FRANCISCO RIBEIRO DE MORAES

Ploidia de DNA, grau nuclear e alterações arquiteturais
no carcinoma *in situ* e no carcinoma ductal invasivo da
mama feminina: uma contribuição para o estudo do
modelo de progressão de doença

São Paulo
2005

FRANCISCO RIBEIRO DE MORAES

Ploidia de DNA, grau nuclear e alterações arquiteturais
no carcinoma *in situ* e no carcinoma ductal invasivo da
mama feminina: uma contribuição para o estudo do
modelo de progressão da doença

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós graduação em
Patologia Experimental e Comparada
da Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e
Comparada

Orientador:

Dr. Adhemar Longatto Filho

São Paulo
2005

MORAES, F. R. **Ploidia de DNA, grau nuclear e alterações arquiteturais no carcinoma *in situ* e no carcinoma ductal invasivo da mama feminina**: uma contribuição para o estudo do modelo de progressão de doença. [DNA ploidy, nuclear grade and architectural changes in ductal carcinoma in situ and in invasive female breast cancer: a contributory study for the model of disease progression]. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ERRATA				
Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
10	1	5	progression].2005.	progression]. 2005. 66 f.
11	1	5	de doença.]. 2005.	de doença.]. 2005. 66 f.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MORAES, Francisco Ribeiro de

Título. Ploidia de DNA, grau nuclear e alterações arquiteturais no carcinoma *in situ* e no carcinoma ductal invasivo da mama feminina: uma contribuição para o estudo de modelo de progressão de doença

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Esta dissertação de mestrado é dedicada à minha família, legítima unidade celular,
base da formação da sociedade Humana tal qual a célula é a base da formação dos
tecidos do corpo

Mãe
Angelina

Irmãos
Gabriel
Humberto
Rodolpho

Esposa e filhos
Sonia Regina(esposa)
Maria Lucia
Tamiris Regina
Ayrton Francisco

Referência especial ao meu melhor amigo e companheiro

In memoriam

Rodolpho Ribeiro de Moraes

Pai

AGRADECIMENTOS

O Amor não pode ser mensurado por grandezas humanas porque faz parte da essência de Deus, o Amor Puro, e ao mesmo tempo, está acima das Nações, religiões, etc. O Ser Humano ainda não compreendeu o forte poder de união do Amor e não será pelo poder da força que a Paz ocorrerá, ao contrário e como exemplo, pequenos gestos e algumas atitudes transbordam e transmitem Amor e Paz. Neste espaço, último que escrevo, desejo agradecer a todos aqueles que dedicaram no mínimo um pensamento, uma oração para que, pela força do Amor, um sonho se transformasse em realidade.

Prof.Dr. JOSÉ LUIS GUERRA, Livre Docente e Professor de Patologia Veterinária, primeiro orientador, abriu-me as portas da Universidade de São Paulo, através da gloriosa Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, elogiado por todos os seus orientandos.

Dr. ADHEMAR LONGATTO FILHO, Biomédico, Citopatologista, responsável pelo setor de Citopatologia do Instituto Adolfo Lutz é um exemplo de Amor à Profissão e incentivo aos mais jovens, um irmão na fé, agradeço toda a orientação e companheirismo, acreditando sempre.

Dr. VICTOR EDUARDO ARRÚA ARIAS, Médico, Patologista, do Instituto de Patologia Dr. Cardoso de Almeida, jovem brilhante a quem Deus agraciou com muitos Dons, é o autor intelectual do trabalho e agradeço a convivência, o aprendizado e a amizade que espero ser duradoura.

Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO SOARES, Médico Patologista, chefe do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer (A.C. Camargo) que autorizou o levantamento e retirada de lâminas e blocos de parafina para formar a casuística do trabalho.

Ms. NEUZA KAZUMI SHIRATA, Biomédica da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, especialista em interpretação de Histogramas, seus conhecimentos foram valiosos tanto na Quantificação do DNA quanto na interpretação dos Histogramas.

Dra. MARINA YOSHIE SAKAMOTO MAEDA, Biomédica-Chefe, da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo feliz reencontro, trabalhando no Instituto, e com atraso mas fazendo-se justiça, aos ensinamentos ministrados e convívios num lonlino 1978.

LUIS MARCELO SPOLADORE WERNECK, Biomédico, Citopatologista do Hospital do Servidor Público Estadual, jovem brilhante de imenso futuro que já está se realizando, pelos ensinamentos e ajuda técnica na quantificação e aprendizado na utilização do CAS, mas principalmente pelo incentivo, convívio e amizade que serão perpetuados.

