



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM PATOLOGIA

RENATA KELLY DE ARAÚJO VEIGA

**Expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres
portadoras de doenças tumorais de mama**

Recife, 2007

RENATA KELLY DE ARAÚJO VEIGA

**Expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres
portadoras de doenças tumorais de mama**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Patologia do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Co-orientador:

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo-Júnior

Recife, 2007

Veiga, Renata Kelly de Araújo

Expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais de mama/ Renata Kelly de Araújo Veiga. – Recife: O Autor, 2007.

82 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Proteína cerbB-2 2. Câncer - mama 3. Tumores I. Título.

616-006

CDU (2.ed.)

UFPE

616.07

CDD (22.ed.)

CCB – 2007-136



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: RENATA KELLY DE ARAÚJO VEIGA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

NOME DA TESE: "Expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama"

ORIENTADOR: NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

TESE DEFENDIDA E APROVADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

DATA: 16/08/2007

BANCA EXAMINADORA:

PROFª ANA MARIA DOS ANJOS CARNEIRO LEÃO

PROFº ETENILDO DANTAS CABRAL

PROFª PALOMA LYS DE MEDEIROS

DEDICATÓRIA

A meus pais, Edileuza Veiga e Carnot Veiga,
e meu marido, César Lima,
eternos companheiros que apoiaram minhas decisões,
e me deram todo carinho durante mais uma jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e co-orientador Mário Ribeiro pelos valiosos ensinamentos desde minha graduação, pelos momentos tão agradáveis de pura ciência, por ter sido sempre solícito, mesmo com suas tantas atribuições.

A Jorge Luiz, por sua amizade e bondade, sempre disposto a ajudar os que o cercam. Obrigada, por sua contribuição científica e pelo incentivo moral.

Ao Professor e “orientador amigo”, Nicodemos Teles, pela oportunidade de iniciar cientificamente em seu grupo especial de pesquisa, por estar presente em muitos dos momentos importantes de minha vida acadêmica e pela confiança em mim depositada.

A Dra Consuelo Antunes, pela contribuição dada com seus conhecimentos, diagnóstico dos casos e disponibilização de reagentes para conclusão deste trabalho.

A Napoleão Rodrigues e Iris, pela ajuda na seleção de casos e realização das reações imunohistoquímicas.

A todos de nosso grupo de pesquisa, Carmelita Bezerra, Vasco Malta, Marcos Machado e Luciano Mello, pelas contribuições e pelos momentos de descontração, que por muitas vezes, me fizeram esquecer o cansaço.

Às Dras Paula Loureiro e Virgínia Palermo pelo apoio necessário para desenvolvimento do mestrado.

Às amigas, Bruna Arruda, Amélia Lacerda, Nélia Lima e Eveline Moraes, Telma Araújo e Valquíria pela amizade e força transmitida.

Aos que fazem o LIKA, Moisés Melo, Ilma Maria, Conceição Chimenes e Isabel Oliveira, Vera Santana e Paulo Freitas, em suas diferentes atividades possuem particular importância para o desenvolvimento de nosso trabalho.

E a Deus, meu grande guia, que esteve sempre junto a mim, me impulsionando, inspirando e fortalecendo através de todas estas pessoas especiais às quais agradeço.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1 HISTOFISIOLOGIA DA MAMA.....	14
1.2 CÂNCER, UMA VISÃO GERAL	16
1.3 CÂNCER DE MAMA	18
1.4 DOENÇAS TUMORAIS BENIGNAS DA MAMA	23
1.5 FIBROADENOMA	25
1.6 MARCADORES TUMORAIS	27
1.7 A PROTEÍNA CERBB-2.....	29
1.8 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS EM PATOLOGIA	32
2. JUSTIFICATIVAS.....	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 GERAL	37
3.2 ESPECÍFICOS.....	37
4. ARTIGO	38
4.1 INTRODUÇÃO	39
4.2 METODOLOGIA.....	42
4.2.1 AMOSTRAS DE TECIDO.....	42
4.2.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
4.2.3 ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO	42
4.2.4 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS.....	44
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.4 CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
6. ANEXOS.....	74
ANEXO 1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS.	74
ANEXO 2. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA	74

ANEXO 2. NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	75
ANEXO 3. TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto anatomo-funcional de mama normal de mulher adulta.	12
Figura 2. Localização do carcinoma ductal	16
Figura 3. Aspecto morfológico geral de fibroadenoma.	22
Figura 4. Atividade biológica do Herceptin frente a proteína HER-2.	28
Figura 5. Estação de análise de imagens do Departamento de patologia, CCS-UFPE	42
Figura 6. Análise comparativa da positividade da proteína cerbB-2 em amostras teciduais de mama e carcinoma ductal infiltrante.	46
Figura 7. Análise digital de imagem do número de áreas imunomarcadas pelo anti-cerbB-2 em lesões tumorais da mama.	48
Figura 8. Padrão membranar da imunoexpressão da proteína c-erb-2 em carcinoma ductal infiltrante (Magnificação 200x).	51
Figura 9. Análise comparativa entre o Score qualitativo e análise de imagem da expressão tecidual da proteína cerbB-2.	52
Figura 10. Imagem da tela do programa de análise de imagens (OPTIMAS 6.1), área média de células marcadas (em vermelho).	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da marcação imunohistoquímica de Her-2/neu sugerida pela DAKO.	41
Tabela 2. Distribuição etária das lesões tumorais da mama.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

CDI - Carcinoma Ductal Invasivo
Her-2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor – 2
AFP - Alfafetoproteína
ICAMs - Intercelular Adhesion Molecules
PECAMs - Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
CDs - Antígenos de Citodiferenciação
EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor
FDA – Food and Drug Administration
rhuMAB - Anticorpo monoclonal humanizado recombinante
EGF - Epidermal Growth Factor
FISH - Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization
PCR - Reação em cadeia da Polimerase
CAD - Computer Aided Diagnosis
KDa – Kilo dalton
HE - Hematoxilina-Eosina
PBS - Phosphate Buffered Saline
DAB - Diaminobenzidina
MIB1 – Mindbomb homolog 1 – Drosophila; anticorpo monoclonal desenvolvido a partir do Ki-56
FAK - Focal Adhesion Kinase

RESUMO

A proteína cerbB-2 tem sido bastante estudada não só por sua importância como fator prognóstico dos carcinomas da mama, mas sobretudo por ser um indicador para terapias com esquemas quimioterápicos. Para eliminar a subjetividade da interpretação do método imunohistoquímico convencional, este estudo tem como objetivo quantificar, morfometricamente, a imunomarcação da proteína cerbB-2 expressa em tumores de mama. Fragmentos de tecido mamário normal (n=10) e com doença tumoral (carcinoma ductal invasivo, CDI, n=51; fibroadenoma, n=11) foram fixados em formalina, submetidos à rotina histológica para inclusão em parafina. Cortes histológicos (4 μ m), corados em hematoxilina e eosina foram examinados para confirmar o diagnóstico. Os cortes foram incubados com solução de anticorpos por uma por uma hora em temperatura ambiente. A marcação foi visualizada após incubação com diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. A análise morfométrica foi realizada utilizando uma estação de análise digital de imagens através do software de análise OPTIMAS[®]. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a superexpressão do cerbB-2 em casos de CDI é um fenômeno condizente com o estágio de proliferação das células neoplásicas e quando analisados os casos de fibroadenoma, este marcador não exibiu qualquer correlação ou padrão específico, ao contrário apresentaram resultados semelhantes ao tecido mamário normal. Não houve diferenças significativas entre os diferentes scores qualitativos e a análise morfométrica digital, o que no mínimo demonstra a necessidade de estudos mais acurados a fim de resolver esta dificuldade de interpretação.

Palavras-chave: câncer de mama, cerbB-2, Her-2-neu.

ABSTRACT

The cerbB-2 protein has been sufficiently studied for its importance as prognostic factor of the breast cancer, mainly in the chemotherapy associations. To eliminate the subjectivity in the interpretation of the conventional immunohistochemistry method, this study aims to quantify, morphometrically, the immunostain of the cerbB-2 protein expressed in breast tumors. Mammary fragments of normal tissues (n=10) and with tumoral disease (invasive ductal carcinoma ,CDI , n=51, fibroadenoma, n=11), were fixed in formalin, processed and embedded in paraffin. Hematoxylin and eosin sections were examined to confirm the diagnosis. Slices (4 μ m) were incubated with antibody solution for one hour at room temperature. The staining pattern was visualized by incubation in solution containing diaminobenzidine and hydrogen peroxide. The morphometric analysis was carried out using a digital image analysis workstation based on OPTIMAS[®] software. From the results it can be concluded that the superexpression of cerbB-2 into breast carcinoma cases is a phenomenon according to the period of proliferation of the neoplastic cells and when analysed the fibroadenoma's cases, this marker does not shown any correlation with the staining pattern. On the other hand, fibroadenomas presented similar results to the normal mammary tissue. On the other hand, fibroadenomas presented similar results to the normal mammary tissue. There were not having significant differences between the different qualitative scores and the digital morphometric analysis, and those findings suggesting the necessity for more specific studies about the histopathologic interpretations.

Keywords: Breast cancer, cerbB-2, Her-2-neu.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Histofisiologia da mama

As glândulas mamárias, emparelhadas, ficam sobre o músculo peitoral na parede torácica superior. São compostas por tecido especializado glandular suportado por tecido conectivo predominantemente adiposo, com agrupamentos neurovasculares e uma quantidade variável de tecido fibroso (Cunha *et al.*, 2004).

Seis a dez dos principais sistemas ductais originam-se no mamilo. O epitélio escamoso queratinizado da pele sobrejacente continua dentro dos ductos e então muda abruptamente para um epitélio cubóide de camada dupla. Um pequeno tampão de queratina é encontrado, com freqüência, no orifício do ducto. A pele alreolar circunjacente é pigmentada e sustentada por musculatura lisa (Robbins *et al.*, 2005).

A ramificação sucessiva de grandes ductos leva, eventualmente, à unidade ductolobular terminal. Na mulher adulta, as ramificações do ducto terminal criam um agrupamento de ácinos que formam um lóbulo. Cada sistema ductal ocupa tipicamente um quarto da mama, e sobrepõem-se extensivamente sobre outros. Em algumas mulheres, os ductos estendem-se ao tecido subcutâneo da parede torácica e da axila (Ian & D'Arrigo, 2004).

Na mama normal os ductos e lóbulos (**figura 1**) são forrados por dois tipos de células, uma camada inferior plana e descontínua de células contráteis contendo miofilamentos (células mioepiteliais) que ficam sobre a membrana basal. Essas células ajudam na ejeção do leite durante a lactação e têm um papel importante na manutenção da estrutura e função normais do lóbulo e da membrana basal. Uma segunda camada de células epiteliais demarca os lúmens. As células luminais do

ducto terminal e do lóbulo produzem leite, porém aquelas que revestem o grande sistema ductal não (Ian & D'Arrigo, 2004).

A maioria do estroma mamário consiste em tecido conjuntivo fibroso denso misturado com tecido adiposo (estroma interlobular). Os lóbulos são confinados por um estroma mamário específico hormonalmente responsivo, delicado e mixomatoso que contém uma disseminação de linfócitos, o estroma intralobular (Robbins *et al.*, 2005).

Desta forma, devido a grande variedade de estruturas, a mama torna-se alvo de uma série de distúrbios anatomo-funcionais que acomete grande parcela da população mundial feminina.



Figura 1. Aspecto anatomo-funcional de mama normal de mulher adulta.
Fonte: <http://www.mentorcorp.com/global>

1.2 Câncer, uma visão geral

A carcinogênese inicia-se a partir de uma alteração no DNA celular ou da ativação anormal de genes presentes em células sadias. Tais genes coordenam a proliferação, a diferenciação, a morte por apoptose e outras funções celulares primordiais. A expressão amplificada de proteínas reguladas por tais genes pode determinar a progressão de alterações celulares levando aos estados neoplásicos malignos (Montenegro & Franco, 2004).

São várias as causas que dão origem ao câncer, podendo ser exógenas ou endógenas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas exógenas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas endógenas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas provocando mutações genômicas, resultando na ativação de oncogenes, responsáveis pela proliferação celular e regulação da apoptose, além de ocorrer a inativação dos genes supressores. Com isso, a expansão clonal ocasiona mutações adicionais (progressão), induzindo heterogeneidade celular e conseqüente formação de um neoplasma maligno, esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (Robbins *et al.*, 2005).

No que se refere às funções bioquímicas as moléculas de adesão e as vias de transdução dos sinais para o crescimento tumoral são bastante alterados durante a progressão tumoral (Gua *et al.*, 2006).

As proteínas normais codificadas pelos proto-oncogenes (genes que regulam a proliferação celular) desempenham funções iniciais nas células durante o desenvolvimento das neoplasias. Dentre estas moléculas, destacam-se os fatores de

crescimento, proteínas envolvidas na recepção e transdução de sinais localizados na superfície celular (Robbins *et al.*, 2005).

Os diferentes tipos de carboidratos na superfície celular apresentam uma importante função no controle de vários processos fisiológicos e patobioquímicos no organismo (Phipps *et al.*, 2005). Mudanças quantitativas e/ou qualitativas nos componentes lipídicos e protéicos das membranas e organelas celulares também são evidentes durante o desenvolvimento dos processos patológicos (Astoul *et al.*, 2000).

O mecanismo de reconhecimento molecular na superfície da célula, o que a torna capaz de reconhecer células semelhantes e assim interagir com as mesmas mantendo a homeostase, é afetado quando células normais sofrem neoplasia. O resultado é um crescimento e divisão descontrolados, devido às alterações nos mecanismos de reconhecimento que agem na membrana celular (Shekhar *et al.*, 2004).

A histopatologia é de extremo valor na confirmação do diagnóstico do câncer como também na determinação da diferenciação (grau) e na invasividade tumoral (estadiamento). O tecido a ser analisado é obtido a partir de uma amostra do tumor (biópsia incisional) ou da peça completa (biópsia excisional) (Bacchi *et al.*, 1999).

Grande parte dos tumores ainda apresenta algumas das características estruturais das células das quais se originaram e isto permite ao patologista estabelecer, a grosso modo, o grau de malignidade pela extensão com que a histologia do tumor se distancia daquela do tecido normal (diferenciação). Mas ainda há problemas, pois alguns podem ser tão indiferenciado que não mais retêm qualquer estrutura indicativa do tecido de origem (Montenegro & Franco, 2004).

Estudos com extratos de tumores realizados por Hirschfeld & Thonsen na década 30 foram os primeiros a demonstrar alterações bioquímicas nas células tumorais, o que foi posteriormente confirmado como padrões de glicosilação aberrantes associados ao tumor (Dabelsteen *et al.*, 1992).

Transformações celulares são freqüentemente acompanhadas por um aumento geral no tamanho dos glicolípídeos do metabolismo. Com o advento da tecnologia de anticorpos monoclonais, descobriu-se que muitos dos anticorpos "tumor-específicos" reconhecem os epítomos carboidratados especialmente em glicosíngolípídeos. Além do que, correlações significativas entre certos tipos de glicosilação alterada e o atual prognóstico de tumores referidos de animais experimentais ou humanos aumentam o interesse sobre essas mudanças bioquímicas específicas (Leboit & Sexton, 1993; Mitchell & Schumacher, 1999; Villanueva, 2002).

