

RAQUEL MARY RODRIGUES PERES<sup>1</sup>SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN<sup>2</sup>JULIANA KARINA RUIZ HEINRICH<sup>3</sup>KÁTIA PITON SERRA<sup>4</sup>GLAUCE APARECIDA PINTO<sup>5</sup>FERNANDO AUGUSTO SOARES<sup>6</sup>LUÍS OTÁVIO ZANATTA SARIAN<sup>7</sup>

# Expressão da proteína erbB-2 e dos receptores de hormônios na transição das regiões *in situ* para invasora de tumores da mama

*ErbB-2 expression and hormone receptor status in areas of transition from *in situ* to invasive ductal breast carcinoma*

## Artigo original

### Palavras-chave

Neoplasias da mama/patologia  
Neoplasias da mama/metabolismo  
Receptor erbB-2/metabolismo  
Receptores estrogênicos/metabolismo  
Receptores de Progesterona/metabolismo  
Invasividade neoplásica

### Keywords

Breast neoplasms/patologia  
Breast neoplasms/metabolism  
Receptor, erbB-2/metabolism  
Receptors, estrogen/metabolism  
Receptors, progesterone/metabolism  
Neoplasm invasiveness

### Resumo

**OBJETIVOS:** avaliar a expressão de erbB-2 e dos receptores hormonais para estrógeno e progesterona (RE/RP) nas regiões de transição entre as frações *in situ* e invasoras de neoplasias ductais da mama (CDIS e CDI, respectivamente). **MÉTODOS:** oitenta e cinco casos de neoplasias mamárias, contendo regiões contíguas de CDIS e CDI, foram selecionados. Espécimes histológicos das áreas de CDIS e de CDI foram obtidos através da técnica de tissue microarray (TMA). As expressões de erbB-2 e dos RE/RP foram avaliadas por meio de imunistoquímica convencional. A comparação da expressão de erbB-2 e dos RE/RP nas frações *in situ* e invasoras da mama foi realizada com emprego do teste de McNemar. Os intervalos de confiança foram determinados em 5% ( $p=0,05$ ). Foram calculados coeficientes de correlação intraclasse (ICC) para avaliar a concordância na tabulação cruzada da expressão de erbB-2 e RE/RP nas frações de CDIS e CDI. **RESULTADOS:** a expressão de erbB-2 não diferiu entre as áreas de CDIS e CDI ( $p=0,38$ ). Comparando caso a caso suas áreas de CDIS e CDI, houve boa concordância na expressão de erbB-2 (coeficiente de correlação intraclasse, ICC=0,64), dos RP (ICC = 0,71) e dos RE (ICC = 0,64). Considerando apenas tumores cujo componente *in situ* apresentasse áreas de necrose (comedo), o ICC para erbB-2 foi de 0,4, comparado a 0,6 no conjunto completo de casos. Os ICC não diferiram substancialmente daqueles obtidos com o conjunto completo de espécimes em relação aos RE/RP: para RE, ICC=0,7 (versus 0,7 no conjunto completo), e para RP, ICC=0,7 (versus 0,6 no conjunto completo). **CONCLUSÕES:** nossos achados sugerem que as expressões de erbB-2 e RE/RP não diferem nos componentes contíguos *in situ* e invasivo em tumores ductais da mama.

### Abstract

**PURPOSE:** to evaluate the expression of erbB-2 and of the estrogen and progesterone (ER/P) hormonal receptors in the transition regions between the *in situ* and the invasive fractions of ductal breast neoplasia (ISDC and IDC, respectively). **METHODS:** Eighty-five cases of breast neoplasia, containing contiguous ISDC and IDC areas, were selected. Histological specimens from the ISDC and the IDC areas were obtained through the tissue microarray (TMA) technique. The erbB-2 and the ER/PR expressions were evaluated through conventional immunohistochemistry. The McNemar's test was used for the comparative analysis of the expressions of erbB-2 protein and the ER/PR in the *in situ* and invasive regions of the tumors. The confidence intervals were set to 5% ( $p=0.05$ ). Intraclass correlation coefficients (ICC) were calculated to assess the cross-tabulation agreement of the erbB-2 and the ER/PR expression in the ISDC and the IDC areas. **RESULTS:** the erbB-2 expression has not differed between the ISDC and the IDC areas ( $p=0.38$ ). Comparing the two areas in each case, there was agreement in the expression of erbB-2 (ICC=0.64), PR (ICC=0.71) and ER (ICC=0.64). Restricting the analysis to tumors with the *in situ* component harboring necrosis (comedo), the ICC for erbB-2 was 0.4, compared to 0.6 for the whole sample. In this select group, the ICC for PR/ER did not differ substantially from those obtained with the complete dataset: as for the ER, ICC=0.7 (versus 0.7 for the entire sample) and for PR, ICC=0.7 (versus 0.6 for the entire sample). **CONCLUSIONS:** our findings suggest that the erbB-2 and the ER/PR expressions do not differ in the contiguous *in situ* and invasive components of breast ductal tumors.