FABIO NAKANO, Biomédico, jovem aprimorando da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz pelo auxílio na quantificação, na etapa fotográfica e impressão dos histogramas, mas principalmente, pela alegria e parceria, nas horas de descontração, um verdadeiro *filhão*.

SILVIA BRACALLE, Secretária da Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia que através de seus E-mails e também pessoalmente, manteve-me sempre alerta aos prazos e avisos importantes por todo período.

MARIA CLAUDIA PESTANA, Bibliotecária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela pronta correção do texto final e elaboração da ficha catalográfica.

CRISTIANO BARBOSA SILVA, Quiropraxista, recém formado pela Universidade Anhembí Morumbi, ex-aluno, pelos ensinamentos e serviços prestados diante das minhas dificuldades na utilização do microcomputador, na língua inglesa e pela amizade que nos une.

Profa. ADRIANA PACÍFICO, Professora de Língua Inglesa, cujos ensinamentos permitiram a minha aprovação no exame de proficiência, quando tudo não passava de um sonho.

PROFESSORES COLEGAS e Coordenadores das Faculdades de Educação, Enfermagem e Fisioterapia de Guarulhos, pelo apoio e permissão em descumprir compromissos com os cursos em função do andamento do desenvolvimento do trabalho.

PROFESSORES COLEGAS e Coordenadores das Faculdades de Quiropraxia, Naturologia, Fisioterapia, Farmácia, Enfermagem e Cursos Sequenciais da Universidade Anhembí Morumbi, pelo apoio, incentivo e dispensa de compromissos e reuniões em suas áreas.

Dr. STEFANOS PARASKEVAS LAZAROU, Biomédico, Médico-Pediatra, irmão de fé e amigo, exemplo de Amor à Medicina, atendendo às crianças necessitadas junto a Pastoral da Saúde, bem como nos postos de saúde pública com o mesmo interesse, justificando a palavra Amor, pelo incentivo constante, pela força e pela oração.

O amor não vence todas as batalhas. Ele conhece derrotas. Mas ganha a batalha decisiva e final. O termo de todas as lutas da existência humana é o abraço amoroso entre todos ao se reconhecerem como próximos, como irmãos e como irmãs. Passa o sofrimento, passa o ódio. No final só o amor permanece, aquecendo corações, direcionando para frente e para cima a história e sendo a vida e a alegria da eternidade.

Pe. Leonardo Boff

Ave Gratia Plena

RESUMO

MORAES, F. R. **Ploidia de DNA, grau nuclear e alterações arquiteturais no carcinoma *in situ* e no carcinoma ductal invasivo da mama feminina**: uma contribuição para o estudo do modelo de progressão de doença. [DNA ploidy, nuclear grade and architectural changes in ductal carcinoma in situ and in invasive female breast cancer: a contributory study for the model of disease progression]. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Carcinogênese é um fenômeno de múltiplas fases. A literatura recente aceita, baseada em evidências epidemiológicas, que a progressão neoplásica em direção ao carcinoma invasor da mama inicia-se em estados hiperplásicos do epitélio ductal, passando pelo carcinoma *in situ*. Questões abertas na literatura no que concerne à relação existente entre o carcinoma intraductal e o carcinoma ductal invasivo referem-se aos fatores envolvidos nos processos que levam à invasão tumoral. Quatro modelos de progressão de doença foram propostos baseados na morfologia dessas lesões. Três deles descreveriam diferentes vias de progressão direta do carcinoma intraductal para o carcinoma invasor. O quarto modelo propõe que a evolução do carcinoma intraductal e do carcinoma invasor se faz independentemente, "em paralelo", a partir de uma terceira lesão precursora comum que, na verdade, gera um tumor de colisão *in situ* e invasor. O presente trabalho estudou retrospectivamente o tecido tumoral da mama de 46 pacientes do sexo feminino que continham carcinoma intraductal associado ao componente invasor na mesma lesão. Foram determinados o conteúdo de DNA nuclear por citometria estática e o grau nuclear de ambas as lesões, assim como o padrão arquitetural do componente intraductal e o índice de formação de túbulos do componente invasor. Os resultados mostraram relação estatisticamente significativa ($\kappa=0,713$; $p<0,001$) para o grau nuclear entre os grupos, o mesmo acontecendo com o conteúdo de DNA nuclear ($\kappa=0,5018$ $p=0,0002$). Ao compararmos o aspecto arquitetural do componente intraductal com o índice de formação de túbulos do componente invasor, não encontramos correlação estatisticamente significativa ($p=0,1033$). Os resultados permitem especular que as características nucleares de um dado carcinoma invasor de ductos mamários são possivelmente determinados em fases pré-invasivas, enquanto que alterações arquiteturais provavelmente se desenvolvem em estágios avançados, após a célula tumoral adquirir o fenótipo invasor.