1.3 Câncer de Mama

Dentre os tumores malignos de mama, os carcinomas ductais invasivos representam o maior grupo, constituindo cerca de 65 a 80% dos carcinomas mamários. O quadro morfológico desses carcinomas é bastante heterogêneo, tendo sido caracterizadas algumas variáveis como fatores histológicos de prognóstico (Dantas *et al.*, 2003). A maioria exibe um aumento acentuado no estroma tissular fibroso denso, dando ao tumor uma consistência endurecida conhecida como carcinoma cirroso (Robbins *et al.*, 2005).

Os diferentes estágios da progressão do carcinoma ductal não estão bem individualizado. O processo se inicia com uma hiperplasia atípica das células epiteliais ductais, que podem ser difíceis de distinguir de um carcinoma ductal *in situ*.

O carcinoma ductal invasivo (**Figura 2**) pode ser de origem familiar ou esporádica, estima-se que entre 5 e 10% dos casos são de origem familiar. As aberrações cromossômicas encontradas não são específicas para este tumor e os cariótipos indicam um alto grau de heterogeneidade nestes tumores (Hoffmann & Schalag, 2000).

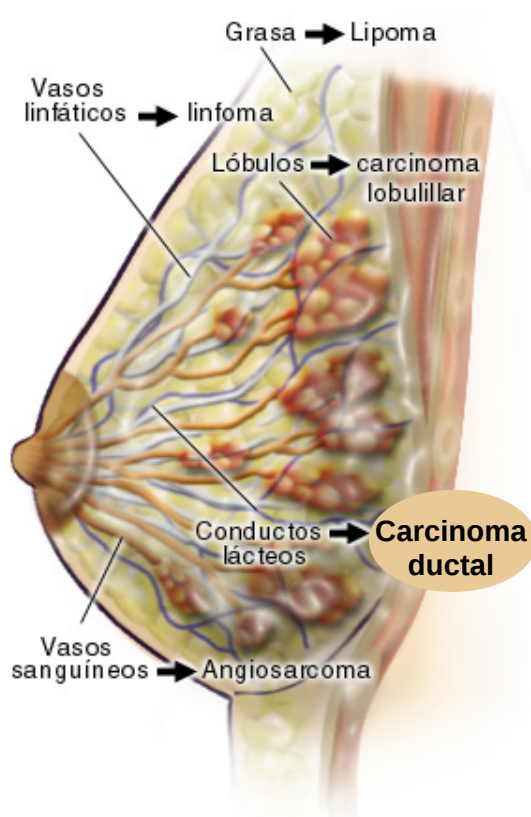


Figura 2. Localização do carcinoma ductal
Fonte: <http://www.senosalud.org>

A graduação histológica, a infiltração estromal linfoplasmocitária, a invasão vascular, linfática e sanguínea e a infiltração perineural são alguns dos aspectos morfológicos descritos como de importância prognostica (Elston & Ellis, 1991).

Dentre estes, o grau histológico tem sido demonstrado como excelente indicador prognóstico (Ian & D'Arrigo, 2004).

A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 novos casos de câncer de mama em todo o mundo, o que o torna o câncer mais comum entre as mulheres (World Health Organization, 2004).

Tem-se observado, em alguns países desenvolvidos, como é o caso dos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, um aumento da incidência do câncer de mama acompanhado de uma redução da mortalidade por esse câncer, o que está associado à detecção precoce por meio da introdução da mamografia para rastreamento e à oferta de tratamento adequado. Em outros países, como no caso do Brasil, o aumento da incidência tem sido acompanhado do aumento da mortalidade, o que pode ser atribuído, principalmente, a um retardamento no diagnóstico e na instituição de terapêutica adequada (INCA, 2005).

No Brasil, informações processadas pelos Registros de Câncer de Base Populacional, disponíveis para 16 cidades brasileiras, mostram que na década de 90, este foi o câncer mais freqüente no país. As maiores taxas de incidência foram observadas em São Paulo, no Distrito Federal e em Porto Alegre (INCA, 2005).

As estimativas para o ano de 2006 calculavam uma ocorrência de 472.050 casos novos de câncer no Brasil. O tipo mais incidente no sexo feminino, com exceção do de pele (não melanoma), seria o de mama (49.000 casos), estes valores correspondem a um risco estimado de 52 novos casos a cada 100 mil mulheres acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2005). Dados divulgados pelo Datasus (2007) demonstraram que no Brasil em 2006 foram

informadas 36.744 internações e 2.344 mortes de mulheres por neoplasia maligna da mama.

O câncer de mama é a neoplasia mais prevalente em mulheres, representando 22% de todos os carcinomas diagnosticados em 2000 nos EUA, e a segunda maior causa de morte por câncer (15% das mortes por neoplasia) nesta população (Parkin, 2004). Associado a fatores genéticos, estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes populações determinaram que fatores de risco como idade, localização geográfica, status socioeconômico e eventos reprodutivos (idade da menarca e da menopausa, infertilidade, gravidez e amamentação) estão associados à maior incidência de carcinoma de mama (Dumitresco & Cotarla, 2005).

Frente às limitações práticas para a implementação, junto à população, de estratégias efetivas para a prevenção do câncer de mama, as intervenções, do ponto de vista da Saúde Pública, passam a ser direcionadas a sua detecção precoce, com a garantia de recursos diagnósticos adequados e tratamento oportuno (INCA, 2005).

A vasta exibição de semelhanças histológicas de doença mamária proliferativa atípica, bem como carcinomas, traduz-se nas manifestações externas de dúzias ou sentenas de alterações biológicas, tomando lugar dentro dessas lesões, e aponta para as vias complexas e variáveis à carcinogênese. Realmente, nenhuma alteração genética ou funcional comum pode ser encontrada em cada tipo de câncer de mama. A maioria das alterações reportadas ocorre em somente um subconjunto de carcinomas e, em geral, em combinações altamente variáveis com outras alterações (Mirtrunen & Hirvonen, 2003).

Um modelo geral da carcinogênese postula que uma célula normal deve obter sete novas capacidades para tornar-se maligna, incluindo instabilidade genética (Hanahan & Weinberg, 2000; Hahn & Weinberg, 2002). No carcinoma hereditário, uma ou mais alterações é facilitada pela herança das mutações da linhagem germinativa. Cada uma das novas capacidades pode ser obtida por uma alteração em um dos muitos genes. As alterações nos receptores de estrógeno ou na proteína cerbB-2, por exemplo, podem resultar em auto-suficiência nos sinais do crescimento e por outro lado, uma alteração no metabolismo celular (p. ex., uma alteração do gene p53 que tem um papel central no controle do ciclo celular, reparação de DNA e apoptose) pode afetar mais que uma dessas capacidades (Climent *et al.*, 2001).

As alterações morfológicas na mama associadas ao menor risco aumentado de câncer são lesões com números crescentes de células epiteliais (alterações proliferativas). Isto sugere que as alterações iniciais estão relacionadas à evasão de sinais inibidores do crescimento, da apoptose e da auto-suficiência dos sinais de crescimento. Há evidências de que, mesmo no estágio inicial, exista expressão anormal dos receptores hormonais e regulação anormal da proliferação em associação à positividade dos receptores hormonais (Iqbal *et al.*, 2001).

Os aspectos morfológicos e biológicos dos carcinomas são, em geral, estabelecidos nos estágios *in situ*, pois na maioria dos casos, a lesão *in situ* se parece com o carcinoma invasivo subsequente. Os carcinomas mamários não se “desdiferenciam”, ou tornam-se mais pobremente diferenciados com o tempo (Ilan & D’Arrigo, 2004).

O estágio final da carcinogênese, ou seja, a transição do carcinoma limitado pela membrana basal aos ductos e lóbulos (carcinoma *in situ*) ao carcinoma

invasivo, é o menos compreendido. As funções gênicas específicas necessárias à invasão foram de difícil identificação (Porter *et al*, 2001). O desequilíbrio cromossomal ocorre com os ganhos ou perdas em múltiplos locus, como em lesões hiperplásicas que progridem para carcinoma ductal *in situ* até carcinoma ductal invasivo. Não obstante, as mudanças cromossômicas compartilhadas com ambos os carcinomas ductal *in situ* e adjacente ao carcinoma ductal invasivo demonstram sua relação clonal e evolucionária (Menezes *et al.*, 2006).

1.4 Doenças tumorais benignas da mama

Distúrbios tumorais aplicam-se a uma variedade de alterações morfológicas na mama que vão desde lesões inteiramente inócuas até lesões associadas a um risco aumentado de carcinoma. Uma característica de todas essas alterações é o fato de produzirem tumorações palpáveis. Essas tumorações palpáveis são encontradas em 60% a 90% das mamas examinadas em autópsia de rotina (Robbins *et al.*, 2005).

Os aspectos morfológicos variam desde lesões constituídas principalmente por cistos até lesões que se caracterizam por um crescimento exagerado do estroma fibroso, lesões em que ocorre proliferação do estroma e do epitélio, e outros tipos onde há predomínio e proliferação epitelial (Lundin *et al*, 1998).

As alterações fibrocísticas são modificações da mama que se caracterizam pela formação de vários pequenos cistos e maior produção de tecido fibroso (tecido de preenchimento e sustentação da mama), tornando a mama mais endurecida e de aspecto tumoral. Pode acompanhar-se de dor e geralmente afeta ambas as mamas.

Não existe tratamento específico e geralmente esse quadro cessa com a menopausa ou diminuição do estímulo hormonal da mama (Horner & Lampe, 2000).

Estas variantes juntas constituem o distúrbio isolado mais comum da mama e são responsáveis por mais da metade de todas as cirurgias. Acredita-se que o desequilíbrio hormonal seja o fator básico para o surgimento deste distúrbio. Também existem algumas evidências de metabolismo anormal dos hormônios no órgão terminal para explicar a patogênese da doença fibrocística. O uso de anticoncepcionais orais diminui o risco dessa doença, possivelmente pelo fornecimento de uma quantidade equilibrada de progesterona e estrogênio (Horner & Lampe, 2000).

Clinicamente as alterações fibrocísticas produzem massas na mama que precisam ser diferenciadas do carcinoma, também apresentam microcalcificações detectadas com frequência nas mamografias (Hoffmann & Schalag, 2000).

A maioria das pacientes que buscam o atendimento médico para a realização da mamoplastia redutora estética não apresenta qualquer alteração ao exame físico ou radiológico das mamas. As análises macro e microscópicas das peças cirúrgicas podem permitir o diagnóstico de alterações fibrocísticas, bem como de lesões proliferativas pré-malignas ou a identificação de câncer oculto de mama não-detectado no pré-operatório (Tafari & Gobbi, 2005).

A incidência de lesões mamárias em espécimes de mamoplastia redutora estética ou contralateral é variável. Cerca de 60% das mulheres categorizadas como normais clinicamente apresentam alguma alteração histológica nos espécimes de mamoplastia em pelo menos uma de suas mamas (Ayhan *et al.*, 2002). A maioria destas alterações é composta por lesões benignas não-neoplásicas, como as

alterações fibrocísticas incluindo cistos, metaplasia apócrina, adenose e eventuais fibroadenomas (Quirino *et al.*, 2001).

1.5 Fibroadenoma

O fibroadenoma é o tumor benigno mais freqüente em mulheres com menos de 30 anos de idade (Burbano *et al.*, 2001). Embora classificado entre as neoplasias benignas, alguns autores o consideram uma lesão hiperplásica ou mesmo mal formativa. Como regra geral, o fibroadenoma apresenta-se como nódulo único, bem delimitado, em pacientes jovens. Durante a gravidez e no final do ciclo menstrual, o fibroadenoma pode sofrer aumento de volume, macroscopicamente, o tumor é bem circunscrito, têm consistência elástica e em geral mede de 1 a 3 centímetros. Macroscopicamente, os tumores são nódulos branco-acinzentados bem circunscritos, firmes e elásticos que se destacam acima do tecido circunjacente e contêm com freqüência, espaços do tipo fendas (**figura 3**). Na intimidade do fibroadenoma, podem ser encontradas várias das alterações que ocorrem nos lóbulos, como adenose esclerosante, metaplasia apócrina, hiperplasias epiteliais e raramente carcinoma in situ ou invasores. Já no estroma se identificam importantes alterações no tecido conjuntivo de sustentação podendo ocorrer fibrose e depósitos hialinos (Conde *et al.*, 2005).

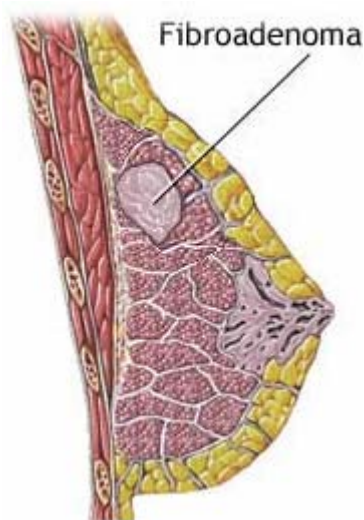


Figura 3. Aspecto morfológico geral de fibroadenoma.

Fonte: <http://www.insightec.com>

Alguns fibroadenomas são policlonais em origem, provavelmente, devido à hiperplasia focal do estroma lobular. Há estudo que demonstram que quase metade das mulheres que recebem ciclosporina A após transplante renal desenvolve fibroadenomas (Baildam *et al.*, 1996). São tumores frequentemente bilaterais e provavelmente são causados pela estimulação do crescimento relacionada à droga. No entanto, há também um subconjunto de fibroadenomas que são neoplasmas benignos das células estromais. Alguns estudos demonstraram que, o componente fibroso (estromal) é clonal e pode ter alterações citogenéticas, porém o componente epitelial é policlonal. Entretanto, nenhuma alteração citogenética consistente foi encontrada (Cavalli *et al.*, 2001; Ojopi *et al.*, 2001).

Atualmente, tem aumentado o número de estudos a respeito do fibroadenoma, principalmente pelo fato de alguns trabalhos terem demonstrado que a presença do fibroadenoma está ligada a um aumento do risco de desenvolver carcinoma na mama, quando há determinadas alterações intralesionais, como

calcificação intra-epitelial, cistos com mais de três milímetros, alteração papilar apócrina e adenose esclerosante. O epitélio dos ductos pode mostrar vários graus de hiperplasia, com ou sem atipia (Calado & Lima, 2004).

No intuito de esclarecer os eventos envolvidos no processo de carcinogênese, houve um grande desenvolvimento de técnicas, para monitorar as transformações celulares ocorridas através da determinação da presença ou aumento da expressão dos chamados marcadores tumorais (Silva *et al.*, 2002).

1.6 Marcadores tumorais

Poucas medidas na medicina diagnóstica tiveram tanto impacto em anos recentes quanto a introdução, nas práticas de laboratório clínico, dos imunoensaios para determinação de proteínas relacionadas a tumores, também classificadas como marcadores tumorais (Pradal *et al.*, 2004).

Marcadores tumorais são macromoléculas, geralmente proteínas, cujo aparecimento e alterações em sua concentração estão relacionadas de certa forma com a gênese e o crescimento de células cancerosas nos indivíduos (Ustun & Ceber, 2004).

Os marcadores tumorais não são a principal ferramenta utilizada no diagnóstico do câncer. Sua principal utilidade na prática clínica é a de um exame laboratorial que sustenta o diagnóstico. Alguns marcadores tumorais também têm valor na determinação da resposta ao tratamento e na indicação da recidiva durante o período de acompanhamento (Abreu & Koifman, 2002).

O desenvolvimento e a introdução de tais exames, preocupação típica de países onde as condições de assistência à saúde e prevenção das doenças, asseguraram maior expectativa de vida a população e conseqüentemente maior incidência de doenças neoplásicas, veio contribuir de maneira intensa e decisiva para intervenção clínico-cirúrgica nos portadores de distúrbios tumorais (Pradal *et al.*, 2004).