### Correspondência:

Luís Otávio Zanatta Sarian  
Área de Oncologia Ginecológica e Patologia Mamária do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Rua Alexander Fleming, 101 – Cidade Universitária  
CEP: 13083-881 – Campinas (SP), Brasil  
Fone: (19) 3521-9384  
E-mail: sarian@terra.com.br

### Recebido

22/7/09

### Aceito com modificações

18/8/09

Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Pós-graduanda (Doutorado) do Programa de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Livre-docente do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Supervisora da Seção de Laboratórios Clínicos Especializados do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas – CAISM-UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Pós-graduanda (Mestrado) do Programa de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Supervisora do Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

<sup>6</sup> Professor Titular de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil. e Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, Fundação Antônio Prudente.

<sup>7</sup> Professor do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## Introdução

Recentes evidências apoiam o conceito de que a evolução do carcinoma ductal *in situ* (CDIS) da mama para a forma invasora (CDI) seja controlada por um pequeno número de genes<sup>1</sup>. Mais da metade do CDIS evolui para CDI, apesar da alta variabilidade em termos de tempo para que tal transformação ocorra. De 11 a 20% do CDIS estão associados com CDI quando completamente removidos, e entre 1 e 32% dos casos de recorrência de CDIS ocorrem na forma invasora. As principais alterações nos padrões de expressão gênica ocorrem na transição do tecido mamário normal para CDIS. Na fase de transição de CDIS para CDI, as alterações genômicas são menos intensas<sup>2</sup>. A avaliação histológica se mostrou insuficiente para prever o potencial de evolução para formas invasoras<sup>3</sup>, e os mecanismos moleculares responsáveis por esta evolução são pouco conhecidos.

Os marcadores biológicos atualmente usados na predição do prognóstico e planejamento terapêutico para o carcinoma da mama, seja CDIS ou CDI, são os receptores de estrógenos (RE) e progesterona (RP) e a expressão da proteína erbB-2. O gene responsável pela codificação da proteína erbB-2 está amplificado em cerca de 30% dos casos de CDI, e em mais de 60% do CDIS de alto grau. A erbB-2, uma proteína transmembrana, está envolvida em uma série de processos biológicos importantes, como: ciclo celular, apoptose, migração e adesão celular. A erbB-2 pertence à família dos receptores epidérmicos de controle do crescimento (EGFR), tendo função tirosina quinase<sup>4,5</sup>. Já o estrógeno é um dos fatores mais importantes na estimulação da multiplicação e desenvolvimento celular no câncer de mama. O RE faz parte da família dos receptores nucleares, e sua forma “alfa” está expressa em mais da metade dos CDI<sup>6,7</sup>.

Muitos estudos foram conduzidos com o intuito de avaliar se esses marcadores seriam capazes de prever o potencial de invasão futura do CDIS, e os resultados foram decepcionantes. A maior parte dos relatos é concordante em afirmar que o estado dos receptores hormonais não é um fator prognóstico de importância no CDIS. O mesmo é verdade com relação à expressão da erbB-2, sendo a maioria dos estudos convergentes para o conceito de que, à parte as demais características histológicas do CDIS, esta proteína não teria valor prognóstico adicional<sup>8-10</sup>.

