variabilidade da taxa de expressão aumentada reportada na literatura.⁴⁷

As razões para as discrepâncias nos resultados, segundo Keshgegian seriam:

- a) grande variação do número de casos;
- b) variação na metodologia;
- c) uso de diferentes anticorpos na determinação da expressão aumentada de *c-erbB-2* por imuno-histoquímica;
- d) diferentes critérios de positividade (desde qualquer coloração de membrana até

a fortemente corada, ou coloração do citoplasma de uma pequena percentagem de células até a maioria das células coradas).⁴⁰

Catepsina D

A catepsina D é uma endoprotease lisossomal ácida, encontrada em praticamente todas as células dos mamíferos e é um marcador tumoral muito estudado em câncer de mama.⁴⁸⁻⁵⁴ Embora a catepsina D apresente ampla distribuição nos vários tipos de células humanas, existem diferenças quantitativas na sua distribuição tecidual.⁵¹ A função fisiológica da catepsina D é desconhecida, mas parece estar envolvida na degradação das proteínas teciduais, tanto em condições normais quanto patológicas.⁵¹ O papel da catepsina D na carcinogênese acredita-se estar associado à estimulação da síntese de ADN e mitose durante a regeneração tecidual e devido ao seu poder proteolítico, facilitaria a disseminação tumoral, por digestão de proteoglicanos da matriz intersticial e membrana basal.^{50,52} Estas evidências levaram à elaboração da hipótese de que a secreção da catepsina D pelas células tumorais facilitaria a iniciação e progressão do processo metastático.⁵⁰ Segundo Nakopoulou et al.⁵¹ a catepsina D é uma proteína claramente associada com a invasividade tumoral e a presença de metástases para linfonodos axilares.

Os dois métodos mais empregados para a detecção da catepsina D são o bioquímico e o imuno-histoquímico. Göhring et al.,⁵² Stonelake et al.⁵⁵ e Itoh et al.,⁵⁶ encontraram boa correlação entre esses dois métodos de detecção da catepsina D. Göhring et al.⁵² encontraram, na literatura, taxas de concordância de aproximadamente 70%.

Segundo Göhring et al.⁵² o método imuno-histoquímico é superior ao bioquímico, porque, além de ser um método mais simples, fornece dados mais preditivos em relação ao prognóstico. Além disto, para o método bioquímico há necessidade de uma boa quantidade de o tecido a fresco ou congelado à -70°C. Para o método imuno-histoquímico necessita-se de quantidades mínimas de material e este pode ser fixado em formol e embebido em parafina (material de arquivo).

Alguns estudos têm demonstrado que altos níveis de catepsina D, detectada através do método bioquímico, associa-se com pior prognóstico do câncer de mama.^{52,57} Utilizando-se a técnica por imuno-histoquímica, as discrepâncias nos resultados são grandes: enquanto que alguns estudos não têm confirmado a associação entre imunorreatividade da catepsina D e maior agressividade do carcinoma de mama,^{50,55,56} outros têm revelado maior agressividade biológica.^{48,52,53}

Quando se compara a expressão da catepsina D, através de estudo imuno-histoquímico, com outros fatores prognósticos do câncer de mama, como o grau histológico, por exemplo, parece haver resultados controversos, sendo que a maioria dos autores pesquisados não encontrou associação entre alto grau histológico e a positividade para a catepsina D.^{48-51,55}

A produção da catepsina D parece ser influenciada pelo estrogênio, embora esta afirmação seja ainda debatida na literatura.⁵⁰ Eng Tan et al.⁵⁸ relataram uma associação entre a positividade para os receptores de estrogênio e a imunocoloração positiva para a catepsina D. Outros autores não têm confirmado esses achados.^{48-52,55,56}

A associação entre a expressão aumentada da catepsina D e a sobrevida livre de doença é controversa. Para esta associação, Aaltonen et al.,⁴⁹ Iwaya et al.⁵⁴ e Eng Tan et al.⁵⁸ encontraram significância estatística.

Na literatura estudada, o único estudo onde a catepsina D foi um fator prognóstico independente para a sobrevida geral, em pacientes com linfonodos positivos e negativos, foi o de Isola et al.⁴⁸ No estudo de Göhring et al.,⁵² a catepsina D foi também um fator prognóstico independente para a sobrevida geral, mas somente nas pacientes com linfonodos negativos. Vários autores^{49,56,58} não confirmaram esses achados.