Segundo Mora e colaboradores (2001) podem ser classificados em três tipos: celulares ou teciduais, séricos ou plasmáticos e genéticos. Os marcadores teciduais são antígenos localizados nas membranas celulares, tais como as moléculas de adesão (PECAMs e ICAMs) ou antígenos de citodiferenciação (CDs); Os marcadores genéticos são representados por seqüências de genes e proteínas por eles codificadas, superexpressas em situações de desenvolvimento tumoral, como por exemplo a proteína cerbB-2.

Os marcadores tumorais ou séricos são substâncias que podem ser detectadas em concentrações diferentes daquelas encontradas nas condições normais no sangue, urina ou tecidos, tais como alfa-fetoproteína (AFP) relacionada a tumores de fígado ou galectinas-1 e -3 que são envolvidas no desenvolvimento de neoplasias da tireóide (Rabinovich, 1999; Rabinovich *et al.*, 2002; Pradal *et al.*, 2004).

Atualmente, cerca de 200 substâncias são descritas como marcadores tumorais, entretanto, poucas conseguem manter-se como tal. Frutos de investigação sobre as alterações bioquímicas da célula tumoral, sua purificação, identificação química e testes de aplicabilidade clínica, podem levar muitos anos (Pradal *et al.*, 2004).

Teoricamente, para que uma substância possa ser aceita e persistir como um marcador tumoral, deveria apresentar alta especificidade (não ser detectada em outras doenças), alta sensibilidade (ser detectada muito precocemente), ser órgão-específica e apresentar paralelismo com o desenvolvimento tumoral (Diamandis *et al.*, 2000).

Contudo, após anos de pesquisas têm-se observado exatamente o contrário. Atualmente, os melhores marcadores tumorais são aquelas biomoléculas relacionados a processos fisiológicos da célula normal que durante a progressão tumoral tem seus níveis de expressão aumentados ou reduzidos drasticamente. Como exemplos desses potenciais marcadores podemos citar a proteína S100, citoqueratina, Ki-67, p-53, Proteína C-reativa, galectinas, auto-anticorpos, citocinas e moléculas de adesão (Mason *et al.*, 2002; Harpio & Einarsson, 2004).

Desta forma, cada vez mais tem se buscado investigar, através de diversas ferramentas de análise, as alterações no comportamento dessas proteínas a fim de se estabelecer para cada tipo de tumor um padrão de expressão específico que caracterize os níveis de agressividade, chances de recidiva e potencial de metastatização (Ustun & Ceber, 2004).

1.7 A proteína cerbB-2

O gene erbB-2, também chamado de HER-2, é um proto-oncogene localizado no cromossomo 17 (17q12.21.32), codifica a síntese da proteína cerbB-2 de 185-KDa (p185^{HER-2}), que é um dos receptores transmembrana homologa ao receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Kobayashi *et al.*, 2002). A ligação deste receptor acarretará a transmissão de um sinal para a ativação da tirosina-cinase

intracelular e esta enzima fosforila outras tirosina-cinases que irão transmitir os sinais para a proliferação, migração, adesão e transformação celular (Lee *et al.*, 2004). Conseqüentemente, a ativação anômala do gene erbB-2 terá como conseqüência a exacerbação das funções sinalizadas pela proteína cerbB-2.

O interesse pela aplicação clínica da expressão da cerbB-2 teve início com os estudos de Slamon (1987) na década de 80, quando os mesmos demonstraram que a amplificação do gene erbB-2, em câncer de mama estava relacionado significativamente ao tempo de sobrevida das pacientes (Diermeier *et al.*, 2005).

A síntese elevada de cerbB-2 foi citada não só como fator importante para o prognóstico evolutivo da doença, mas sobretudo como um indicador para terapias com esquemas quimioterápicos mais agressivos com o uso de antraciclinas na doença metastática, além de provavelmente representar um fator de resistência contra terapia hormonal (Climent *et al.*, 2001).

A superexpressão da proteína Her-2/neu (cerbB-2) em pacientes linfonodo-negativas tem sido correlacionada com recorrência da doença e metastase (Press *et al.*, 1997). A avaliação do status da Her-2/neu só ou em combinação com outros fatores prognósticos, talvez identifique o risco de recorrência em pacientes linfonodo-negativas, e então o tratamento pode ser individualizado (Kakar *et al.*, 2000).

Em 1998, uma nova terapia contra o câncer foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration), o Trastuzumab ou Herceptin® (Genentech, San Francisco, USA), que é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante rhuMAb HER-2, que apresenta alta afinidade para p185^{HER2} e inibe o crescimento de células do câncer de mama que têm expressão aumentada de HER-2/neu. O Herceptin® foi inicialmente obtido a partir de camundongos imunizados com células que expressavam níveis elevados de p185^{HER2}, dirigidos contra o domínio extra-celular

da proteína (**figura 4**). Ensaios clínicos bem controlados demonstram a atividade do rhuMAb HER-2 em casos de câncer de mama avançados (linfonodos axilares positivos), com expressão aumentada de HER-2, constituindo-se em evidência clínica pioneira da utilização de anticorpos dirigidos contra receptores de fator de crescimento para o tratamento do câncer de mama em humanos (Zerbini & Stiepich, 2007).

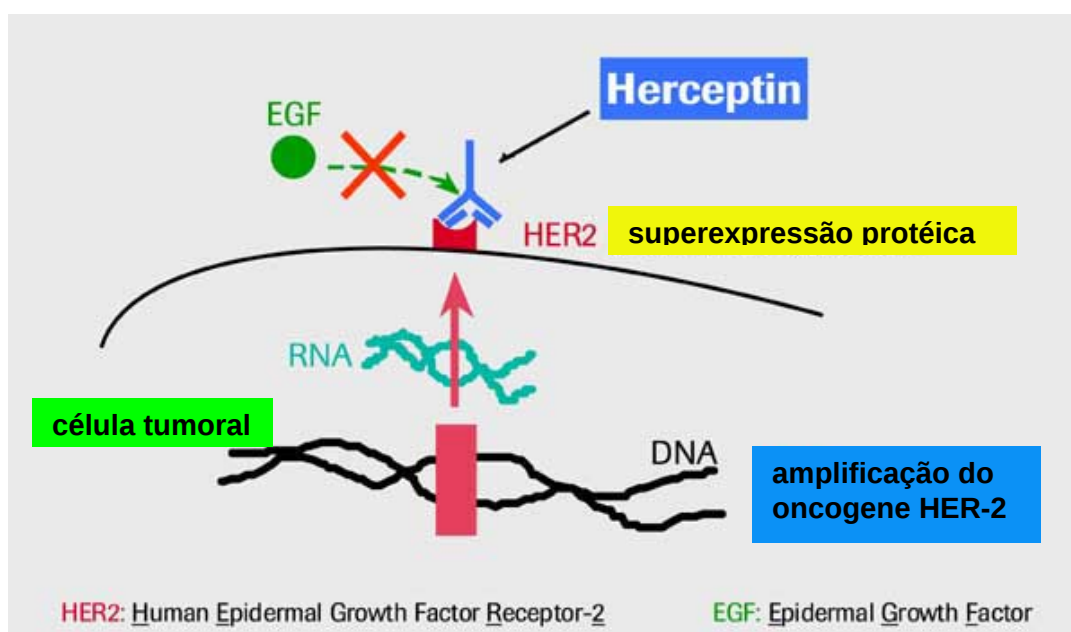


Figura 4. Atividade biológica do Herceptin frente a proteína HER-2.

Fonte: <http://www.roche.com>

Uma variedade de métodos tem sido utilizada para diagnosticar o status de Her-2/neu, entre eles estão as avaliações que utilizam ácido nucléico, como por exemplo, southern ou northern blot, PCR, Fluorescency *in situ* Hibridization (FISH) e métodos que quantificam a expressão da proteína como western blot e imunohistoquímica (Kakar *et al.*, 2000). Na avaliação histológica de biópsia ou de ressecção cirúrgica (mastectomia) a imuno-histoquímica é a técnica mais utilizada

na rotina, por ser mais simples, rápida e relativamente barata, entretanto, devido à subjetividade inerente na interpretação qualitativa da reação imunohistoquímica, foram desenvolvidos sistemas de análise de imagem para quantificar a expressão tecidual da proteína de acordo com sua intensidade e distribuição (Bishop *et al.*, 2002; Biestterfeld *et al.*, 2003).

1.8 Análise digital de Imagens em Patologia

Os mais diversos métodos de análise têm sido aplicados para traduzir de forma mais objetiva e numericamente representativa as transformações que ocorrem nas células tumorais (Francis, 2000), seja através da análise colorimétrica de células neoplásicas em cultura (Alley, 1991), citometria automática ou variações morfométricas nucleares (Roels, 2000).

No apoio à interpretação dos resultados obtidos pela histoquímica de células tumorais, os sistemas computadorizados de análise de imagens têm fornecido dados qualitativos e quantitativos mais refinados esclarecendo assim, vários aspectos histomorfológicos das neoplasias (Demirkaya, 1999; Lee *et al.*, 2004).

A análise digital de imagens é de grande importância para o diagnóstico, especialmente nos casos onde a suspeita clínica de câncer prevalece mesmo após uma biópsia negativa (Montironi *et al.*, 2000).

O avanço da computação digital tem oferecido grandes benefícios na discriminação e estudo estatístico de dados numéricos. A possibilidade da utilização de ferramentas computacionais na construção de gráficos complexos, avaliação dos padrões de cor e capacidade de armazenar imagens tem sido amplamente utilizada nas análises morfométricas de padrões histológicos e citológicos (Hamilton, 1997; Lambert *et al.*, 2001; Melo-Júnior, 2003).

Inúmeras técnicas morfométricas foram desenvolvidas durante os últimos anos com a expectativa de introduzir na prática da patologia critérios objetivos e reprodutíveis relacionados ao diagnóstico e ao prognóstico de doenças. Contudo, os estudos quantitativos não foram inicialmente considerados práticos devido à complexidade das técnicas e o longo tempo necessário para o processo (Bartels & Thompson, 1994).

Com o avanço dos componentes computacionais, novos métodos para captação e tratamento de imagens têm facilitado cada vez mais a precisão das informações devido à capacidade de se realçar, excluir e delimitar certas características obtidas pela imagem digital. Estas imagens digitais são representadas por uma matriz cujos elementos são chamados pixels (*picture elements*) que representam a unidade fundamental de análise de uma figura através de tonalidades específicas de cor (Synopsis, 1996).

Programas computacionais cada vez mais especializados em análise de parâmetros microscópicos tenderão a se tornar uma prática freqüente nos laboratórios, seja para pesquisa ou diagnóstico de rotina (Hamilton, 1997; Barbosa-Júnior, 2001).

As vantagens da mensuração das estruturas biológicas na histopatologia e na citopatologia incluem: diminuição da variabilidade na quantificação dos aspectos celulares e teciduais; promoção de uma escala numérica e reprodutível dos aspectos qualitativos; aumento da sensibilidade na detecção de alterações mínimas; avaliação dos efeitos de diferentes métodos de processamento histológico; emprego no controle de qualidade; determinação da forma e tamanhos padrões para ensino e diagnóstico; maximização como ferramenta de pesquisa (Hamilton & Allen, 1995; True, 1996).

Através da análise computadorizada de imagens podem ser processadas medidas lineares, contagem de objetos, determinação de forma, estereologia, além de mensurações mais complexas e multiparamétricas (Barterls & Thompson, 1994; True, 1996; Oberholzer *et al.*, 1996). Estes novos parâmetros têm servido como auxiliares no diagnóstico de neoplasias dos mais variados tipos (Herman, 1996; Waldman *et al.*, 1996; Novik, 2000; Rubegni *et al.*, 2001).

Avaliações histológicas através da imunohistoquímica (Weinberg, 1994), imunofluorescência (Waggoner *et al.*, 1996), densitometria do DNA (Cohen, 1996) e reconstrução tri-dimensional de estruturas (Whimster & Cookson, 1995), conjugados a métodos morfométricos computadorizados, tanto no modelo experimental (Figueiredo-Silva *et al.*, 1999), como em seres humanos (Araújo-Filho *et al.*, 2006; Melo-Júnior, 2003) tem fornecido resultados mais precisos e completos para os mais diversos tipos de alterações morfológicas nos tecidos.

Através da captação de imagens histológicas pelo computador novas aplicações têm surgido no intuito de agilizar o fluxo de informações sobre temas e problemáticas no campo da interpretação das diversas alterações morfológicas e até bioquímicas dos ambientes celulares durante as mais variadas situações de estresse resultando numa maior precisão dos resultados obtidos (Rashbass, 2000; Furness & Rashbass, 2000; Peterson *et al.*, 2000).

Esta opção metodológica tem se apoiado cada vez mais em novas tecnologias permitindo a troca de informações e resultados de estudos em tempo real através da captação e análise de imagens utilizando-se da rede mundial de computadores / *internet* (Eusebi *et al.*, 1997; Strauchem *et al.*, 2000; Demartines *et al.*, 2000).

Os dois métodos básicos para realizar medições aplicando-se sistemas computacionais são: o sistema interativo de análise de imagens através de um operador para definir as estruturas de interesse usando cursores ou canetas digitais e o sistema automático de análise de imagens que através de vídeo câmera acoplada captura as imagens histológicas para serem armazenadas na memória do computador (Hamilton, 1997; Lambert *et al.*, 2001).

Estudos mencionados na literatura demonstraram a utilidade da análise digital de imagem na identificação e quantificação de áreas marcadas através de reação imunohistoquímica em neoplasias de pele (Melo-Júnior *et al.*, 2006) e próstata (Araújo-Filho *et al.*, 2006).

No estudo da mama, observa-se atualmente o desenvolvimento de diferentes técnicas de análise de imagem, pode-se citar como exemplo o sistema diagnóstico auxiliado por computador (Computer Aided Diagnosis, CAD), que tem o objetivo de facilitar, na mamografia, a visualização dos tumores pelos radiologistas, identificando padrões de imagens previamente fornecidas ao software (Giger, 2004). Outro exemplo são os sistemas utilizados para quantificar a intensidade de marcação em reações imunohistoquímicas no intuito de eliminar a subjetividade da análise convencional (Lee *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVAS

Nos últimos anos, tem-se acentuado o interesse por estudos relacionados aos mecanismos envolvidos na carcinogênese da mama, em parte devido ao desenvolvimento de diversos marcadores moleculares histoquímicos que podem ter grande influência na evolução dos processos neoplásicos (Yarbro *et al.*, 1999).

Embora o estudo histoquímico dos tumores possa ser visto como um exercício acadêmico assume grande importância prática no momento de decidir sobre o tratamento de cada paciente. Embora um câncer possa ser fortemente sugerido clínica e radiologicamente, seu diagnóstico não pode ser definido até que se obtenha confirmação citológica ou histológica. Sem a prova anatomopatológica de malignidade, o tratamento não pode ser adequadamente planejado, procedimentos terapêuticos não podem ser comparados, nem qualquer prognóstico pode ser feito de maneira precisa (Faria, 1999; Akimoto *et al.*, 2006).

Atualmente, na literatura científica existem poucas citações correlacionando a expressão imuno-histoquímica da proteína cerbB-2, entre indivíduos normais, pacientes portadoras de neoplasias ou doenças tumorais frequentes da mama.

Por outro lado, estudos histomorfométricos (análise digital de imagens) de material obtido por biópsia fornecem dados qualitativos e quantitativos mais precisos eliminando em grande parte a subjetividade na interpretação dos achados clínicos ou imagem (Dermikaya, 1999).