Alguns estudos detectaram que certas áreas de CDI, ao redor de áreas de CDIS com expressão positiva de erbB-2, não expressam a proteína. Este achado levou muitos pesquisadores a suspeitar que a amplificação do gene ERBB2 pode não ser essencial para a progressão do CDIS para CDI<sup>11</sup>. Entretanto, nenhum estudo examinou a expressão dessa proteína e dos receptores hormonais nas regiões onde ocorre a transformação do CDIS para

CDI. Além disso, a maior parte dos estudos disponíveis avaliou grupos diferentes de mulheres com, respectivamente, CDI e CDIS, ou seja, não compararam a expressão dos marcadores em CDIS e CDI no mesmo espécime. O objetivo deste estudo foi, portanto, avaliar a expressão da proteína erbB-2 e dos receptores hormonais nas regiões de transição entre CDIS e CDI. Com esta metodologia, eliminamos fatores de confusão, como backgrounds genéticos diversos (o que ocorreria se os casos de CDI e CDIS fossem obtidos de pacientes diferentes) e clones mutantes diferentes.

## Métodos

### Pacientes

Para este estudo de corte transversal foram selecionados 107 casos de tumores de mama, contendo regiões contíguas de CDI e CDIS. As pacientes haviam sido tratadas com cirurgia no serviço de mastologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) entre 2004 e 2006. As características clínicas e epidemiológicas das mulheres foram obtidas dos prontuários médicos. Foram, então, excluídas da análise 22 mulheres devido a dificuldades técnicas na avaliação concomitante de erbB-2 e dos RE/RP, resultando em uma amostra de 85 casos. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CEP #314/2008). Por conta da natureza retrospectiva do estudo, os pesquisadores foram eximidos de obter consentimento informado das mulheres.

A amostra foi composta por mulheres com média etária de 45 anos. Doze mulheres tinham história familiar de câncer de mama, 33 tinham tumores com diâmetro menor que 2,0 cm, e apenas três mulheres tinham doença estágio IV. A maioria (76/85) dos tumores era de alto grau. Considerando os componentes *in situ*, aproximadamente 38% das lesões foram classificadas como carcinoma e 66% foram consideradas como sendo de alto grau nuclear (grau 3). A maioria (90%) dos componentes CDI foi considerada como “pouco diferenciados” (Tabela 1).

### Características dos espécimes

Lâminas para coloração com hematoxilina e eosina foram produzidas a partir dos blocos originais que contivessem regiões contíguas de CDI e CDIS. Um patologista experiente usou essas lâminas para determinar as melhores e mais representativas áreas de CDI e CDIS para a montagem dos tissue microarrays (TMA). Uma das principais preocupações era a de que tais áreas deveriam ser contíguas. Com base nas marcações do patologista, cilindros de tecido com 1 mm de diâmetro foram obtidos dos blocos doadores e arranjados em um único bloco de

TMA. As lâminas foram, então, cortadas a partir destes blocos, sobre as quais os testes de imunistoquímica foram realizados, conforme técnica descrita a seguir.

### ■ Técnicas de detecção

As lâminas para imunistoquímica foram desparafinizadas com xilol e desidratadas em uma série de álcoois. Lavagens em peróxido de hidrogênio foram realizadas, seguidas por lavagens em água destilada. Para recuperação dos antígenos, banhos em vapor foram usados e as lâminas foram imersas em tampão citrato com pH 6,0 durante 30 minutos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e novamente lavadas em água destilada. Após esse procedimento, as lâminas foram incubadas em câmara úmida, com o anticorpo primário específico, a 4°C (erbB-2: clone CB11/diluição 1:200, Novocastra; RE: clone 6F11/diluição 1:80, Novocastra; RP: clone PGR312/diluição 1:100, Novocastra). As lâminas foram lavadas em PBS pH entre 7,4 e 7,6.

Como sistema de detecção, a lâmina foi incubada em polímero Novolink (Novocastra) a 37°C por uma hora e lavada em PBS. Depois, foi aplicado substrato DAB (3'-diaminobenzidina, SIGMA, # D5637) na proporção de 0,06 g para 100 mL de PBS, 500 microlitros de peróxido de hidrogênio a 3% de dimetilsulfoxido (DMSO) a 37°C por cinco minutos. Finalmente, a lâmina foi lavada em água de torneira e contracorada com hematoxilina. Após serem desidratadas, as lâminas foram montadas em resina (Entellan®). Controles positivos internos e externos foram usados para validar as reações. Os procedimentos de montagem das lâminas de TMA foram realizados no Hospital do Câncer AC Camargo, em São Paulo.