Palavras Chave: DNA (Quantificação), Neoplasias, mamas, Histologia (classificação), Doenças (desenvolvimento), Carcinoma.

ABSTRACT

MORAES, F. R. **DNA ploidy, nuclear grade and architectural changes in ductal carcinoma *in situ* and in invasive female breast cancer**: a contributory study for the model of disease progression. [Ploidia de DNA, grau nuclear e alterações arquiteturais no carcinoma *in situ* e no carcinoma ductal invasivo da mama feminina: Uma contribuição para o estudo do modelo de progressão de doença.]. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Carcinogenesis is a multiple stage phenomenon. Epidemiologic evidence indicates that progression to invasive breast cancer begins in hyperplastic states of the epithelium passing by *in situ* carcinoma. The actual relationship that exists between ductal carcinoma *in situ* and invasive ductal carcinoma of the breast and the factors that lead to the tumor invasion process are questions that remain unanswered in the literature. Four models have been developed to explain the progression of the neoplastic disease in the breast tissue. Three of them propose that there is a direct pathway of progression from ductal carcinoma *in situ* to invasive carcinoma. The fourth one suggests that there is a common precursor lesion and both carcinoma *in situ* and invasive carcinoma progress in an independent fashion with no relationship between each other. The present work retrospectively studied 46 tumor tissues of the female breast with coexisting ductal carcinoma *in situ* and ductal invasive carcinoma. DNA ploidy as well as nuclear were determined in both lesions. The architectural pattern of the *in situ* component and the degree of tubule formation of the invasive component were determined also. Our results showed that there are no statistically significant differences in both nuclear parameters studied (DNA ploidy, $k=0,713, p<0,001$; nuclear grade, $k=0,5018, p=0,0002$). When we compared the architectural features of ductal carcinoma *in situ* with the degree of tubule formation in the invasive component we found a statistically significant different between the groups ($p=0,1033$). The results lead us to conclude that the nuclear features of a given invasive breast cancer are possibly determined in a preinvasive level, while architectural changes probably develop in a late stage, after the acquisition of the invasive phenotype.