Neste intuito, propomos utilizar um sistema digital de análises de imagens para obter dados quantitativos na expressão imuno-histoquímica da proteína cerbB-2 e comparar os resultados com àqueles obtidos pela visualização do patologista na microscopia.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a expressão da proteína cerbB-2 através do método imuno-histoquímico e da análise digital de imagens em diferentes lesões tumorais da mama.

3.2 Específicos

- Proceder ensaio imuno-histoquímico com cerbB-2 em material de biopsia de mama normal e com distúrbios tumorais de mama (carcinoma ductal invasivo e fibroadenoma);
- Realizar análise morfométrica do padrão de marcação da proteína cerbB-2 em tecidos de mulheres com distúrbios tumorais da mama e no tecido mamário normal adjacente da própria paciente;
- Avaliar os resultados da morfometria e do exame imuno-histoquímico para a proteína cerbB-2 correlacionando-os com os tipos histológicos.

4. ARTIGO

Avaliação digital comparativa da expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama

RENATA KELLY DE ARAÚJO VEIGA^{1,2}

MARIO RIBEIRO DE MELO-JÚNIOR^{1,3}

CONSUELO ANTUNES BARRETO LINS⁴

NICODEMOS TELES DE PONTES-FILHO^{1,5}

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); 2. Mestrado em Patologia – CCS/UFPE; 3. Associação Caruaruense de Ensino Superior – ASCES; 4. Universidade de Pernambuco – UPE; 5. Departamento de Patologia - UFPE, Brasil.

Correspondence: Nicodemos Teles de Pontes-Filho - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário - 50670-910, Brasil. E-mail: ntpf@ig.com.br

* Submetido ao Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine

4.1 Introdução

Frente à dificuldade de eliminar o câncer instalado, cada vez mais os oncologistas utilizam a avaliação de marcadores tumorais para nortear sua conduta diante de cada paciente, quanto ao tratamento a ser utilizado e posteriormente no acompanhamento da eficácia do mesmo (Dubská *et al.*, 2005).

A proteína cerbB-2 é um dos marcadores atualmente utilizado na oncologia para a avaliação de tumores malignos da mama. É um receptor glicoproteico transmembranar, com peso de 185 KDa e codificado pelo gene erbB-2, um proto-oncogene, da família de oncogenes das tirosinas quinases, localizado no cromossomo 17 q21 (Kobayashi *et al.*, 2002). Este receptor, homólogo ao do fator de crescimento epidermal, quando ligado funciona transmitindo sinais para a proliferação, migração, adesão e transformação celular (Lee *et al.*, 2004). Obviamente, a ativação anômala do gene erbB-2 terá como consequência a exacerbação das funções sinalizadas pela proteína cerbB-2.

Cerca de 20% a 30% dos carcinomas ductais e 40% a 70% das lesões intraductais apresentam superexpressão de cerbB-2 (Oliveira *et al.*, 2004) e esta expressão está correlacionada a um fenótipo mais agressivo (Ganceberg *et al.*, 2000), tendo sido demonstrado por alguns autores, que pacientes com câncer de mama e com alta expressão de cerbB-2 tem baixa resposta à terapia hormonal para casos em que já ocorreu metástase (Leitzel *et al.*, 1995; Carlomagno *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 1997).

São vários os métodos utilizados para a quantificação da expressão do Her-2/neu, entre os mais conhecidos estão o southern, northern e dot blot, PCR, Fluorescency *in situ* Hibridization (FISH) e outros métodos que avaliam a expressão protéica, tais como western blot e imunohistoquímica (Madan *et al.*, 2006). Esta

última é a técnica mais difundida entre os laboratórios de patologia, para análise histológica de mama por ser um método relativamente barato, rápido e simples (Gouvêa *et al.*, 2004).

Contudo, os métodos imunohistoquímicos quando analisados de forma qualitativa, muitas vezes têm apresentado grande disparidade e variabilidade de resultados entre diferentes observadores. Assim, a fim de prover uma escala numérica e reprodutível dos padrões de marcação dos tecidos, aumentando a sensibilidade e o controle de qualidade das análises, tem-se buscado cada vez mais refinamentos tecnológicos através de métodos morfométricos automatizados (Rashbass, 2000; Novik, 2000).

Os sistemas computadorizados de análise de imagens têm fornecido dados qualitativos e quantitativos mais refinados na interpretação dos resultados obtidos pela histoquímica de células tumorais, esclarecendo vários aspectos histomorfológicos das neoplasias da mama (Demirkaya *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004). Os avanços da computação digital tem oferecido grandes benefícios na discriminação e estudo estatístico de dados numéricos e a possibilidade da utilização de ferramentas computacionais na construção de análises morfométricas de padrões histológicos e citológicos de lesões tumorais (Hamilton, 1997; Lambert *et al.*, 2001; Melo-Júnior *et al.*, 2006; Araújo-Filho *et al.*, 2006).

O cerbB-2 é, atualmente, um marcador tumoral bastante pesquisado através da imunohistoquímica, no entanto são poucos os relatos de avaliações com o auxílio de sistemas de análise de imagem para quantificação exata da expressão desta proteína. Diante de tal fato, este estudo se propõe a avaliar o padrão de marcação imunohistoquímica em amostras de mama de mulheres com carcinoma ductal

invasivo e fibroadenoma através dos métodos manual convencional e análise digital de imagem.

4.2 Metodologia

4.2.1 Amostras de tecido

Foram selecionados 62 blocos de parafina com fragmentos teciduais (biópsias ou ressecção cirúrgica) de pacientes do sexo feminino do arquivo do setor de patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) e do Laborantunes (laboratório particular de Recife), sendo 51 amostras com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo e 11 de fibroadenoma. Os 10 casos de mama normal analisados no trabalho foram obtidos a partir das margens teciduais livres dos tumores. Todos os tecidos foram retirados de mulheres que possuíam idades entre pacientes possuíam idades variando entre 17 - 70 anos.

4.2.2 Aspectos éticos

O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho fez parte de um projeto submetido e aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do CCS/UFPE (Registro CEP/CCS/UFPE N°312/06).

4.2.3 Estudo histológico e imuno-histoquímico

A partir dos blocos selecionados foram retirados cortes histológicos medindo 4µm, montados em lâminas silanizadas e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), e então revisados por um patologista (C.A.B. L).

Para a reação imunohistoquímica os cortes foram previamente montados em lâminas silanizadas e desparafinizados pela ação do xilol em 2 banhos de 5 min a temperatura ambiente (TA), hidratados com etanol 100% (2 banhos de 5 min a TA) e lavados em água corrente e destilada. Em seguida precedeu-se a recuperação antigênica incubando-se as lâminas em solução tampão citrato de sódio 10mM/pH6.0, em vapor úmido por 30 min a 100°, em seguida lavadas (por 5 min) com PBS (Phosphate buffered saline) e leite mólico® (a fim de evitar reações cruzadas). Logo após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (2 banhos de 10 min), seguindo-se as lavagens em água corrente e destilada e PBS 0,015 mol/L com pH 7,8. Posteriormente os cortes foram incubados com anticorpo Anti-cerbB-2 (DAKO-USA) diluído a 1:800 por 30 min em Temperatura Ambiente (TA); lavados em tampão PBS (3 X 3 min); incubados com o anticorpo secundário biotinilado (Kit LSAB DAKO/USA) por 15 min a TA e novamente lavados com tampão PBS. Para revelação da reação incubaram-se as lâminas em solução de Diaminobenzidina (DAB) 60 mg% por 10 min a TA ao abrigo da luz. Nesta etapa a DAB reage com a peroxidase produzindo uma coloração marrom característica da positividade do ensaio imuno-histoquímico. Para finalização do processo, as lâminas foram lavadas em água destilada e corrente, contracoradas com Hematoxilina, montadas com entelan® e, após secas, foram levadas ao microscópio óptico para análise.

O diagnóstico da imunohistoquímica foi atribuído pelo mesmo patologista de acordo com a classificação do fabricante do Kit utilizado (**Tabela 1**) (DAKO, 2002).

Tabela 1: Classificação da marcação imunohistoquímica de Her-2/neu sugerida pela DAKO.

Score de expressão de cerbB-2	
Diagnóstico	Padrão de marcação
0	Ausência de coloração ou coloração de membrana citoplasmática em menos de 10% das células tumorais
1+	Coloração fraca, quase imperceptível, em mais de 10% das células tumorais. As células são coradas em parte da membrana
2+	Coloração fraca a moderada em toda a circunferência da membrana observada em mais de 10% das células tumorais
3+	Coloração intensa em toda a membrana, observada em mais de 10% das células tumorais

4.2.4 Análise Digital de Imagens

Imagens digitais foram capturadas das lâminas histológicas utilizando um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2), já utilizado com sucesso em análises diagnósticas (Oberholzer *et al.*, 1996). O sistema interativo de análise de imagens utiliza o Software OPTIMAS[®] 6.1 e Câmera digital CCBBW 410 (Sansung), disponíveis no Departamento de Patologia da UFPE (Figura 5).

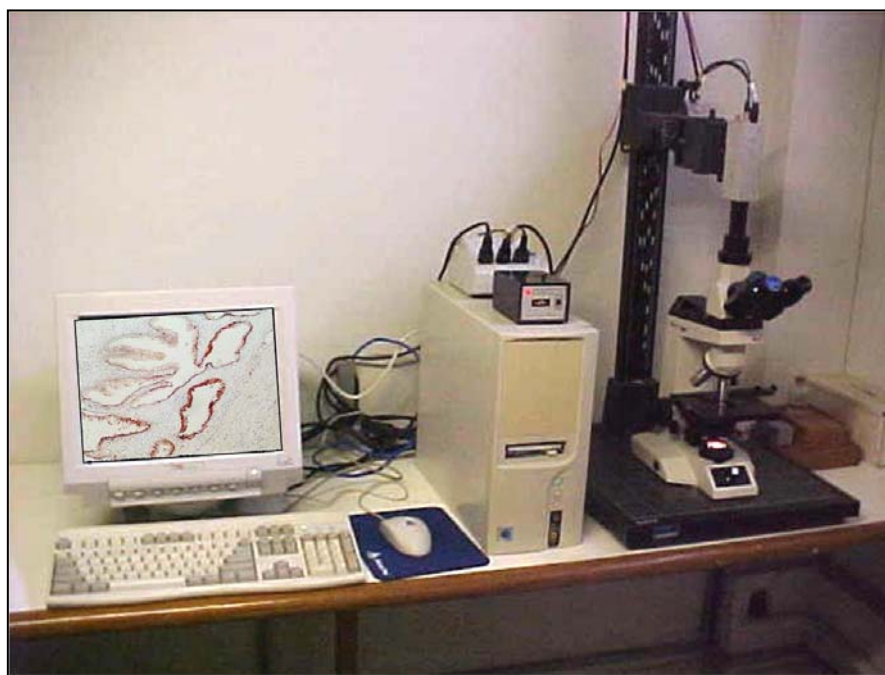


Figura 5. Estação de análise de imagens do Departamento de patologia, CCS-UFPE (abril, 2007).

Os perfis de marcação da imunohistoquímica (magnificação 200x) revelados pela reação do DAB+Peroxidase foram captados pelo ajuste do contraste do nível de cinza (gray value). A partir da captura das imagens dos tecidos marcados com o cerbB-2 e posterior conversão para escala de cinza foram selecionadas as áreas a serem contadas através do ajuste de calibração manual (threshold range).

O parâmetro morfométrico adotado foi área média total (μm^2) composta pelo número de partículas (perfil de marcação da imunohistoquímica) por campo captado (área de $12.234 \mu\text{m}^2$) na preparação histológica. A análise quantitativa das células marcadas foi realizada utilizando sistema automático, estudando-se três campos em cada caso.

Para minimizar distorções nos valores das medições devido a presença de células não marcadas, aplicou-se um Fator de Correção (FC) de acordo com a

equação $FC = s/S$, onde s é o valor da área superficial marcada e S a área total medida (Van Bemmelen & Musen, 1997).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando os testes de Tukey, para um nível de significância ($p < 0,05$).

4.3 Resultados e discussão

Os marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente pelo tumor ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor (Melo-Júnior, 2003). A caracterização e quantificação destas substâncias têm se mostrado de grande importância para a evolução da oncologia, visto que através dos resultados de inúmeros estudos pode-se hoje, tratar os pacientes de maneira mais direcionada e conseqüentemente, este tratamento tende a ter uma maior eficácia (Eisenberg & Koifman, 2001).

A utilização dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico do câncer de mama tem crescido muito nos últimos anos. Muitos desses marcadores, que 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 (Eisenberg & Koifman, 2001).

A expressão anômala ou exagerada de algumas dessas substâncias biológicas pode estar presente em neoplasias malignas da mama, apresentando relevância do ponto de vista prognóstico. Os fatores biológicos mais implicados com o prognóstico em câncer de mama são os receptores hormonais de estrógeno e progesterona, a expressão da proteína anômala p53 e a hiperexpressão e *human epidermal growth factor receptor* (HER-2/neu) (Sales *et al.*, 2004).

Estudos retrospectivos têm demonstrado que pacientes com câncer de mama em que o tumor apresenta alta expressão de cerbB-2 tem baixa resposta à terapia

hormonal para casos em que ocorreu metástase (Leitzel *et al.*, 1995; Carlomagno *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 1997). O erbB-2 é amplificado ou a proteína é superexpressa em 20% a 30% (Zilembo *et al.*, 2002) dos carcinomas ductais e em 40% a 70% das lesões intraductais (Oliveira *et al.*, 2004) e esta amplificação está correlacionada a um fenótipo mais agressivo (Ganceberg *et al.*, 2000).

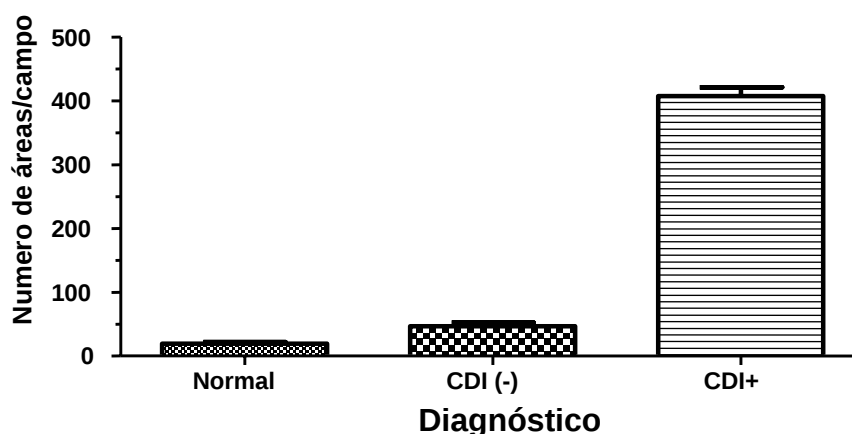
A amplificação do gene erbB-2 tem sido descrita em 10-40% dos carcinomas de mama. A expressão aumentada da proteína cerbB-2, detectada por imuno-histoquímica, ocorre em cerca de 20% de todos os cânceres de mama e em 25% dos CDI (Carcinoma Ductal Invasivo). Nenhum aumento de expressão tem sido descrito no Carcinoma Lobular in situ (De Potter & Schelfhout, 1995), mas há relatos de que 10% dos carcinomas medulares superexpressam cerbB-2 (Eisenberg & Koifman, 2001).