### ■ Imunistoquímica

As colorações para erbB-2 e ER/PR foram avaliadas por um único examinador, que não estava informado sobre as características clínicas e patológicas da doença. Dois conjuntos de TMA foram usados para cada marcador, ou seja, cada área tumoral foi avaliada duplamente. Na análise *post-boc*, se os escores diferissem entre cada uma das avaliações, a coloração mais intensa era a considerada. Para a erbB-2, a coloração das membranas celulares foi considerada, enquanto a coloração nuclear foi usada para RE e RP.

A coloração para erbB-2 foi graduada em quatro categorias: 0 (negativo): nenhuma coloração; 1+: coloração em <10% das células tumorais de fraca intensidade; 2+: coloração em 10% a 30% das células tumorais de moderada intensidade, incompleta na membrana; 3+: coloração de forte intensidade, em toda a membrana, em >30% das células tumorais (Figura 1)<sup>12</sup>. O percentual de núcleos celulares corados para RE/RP foi categorizado em três grupos: negativo, com menos de 10% dos núcleos

**Tabela 1 - Principais características clínicas das mulheres incluídas no estudo**

Característica	n	%
<b>Idade</b>		
<54	46	54
≥54	39	46
<b>Histórico familiar de câncer de mama</b>		
Sim	12	14
Não	73	86
<b>Linfonodos axilares</b>		
Negativo	36	43
1-2 linfonodos acometidos	23	27
3 ou mais	26	16
<b>Tamanho do tumor</b>		
<2,0 cm	33	39
2,0 para 5,0	33	39
>5,0 cm	19	22
<b>Estádio</b>		
I	20	23
II	26	30
III	36	42
IV	3	4
<b>Componente <i>in situ</i> tipo comedo</b>		
Não	53	62
Sim	32	38
<b>Componente invasivo grau histológico</b>		
1	2	2
2	7	32
3	76	66

corados; 10 a 50% de núcleos corados; >50% de núcleos corados (Figura 2).

Para fins de análise estatística (Tabela 2), os casos foram dicotomizados, com relação à erbB-2, em negativo (negativo, 1+ e 2+) e positivo (3+), e em relação aos RE/RP, como negativos (<10% dos núcleos corados) ou positivos (≥10% dos núcleos corados). A classificação completa foi usada na tabulação cruzada entre as áreas *in situ* e invasora (Tabelas 3 e 4).

Todos os cálculos estatísticos foram realizados com o programa R para computação estatística<sup>13</sup>. A comparação da expressão da erbB-2 e dos RE/RP nas frações *in situ* e invasoras da mama foi realizada com emprego do teste de McNemar. Os intervalos de confiança foram determinados em 5% (p=0,05). Foram calculados coeficientes de correlação intraclasses (ICC) para avaliar a concordância na tabulação cruzada da expressão de erbB-2 e RE/RP nas frações de CDIS e CDI.

## Resultados

Aproximadamente 31% das áreas CDI foram classificadas como 3+ para erbB-2, comparado a 27% nas regiões de CDIS. Aproximadamente 61% das áreas CDI tiveram expressão de RE em ≥10% dos núcleos, e 69%