MIB-1 E PCNA

A atividade mitótica, vista em histopatologia, é um indicador do ciclo celular, mas a contagem de mitoses requer padronização e envolve algum grau de subjetividade.¹⁶ Atualmente existem técnicas que permitem a avaliação, por imuno-

histoquímica, da proliferação celular pela detecção e quantificação de proteínas celulares que somente existem durante a proliferação celular. Vários antígenos têm sido identificados, incluindo o MIB-1 (para material parafinado), o Ki-67 (para material congelado) e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).^{16,59}

O PCNA é uma proteína de 36 kD e aparece no núcleo da célula da fase G1 tardia à fase S do ciclo celular. O MIB-1 é um anticorpo direto contra partes do antígeno Ki-67. Uma alta proporção de células tumorais coradas pelo MIB-1 ou pelo Ki-67 e pelo PCNA associa-se com alto grau de diferenciação tumoral e indica um pior prognóstico.^{16,59}

O MIB-1 e o Ki-67 são proteínas nucleares não-histona encontradas em todas as fases do ciclo celular, menos na G₀. Uma alta proporção de células tumorais corando para MIB-1 ou Ki-67 associa-se positivamente a um tumor de pouca diferenciação e inversamente ao número de receptores estrogênicos, indicando um prognóstico ruim.^{16,59} O PCNA é também uma proteína nuclear não-histona que funciona como uma proteína acessória à ADN polimerase delta. Seus níveis correlacionam-se à proliferação celular e, especificamente, à síntese de ADN. Sua medição feita numa série de tumores mostrou associações com a atividade mitótica e o grau tumoral.⁶⁰

Tumores bem diferenciados tendem a ter baixo índice de proliferação, enquanto que os de alto grau tendem a ter alto índice de proliferação, tanto do MIB-1 ou Ki-67, quanto do PCNA. Os tumores que apresentam altas taxas de proliferação celular, na grande maioria das vezes, são tumores de alto grau de malignidade e também são mais sensíveis ao tratamento, pois a maioria das drogas anti-neoplásicas são mais eficazes contra células mais rapidamente proliferativas.¹⁶

Crosier et al.⁶¹ comparando cânceres de mama detectados por mamografia (*screening*) e aqueles que surgem no intervalo entre duas mamografias (dois *screenings*) evidenciaram que os últimos, na análise univariada, apresentavam maiores dimensões, alto grau histológico e eram RE negativos, p53 positivos, Ki-67 positivos e c-*erbB-2* positivos. Na regressão logística, as variáveis de maior peso foram o Ki-67 e o c-*erbB-2*. Estes tumores apresentaram níveis muito aumentados de proliferação celular.

p53

Generalidades

O gene supressor de tumor TP53 (ou p53), localizado no cromossomo 17p13.1, codifica uma fosfoproteína de 53 kDa que desempenha um importante papel no controle do ciclo celular e previne o aparecimento do câncer. A proteína p53 tem o papel de bloquear a divisão celular em células que sofreram injúrias no seu ADN, dando tempo para a sua reparação; se esta falha, a expressão mantida do p53 dispara a cascata da apoptose. A perda da função desse gene pode estar relacionada tanto à iniciação quanto à progressão tumoral.^{45,62}

Mutações em regiões diferentes da proteína p53 podem resultar em diferentes efeitos biológicos. A imunorreatividade nuclear do p53 tem sido considerada um indicador indireto de mutação do gene p53. Suas mutações constituem a anormalidade molecular mais comumente encontrada nos tumores sólidos do homem e são achadas numa alta proporção dos tumores de mama, onde estão associadas a tumores mais agressivos e a um pior prognóstico.^{63,64}

As mutações no gene p53 em câncer de mama foram identificadas em cerca de 15 a 40% dos tumores esporádicos e na linhagem germinativa de pacientes com *Síndrome de Li-Fraumeni*, uma síndrome de câncer hereditário associada ao câncer de mama. Essas mutações em carcinomas de mama esporádicos têm sido associadas com alto grau histológico e baixos níveis de receptores de estrogênio e progesterona.⁶²