Neste trabalho, observou-se que 76% dos casos de carcinoma ductal invasivo apresentaram marcação positiva para cerbB-2 (**Figura 6**), corroborando com os resultados de Madan e colaboradores (2006) que encontraram uma positividade de 85% no mesmo tipo de carcinoma. No entanto, diversos estudos detectaram a superexpressão de cerbB-2 em torno de 10-30% dos casos analisados (Sharma *et al.*, 1999; Reed *et al.*, 2000) de tumores de mama do tipo ductal infiltrante. De uma maneira geral, a super-expressão de cerbB-2 pode ser encontrada em 10% a 40% dos tumores de mama não metastáticos, como demonstrado nos resultados de Silva e colaboradores (2002).

As discrepâncias entre os estudos têm sido explicadas e atribuídas às diferenças na metodologia e à ampla variabilidade na sensibilidade da imunohistoquímica, dependendo de diferentes clones do anti-Her-2/neu e suas

perdas por causa de alterações antigênicas causadas no procedimento da fixação (Menczer *et al.*, 2007).

Figura 6. Análise comparativa da positividade da proteína cerbB-2 em amostras teciduais de mama e carcinoma ductal infiltrante



Normal = Mama normal

CDI (-) = Carcinoma ductal invasivo com diagnóstico negativo para cerbB-2

CDI (+) = Carcinoma ductal invasivo com diagnóstico positivo para cerbB-2

Os resultados obtidos da análise de imagem das amostras em questão demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre o número de áreas marcadas do tecido normal ($19 \pm 4,2$) e do carcinoma ductal invasivo negativo para a expressão de cerbB-2 (46 ± 23), no entanto houve diferença entre este dois grupos e o carcinoma ductal invasivo com expressão tecidual positiva para a proteína (408 ± 157).

A amplificação do gene erbB-2 e a superexpressão da proteína cerbB-2 têm sido estudada em uma variedade de tecidos com tumores malignos, entre os quais estão: pulmão, onde Shigematsu e colaboradores (2005) demonstraram a amplificação gênica em 1,6% dos casos analisados; ovário, que é objeto de um maior número de pesquisas com resultados um tanto contraditórios, enquanto alguns

pesquisadores encontraram uma positividade entre 50% (Furger *et al.*, 1998) e 97% (King *et al.*, 1996). Trabalhos mais recentes demonstram a ausência da expressão da proteína em ovário (Kusamura *et al.*, 2003; Leibl *et al.*, 2006; Menczer *et al.*, 2007); próstata, onde foi demonstrada a superexpressão de cerbB-2 (Kallakury, 1998; Ross *et al.*, 1997), como também em intestino (Tanner *et al.*, 2005; Schuell *et al.*, 2006).

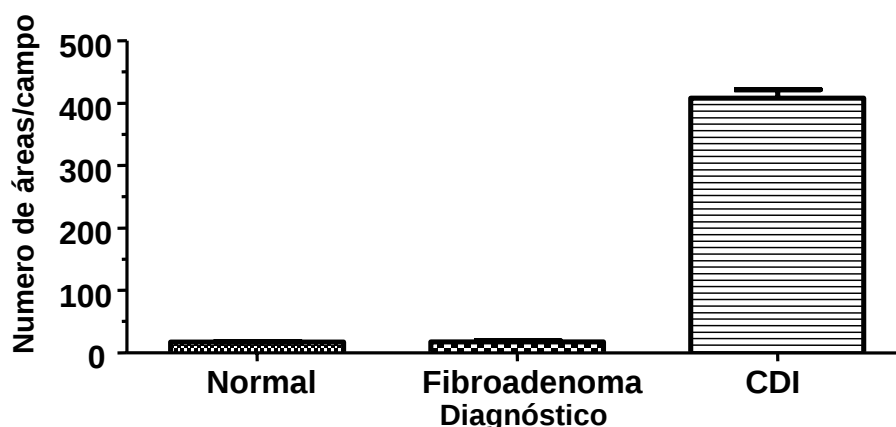
Estudos mais recentes demonstraram uma variação de positividade de 10% a 25% para a superexpressão de Her-2/neu em carcinomas de ovário (Wu *et al.*, 2004; Skirnisdottir *et al.*, 2001; Ferradina *et al.*, 2002).

Uma das razões para o presente estudo investigar a expressão de cerbB-2 em tecidos mamários com fibroadenoma se deve ao fato de que este distúrbio tem sido correlacionado a vários processos neoplásicos na mama. Embora a explicação para este fenômeno esteja longe de ser encontrada, determinar os aspectos comuns e distintos para esta doença e suas respectivas complicações tem atraído cada vez mais o interesse dos pesquisadores (Calado & Lima, 2004)

Fibroadenoma da mama é um frequente tumor benígno, formado por componentes epiteliais e estromais, que ocorre geralmente em mulheres jovens e raramente está associado ao desenvolvimento de malignidade. Entretanto em revisão de 22 anos da literatura japonesa, Abe e colaboradores (2004) encontraram 16 casos de carcinoma com fibroadenoma, onde 18,8% eram carcinomas ductais *in situ*, 37,5% eram carcinomas ductais invasivos, 37,5% carcinomas lobulares *in situ*, e 6,3% carcinomas lobulares invasivos. O pequeno número de casos de fibroadenoma com carcinoma é refletido por poucos trabalhos e estudos de casos, além do fato de que o comportamento destes tumores ainda não está bem definido (Marubashi *et al.*, 1999). No presente estudo não foi observada a expressão do

cerbB-2 em nenhum dos tecidos normal ou com fibroadenoma (**Figura 7**), no entanto um estudo realizado pela DAKO para esclarecimento dos usuários dos kits comercializados por esta empresa, demonstra a expressão desta proteína em tecido normal de alguns órgãos como, mama, rim, pulmão, pâncreas, próstata, pele, estômago e tonsila (DAKO, 2002). Quanto ao fibroadenoma, durante a revisão da literatura deste trabalho foram encontrados poucos relatos sobre a pesquisa de marcadores de proliferação ou transformação neste tipo de tumor, e em nenhum dos casos foi indicado um aumento da expressão dos marcadores.

Figura 7. Análise digital de imagem do número de áreas imunomarcadas pelo anti-cerbB-2 em lesões tumorais da mama



CDI = Carcinoma Ductal Invasivo

Outros marcadores têm sido propostos para investigação e diferenciação das lesões tumorais da mama, como por exemplo o MIB-1 (mindbomb homolog 1 – *Drosophila*) e a FAK (Focal Adhesion Kinase). Em sua avaliação do índice de proliferação celular com o emprego do anticorpo monoclonal MIB-1, Einsenberg e Koifman (2001) demonstrou a importância deste marcador como valor prognóstico no carcinoma. Apesar de poucos estudos empregarem o MIB-1 em epitélio mamário

humano normal, no mesmo estudo foi observado a diminuição deste marcador no tecido normal de pacientes em tratamento quimioterápico.

Investigando a utilidade focal das proteínas de adesão FAK (Focal Adhesion Kinase) como marcadores de transformação maligna e indicadores prognósticos de câncer de mama, Madan e colaboradores (2006) demonstraram que as FAK, proteína que tem sua superexpressão implicada em transformação maligna e aquisição de fenótipo de tumor invasivo em diferentes tecidos, não é expressa no epitélio ductal benigno da mama nem no fibroadenoma, mas sim em carcinomas ductais *in situ* (100%) e em carcinomas ductais invasivos (85%).

Outro fator prognóstico que os marcadores teciduais têm ajudado a estabelecer é a idade média dos pacientes portadores de lesões tumorais malignas e benignas. A idade média das pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante foi de 52 anos, enquanto as que possuíam fibroadenoma apresentaram uma idade média de 36 anos, confirmando os achados da literatura, de que o fibroadenoma, geralmente, acomete as mulheres mais jovens (Abe *et al.*, 2004), enquanto os carcinomas de mama surgem, na maioria dos casos, em idade mais avançada (**Tabela 2**).

Tabela 2. Distribuição etária das lesões tumorais da mama.

	Faixa Etária/anos (%)			
Lesão*	15 – 29	30 – 45	46 – 60	> 60
CDI (-)	-	3 (25)	5 (42)	4 (33)
CDI (+)	1 (3)	11 (28)	14 (36)	13 (33)
Fibroadenoma	4 (36)	5 (45)	2 (18)	-

*CDI: Carcinoma Ductal Invasivo.

O método imuno-histoquímico (IHC) é atualmente o método mais empregado para a detecção de *cerbB-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 *cerbB-2*, esta última pode estar presente sem a amplificação do gene (Eisenberg & Koifman, 2001).

As principais vantagens dos métodos convencionais de imunohistoquímica podem ser resumidas como sendo: 1) possibilidade de ser realizado na maioria dos laboratórios; 2) rapidez; 3) necessidade apenas de microscópio óptico comum para visualização e interpretação dos resultados; 4) associação com evolução clínica.

As principais desvantagens são: 1) grande número de diferentes anticorpos disponíveis no mercado e com graus de antigenicidades distintas; 2) variedade do tipo de sistema de detecção utilizado; 3) falta de padronização do método escolhido para recuperação antigênica; 2) ausência de limites padronizados para definição de negatividade e positividade e distinção entre os diversos graus de positividade; 3) falta de um padrão de escore definido (Sales *et al.*, 2004)

Nas análises realizadas durante este estudo observou-se que a reação imonuhistoquímica positiva para *cerbB-2* apresenta um padrão de marcação de membrana celular (**Figura 8**), sendo desconsiderada qualquer marcação inespecífica em outras estruturas celulares como por exemplo citoplasma celular. Os padrões de marcação obtidos aqui estão de acordo com os dados relatados pela literatura recente (Gouvêa *et al.*, 2004).

Embora não exista um consenso com relação à maneira de quantificar os diferentes padrões de marcação, na rotina costuma-se utilizar os scores qualitativos que estabelecem a seguinte classificação: 0 (coloração em menos de 10%), 1+

(marcação fraca em mais de 10% das células), 2+ (coloração fraca a moderada em mais de 10% das células tumorais), 3+ (marcação intensa em mais de 10% das células tumorais (Montironi *et al.*, 2006). Entretanto, muitas vezes esta classificação não demonstra e muita acurácia científica, embora seja útil para o direcionamento da terapêutica a ser administrada aos pacientes (Eisenberg & Koifman, 2001).

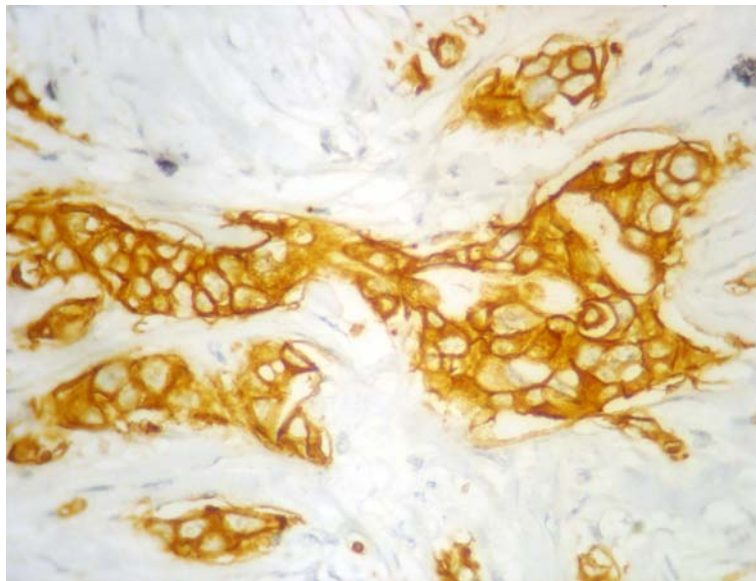
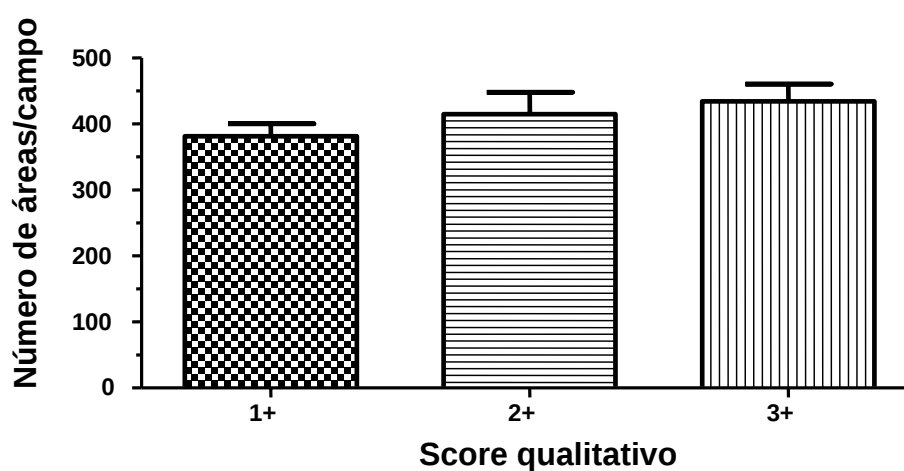


Figura 8. Padrão membranar da imunoexpressão da proteína c-erb-2 em carcinoma ductal infiltrante (Magnificação 200x).

Quando investigada a relação entre os três possíveis diagnósticos positivos do método manual para cerbB-2 (1+, 2+ e 3+), constatou-se que os resultados do número médio de áreas marcadas não apresentaram diferença estatisticamente significativas (**Figura 9**).

Figura 9. Análise comparativa entre o Score qualitativo e análise de imagens da expressão tecidual da proteína cerbB-2



Quanto ao sistema computadorizado de imagens utilizado, pode-se observar que as diferentes etapas desde a captura, processamento e análise morfométrica das imagens (**Figura 10**), foram executadas em um tempo médio de 10 min para cada lâmina analisada, o que demonstra que, após a calibração inicial do equipamento, o método proposto não se configura uma técnica muito demorada.

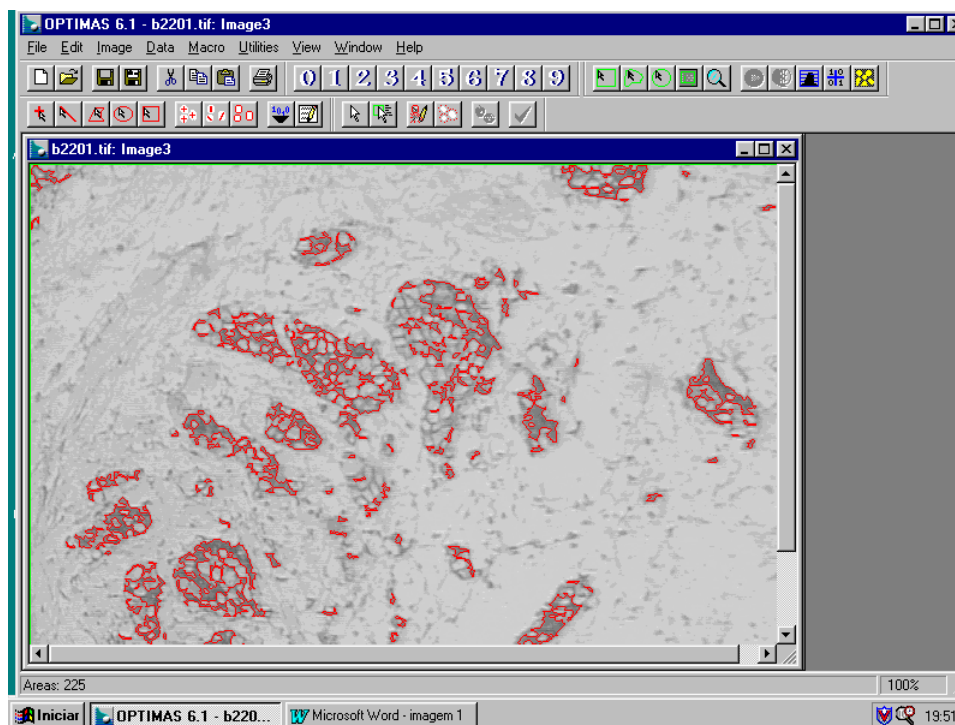


Figura 10. Imagem da tela do programa de análise de imagens (OPTIMAS 6.1), área média de células marcadas (em vermelho).