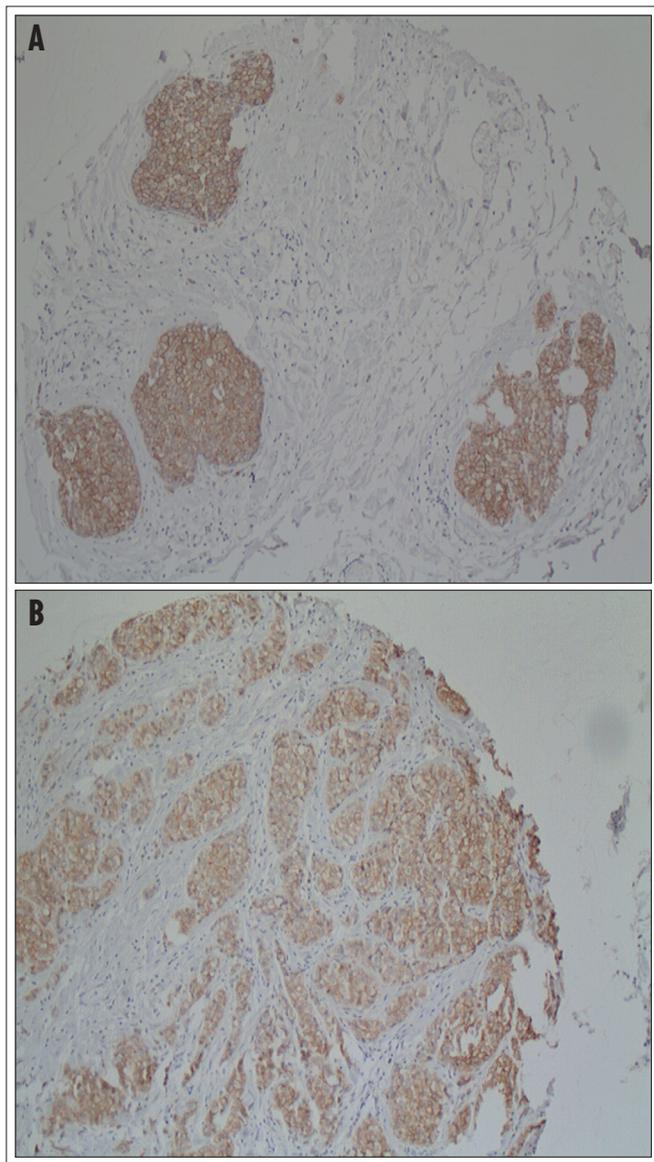


Figura 1 - Expressão concordante 3+ da erbB-2 nas frações *in situ* (A) e invasora (B) de um tumor mamário (X100).

Tabela 2 - Expressão da proteína erbB-2 e dos receptores esteróides nos componentes *in situ* e invasor

Marcadores	Componente				Valor de p
	<i>in situ</i>		Invasor		
	n	%	n	%	
<b>erbB-2</b>					
Até 2+	62	73	65	69	0,38
3+	23	27	20	31	
<b>Receptor de estrógeno</b>					
Negativo	26	31	33	39	0,12
≥10%	59	69	52	61	
<b>Receptor de progesterona</b>					
Negativo	43	51	57	67	<0,01
≥10%	42	49	28	33	

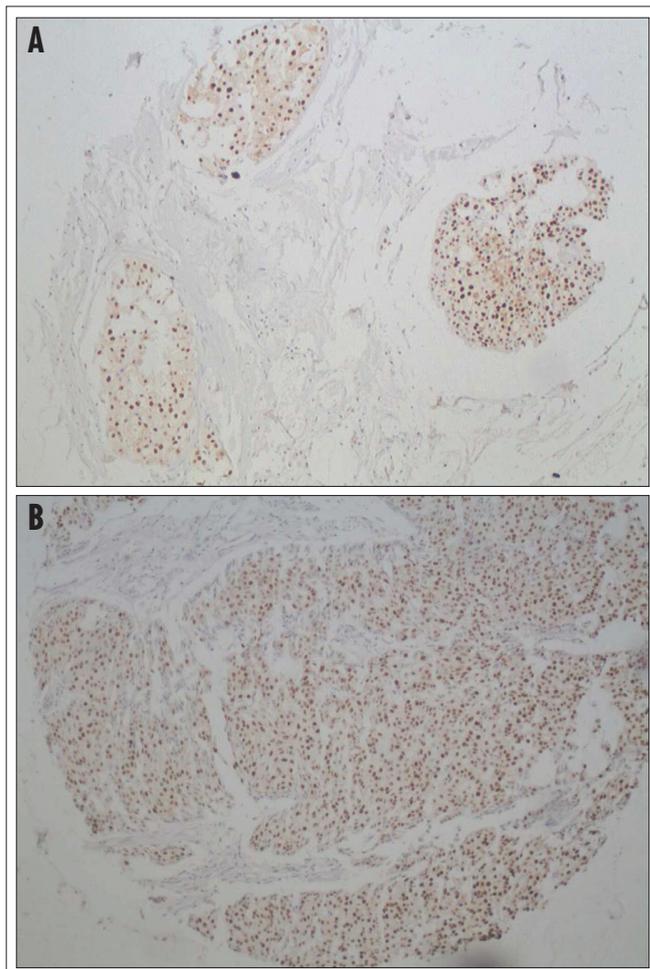


Figura 2 - Expressão concordante >50% de receptores de estrógeno nas frações *in situ* (A) e invasora (B) de um tumor mamário (X100).