Um fato que deve sempre ser considerado quando se lida com o p53 imuno-histoquimicamente é que a sua expressão aumentada pode ocasionalmente não estar relacionada à mutação do gene p53 e, inversamente, a mutação do gene p53 pode ocorrer sem a expressão aumentada do p53.⁴⁵

Em muitos tumores humanos, a expressão aumentada do p53 está associada a parâmetros biológicos e histológicos de agressividade. Vários investigadores têm sugerido um possível valor prognóstico para a expressão imuno-histoquímica do p53 em carcinomas de mama. Entretanto, os resultados desses estudos em carcinomas de

mama são, pelo menos em parte, conflitantes, e é difícil de se comparar os resultados obtidos, devido às diversas metodologias e técnicas utilizadas.^{45,62,65,66}

Uma boa correlação entre os resultados de imuno-histoquímica, e a ocorrência de mutação, detectada por métodos moleculares, tem sido observada quando se consideram tumores com pelo menos 25% de células positivamente coradas. Alguns estudos têm relatado a existência de uma associação entre a amplificação do oncogene *c-erbB-2* e o acúmulo da proteína p53.⁶²

Análise da literatura

Para comparar os resultados dos artigos publicados sobre a expressão aumentada do p53 na sobrevida dos carcinomas de mama, Barbareschi,⁴⁵ analisou alguns dos mais relevantes aspectos de 37 estudos envolvendo uma população total de 9.860 pacientes. Os artigos foram subdivididos em três grupos:

a) 12 artigos (4.510 pacientes) encontraram que a expressão aumentada do p53 teve valor prognóstico independente na sobrevida dos carcinomas de mama;

b) 11 artigos (2.331 pacientes) encontraram associação entre a expressão aumentada do p53 e uma pior sobrevida nos carcinomas de mama somente na análise univariada ou somente em pequenos subgrupos dos pacientes investigados;

c) 12 artigos (3.021 pacientes) não mostraram qualquer valor da expressão aumentada do p53 na sobrevida dos pacientes.

Barbareschi⁴⁵ encontrou, ainda, na literatura, algumas associações entre o p53 e outros fatores prognósticos do câncer de mama (número de estudos onde se pesquisou/número de estudos onde se encontrou a associação): associações do p53 com:

- a) alto grau nuclear e/ou alto grau histológico (6/7);
- b) receptores de estrogênio negativos (8/11);
- c) grande tamanho de tumor (1/12);
- d) linfonodos positivos (1/8);
- e) receptores de progesterona negativos (7/9);
- f) alto número de mitoses (0/1);
- g) expressão aumentada de *c-erbB-2* (2/4);
- h) Ki-67 (1/1).

CONCLUSÕES

Os grandes avanços na Biologia Molecular, ocorridos na última década, contribuíram bastante para o desenvolvimento dos marcadores tumorais. A sua utilização, sempre crescente, na avaliação do prognóstico do câncer de mama se dá em decorrência de que o uso de fatores prognósticos convencionais pode identificar apenas as pacientes que têm um excelente ou um péssimo prognóstico. Para as remanescentes, os indicadores prognósticos atuais não são suficientemente sensíveis para determinar decisões terapêuticas. Um dos caminhos para se diminuir a mortalidade por câncer de mama seria a procura de marcadores que poderiam ajudar o clínico a identificar pacientes com tumores potencialmente agressivos, para a instituição de terapia que poderia alterar o curso da doença. Alguns marcadores tumorais e suas relações com o prognóstico são discutidos:

Cerca de dois terços dos carcinomas de mama são RH positivos (RE e/ou RP) e esta positividade está altamente associada com a idade da paciente e existe uma relação inversa com o tamanho do tumor, o grau histológico e o grau nuclear. Os tumores RH positivos têm um prognóstico mais favorável e respondem melhor à terapia hormonal.

O *c-erbB-2* é um proto-oncogene que ocorre em cerca de 20% de todos os cânceres de mama e os tumores que exibem amplificação deste proto-oncogene, geralmente, apresentam um pior prognóstico. A maioria dos tumores *c-erbB-2* positivos respondem melhor à quimioterapia não hormonal.

A catepsina D é um outro marcador tumoral que, segundo alguns autores, está associado a um pior prognóstico.