Key words: DNA (ploidy), Carcinoma of the breast, Histology (classification), disease progression. Carcinoma.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Graduação nuclear proposta para o carcinoma intraductal da mama por LAGIOS e colaboradores (1990).....	22
Quadro 2 -	Esquema de graduação do carcinoma intraductal da mama proposto por LAGIOS e colaboradores (1990).....	23
Quadro 3 -	Parâmetros para avaliação de Kappa segundo Landis e Koch (1997).....	41
Tabela 1 -	Correlação entre o tipo histológico predominante observado no carcinoma ductal <i>in situ</i> e o índice de formação de túbulos observado no componente invasor associado nas amostras examinadas.....	43
Tabela 2 -	Correlação entre o grau nuclear observado no carcinoma ductal <i>in situ</i> e o grau nuclear observado no componente invasor associado nas amostras examinadas.....	44
Tabela 3 -	Correlação entre a DNA ploidia observada no carcinoma ductal <i>in situ</i> e a DNA ploidia observada no componente invasor associado nas amostras examinadas.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema proposto para o modelo de progressão tumoral do adenocarcinoma colon-retal . (ROBBINS, Patologia, 6 ^a .ed. 2000, p. 679).....	17
Figura 2 -	Representação esquemática da variação do conteúdo nuclear em DNA de uma população celular não neoplásica de acordo com o ciclo celular (MELLIN et al, 1990, adaptado).....	29
Figura 3 -	Representação esquemática do ciclo celular, correlacionada ao histograma de DNA ploidia (MELLIN et al, 1990, adaptado).....	30
Figura 4 -	Histograma controle.....	31
Figura 5 -	O histograma tipo I é caracterizado por apresentar um pico semelhante às das células controle na região diplóide <i>near</i> -diplóide, isto é, na região 2n ou próxima a ele.....	32
Figura 6 -	O histograma tipo II é caracterizado por apresentar um pico na região tetraplóide ou <i>near</i> -tetraplóide ou com dois picos bem definidos ao redor de 2n a 4n.....	32
Figura 7 -	O histograma tipo III é caracterizado por apresentar dois picos, sendo o Primeiro <i>near</i> -diplóide ou diplóide (similar ao controle interno) e o segundo pico variando entre a região 2n a 4n.....	33
Figura 8 -	O histograma tipo IV é caracterizado por apresentar uma aneuploidia acentuada e irregular, com pico variando de 2n a 6n (AUER et al, 1980; SHIRATA, 1999).....	33
Figura 9 -	Carcinoma intraductal – classificação arquitetural: comedocarcinoma (A) sólido (B), cribriforme (C) e micropapilar (D).....	42
Figura 10 -	Fotomicrografias e histogramas representativos: Carcinoma intraductal associado ao carcinoma invasivo (A e B), caso 13, coloração HE. Carcinoma intraductal associado ao carcinoma invasivo (C e D), caso 13 coloração Feulgen-Tionina. Histogramas correspondentes ao caso 13, <i>near</i> -diplóide.....	45
Figura 11 -	Fotomicrografias e histogramas representativos: Carcinoma intraductal comedocarcinoma (A) e grau nuclear 3 (B) caso 19, coloração HE. Carcinoma intraductal e carcinoma invasor (C e D), caso 19, coloração Feulgen-Tionina. Histogramas correspondentes ao caso 19, aneuplóide.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	O CANCER COMO DOENÇA DO GENOMA E OS MODELOS PARA EXPLICÁ-LO COMO UM FENÔMENO DE MÚLTIPLAS FASES.....	15
1.2	O MODELO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DA MAMA. O PAPEL DO CARCINOMA INTRADUCTAL COMO LESÃO PRÉ-INVASIVA.....	18
1.3	ANÁLISE DE DNA EM TUMORES SÓLIDOS. O MÉTODO APLICADO AO ESTUDO DOS TUMORES DOS DUCTOS MAMÁRIOS.....	27
2	OBJETIVOS.....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS.....	37
3.2	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS.....	38
3.3	QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR.....	39
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	41
4	RESULTADOS.....	43
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
	APÊNDICE.....	62
	ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER COMO DOENÇA DO GENOMA E OS MODELOS PARA EXPLICÁ-LO COM UM FENÔMENO DE MÚLTIPLAS FASES.

A carcinogênese é um fenômeno de múltiplas fases tanto do ponto de vista fenotípico, como genotípico (ROBBINS, 2000; SUGIMURA et al., 1992). Toda neoplasia é, por definição, monoclonal e se desenvolve como resultado de modificações aleatórias e cumulativas, não letais, da estrutura do genoma celular, mais precisamente em genes que controlam o ciclo celular, a saber, proto-oncogenes que promovem o crescimento celular, genes supressores de tumores e genes que controlam o processo de morte celular programada (apoptose). O processo de ativação dos proto-oncogenes e dos genes reguladores de apoptose é conseqüente a alterações da estrutura gênica, resultando na síntese anormal de proteínas efetoras (oncoproteínas), que têm função aberrante, ou da regulação da expressão gênica. O mecanismo de perda de função dos genes supressores de tumores é chamado perda de heterozigose, no qual ambos os alelos são suprimidos. Lesões específicas da molécula de DNA incluem mutações nucleotídicas pontuais, amplificação ou deleção de genes, inserções e translocações e ganhos e perdas de cromossomos ou de partes deles (BIECHE; LIDEREAU, 1995, STEVENS; LOWE, 2002). O resultado fenotípico das transformações genotípicas citadas é a imortalização celular gerando a possibilidade de crescimento e progressão tumoral através do acúmulo de células-filhas geneticamente instáveis e, finalmente, a invasão estromal e metástase (SUGIMURA et al., 1992; DOUGLAS et al., 2000). Morfologicamente esses eventos são traduzidos na perda progressiva da diferenciação celular, que constitui a base para

a classificação anatomopatológica da neoplasia, correlacionando-se à evolução clínica (GERALDO FILHO et al., 2000).