Tabela 3 - Tabulação cruzada da expressão da erbB-2 e dos RE/RP nas frações *in situ* e invasoras dos tumores mamários

Componente <i>in situ</i>	Componente invasor				ICC
	Negativo	1+	2+	3+	
<b>erbB2</b>					
Negativo	43	2	2	2	0,6
1+	4	2	2	3	
2+	0	0	2	0	
3+	7	0	1	15	
<b>RE</b>					
Negativo	22	1	3		0,7
≥10% a <50%	2	3	8		
≥50%	9	6	31		
<b>RP</b>					
Negativo	41	2	0		0,6
≥10% a <50%	14	7	4		
≥50%	2	6	9		

RP: receptor de progesterona; RE: receptor de estrógeno.  
ICC: coeficientes de correlação intraclassa.

**Tabela 4** - Tabulação cruzada da expressão da erbB-2 e dos RE/RP nas frações *in situ* (comedo) e invasoras dos tumores mamários

Componente <i>in situ</i> (comedo)		Componente invasor				ICC
erbB2	Negativo	1+	2+	3+		
Negativo	15	1	1	2	0,4	
1+	2	0	0	1		
2+	0	0	0	0		
3+	1	0	0	9		
RE		Negativo	≥10 a <50%	≥50%	0,7	
Negativo	11	0	2			
≥10 a <50%	1	1	3			
≥50%	4	2	8			
RP		Negativo	≥10 a <50%	≥50%	0,7	
Negativo	19	0	0			
≥10 a <50%	6	2	1			
≥50%	0	1	3			

RP: receptor de progesterona; RE: receptor de estrógeno.  
ICC: coeficientes de correlação intraclasse.

da CDIS expressou este marcador. Com relação aos RP, 33% das frações CDI expressaram o marcador em ≥10% das células, contrastando com 49% nas frações de CDIS. A expressão de erbB-2 não diferiu nas regiões de CDIS e CDI ( $p=0,3$ ). Não houve diferença quanto à expressão de RE ( $p=0,1$ ). Em contraste, houve desequilíbrio em relação aos RP ( $p<0,01$ ) (Tabela 2).

Os coeficientes de correlação intraclasse (ICC) mostraram boa concordância na comparação caso a caso da expressão da erbB-2 (ICC=0,6), de RP (ICC=0,7) e dos RE (ICC=0,6) nos componentes CDI e CDIS. Concordância completa (exatamente o mesmo escore) foi mais comum nas extremidades das escalas, isto é, nos escores negativo e 3+ para erbB-2, e negativo ou >50% para os receptores hormonais. A discordância completa, isto é, expressão negativa em um dos componentes contrastando com expressão máxima no outro ocorreu em apenas dois casos para erbB-2, em três para os RE, e nenhum dos RP (Tabela 3).

Considerando apenas tumores cujo componente *in situ* apresentasse áreas de necrose (comedo), o ICC para erbB-2 foi de 0,4, comparado a 0,6 no conjunto completo de casos. Os ICC não diferiram substancialmente daqueles obtidos com o conjunto completo de espécimes em relação aos RE/RP: para RE, ICC=0,7 (*versus* 0,7 no conjunto completo) e para RP, ICC=0,7 (*versus* 0,6) (Tabela 4).

## Discussão

Nossos achados sugerem que as expressões da erbB-2 e dos RE/RP são muito semelhantes nas frações *in situ* e invasora de neoplasias ductais da mama, especialmente

na região de transição de um componente para o outro. Nosso estudo examinou a expressão destes marcadores na região de transição entre CDIS e CDI. Com essa estratégia, pudemos avaliar regiões fisicamente vizinhas, porém, com perfis morfológicos e com potenciais clínicos distintos. É razoável supor que a transformação maligna (obtenção do potencial de invasão) dos carcinomas *in situ* esteja ocorrendo nestas áreas dos tumores e que, portanto, os processos moleculares que levam a tal transição estejam ativos ali.