Tanto na prática clínica como em trabalhos experimentais é de fundamental importância a utilização de métodos para quantificar parâmetros relevantes observados na formação de tecido tumoral (Barbosa-Júnior, 2001).

Vários trabalhos têm empreendido a utilização de métodos morfométricos computadorizados para o estudo de distúrbios morfológicos da mama (Carter *et al.*, 2003). Entretanto, o número de trabalhos com a análise de imagem de técnicas imunohistoquímicas na mama é pequeno, porém aqueles que o fazem relatam ganhos significantes, principalmente como um instrumento de relevante valor prognóstico (Tawfik *et al.*, 2006).

A partir dos resultados recentes da análise morfométrica utilizando o sistema de análises OPTIMAS™ 6.1, pode-se constatar a eficiência desse sistema para

avaliar tecidos marcados com a técnica de imuno-histoquímica (Araújo-Filho *et al.*, 2006; Melo-Júnior *et al.*, 2006).

Todavia, existem algumas limitações, como padronização (calibração), alto preço do equipamento e longo período de treinamento, que podem ser as causas da lenta implantação dessa metodologia nos laboratórios de patologia, tanto para uso na rotina histológica como para utilização em imunohistoquímica de tecidos com lesões tumorais (Barbosa-Júnior, 2001).

O desenvolvimento e a execução de metodologias automatizadas podem trazer um grande benefício para a rotina clínica, sendo útil para o controle de qualidade e a quantificação exata da marcação imunohistoquímica. Alguns autores enfatizam a possibilidade do armazenamento dos dados e das análises realizadas, o que torna possível a re-análise a qualquer momento. Desta maneira os assistentes técnicos podem executar uma pré-análise que pode ser avaliada pelo perito posteriormente, e ainda pode ser usado como uma boa ferramenta para a formação de novos profissionais (Hilbe *et al.*, 2003).

Com base neste processo, diferentes trabalhos constataram uma maior precisão, sensibilidade e reprodutibilidade dos sistemas de quantificação semi-automáticos frente ao método manual em diferentes tipos de tecidos (Hilbe *et al.*, 2003; Barreiro *et al.*, 2003). No entanto estes sistemas também possuem suas áreas de conflito por não haver um sistema de referência bem definido (em área) para realizar a quantificação, por falta de consenso a respeito das unidades contábeis (células ou áreas marcadas), ou pela própria variedade de localização celular do marcador a ser identificado (nuclear, citoplasmático, membranar) (Gil & Wu, 2003).

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a superexpressão do cerbB-2 em casos de CDI é um fenômeno condizente com o estágio de proliferação

das células neoplásicas e que referente a este marcador específico não parece qualquer correlação com o padrão de expressão nos casos de fibroadenoma analisados, que pelo contrário apresentaram resultados semelhantes ao tecido mamário normal.

Outro dado importante deve-se ao fato de que não se pode constatar diferenças significativas entre os diferentes scores qualitativos e a análise morfométrica digital, o que no mínimo demonstra a necessidade de estudos mais acurados a fim de resolver esta dificuldade de interpretação.

4.4 Conclusões

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- As amostras de carcinoma ductal invasivo apresentaram uma superexpressão da proteína cerbB-2, diferentes das amostras de fibroadenoma e do tecido normal que não demonstraram aumento na expressão da proteína.
- A expressão da proteína cerbB-2 em carcinoma ductal invasivo foi significativamente maior que no tecido normal e em fibroadenoma.
- Não houve correlação entre os resultados do diagnóstico qualitativo manual e a análise morfométrica quantitativa dos tecidos marcados pela proteína cerbB-2.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; HANASAWA, K.; NAITOH, H.; ENDO, Y.; TANI T.; KUSHIMA, R. Invasive ductal carcinoma within a fibroadenoma of the breast. *Int J Clin Oncol* v. 9, p. 334-338, 2004.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Significância prognóstica dos receptores hormonais e do cerbB-2 no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Mastologia* v. 12, n. 2, p. 33-40, 2002.

AKIMOTO, T.; KATOH, H.; KITAMOTO Y.; SHIRAI K.; SHIOYA M.; NAKANO, T. Anatomy-based inverse optimization in high-dose-rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiotherapy for localized prostate cancer: comparison of incidence of acute genitourinary toxicity between anatomy-based inverse optimization and geometric optimization. *Int. J. Radiation Oncology Biol Phys*, 2006 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 01 mar.2006.

ALLEY, M.C. Morphometric and colorimetric analysis of human tumor-cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture. *Câncer Res.* v. 51, n. 4, p. 1247-1256, 1991.

ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; MELO-JÚNIOR, M.R.; LINS, C.A.B.; LINS, R.A.B.; MACHADO, M.C.F.P.; CARVALHO-JR, L.B.C.; PONTES-FILHO, N.T. Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens. *J Bras Patol Med Lab.* v. 42, n. 6, p. 469-475, 2006.

ASTOUL, C.H.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME E.J. Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 probed by in vitro interaction with mannose-binding lectins. *Biochem. Biophys. Commun.* v. 274, n. 2, p. 455-460, 2000.

AYHAN, S. et al. Histologic profiles of the breast reduction specimens. *Aesth Plast Surg*, v. 26, p. 203-05, 2002.

BACCHI, C.E.; ALMEIDA, P.C.C.; FRANCO, M. Manual de padronização de laudos histopatológicos (Sociedade Brasileira de Patologia), 2a Edição, Reichmann & Affonso (Ed.), Rio de Janeiro. 266p, 1999.

BAILDAM, A.D. et al. Cyclosporin A and multiple fibroadenomas of the breast. *Br J Surg* v. 83, p. 1755, 1996.

BARBOSA-JÚNIOR, A.A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. *J. Bras. Patol.* v.37, n. 3, p. 197-200, 2001.

BARREIRO, B.; BADOSA, G.; QUINTANA, S.; ESTEBAN, L.; HEREDIA, J.L. Comparison between automatic and manual analysis in the diagnosis of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Arch Bronconeumol* v. 39, n. 12, p. 544-548, 2003.

BARTELS, P.H.; THOMPSON, D. The video photometer. In: *Image Analysis. A primer for pathologists.* Marchevsky AM & Bartels PH (Ed.) Raven Press Ltd. New York. p. 29-56, 1994.

BIESTERFELD, S.; KRAUS, H.L.; REINEKE, T. et al. Analysis of the reliability of manual and automated immunohistochemical staining producers: A pilot study. *Anal Quant Cytol Histol.* v. 25, p. 90-96, 2003.

BISHOP, J.W.; MARCELPOIL, R.; SCHIMID, J. Macfjhine scoring of Her2/neu immunohistochemical stains. *Anal Quant Cytol Histol.* v. 24, p. 257-262, 2002.

BURBANO, R.R.; LIMA, E.M.; KHAYAT, A.S.; BARBIERI NETO, J.; CABRAL, I.R.; BASTOS JR, L.; BAHIA, M.O.; CASARTELLI, C. Cytogenetic description of breast fibroadenomas: alterations related solely to proliferation? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 1003-1006, 2001.

CALADO, S.S.; LIMA, M.C.C.A. Estudo morfológico dos fibroadenomas da mama: uma análise comparativa entre grupos etários. *J Brás Med Lab*, v. 40, n. 6, p. 411-19, 2004.

CARLOMAGNO, C.; PERRONE, F.; GALHO, C. CerbB-2 overexpression decrease the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast câncer without axillary lymph-node metástases. *J Clin Oncol* v. 14, p. 2702-8, 1996.

CARTER, J.K.; CASTRO F.; KESSLER E.; ERICKSON, B. A computer model for the study of breast cancer. *Computer in Biology and Medicine* v. 33, p. 345-360, 2003.

CAVALLI, L.R.; CORNELIO, D.A.; WUICK, L.; BRAS, A.T.S.; RIBEIRO, E.M.S.F.; LIMA, R.S.; URBAN, C.A.; ROGATTO, S.R.; CAVALLI, I.J. Clonal chromosomal alterations in fibroadenomas of the breast. *Cancer Genet Cytogenet.* p. 131:120, 2001.

CLIMENT, M.A.; SEGUÍ, M.A.; PEIRÓ, G.; MOLINA, R.; LERMA, E.; OJEDA, B.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.J.; ALONSO, C. Prognostic value of Her-2/neu and p53 expression in node-positive breast cancer. Her-2/neu effect on adjuvant tamoxifen treatment. *The breast* v. 10, p. 67-77, 2001.

COHEN, C. Image Cytometry Analysis in Pathology. *Hum. Pathol.* v. 27, p. 428-493, 1996.

CONDE, D.M.; TERRESAN, R.Z.; KASHIMOTO, E.; CARVALHO, L.E.C.; FILHO, C.C. Fibroadenoma in axillary supernumerary breast: case report. *São Paulo Med. J.* v. 123, n. 5, p. 253-5, 2005.

CUNHA, G.R.; COOKE, P.S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interaction in hormonal responses. *Arch Histol Cytol.* v. 65, n. 5, p. 417- 434, 2004.

DABELSTEEN, E.; CLAUSEN, H.; MANDEL, U. Carbohydrate changes in squamous cell carcinomas. *APMIS.* (suppl. 27) v. 100, p. 130-138, 1992.

DAKO. HercepTest™ Interpretation Manual. 2002. Disponível em: <http://www.Dakocytomation.com>. Acesso em 25 mai. 2007.

DANTAS, K.A.; SANTOS, G.C.; FILHO, O.G. Sistemas de graduação para carcinoma: estudo comparativo da concordância cito-histológica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* v. 25, n. 2, 2003.

DATASUS, 2007. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus>. Acesso em 12 mai. 2007.

DE POTTER, C.R.; SCHELFHOUT, A.M. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Archiv* v. 426, p. 107-15, 1995.

DEMARTINES, N.; BATTEGAY, E.; LIEBERMANN, J.; OBERHOLZER, M.; RUFLI, T.; HARDER, F. Telemedicine: Perspectives and multidisciplinary approach. Schweiz. Med. Wochensh. v. 130, n. 9, p. 314-323, 2000.

DEMIRKAYA, O. Automated identification of stained cells in tissue sections using digital image analysis. Anal. Quant. Cytol. Histol. v. 21, n. 2, p. 93-102, 1999.

DIAMANDIS, E.P.; YOUSEF, G.M.; BUNTING, P. Human kallikrein 6 Zyme/protease M/Neurosin): A new serum biomarker of ovarian carcinoma. Clin. Biochem. v. 33, n. 7, p. 579-583, 2000.

DIERMEIER, S.; HORVÁTH, G.; KNUECHEL-CLARKE, R.; HOFSTAEDTER, F.; SZÖLLOSI, J.; BROCKHOFF, G. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. Experimental Cell Research v. 304, p. 604– 619, 2005.

DUBSKÁ, L.; ANDERA, L.; SHEARD, M.A. ER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: An unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. FEBS Letters v. 579, p. 4149–4158, 2005.

DUMITRESCO, R.G.; COTARLA, I. Understanding breast câncer risk — where do we stand in 2005? J Cell Mol Med.v. 9, n. 1, p. 208-21, 2005.

EINSENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão da literatura). Revista Brasileira de Cancerologia. v. 47, n. 4, p. 377- 88, 2001.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. 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 v. 19, p. 403-10, 1991.

EUSEBI, V.; ROSHINI, L.; ERDE, S.; ROSAI, J. Transcontinental consults in surgical pathology via the internet. Hum. Pathol. v. 28, p. 13-16, 1997.

FARIA, J.L. Carcinomas. In: Patologia Especial com aplicações clínicas. 2a ed. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. P. 687, 1999.

FERRADINA, G.; RANELLETTI, F.O.; LAURIOLA, L.; FANFANI, F.; LEGGE, F.; MOTTOLESE, M. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2), epidermal growth factor receptor (EGFR), and Her-2/neu expression in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, v. 85, n. 2, p. 305-10, 2002.

FIGUEIRÊDO-SILVA, J.; PONTES-FILHO, N.T.; MONTENEGRO, L.T.; SANTANA, J.W.; FREITAS, S.B. Esquistossomose mansônica experimental: Estudo morfométrico e experimental das células caliciformes intestinais. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pe.* v. 44, p. 21-25, 1999.

FRANCIS, I.M. Manual versus image analysis estimation of PCNA in breast carcinoma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* v. 22, n. 1, p. 11-16, 2000.

FURGER, C.; FIDDES, R.J.; QUINN, D.I.; BOYA, R.J.; DALY, R.J.; SUTHERLAND, R.L. Granulosa cell tumors express erbB4 and are sensitive to the cytotoxic action of heregulin beta2/PE40. *Cancer Res* v. 58, p. 1773-8, 1998.

FURNESS, P.; RASHBASS, J. The virtual double-headed microscope: telepathology for all? *Histopathol.* v. 36, n. 2, p. 182-183, 2000.

GANCEBERG, D. et al. Sensitivity of Her-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Anat Pathol*, v. 113, p. 675-82, 2000.

GIGER, M.L. Computerized Analysis of Images in the Detection and Diagnosis of Breast Cancer. *Seminars in Ultrasound CT and MRI* v. 25, p. 411-418, 2004.

GIL, J.; WU, H.S. Applications of image analysis to anatomic pathology: realities and promises. *Cancer Invest* v. 21, n. 6, p. 950-959, 2003.

GOUVÊA, P.A.; FERNANDES, J.R.M.; OLSON, S.J.; BRANDÃO, E.C.; LEITE, M.T.; GOBBI, H. Her-2/neu immunoreactivity in invasive mammary carcinomas: a comparative study using monoclonal and polyclonal antibodies including the HercepTestTM. *J Bras Patol Med Lab.* v. 40, n. 1, p. 27-32, 2004.

GUA, Y.; LI, H.; MIKI, J.; KIMA, K.H.; FURUSATO, B.; SESTERHENN, I.A.; CHUB, W.S.; MCLEODA, D.G.; SRIVASTAVA, S.; EWINGD, C.M.; ISAACS, W.B.; RHIMA, J.S. Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines. *Experimental cell research*. v. 312, p. 831-843, 2006.

HAHN, W.C.; WEINBERG, R.A. Rules for marking human tumor cells. *N Engl Med*. v. 347, p. 1593, 2002.

HAMILTON, P.W. Interactive computer-aided morphometry. In: *Quantitative Clinical Pathology*. Peter W. Hamilton & Derek C. Allen (Ed.), Blackwell-Science, USA, p. 342, 1997.

HAMILTON, P.W.; ALLEN, D.C. Morphometry in Histopathology. *J. Pathol*. v. 175, p. 369-379, 1995.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* v. 100, p. 57, 2000.

HARPIO, R.; EINARSSON, R. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin. Biochem*. v. 37, p. 512-518, 2004.

HERMAN, C.J. Image Cytometry in Pathology. *Hum. Pathol*. v. 27, p. 435-436, 1996.

HILBE, W.; GACHTER, A.; DUBA, H.C.; DIRNHOFER, S.; EISTERER, W.; SCHMID, T. et al. Comparison of automated cellular imaging system and manual microscopy for immunohistochemically stained cryostat sections of lung cancer specimens applying p53, ki-67 and p120. *Oncology Reports*; v. 10, n. 1, p. 15-20, 2003.