Existe uma associação positiva entre o grau histológico e o índice de proliferação celular, sendo o MIB-1 e o PCNA dois marcadores que medem essa proliferação (atividade mitótica). Os tumores que exibem um alto índice de proliferação celular são, na maioria das vezes, mais sensíveis às drogas anti-neoplásicas.

A mutação do gene p53 é um fenômeno comum em numerosos tumores humanos, especialmente nos carcinomas de mama. A expressão aumentada do p53 está associada, segundo alguns autores, a tumores mais agressivos e a um pior prognóstico.

Não existe consenso, na literatura, sobre os resultados aqui apresentados e estas controvérsias podem ser explicadas, em parte, pela falta de homogeneidade nos diferentes estudos. Algumas das razões para as discrepâncias são as que se seguem:

- a) grande variação do número de casos nas diferentes séries;
- b) diferentes métodos de fixação dos tecidos;
- c) variação de técnicas e de metodologias utilizadas nos diferentes trabalhos;
- d) o uso de diferentes métodos de recuperação de antígenos (em imuno-histoquímica);
- e) o uso de diferentes anticorpos em imuno-histoquímica (mono ou policlonais);
- f) diferentes critérios da avaliação da positividade para os diferentes antígenos.^{28,40}

Deve-se ter muito cuidado ao se lidar com os marcadores tumorais como fatores prognósticos do câncer de mama, pois ainda se tem muito a aprender sobre eles. São necessários mais estudos prospectivos para serem confirmadas as associações entre os marcadores tumorais e outros fatores prognósticos importantes para o câncer de mama. Para alcançar a resposta precisa, há necessidade de grandes estudos cooperativos que possam avaliar a sobrevida das pacientes em relação a estes marcadores, utilizando métodos uniformes, em grandes séries de pacientes, tratadas de uma maneira homogênea e com seguimentos superiores a 10 anos.^{40,45,62}

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andriolo A. Marcadores tumorais. Rev Bras Med 1996;53:641-53.
2. Rosen PP. Breast Pathology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
3. Cote RJ, Taylor CR. Immunohistochemical detection of steroid hormone receptors. In: Taylor CR, Cote RJ, eds. Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. 2th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. (Major problems in pathology; vol. 19).
4. Wilkens C, Beck T, Weikel W, Brumm C, Pollow K. Hormone receptor determination in breast carcinoma tissue. Comparison of recent immunohistologic techniques with biochemical receptor. Pathologie 1995; 16:256-61.

5. Charalambous D, Kitchen PR, Stillwell RG, Smart PJ, Rode J. A comparison between radioligand and immunohistochemical assay of hormone receptors in primary breast cancer [Abstract]. *Austral N Zeal J Surg* 1993;63(8):637-41.
6. MacGrogan G, Soubeyran I, De Mascarel I, et al. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in breast invasive ductal carcinomas: a correlative study of 942 cases. *Appl Immunohistochem* 1996;4:219-27.
7. Masood S, Dee S, Goldstein JD. Immunocytochemical analysis of progesterone receptors in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1991;96:59-63.
8. Patino JF, Cavanzo C, Francisco J. Receptores de estrogênio en cancer mamario: demostracion inmuno-histoquimica con anticuerpos monoclonales / Estrogen receptors in breast cancer: immunohistochemical demonstration with monoclonal antibodies [Abstract]. *Cirurgía (Bogotá)* 1988;3:5-8.
9. Elliott RL, Head JF, McCoy JL. Comparison of estrogen and progesterone receptor status to lymphocyte immunity against tumor antigens in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1994;30:299-304.
10. Kuukasjärvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncol* 1996;14:2584-89.
11. Stierer M, Rosen H, Weber R, et al. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg* 1993;218:13-21.
12. Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Principles & Practice of Oncology* 1990;4:1-11.
13. Mauri FA, Maisonneuve P, Caffo O, et al. Prognostic value of estrogen receptor status can be improved by combined evaluation of p53, Bcl2 and PgR expression: an immunohistochemical study on breast carcinoma with long-term follow-up. *Int J Oncol* 1999;15:1137-47.
14. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994;74:381-400.
15. Beckmann MW, Niederacher D, Massenkeil G, et al. Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/*neu*: no advantage of prediction of recurrence or survival in breast cancer patients. *Oncology* 1996;53:441-7.
16. Leong ASY, Lee AKC. Biological indices in the assessment of breast cancer. *J Clin Pathol: Clin Mol Pathol* 1995;48:M221-38.
17. Shimizu C, Fukutomi T, Tsuda H, et al. C-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues. *J Surg Oncol* 2000;73:17-20.
18. Thorpe SM. Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res* 1987;47:6125-33.
19. Hendricks JB, Wilkinson EJ. Comparison of two antibodies for evaluation of estrogen receptors in paraffin-embedded tumors [Abstract]. *Mod Pathol* 1993;6:765-70.
20. Reiner A, Neumeister B, Spona J, et al. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:7057-61.
21. Stierer M, Rosen H, Weber R, et al. A prospective analysis of immunohistochemically determined hormone receptors and nuclear features as predictors of early recurrence in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36:11-21.
22. Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980; 46:2884-8.
23. Nicholson RI, Bouzubar N, Walker KJ, et al. Hormone sensitivity in breast cancer: influence of heterogeneity of oestrogen receptor expression and cell proliferation. *Eur J Cancer* 1991;27:908-13.
24. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *her-2/neu* oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
25. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the *her-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
26. Barnes DM. C-*ErbB-2* amplification in mammary carcinoma [Abstract]. *J Cell Biochem Suppl* 1993;17g:132-8.
27. Têtu B, Brisson J. Prognostic significance of *her-2/neu* oncoprotein expression in node-positive breast cancer: the influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer* 1994;73:2359-65.
28. Bobrow LG, Happerfield LC, Millis RR. Comparison of immunohistological staining with different antibodies to the *c-erbB-2* oncoprotein. *Appl Immunohistochem* 1996;4:128-34.