Algumas implicações e inferências teóricas podem ser obtidas da análise conjunta de nossos dados com aqueles originados de estudos anteriores. As expressões de receptores esteróides e da proteína erbB-2 são exemplos de fatores preditivos e prognósticos consolidados em patologia mamária, enquanto o papel preditivo e prognóstico das características morfológicas das lesões já foi explorado até seu pleno potencial. As classificações histológicas dos carcinomas *in situ* da mama têm sido usadas amplamente, e resultaram em algumas informações de relevância clínica. No entanto, o papel da biologia molecular como instrumento auxiliar na avaliação dessas lesões ainda está em estudo. Com relação ao gene ERBB2 (que dá origem à proteína erbB2), sabe-se que sua amplificação em casos de câncer de mama está associada à velocidade de proliferação celular, mobilidade celular, invasividade tumoral, evolução locorregional e através de metástases, angiogênese e redução da apoptose<sup>14</sup>. Contudo, a quantidade de informações na literatura sobre a ação deste gene e de sua proteína na passagem do CDIS para CDI é escassa. O conhecimento sobre o papel dos receptores esteróides nesse processo também é muito limitado, o que justifica a realização do presente estudo.

Um estudo recente que analisou a assinatura genética de células epiteliais em tumores com componentes *in situ* e invasor concomitantes demonstrou que ambos os componentes são muito semelhantes. Em contraste, células isoladas de CDIS puro tinham assinaturas muito diferentes daquelas de células encontradas em CDI puro<sup>15</sup>. Esses autores propuseram duas explicações para seus achados: um pequeno número de genes regula a transição de CDIS para CDI, e as alterações moleculares relacionadas à transição da forma CDIS para a CDI precedem em muito tempo as alterações morfológicas detectadas ao microscópio. Essas são explicações perfeitamente aplicáveis aos nossos achados, embora tenhamos que adicionar que, se elas estiverem corretas, é provável que as alterações moleculares que ocorrem antes das transformações morfológicas persistam inalteradas na forma invasora do tumor.

Existem outras linhas atuais de evidência sugerindo o mesmo processo, ou seja, que a manifestação histológica de invasão só ocorre após grandes alterações em nível molecular. Essas alterações moleculares devem se somar

aos fatores do microambiente (decorrentes da ação de células mioepiteliais e estromais) para que o CDIS evolua para CDI<sup>16</sup>. Os fatores do microambiente podem explicar porque alguns CDIS progridem para CDI, enquanto outros CDIS não progridem, embora possuam semelhantes perfis moleculares.

É importante ressaltar que nosso estudo demonstrou que a proteína erbB-2 não está envolvida na aquisição da capacidade de invasão pelos tumores de mama. Em concordância com outros estudos<sup>11,15,17,18</sup>, podemos afirmar que os componentes CDIS e CDI de um determinado tumor mamário costumam ter perfis moleculares semelhantes.

Estudos anteriores sugerem que clones celulares com funções biológicas associadas à invasão podem ser gerados a partir da perda de expressão de RE e aumento da expressão de erbB-2<sup>19,20</sup>. Concomitantemente à perda da expressão de RE e aumento da expressão da proteína erbB-2, tais clones passariam a expressar vários genes relacionados à perda da capacidade de apoptose e aquisição de potencial de invasão. Esses achados foram obtidos a partir da análise comparativa entre células tumorais recobrando áreas de membrana mioepitelial íntegra com células encontradas nas circunvizinhanças de áreas de invasão. Nossos achados não estão em concordância com esses estudos, pois não detectamos diferenças de expressão da erbB-2 e dos RE/RP nas regiões de transição entre CDIS e CDI.

A associação da erbB-2 com achados patológicos específicos da mama foi estudada amplamente na última década. A maior expressão da erbB-2 tem sido consistentemente associada a maiores graus de necrose tipo “comedo” em CDIS<sup>21-24</sup>. A positividade para erbB-2 em CDIS variou de 24 a 38%, discretamente acima daquela em tumores invasores. Nós detectamos a mesma tendência em nossa amostra. É importante citar que a maior proporção de casos positivos para erbB-2 em nossa amostra,

comparada àquela relatada em outros estudos, pode ser decorrente de características clínicas e epidemiológicas, posto que temos alta proporção de casos de alto grau e doença avançada.

Alguns aspectos metodológicos do nosso estudo precisam ser discutidos. O uso da imunistoquímica pode ser aplicado com segurança em combinação com a técnica do TMA, que foi descrita pela primeira vez em 1998<sup>25</sup>, sendo que as vantagens do uso de TMA são o baixo consumo de reagentes e uniformidade da reação em diferentes amostras<sup>25</sup>. Em nosso estudo, a técnica TMA também permitiu a obtenção de amostras em regiões precisas dos tumores de mama, o que tornou viável a avaliação da região de transição CDIS-CDI.