Dados epidemiológicos, clínicos e experimentais apóiam a idéia que indica que o desenvolvimento tumoral é polifásico (SUGIMURA et al., 1992; GATENBY; VINCENT, 2003). O processo durante o qual células neoplásicas se acumulam, denominado progressão tumoral, é melhor conhecido em tecidos epiteliais para os quais foram desenvolvidos modelos na tentativa de se explicar o fenômeno (BOCKING et al., 1994), sendo que para cada evento biomolecular parece haver correspondente histomorfológico (STEVENS et al., 2002; DOUGLAS et al., 2000). Constituem modelos bem estudados de progressão tumoral o adenocarcinoma colo-retal e o carcinoma epidermóide que se desenvolve em sítios revestidos por epitélio escamoso metaplásico ou não, como o colo do útero, pele e brônquios.

Fearon e Vogelstein (1990) descreveram um modelo genético para a evolução do câncer colo-retal correlacionando as alterações genéticas com a morfologia tumoral (Figura 1). Brevemente, a progressão da lesão adenomatosa para o adenocarcinoma se inicia com a perda ou mutação do gene APC, um gene supressor de tumor, presente no cromossomo 5q. Sobrevêm degenerações adicionais como as mutações no gene *ras*, do gene DCC no cromossomo 18q e a perda de heterozigose (LOH) do gene TP53 no cromossomo 17p, alterações essas ligadas, respectiva e morfológicamente, à displasia moderada, acentuada e carcinoma invasor do intestino grosso. Assim, alterações cumulativas no genoma acarretam aumentos progressivos do tamanho, nível de displasia e potencial invasivo das lesões neoplásicas (GERALDO FILHO et al., 2000).

Figura 1 - Esquema proposto para o modelo de progressão tumoral do adenocarcinoma do colon. (ROBBINS, Patologia, 6^a. ed. 2000 p.679)

Outro modelo possível de progressão tumoral amplamente aceito na literatura é o do carcinoma epidermóide originado em células de um epitélio plano pluriestratificado. Para fins de exemplificação será descrito, a seguir, o modelo aplicado ao carcinoma epidermóide do colo uterino, que, excetuando-se o possível fator etiológico, guarda semelhanças com o modelo proposto para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de outros sítios. Os ensaios epidemiológicos e clínicos mostraram que o tumor primário do colo uterino comporta-se como uma doença sexualmente transmissível sendo mais freqüente em mulheres de baixo nível sócio-econômico, que têm múltiplos parceiros e infecções ginecológicas freqüentes (GERALDO FILHO et al., 2000; DÔRES et al., 1994). O agente etiológico associado à produção de lesões pré-invasivas e invasivas do colo uterino é o Vírus do Papiloma Humano (HPV), destacando-se os subtipos 16, 18 e 31 que determinam, morfologicamente, lesões de alto grau, associadas ao baixo grau de diferenciação das células transformadas, caracterizando acentuado grau de displasia morfológica (BARRASSO et al., 1999). As proteínas E6 e E7 codificadas pelo material genético do HPV ligam-se respectivamente às proteínas codificadas pelos genes p53 e pelo gene Rb (Retinoblastoma), portanto supressoras de tumor, gerando produtos inativos com conseqüente perda do controle

do ciclo celular, perda da capacidade de apoptose e proliferação celular descontrolada (BARRASSO et al., 1999). Tais eventos, como no modelo proposto para o câncer colo-retal, têm sua tradução morfológica estando associados ao aumento no grau de anaplasia, ou menor grau de diferenciação celular. É sabido, ainda, que apesar das oncoproteínas produzidas pelo Vírus do Papiloma Humano determinarem a imortalização das células epiteliais infectadas, são necessárias mutações posteriores para o completo desenvolvimento do fenótipo invasor e a ocorrência dessas alterações parece ser facilitada por ação de co-fatores tais como o consumo de tabaco e presença de infecções microbianas coexistentes (DÔRES et al., 1994).

1.2 O MODELO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DA MAMA. O PAPEL DO CARCINOMA INTRADUCTAL COMO LESÃO PRÉ-INVASIVA.

No caso do tecido epitelial mamário, o desenvolvimento de um modelo de progressão de doença é tarefa dificultada pelo amplo espectro de lesões, que podem ser classificadas de acordo com o padrão de crescimento em ductais e lobulares (W.H.O., 1982), sendo de nosso interesse, no presente trabalho, as lesões de padrão ductal.