HOFFMANN, W.; SCHALAG, P.M. BRCA1 and BRCA2 breast Cancer Susceptibility Genes. *J Cancer Res Clin Oncol* v. 126, n. 9, p. 487-96, 2000.

HORNER, N.K.; LAMPE, J.W. Potencial mechanisms of diet therapy for fibrocystic breast conditions show inadequate evidence of effectiveness. *Journal of American Dietetic Association*, v. 100, p. 1368-1380, 2000.

IAN, S.F.; D'ARRIGO, C. Pathogenesis of breast carcinoma. *Int J Clin Pract*. v. 58, n. 1, p. 35-40, 2004.

INCA - Instituto Nacional de Câncer Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 94p, 2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>. Acesso em: 08 fev. 2007.

IQBAL, M.; DAVIES, M.P.; SHOKER, B.S.; JARVIS, C.; SINBSON, D.R.; SLOANE, J.P. Subgroups non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of estrogen receptor-positive cells. *J Pathol* v. 193, p. 333, 2001.

KAKAR, S.; PUANGSUVAN, N.; STEVENS, J.M.; SERENAS, R.; MANGAN, G.; SAHAI, S.; MIHALOY, M.L. HER-2/neu assessment in breast câncer by immunohistochemistry and fluorescence In Situ Hybridization: comparason of results and correlation with survival. *Molecular Diagnosis*, v. 5, p. 3, 2000.

KALLAKURY, B.V.; SHEEHAN, C.E.; AMBROS, R.A.; FISHER, H.A.; RONALD, P.; KAUFMAN, J.; MUARACA, P.J.; ROSS, J.S. Correlation of p34^{cdc2} cyclin-dependent kinase overexpression CD44s dowregulation, and HER-2/neu oncogen amplification with recurrence in prostate adenocarcinomas. *J Clin Oncol*, v. 16, p. 1302-1309, 1998.

KING, L.A.; OKAGAKI, T.; GALLUP, D.G.; TWIGGS, L.B.; MESSING, M.J.; CARSON, L.F. Mitotic count, nuclear atypia, and immunohistochemical determination of Ki-67, c-myc, p21-ras, c-erbB2, and p53 expression in granulosa cell tumors of the ovary: mitotic count and Ki-67 are indicators of poor prognosis. *Gynecol Oncol* v. 61, p. 227-32, 1996.

KOBAYASHI, M.; OOI, A.; ODA, Y. et al: Protein overexpression and gene amplification of cerbB-2 in breast carcinomas: A comparative study of immunohistochemistry and fluorescence in sito hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Human Pathology*. v. 33, p. 21-28, 2002.

KUSAMURA, S.; DERCHAIN, S.; ALVARENGA, M,; GOMES, C.P.; SYRJANEN, K.J.; ANDRADE, L.A. Expression of p53, cerbB-2, Ki-67, and CD34 in granulose cell tumor of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* v. 13, p. 450-7, 2003.

LAMBERT, W.C.; LAPIDUS, A.; RAO, B.K. Melanoma diagnosis by computerized analysis of clinical images. *Arch. Dermatol*. v. 137, n. 3, p. 377, 2001.

LEBOIT, P.E.; SEXTON, M. Microcystic adnexal carcinoma of the skin - A reappraisal of the differentiation and differential-diagnosis of na under recognized neoplasm. J. Am. Acad. Dermatol. v. 29, n. 4, p. 609-618, 1993.

LEE, C.M.; LEE, R.J.; HAMMOND, E. et al: Expression of HER2neu (cerbB-2) epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. Gynecol Oncology v. 93, p. 209-214, 2004.

LEIBL, S.; BODOD, K.; GOGG-KAMMERER, M. et al. Ovarian granulosa cell tumors frequently express EGFR (Her-1), Her-3, and Her-4: an immunohistochemical study. Gynecol Oncol v. 101, p. 18-23, 2006.

LEITZEL, K.; TERATOMOTO, Y.; KONTAD, K. et al. Elevated serum cerbB-2 antigen leves and decreased response to hormone therapy of breast cancer. J Clin Oncol, v. 13, p. 1129-1135, 1995.

LUNDIN, C.P.; MERTENS, F.; RIZOU, H.; IDVALL, I.; GEORGIU, G.; INGVAR, C.; PANDIS, N. Cytogenetic Changes in Benign Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Breast. Cancer Genet Cytogenet v. 107, p. 118-120, 1998.

MADAN R.; SMOLKIN, M.B.; COCKER R.; FAYAD, R.; OKTAY, M.O. Focal adhesion proteins as markers of malignant transformation and prognostic indicators ina breast carcinoma. Human Pathology v. 37, p. 9-15, 2006.

MARUBASHI, S.; NAKANO, Y.; MONDEN, T. et al. A case of breast cancer arising in fibroadenoma (in Japanese). Jpn J Clin Surg 60: 2057-2061, 1999.

MASON, M.D.; DAVIES, G.; JIANG, W.G. Cell adhesion molecules and adhesion abnormalities in prostate cancer. Crit. Rev. Oncol. v. 41, p. 11-28, 2002.

MELO-JÚNIOR M.R.; ARAÚJO-FILHO J.L.S.; PATU, V.J.R.M.; MACHADO, M.C.F.P.; BELTRÃO, E.I.C.; CARVALHO-JR, L.B. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. J Bras Patol Med Lab. v. 42, n. 6, p. 455-460, 2006.

MELO-JÚNIOR, M.R. Histoquímica e análise digital de imagens em neoplasias cutâneas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 56p. (Tese Mestrado), 2003.

MENCZER, J.; SCHIREIBER, L.; CZERNOBILSKY, B. et al. Is Her-2/neu expressed in nonepithelial ovarian malignancies? *Am J Obstet Gynecol.* v. 196, p. 79.e1-79.e4, 2007.

MENEZES, M.V.M.; CESTARI, A.L.O.; ALMEIDA, O.; ALVARENGA, M.; PINTO, G.A.; GURGEL, A.S.C.; SOUZA, G.A.; ZEFERINO, L.C. Protein expression of cerbB-2 and p53 in normal ducts, ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the same breast. *São Paulo Medicine Journal* v. 124, n. 3, p. 121-124, 2006.

MIRTRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research* v. 544, p. 9–41, 2003.

MITCHELL, B.S.; SCHUMACHER, U. The use of the lectin *Helix pomatia* agglutinin (HPA) as a prognostic indicator and as tool in cancer research. *Histol. Histopathol.* v. 14, n. 1, p. 217-226, 1999.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. Carcinogênese. In: *Patologia processos gerais*. Capítulo 13, 4a edição, Editora Atheneu, São Paulo, 320p, 2004.

MONTIRONI, R. et al. Nuclear changes in the normal-looking columnar epithelium adjacent to and distant from prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. Morphometric analysis in whole-mount sections. *Virchows Archives.* v. 437, n. 6, p. 625-34, 2000.

MONTIRONI, R.; MAZZUCHELLI, R.; BARBISAN, F.; STRAMAZZOTTI, D.; SANTINELLI, A.; SCARPELLI, M.; BELTRAN, A.L. HER2 expression and gene amplification in pT2a Gleason score 6 prostate cancer incidentally detected in cystoprostatectomies: comparison with clinically detected androgen-dependent and androgen-independent cancer. *Human Pathology* v. 37, p. 1137-1144, 2006.

MORA, L.B.; BUETTNER, R.; AHMAD, N.; SEIGNE, J.D. Prostate adenocarcinoma: Celular and molecular abnormalities. *Cancer Control.* v. 8, n. 6, p. 551-561, 2001.

NOVIK, V.I. The use of computer technology in the cytologic diagnosis of neoplasms. *Vopr. Onkol.* v. 46, n. 2, p. 239-42, 2000.

OBERHOLZER, M.; ÖSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRÜHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell. Biol.* v. 105, p. 333-355, 1996.

OJOPI, E.P.; ROGATTO, S.R.; CALDEIRA, J.R.; BARBIERI-NETO, J.; SQUIRE, J.A. Comparative genomic hybridization detects novel amplifications in fibroadenomas of the breast. *Genes Chromossomes Câncer* v. 30, p. 25, 2001.

OLIVEIRA, A.B.; LUCA, L.A.; CARVALHO, G.T.; ARIAS, V.E.A.; CARVALHO, L.R. Assunção M C. Imunoexpressão do cerbB-2 nas lesões epiteliais proliferativas intraductais da mama de mulheres. *Rev Assoc Med Bras*; v. 50, n. 3, p. 324-9, 2004.

PARKIN, D.M. International variation. *Oncogene* v. 23, p. 6329-40, 2004.

PETERSON, I.; WOLF, G.; ROTH, K.; SCHLÜNS, K. Telepathology by the internet. *J. Pathol.* v. 191, n. 1, p. 8-14, 2000.

PHIPPS, S.; YANG, T.H.J.; HABIB, F.K.; REUBEN, R.L.; MCNEILL, S.A. Measurement of tissue mechanical characteristics to distinguish between benign and malignant prostatic disease. *Urology.* v. 66, p. 447–450, 2005.

PORTER, D.; LAHTI-DOMENICI, J.; KESHAVIAH, A.; BAE, Y.K. et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res* v. 1, p. 362, 2001.

PRADAL, M.; MENEZES, A.M.; DI DIO, R. Marcadores tumorais. *LAES & HAES.* v. 30, p. 146-182, 2004.

PRESS, M.F. et. Al HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potencial source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*, v. 54, p. 2771-7, 1997.

QUIRINO, I.L.G. et al. Alteração histopatológica em espécimes de mamoplastia redutora contralateral (MRC) a câncer de mama. *Jornal Brasileiro de Patologia*, v. 37, n. 2, p. 94, 2001.

RABINOVICH, G.A. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties: a trip from the gene to clinical therapy. *Cell. Death Differentiation*. v. 6, p. 711-721, 1999.

RABINOVICH, G.A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M. Role of Galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1572, p. 274-284, 2002.

RASHBASS, J. The impact of information technology on histopathology. *Histopathology*. v. 36, n. 1, p. 1-7, 2000.

REED, W.; HANNISDAL, E.; BOEHLER, P.; GUNDERSEN, S.; HOST, H.; NESLAND, J. The prognostic value of p53 and cerbB-2 immunostaining is over-rated for patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* v. 88, p. 804-13, 2000.

ROBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. Bases Patológicas das Doenças. 7ª Edição; Ed. Guanabara-Koogan, Editores: Kumar V, Abbas K, Nelson F, Robbins S. Rio de Janeiro. p. 1169-1205, 2005.

ROELS, S.L.M.F. DNA ploidy and nuclear morphometric variables for the evaluation of melanocytic tumors in dogs and cats. *Am. J. Vet. Res.* v. 61, n. 9, p. 1074-1079, 2000.

ROSS, J.S.; SHEEHAN, C.; HAYNER-BUCHAN, A.M.; AMBROS, R.A.; KALLAKURY, B.V.; KAUFMAN, R.; FISHER, H.A.; MURACA, P.J. HER-2/neu gene amplification status in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol*, v. 28, p. 827-833, 1997.

RUBEGNI, P.; CEVENINI, G.; BURRONI, M. Digital dermoscopy analysis of pigmented skin lesions: An important auxiliary for clinical decision and not for automatic diagnosis. *Arch. Dermatol.* v. 137, n. 3, p. 378, 2001.

SALES, A.O.; RODRIGUES, S.J.P.; BACCHI, C.E. Estudo comparativo entre os métodos LSAB®+ e Herceptest® para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama. *J Bras Patol Med Lab*, v. 40, n. 4, p. 265-71, 2004.

SCHUELL, B.; GRUENBERGER, T.; SCHEITHAUER, W.; ZIELINSKI, C.H.; WRBA, F. HER 2/neu protein expression in colorectal cancer. *BMC Cancer*, v. 6, p. 123, 2006.

SHARMA, B.K.; RAY, A.; KAUR, S.; GUPTA, S. Immunohistochemical co-expression of cerbB-2/Neu oncoprotein, altered tumor suppressor (p53) protein, EGF-R and EMA in histological subtypes of infiltrating duct carcinoma of the breast. *Indian J Exp Biol* v. 37, p. 223-7, 1999.

SHEKHAR, M.P.; NANGIA-MAKKER, N.; TAIT, L.; RAZ, M.F. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial– endothelial interactions. *Am. J. Pathol.* v. 165, p. 1931–1941, 2004.

SHIGEMATSU, H.; TAKAHASHI, T.; NOMURA, M.; MAJMUDAR, K.; SUZUKI, M.; LEE, H.; WISTUBA, I.I.; FONG, K.M.; TOYOOKA, S.; SHIMIZU, N.; FUJISAWA, T.; MINNA, J.D. Somatic mutations of the HER2 Kinase Domain in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* v. 65, n. 5, p. 1642-6, 2005.

SILVA, D.M.; SADDI, V.A.; MOMOTUK, E.G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. *Revista Brasileira de Cancerologia.* v. 48, n. 1, p. 39-48, 2002.

SKIRNISDOTTIR, I.; SORBE, B.; SEIDA, I.Y. The growth factor receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, v. 11, n. 2, p. 119-29, 2001.

SLAMON, D.J.; CLARCK, G.M.; WONG, S.G. et al. Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/ cerbB-2 oncogene. *Science.* v. 235, p. 177-181, 1987.

STRAUCHEM, J.A. Further called for "Teleconsultation". *Am. J. Clin. Pathol.* v. 113, n. 4, p. 595, 2000.

SYNOPSIS, A. Image and Sign Process. Yearbook of medical Informatics. Hasnam (Ed.), 1996.

TAFURI, L.S.A.; GOBBI, H. Hiperplasias epiteliais em espécimes de mamoplastia redutora estética bilateral e mamoplastia redutora contralateral a câncer de mama. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* v. 41, n. 2, 2005.

TANNER, M.; HOLLEM'N, M.; JUNTILA, T.T.; KAPPANEN, A.I.; TOMMOLA, S.; SOINI, Y.; HELIN, H.; SALO, J.; JOENSUU, H.; SIHVO, E.; ELENIOUS, K.; ISOLA, J. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIa gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Annals of Oncology*. v. 16, p. 273-278, 2005.

TAWFIK, O.W.;KIMLER, B.F.;DAVIS, M.;DONAHUE, J.K.;PERSONS, D.L.; FAN, F.; HAGEMEISTER, S.; THOMAS, P.; CONNOR, C.; JEWELL, W.; FABIAN, C.J. Comparison of immunohistochemistry by automated cellular imaging system (ACIS) versus fluorescence in-situ hybridization in the evaluation of HER-2/neu expression in primary breast carcinoma. *Histopathology*. v. 48, n. 3, p. 258-67, 2006.

TRUE, L.D. Morphometry Applications in Anatomic Pathology. *Hum. Pathol.* v. 27, p. 450-467, 1996.

USTUN, C.; CEBER, E. Ethnical issues for cancer screenings five countries-four types of cancer. *Prevent. Med.* v. 39, p. 223-229, 2004.

VAN BEMMEL, J.H.; MUSEN, M.A. Biostatistical Methods. In *Handbook of medical informatics*. Springer-Velag (Ed.) Germany, p. 387-96, 1997.

VILLANUEVA, M.A. Elimination of artifacts on native western blots arising from endogenous lectin activity. *J. Biochem. Biophys. Methods*. v. 50, n. 2-3, p. 141-49, 2002.

WAGGONER, A.; TAYLOR L.; SEADLER, A.; DURLAY, T. Multiparameter Fluorescence Imaging Microscopy: Reagents and Instruments. *Hum. Pathol.* v. 27, p. 494-502, 1996.