Em essência, nossos achados confirmam a tese de que nem o status da proteína erbB-2 nem a expressão dos RE e RP desenvolvem um papel significativo na progressão do CDIS para o CDI. Nosso estudo, sendo a primeira tentativa de avaliar a zona de transição de um componente para o outro, avalia uma região em que importantes processos moleculares estariam, ao menos em tese, em pleno andamento.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2008/08536-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 307988/2008-2) pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, Fundação Antônio Prudente, agradecemos pela preparação dos blocos de “tissue microarray” e pela preparação das lâminas para avaliação dos marcadores.

## Referências

- Schnitt SJ. The transition from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: the other side of the coin. *Breast Cancer Res.* 2009;11(1):101.
- Wiechmann L, Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer.* 2008;112(10):2130-42.
- Skinner KA, Silverstein MJ. The management of ductal carcinoma in situ of the breast. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(1):33-45.
- Nibs & Mabs. Drogas de alvo molecular na oncologia e hematologia [Internet]. 2008 [citado 2008 Set 6]. Disponível em: <http://www.nibsemabs.com.br/bases.asp?id=1>
- Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol.* 2002;15(12):1318-25.
- Hussein MR, Abd-Elwahed SR, Abdulwahed AR. Alterations of estrogen receptors, progesterone receptors and c-erbB2 oncogene protein expression in ductal carcinomas of the breast. *Cell Biol Int.* 2008;32(6):698-707.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007;87(3):905-31.
- Provenzano E, Hopper JL, Giles GG, Marr G, Venter DJ, Armes JE. Biological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur J Cancer.* 2003;39(5):622-30.
- Wärnberg F, Nordgren H, Bergkvist L, Holmberg L. Tumour markers in breast carcinoma correlate with grade rather than with invasiveness. *Br J Cancer.* 2001;85(6):869-74.

10. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM, Powles TJ, Price P, et al. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and *in situ* breast cancer. *Int J Cancer*. 1988;42(6):842-5.
11. Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E. HER2 status in pure ductal carcinoma *in situ* and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology*. 2006;48(6):702-7.
12. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1323-33.
13. The R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing: reference index [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2009 [cited 2009 Apr 20]. Available from: <http://cran.r-project.org/doc/manuals/refman.pdf>
14. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-87.
15. Castro NP, Osorio CA, Torres C, Bastos EP, Mourão-Neto M, Soares FA, et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Res*. 2008;10(5):R87.
16. Soomro S, Shousha S, Taylor P, Shepard HM, Feldmann M. c-erbB-2 expression in different histological types of invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1991;44(3):211-4.
17. Sommerville JE, Clarke LA, Biggart JD. c-erbB-2 overexpression and histological type of *in situ* and invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1992;45(1):16-20.
18. Iglehart JD, Kerns BJ, Huper G, Marks JR. Maintenance of DNA content and erbB-2 alterations in intraductal and invasive phases of mammary cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;34(3):253-63.
19. Man YG, Zhang Y, Shen T, Zeng X, Tauler J, Mulshine JL, et al. cDNA expression profiling reveals elevated gene expression in cell clusters overlying focally disrupted myoepithelial cell layers: implications for breast tumor invasion. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;89(2):199-208.
20. Man YG, Shen T, Weisz J, Berg PE, Schwartz AM, Mulshine JL, et al. A subset of *in situ* breast tumor cell clusters lacks expression of proliferation and progression related markers but shows signs of stromal and vascular invasion. *Cancer Detect Prev*. 2005;29(4):323-31.
21. Bose S, Lesser ML, Norton L, Rosen PP. Immunophenotype of intraductal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1996;120(1):81-5.
22. Moreno A, Lloveras B, Figueras A, Escobedo A, Ramon JM, Sierra A, et al. Ductal carcinoma *in situ* of the breast: correlation between histologic classifications and biologic markers. *Mod Pathol*. 1997;10(11):1088-92.
23. Mack L, Kerkvliet N, Doig G, O'Malley FP. Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma *in situ* of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erbB2, bcl-2, and ki-67. *Hum Pathol*. 1997;28(8):974-9.
24. Meijnen P, Peterse JL, Antonini N, Rutgers EJ, van de Vijver MJ. Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Br J Cancer*. 2008;98(1):137-42.
25. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.