A evidência epidemiológica, traduzida pelo risco relativo para o desenvolvimento do carcinoma ductal invasor que cada uma das lesões do epitélio ductal da mama impõe, mostra que é provável haver uma seqüência de evolução que passa por estados hiperplásicos e pelo carcinoma *in situ*. Na reunião do “Cancer Committee of the College of American Pathologists” em 1985 (HUTTER, 1986), lesões chamadas de doença fibrocística mamária foram separadas em três categorias dependendo do aspecto morfológico e do risco

relativo de desenvolvimento de neoplasia maligna em estudo caso-controle: categoria I, lesão não proliferativa do epitélio mamário, risco zero; categoria II, hiperplasia exuberante, sólida ou papilífera, risco baixo (1,5 a 2x); categoria III, hiperplasia atípica ductal ou lobular, risco moderado (5x). Mais tarde, foi adicionada uma categoria a mais (PAGE, 1986), ou seja, o carcinoma *in situ* lobular ou ductal, com alto risco (8-10x).. A noção de risco histológico de desenvolvimento de câncer mamário está mais associada à hiperplasia atípica. DUPONT et al. (1993) verificaram um risco relativo de 4,3 nas pacientes com hiperplasia ductal atípica estudando uma coorte de 15.161 pacientes do “Breast Cancer Detection Demonstration Project” (BCDDP) com seguimento de 5 anos e Bodian et al. (1993) verificaram um risco relativo de 3,9 ($p < 0,02$) em um grupo de 1799 pacientes e seguimento de até 20 anos. Fatores como história familiar de câncer mamário, idade e lesões teciduais associadas podem modificar o risco relativo para câncer mamário em mulheres com hiperplasia atípica ductal. Uma história familiar de câncer em parentes de primeiro grau praticamente dobra o risco (DUPONT ; PAGE 1985; FITZGIBBONS et al., 1998). Considerando que o risco absoluto para desenvolvimento de câncer mamário nas mulheres com hiperplasia atípica do epitélio ductal é de 10 a 15%, que esse risco se aplica a ambas as mamas e que o mesmo cai 10 anos após o diagnóstico inicial, conclui-se que, do ponto de vista epidemiológico, hiperplasia ductal atípica deve ser considerada mais como um marcador de probabilidade de desenvolvimento de câncer do que uma doença precursora verdadeira. Já o carcinoma intraductal, dadas as suas características epidemiológicas, a saber: risco absoluto de 25 a 40%, risco persistente nos vinte anos subseqüentes ao diagnóstico e o desenvolvimento de neoplasia invasora na mama ipsilateral, pode ser considerado um precursor verdadeiro do câncer mamário (SHIRLEY, 1999).

Morfologicamente, o carcinoma intraductal da mama é definido como uma proliferação de células malignas dentro de ductos e se distingue do carcinoma ductal invasor

pela ausência de invasão do estroma observada pela microscopia óptica com preservação da integridade da membrana basal (VAN DONGEN et al., 1992). Quanto à classificação histológica, quatro tipos arquiteturais mais comuns são reconhecidos: comedocarcinoma, cribriforme, micropapilar e sólido (Figura 9) (TAVASSOLI et al., 2003). Os estudos que correlacionam a classificação histológica com o comportamento biológico da lesão têm demonstrado que o tipo comedocarcinoma é mais agressivo oferecendo maiores riscos de recidiva e de invasão (VAN DONGEN et al., 1992; SCHMITT, 1996; ELSTON et al., 1998). Por outro lado, Badve et al. (1998), em um estudo caso-controle utilizando 141 pacientes com até 20 anos de seguimento após ressecção local do tumor, não encontraram relação entre padrão arquitetural da lesão e a probabilidade de recidiva local. Esses dados mostram que a classificação morfológica do carcinoma ductal *in situ* é pouco reprodutível. Enquanto o diagnóstico de carcinoma intraductal é relativamente imediato, com valores de teste kappa para concordância interobservador variando entre 0,69 a 0,87 (PALLI et al., 1996; SLOANE et al., 1999; ELSTON et al., 2000), a subclassificação do tumor utilizando-se o padrão arquitetural como critério atinge valores de kappa tão baixos quanto 0,23 (SLOANE et al., 1994).