WALDMAN, F.M.; SAUTER, G.; SUDAR, D.; THOMPSON, C.T. Molecular Cytometry of Cancer. *Human Pathology*. v. 27, p. 441-449, 1996.

WEINBERG, D.S, Quantitative Immunocytochemistry in Pathology. In: *Image Analysis. A primer for pathologists*. Marchevsky AM & Bartels PH (Ed.) Raven Press Ltd. New York. p. 235-260, 1994.

WHIMSTER, W.F.; COOKSON, M.J.; Three-dimensional reconstruction. In: Quantitative Clinical Pathology. Hamilton PW (Ed.). Blackwell Science Ltd. Oxford. p. 289-300, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 05 jun. 2005.

WU, Y.; SOSLOW, R.A.; MARSHALL, D.S.; LEITAO, M.; CHEN, B. Her-2/neu expression and amplification in early stage ovarian surface epithelial neoplasms. *Gynecologic Oncology*, v. 95, n. 3, p. 570-5, 2004.

YAMAUCHI, H.; O'NEIL, A.; GELMAN, R. et al. Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol*, v. 15, p. 2518-2525, 1997.

YARBRO, J.W.; PAGE, D.L.; FIELDING, L.P.; PARTRIDGE E.E.; MURPHY, G.P. American Joint Committee On Cancer Prognostic Factors Consensus Conference. *Cancer* v. 86, p. 2436-46, 1999.

ZERBINI, M.C.N.; STIEPICH, M. Fatores prognósticos no câncer de mama. Disponível em: <http://www.institutofleury.org.br/site/calandra.nsf>. Acesso em 22 abr. 2007.

ZILEMBO, N.; MARIANI, L.; MARTINETTI, A.; MICELI, R.; SEREGNI, E.; BISHISAO, E.; LA TORRE, I.; POZZI, P.; FERRARI, L.; DE CANDIS, D.; LONGARINI, V.R.; BAJETTA, E.; BOMBARDIERI, E. CerbB-2 serum level as prognostic factor in hormonally treated advanced breast cancer patients. *The Breast* 11:286-294, 2002.

6. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 015/2007-CEP/CCS

Recife, 14 de fevereiro de 2007

Registro do SISNEP FR – 118941

CAAE – 0319.0.172.000-06

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 312/06

Título: “Expressão sérica e tecidual da proteína c-erbB-2 em mulheres portadoras de carcinoma de mama: um estudo prospectivo e retrospectivo”

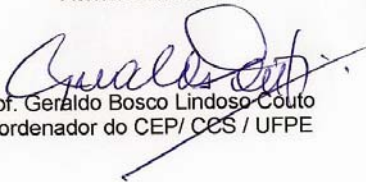
Pesquisador Responsável: Renata Kelly de Araújo Veiga

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 14 de fevereiro de 2007.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório ao final da pesquisa (30/08/2007)

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
Mestranda Renata Kelly de Araújo Veiga
Programa de Pós-Graduação em Odontologia – CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588; cepccs@ufpe.br

Anexo 2. Normas para submissão do artigo



ISSN 1676-2444 printed version ISSN 1678-4774 online version

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Analysis of the manuscripts](#)
- [Copyrights](#)
- [Ethic](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)

The **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine)**, a continuation of *Jornal Brasileiro de Patologia* (Brazilian Journal of Pathology), and published on a bimestrial basis (February, April, June, August, October and December) is directed towards the publication of scientific articles that contribute to the development of the area of Laboratory Medicine (Clinical Pathology, Pathology, Cytopathology). It accepts the following categories of articles: original articles, review articles, case reports, short communications, updating articles, letters to editors and reviews.

Analysis of the manuscript

The manuscript submitted for publication will be forwarded to one or more referees, scientific peers, of renown and specific knowledge to consider the discussed subject. After the answer of the referee, **JBPML** Editor shall contact the authors to inform them if their article is rejected, or the steps to be taken for the definitive publication of the manuscript.

Copyrights

Authors are kindly requested to send an undertaking together with the letter to the Editors. Therefore, when submitted for publication, the manuscript should be accompanied by copyright transfer document including each author's signature (the model is given below): I/We... author/authors of the article entitled... which we hereby submit for publication in the Brazilian Journal of Laboratory Medicine, agree that the copyrights of the above manuscript shall become the exclusive property of Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine), and that any full or partial reproduction is prohibited, without obtaining the prior and required authorization.

We also declare that the article is original in form and content, and has not been published or submitted for publication in any other scientific periodical in full or in part.

We declare the effective participation of all the authors in conceiving and writing the article in question including performance of experiments that resulted in this communication.

We likewise declare our commitment to the data analysis and editing of the manuscript.

We clearly state that we have no conflict of interest with neither the theme discussed nor the products mentioned.

Date: Signature:

Ethic

All research involving human beings – including organs and/or tissues alone as well as medical records or clinical exams results – should be in accordance with Resolution 196/96 from Conselho Nacional de Saúde (<http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm>). Papers to be published shall be accompanied by the patient informed consent and by a copy of the ethics committee certificate from the institution where research has been carried out, in accordance with the Declaration of Helsinki, 1989 (<http://www.bioetica.ufrgs.br/helsin4.htm>).

In experimental research involving animals, ethical principles from the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal–COBEA (<http://www.cobea.org.br/etica.htm#10>) should be respected. Also, rules established by the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C. 1996) <<http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guidex.htm>> should be considered.

It is essential to identify with accuracy chemical substances and drugs used. It may not be used patients' names or initial on illustrative material, as well as is vetoed to inform brand names, companies names and/or hospitals registries.

Form and preparation of manuscript

How to prepare the manuscript before submitting to the Editors

Three hardcopies of the manuscript should be submitted, including a copy in 3 1/2 floppy disk with the text file in Word for Windows 6.0 or higher.

Illustrations and tables should be prepared in a graph processor.

The first page should include: 1) title of the article: should be concise and complete, describing the subject it refers to. Unnecessary words should be omitted. The title should be translated into English; 2) full name(s) of the author(s); 3) academic position and name of institution that each author is linked to, followed by the respective address; 4) name of the department and/or institution where the work was performed; 5) name of the corresponding author; 6) if the work was supported by any financial agency, please mention the name of the sponsors; 7) if based on a thesis, mention the title, year and institution where it was presented; 8) if it was presented in

a scientific meeting, mention the name of the event, city and country where it was held and date.

Abstracts and uniterms

The second page should contain two abstracts: one abstract in Portuguese (Resumo) and the other in English (Abstract). The abstracts should identify the objectives of the work, procedures and conclusions (maximum of 250 words). Three to six key words that represent the subject of the presented work should be provided by the author using the controlled vocabulary “Decs – Descritores em Ciências da Saúde (Health Science Descriptors)” (Bireme). They should be submitted in Portuguese and English.

The mailing address of the authors should come at the end of the article.

Acknowledgments

Should be brief, direct and addressing only the person or institution that contributed substantially to the development of the work and shall come before the bibliographical references.

Text structure

Original article

Contributions intended to disclose unpublished original research results, which may be duplicated or disseminated. Articles may contain up to 4,000 words. Their formal structure should be: Introduction; Material and method; Results; Discussion; and Conclusions. The use of subtitles is recommended, particularly in the Discussion. The clinical implications and limitations of the study should be pointed out. Detailing of Material and method is recommended. Submission of a structure abstract in Portuguese and English is required for these articles, with headings obeying the formal presentation: Introduction, Objectives; Material and method; Results; Discussion; and Conclusions. The Abstract should be preceded by the English title. Bibliographical references should appear at the end of the text.

Short communication

These are short reports that should present: 1) preliminary study data with suggestive findings guaranteeing a more definitive study; 2) replication studies; and 3) studies with negative results corresponding to important topics. These articles should have up to 1,500 words, include an unstructured abstract and, at most, a table or figure, in addition to bibliographical references.

Review article

Systematic critical evaluation of the literature on a certain subject, which should contain conclusions. Should contain up to 5,000 words. The text of the article, with exception of Introduction, Discussion and Conclusion, shall be decided by the author. A structured abstract in Portuguese and another in English

are required. A comprehensive list of bibliographical references should appear at the end of the text.

Updating articles

These are descriptive and interpretive manuscripts based on recent literature on the global status of a specific subject. Should contain up to 3,000 words and be briefer than Review articles. The division of the text shall be a decision of the author. Submit an unstructured abstract and references.

Case reports

These are manuscripts based on clinical observations followed by analysis and discussion. Should contain up to 1,500 words. Their structure should present, at least, the following topics: Background; Case report(s); Discussion. Include an unstructured abstract in the language of the text and in English.

Letters to the Editors

Include letters discussing recent articles published in the journal or relate original research or significant scientific findings. Brief letters with a maximum of 500 words (including references, without tables or figures) shall be considered if the statement "for publication" is clearly written.

The letter must be signed by all its authors.

Reviews

Should be brief, provided by field specialists, consisting of a commented summary, with opinions, which may guide readers interested in the publication.

Before the text, include the complete bibliographical reference of the reviewed work, and at the end, signature, academic position and the name of institution that the author of the review is linked to.

References

Bibliographical references should come at the end of the article.

Titles of periodicals should be referenced in abbreviated form according to the List of Journals Indexed in Index Medicus. If the reference list does not follow this adopted standard, the manuscript shall be immediately rejected without review of their contents.

Authors should certify that references cited in the text appear in the reference list with accurate dates and name of authors spelled correctly.

Authors are responsible for the accuracy of the references. Personal information, unpublished works or works in progress may be cited when absolutely necessary. However, they should not be included in the bibliographical reference list, but merely cited in the text or in a footnote.

The reference list should follow the style of the examples below:

If more than three authors collaborate in a publication, the first author should be mentioned followed by the Latin expression et al.

Examples:

- **Periodical articles (one author only)** COTRIM, F.L.S. Coleta de sangue para dosagem de triglicerídeos. *J Bras Patol*, v. 33, n. 4, p. 201-02, 1997.

- **Periodical articles (more than three authors)** ABREU, E. S. et al. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica imuno-histoquímica e por hibridização in situ. *J Bras Patol*, v. 33, n. 4, p. 178-84, 1998.

- **Online periodical article** YAZLE, J.S.R. et al. Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. *Rev Saude Publ*, São Paulo, v. 31, n. 5, 1997. Available at: <http://www.fsp.usp.br/rsp>. Accessed on: March 23, 1998.

- **Book as a whole (two authors)** RINGSVEN, M.K.; BOND, D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. Albany, N.Y.: Delmar Publishers, 1996.

- **Chapters or part of book edited by another author**

- **Part of book in electronic medium**

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: _____. *Entendendo o meio ambiente*. São Paulo, 1999. v. 1. Available at: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>. Accessed on: March 8, 1999.

- **Event in electronic médium**

SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total da educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. *Anais eletrônicos...* Recife: UFPe, 1996. Available at: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/educ/ce04.htm>. Accessed on: January 21, 1997.

- **Thesis or dissertation**

Oliveira, C. M. *Isolamento e caracterização de estreptococos de placa dental*. Rio de Janeiro, 1974. Tese (doutoramento) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- **Citations in the text**

Citations in the text should be identified with Arabic numerals (index numbers). The author's name and the year may also be added. References with more than one author should contain the author's surname followed by the expression et al, e.g. Higashi et al¹.

Tables and figures

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and titled.

Repetition of the above data in graphs is not recommended. In drawing tables, follow the “Normas de apresentação tabular (Table presentation standards)” established by the National Statistics Council and published by IBGE (1993). Illustration (graphs, pictures, drawings, etc.) should be numbered consecutively with Arabic numerals and cited as figures.

They should be sufficiently clear to enable production. Graphs should come prepared in a graph processor. The approximate places where the illustrations will be inserted as figures in the text should be indicated.

Abbreviations and names of medications

Abbreviations should be indicated on their first appearance in the text.

Use generic name of medications and indicate source of compounds not available for prescription.

Units of measurement, including their abbreviations, should be expressed in metric system and also in the International System (SI) between parentheses.

Address for sending originals

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial R. Dois de Dezembro, 78/salas 909 e 910 – Catete CEP 22220-040 – Rio de Janeiro-RJ – Brazil
Phone: (21) 2258-1024 E-mail: jbpml@sbpc.org.br

[\[Home\]](#) [\[About the journal\]](#) [\[Editorial Board\]](#) [\[Subscription\]](#)

© 2007 SBPC/ML, SBP, SBC

Rua Dois de Dezembro, 78/909 Catete 22220-040 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel.: +55 21 3077-1400 / 3077-1408 Fax. +55 21 2205-3386



jbpml@sbpc.org.br

Anexo 3. Trabalhos desenvolvidos durante o mestrado

Trabalhos apresentados em congresso

MELO JÚNIOR, Mário Ribeiro de; ARAÚJO FILHO, Jorge Luiz Silva; **VEIGA, Renata Kelly de Araújo**; CARVALHO-JR, Luiz Bezerra de. HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE RENAL AND GASTROINTESTINAL TISSUES FROM RATS EXPOSED TO ALCOHOL. XXXVI Reunião annual da SBBq, Salvador, 2007.

ARAÚJO, Virgínia Palermo; **VEIGA, Renata Kelly de Araújo** ; Barros, A. K. L. ; Chivers ; Montenegro, F. . **FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO CAUSADA POR ROTAVÍRUS EM DOIS HOSPITAIS**. In: 40º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2006, Curitiba. 40º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 2006.

VEIGA, Renata Kelly de Araújo ; MELO JÚNIOR, Mário Ribeiro de ; ARAÚJO FILHO, Jorge Luiz Silva ; ARAÚJO, Juliana Amorim ; LINS, Consuelo Antunes Barreto ; CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de . **Evaluation of cerbB-2 protein expression in breast carcinomas by immunohistochemistry and digital image analysis..** In: XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, Natal-RN, 2005

VEIGA, Renata Kelly de Araújo ; ARRUDA, Bruna Cavalcanti ; ARAÚJO, Virgínia Palermo ; LOUREIRO, Paula . **Estudo da Concentração Espermática por Faixa Etária de Indivíduos Atendidos em Laboratório Clínico Privado**. In: 39º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial.

VEIGA, Renata Kelly de Araújo ; ARAÚJO, Virgínia Palermo ; Barros, A. K. L. . **ESTUDO DE ENTEROPARASIToses EM LABORATÓRIOS PRIVADOS DE RECIFE**. In: 40º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial, 2006, Curitiba. ESTUDO DE ENTEROPARASIToses EM LABORATÓRIOS PRIVADOS DE RECIFE, 2006.

ARAÚJO FILHO, Jorge Luiz Silva ; **VEIGA, Renata Kelly de Araújo** ; MELO JÚNIOR, Mário Ribeiro de ; MACHADO, M. C. F. P. . **Avaliação histomorfométrica de micronúcleos e colágeno associado a neoplasias de pele.** In: X Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2006.

Trabalhos submetidos a periódicos

ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva; MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro de; **VEIGA, Renata Kelly de Araújo**; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula; PATU, Vasco José Ramos Malta; PONTES-FILHO, Nicodemos Teles de. **Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos indiretamente ao etanol e desnutrição crônicos durante o período peri-natal.** *Submetido à Revista Brazilian Journal of Nutrition em janeiro de 2006.*

VEIGA, Renata Kelly de Araújo ; MELO JÚNIOR, Mário Ribeiro de ; ARAÚJO FILHO, Jorge Luiz Silva; PONTES-FILHO, Nicodemos Teles de. **Alterações imunomorfológicas no timo, baço e placas de Peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool: um estudo morfométrico.** *Submetido á Revista Eletrônica de Farmácia em março de 2007.*