29. De Potter CR, Schelfhout AM. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Archiv* 1995;426:107-15.
30. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, et al. Immunohistochemical detection of her2/*neu* in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma: a study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer* 1995;75:1320-6.
31. Allred DC, Clark GM, Molina R, 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;23:974-9.
32. Castiglioni T, Elsner B, Curutchet HP, Mostesions M, Debonis D. Análisis inmunohistoquímico de p53 y c-*erbB-2* en el carcinoma de mama / immunohistochemical analysis of p53 and c-*erbB-2* in breast cancer. *Medicina (B Aires)* 1995;55:415-20.
33. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al. C-*erbB-2* overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph-node metastases. *J Clin Oncol* 1996;14:2702-8.
34. Pierce LJ, Merino MJ, D'angelo T, et al. Is c-*erbB-2* a predictor for recurrent disease in early stage breast cancer? [Abstract]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;28:395-403.
35. Barbati A, Cosmi EV, Sidoni A, et al. Value of c-*erbB-2* and p53 oncoprotein co-over-expression in human breast cancer. *Anticancer Res* 1997;17:401-5.
36. Molland JG, Barraclough BH, Gebiski V, Milliken J, Bilous M. Prognostic significance of c-*erbB-2* oncogene in axillary node-negative breast cancer. *Austral N Zeal J Surg* 1996;66:64-70.
37. Marks JR, Humphrey PA, Wu K, et al. Overexpression of p53 and her-2/*neu* proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg* 1994; 219:332-41.
38. O'malley FP, Saad FZ, Kerkvliet N, et al. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-*erbB-2* in lymph node-negative breast cancer. *Hum Pathol* 1996;27:955-63.
39. Haerslev T, Jacobsen GK. C-*erbB-2* oncoprotein is not an independent prognostic parameter in primary breast cancer. *Acta Pathol, Microbiol Immunol Scand* 1994;102:612-22.
40. Keshgegian AA. ErbB-2 oncoprotein overexpression in breast carcinoma: inverse correlation with biochemically - and immunohistochemically - determined hormone receptors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35:201-10.
41. Chariyalertsak S, Cheirsilpa A, Sugano K, Ohkura H. Immunohistochemical detection of c-*erbB-2* oncoprotein in patients with breast cancer [Abstract]. *J Med Assoc Thai* 1996;79:715-21.
42. Chen Y, Dong J, Li C. Amplification and overexpression of c-*erbB-2* in human breast cancer. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* 1995;17:16-9.
43. Mitra I, Redkar AA, Badwe RA. Prognosis of breast cancer: evidence for interaction between c-*erbB-2* overexpression and number of involved axillary lymph nodes. *J Surg Oncol* 1995;60:106-11.
44. Aryandono T, Harijadi & Ghozali A. Correlation of clinical, pathological status, hormone receptor and C-erbB-2 oncoprotein in breast cancer patients. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27(suppl):600-6.
45. Barbareschi M, Leonardi E, Mauri FA, Serio G, Palma PD. P53 and c-*erbB-2* protein expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferating markers, and clinical stage in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1992;98:408-18.
46. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-*erbB2* is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1999;79:1220-6.
47. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of her-2/*neu* antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54:2771-7.
48. Isola J, Weitz S, Visakorpi T, et al. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:36-43.
49. Aaltonen M, Lipponen P, Kosma VW, Aaltomaa S, Syrjänen K. Prognostic value of cathepsin d expression in female breast cancer [Abstract]. *Anticancer Res* 1995;15:1033-7.
50. Derossi DR, Bacchi CE. Cathepsina d em carcinoma de mama: correlação com grau histológico e receptor de estrogênio. *J Bras Patol* 1995;31:100-5.
51. Nakopoulou L, Lazaris AC, Baltas D, et al. Prognostic evaluation of oestrogen-regulated protein immunoreactivity in ductal invasive (nos) breast cancer. *Virchows Archiv* 1995;427:33-40.