Outros critérios foram testados na busca por uma classificação que tenha valor prognóstico e que seja reprodutível. O grau nuclear, o padrão de necrose, o padrão de polarização celular, fibrose, circunscrição e tamanho foram considerados (LAGIOS, 1990; OTTESEN et al., 1992; HOLLAND et al., 1994; SILVERSTEIN et al., 1995; LAGIOS, 1995; TAVASSOLI, 1999). Alguns autores tentaram verificar ainda o significado prognóstico da associação de alguns destes critérios com a morfologia (POLLER et al., 1994). Lagios et al., (1990) propuseram a inclusão das características morfológicas nucleares como critério de subclassificação. O quadro 1 descreve as características nucleares e o quadro 2, a graduação proposta ao carcinoma intraductal. Houve significativa correlação entre o esquema de

graduação proposto com a recorrência da lesão após sua excisão. Os carcinomas intraductais classificados como tipos I e II (alto grau nuclear associado à presença de necrose) foram correlacionados com alto risco de recorrência local, fato ocorrido nos casos que foram seguidos por 26 meses em média. Em contrapartida, nas lesões de baixo grau (tipos III e IV) ocorreu um caso de recorrência local (tipo III) após seguimento de 87 meses e em nenhum caso do tipo IV houve recorrência. Lennington et al. (1994) correlacionaram o grau nuclear com os subtipos do carcinoma intraductal e observaram que as lesões de padrão comedocarcinoma estão correlacionadas com alto grau nuclear. Lesões padrão não-comedocarcinoma, com necrose, estão correlacionadas ao grau intermediário e as lesões de baixo grau foram correlacionadas aos padrões não-comedocarcinoma. Lagios (1995) estudou pacientes tratadas com cirurgia conservadora, sem radioterapia, seguidas por 10 anos em média. Houve recorrência local em 32% das pacientes cujo tumor apresentou alto grau nuclear e em 10% daquelas cuja neoplasia era constituída por células de grau nuclear intermediário. As doentes com tumor de baixo grau nuclear não apresentaram recidiva tumoral. Outro estudo (SILVERSTEIN et al., 1995) dividiu as pacientes em três grupos segundo o grau nuclear e o tipo de necrose da lesão. O grupo de pacientes com lesões “não alto grau nuclear”, sem necrose, apresentou recidiva tumoral em 3,8% dos casos. No grupo de pacientes com lesões “não alto grau” que apresentavam necrose, houve recorrência local em 11,1% dos casos. Finalmente, no grupo das pacientes com lesões de alto grau nuclear, 26,5% apresentaram recidiva local. O índice de sobrevida livre de doença em 8 anos foi de 93% para o primeiro grupo, 84% para o segundo, e 61% para o terceiro grupo ($p \leq 0,05$). Estes resultados mostraram que o grau nuclear, associado ao tipo de necrose, apresenta valor preditivo para recorrência local (SHOCKER ; SLOANE 1999). Fatores como arquitetura, polarização celular e comedonecrose parecem não acrescentar utilidade ao grau nuclear como critério de recidiva tumoral (BADVE et al., 1998).

<p>Alto Grau: Diâmetro nuclear maior que duas hemácias, cromatina vesicular, com um ou mais nucléolos e dez ou mais mitoses por dez campos microscópios em grande aumento (400X).</p>
<p>Grau Intermediário: Diâmetro nuclear entre uma a duas hemácias, cromatina grosseira, nucléolos infrequentes e uma a duas mitoses por dez campos microscópicos em grande aumento (400X).</p>
<p>Baixo Grau: Diâmetro nuclear entre uma a uma hemácia e meia, cromatina difusa, nucléolos não visíveis e menos que uma mitose por dez campos microscópicos em grande aumento (400X).</p>

Quadro 1- Graduação nuclear proposta para o Carcinoma intraductal da mama por LAGIOS e colaboradores (1990)

Subtipo		Critérios Morfológicos
I	Comedo	Alto grau nuclear Padrão de crescimento sólido necrose +++
II	Cribriforme Papilar com necrose	Alto grau nuclear Arquitetura cribriforme/papilar necrose +++
III	Cribriforme	Grau nuclear intermediário Arquitetura cribriforme necrose +/-
IV	Micropapilar Cribriforme sem necrose	Baixo grau nuclear Arquitetura micropapilar/ Cribriforme necrose 0

Quadro 2- Esquema de graduação do Carcinoma intraductal da mama proposto por LAGIOS e colaboradores (1990)