52. Göhring UJ, Scharl A, Thelen U, et al. Prognostic value of cathepsin d in breast cancer: comparison of immunohistochemical and immunoradiometric detection methods. *J Clin Pathol* 1996; 49:57-64.
53. Göhring UJ, Scharl A, Thelen U, Ahr A, Crombach G. Comparative prognostic value of cathepsin d and urokinase plasminogen activator, detected by immunohistochemistry, in primary breast carcinoma [Abstract]. *Anticancer Res* 1996;16:1011-8.
54. Iwaya K, Tsuda H, Fukutomi T, et al. Histologic grade and p53 immunoreaction as indicators of early recurrence of node-negative breast cancer [Abstract]. *Jpn J Clin Oncol* 1997;27:6-12.
55. Stonelake PS, Baker PG, Gillespie WM, et al. Steroid receptors, Ps2 and cathepsin d in early clinically node-negative breast cancer [Abstract]. *Eur J Cancer* 1994;30a:5-11.
56. Itoh Y, Kobayashi S, Iwase H, et al. Clinical significance of cathepsin d assay in breast cancer tissues. *J Surg Oncol*, 1995;60:221-6.
57. Pujol P, Maudelonde T, Daures JP, et al. A prospective study of the prognostic value of cathepsin d levels in breast cancer cytosol. *Cancer* 1993;71:2006-12.
58. Eng Tan P, Benz CC, Dollbaum C, et al. Prognostic value of cathepsin d expression in breast cancer: immunohistochemical assessment and correlation with radiometric assay. *Ann Oncol* 1994;5:329-36.
59. Jeziorski A, Blonski JZ, Niewiadomska H. The expression of products of oncogens c-erbB2 and EGFR and proliferating antigens Ki67 and PCNA in primary invasive ductal cancer of female breast. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19:61-7.
60. 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.
61. Crosier M, Scott D, Wilson RG, Griffiths CD, May FE, Westley BR. Differences in Ki67 and c-erbB2 expression between screen-detected and true interval breast cancers. *Clin Cancer Res* 1999;5:2682-8.
62. Nagai MA. Alterações genéticas em câncer de mama. *Rev Bras Mastol* 1995; 5:31-41.
63. Ozbun MA, Butel JS. Tumor supressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis [Abstract]. *Adv Cancer Res* 1995;66:71-141.
64. Elledge RM, Allred DC. The p53 tumor supressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:39-47.
65. Naidu R, Yadav M, Nair S, Kutty KK. Immunohistochemical analysis of p53 expression in primary breast carcinomas. *Anticancer Res* 1998;18:65-70.
66. el-A Helal T, Khalifa A, Kamel AS. Immunohistochemical expression of p53 and c-erbB2 proteins in breast cancer in Egypt. *Anticancer Res* 2000;20:2145-50.