Embora os estágios iniciais e os caminhos precisos da tumorigênese mamária permaneçam pouco esclarecidos, existem indícios de que há evolução sequencial do carcinoma intraductal para o carcinoma ductal invasivo. A presença de alterações cromossômicas muito semelhantes entre o tumor intraductal quando adjacente ao tumor invasivo pode demonstrar sua relação evolutiva clonal (RADFORD et al., 1996; STRATTON et al., 1995). Estudos de cinética celular que quantificaram o índice de proliferação celular por método imuno-histoquímico e o índice de apoptose em lesões pré-neoplásicas, neoplásicas pré-invasivas e carcinoma invasor do epitélio ductal da mama verificaram que há um aumento da taxa de renovação celular ao longo desse quadro evolutivo que é máxima no carcinoma intraductal (BAI et al., 2001; ARIAS, 2002). Em relação aos marcadores biológicos associados à tumorigênese mamária, alguns merecem destaque. Aproximadamente 70% dos carcinomas intraductais expressam receptores de estrogênio à semelhança da camada de células luminais do epitélio túbulo-ductal. Há superexpressão do oncogene HER2/*neu* em mais da metade dos carcinomas intraductais, porém, esse não está evidenciado na hiperplasia atípica (ALLRED et al., 1992). O mesmo comportamento é observado no gene supressor de tumor p53, que raramente é encontrado mutado nas lesões proliferativas benignas, mas é identificado nessa condição em até 25% dos carcinomas intraductais. Ainda, a frequência com que esses marcadores estão presentes no carcinoma intraductal geralmente está espelhada nos carcinomas invasivos adjacentes (ELLEDGE et al., 1994; BURNSTEIN et al., 2004). É demonstrado, também, que há perda de heterozigose em mais de 70% dos carcinomas intraductais de alto grau, quando comparadas às perdas de 35 a 40% na hiperplasia atípica e 0 nos tecidos mamários normais (O'CONNELL et al., 1998; FARABEGOLI et al., 2002).

A associação de carcinoma intraductal e carcinoma ductal invasivo é observada em 10% a 30% dos casos (FISHER et al., 1975; ELSTON et al., 1998). A maioria dos estudos sobre a presença dos dois componentes tenta atribuir algum valor prognóstico ao achado

quantificando a área ocupada pelos respectivos tipos histológicos, presença de necrose e grau nuclear (ROSEN et al., 1986; TAVASSOLI et al., 2003). Linnel et al. (1980) mostraram que lesões invasivas com predomínio do componente intraductal do tipo comedocarcinoma tiveram pior prognóstico em relação às lesões nas quais o componente intraductal de padrão não-comedocarcinoma predominou. Em 154/231 casos em estágio clínico I e II estudados por Schnitt et al. (1984) as características que indicaram maior risco de recorrência local em 5 anos foram associação a carcinoma intraductal de alto grau e/ou alto índice mitótico. Ao estudar 573 casos consecutivos de neoplasias mamárias invasivas com tamanho menor ou igual a 5cm, Rosen et al. (1986) categorizando-os em relação às características do componente intraductal observaram que, entre as variáveis estudadas, aquelas que tiveram influência sobre o prognóstico da doente foram o *status* nodal ($p<0,01$), o grau nuclear ($p<0,03$), o grau histológico ($p<0,07$) e tamanho do tumor ($p=0,01$). O padrão arquitetural atribuído ao componente intraductal não teve influência sobre o risco de recorrência ou sobrevida nas pacientes mastectomizadas. MATSUKUMA et al., (1991) estudaram 190 casos de carcinoma invasor de padrão ductal separados em duas categorias, uma cujo componente intraductal perfazia até 20% do tumor e a outra cujo componente intraductal perfazia mais que 20% do total da lesão. No primeiro grupo houve predomínio de lesões de baixo grau nuclear e maior quantidade de células com imunoexpressão de antígeno cárcino-embrionário, enquanto que o segundo grupo apresentou maior número de constituintes celulares com alto grau nuclear. Os tumores com mais de 20% de componente intraductal tiveram menor índice de metástases linfonodais e maior tempo de sobrevida em comparação aos tumores cujo componente intraductal estava presente em menos de 20% do total da lesão.

A determinação do modelo morfológico de invasão tumoral ao longo da carcinogênese mamária ainda é objeto de debate na literatura. Gupta et al. (1997) selecionaram 300 amostras de carcinoma ductal invasivo com componente intraductal

adjacente e utilizaram critérios unicamente histomorfológicos para estudá-los. Resumidamente, o componente intraductal foi categorizado segundo dois esquemas de classificação correntes, sendo determinado o grau de diferenciação desse componente. O grau histológico do componente invasor também foi determinado e os resultados foram comparados, tanto em relação ao grau de diferenciação de ambos os componentes, quanto ao prognóstico do componente invasor determinado pelo seguimento das pacientes e por um índice prognóstico bem estabelecido pela literatura (índice prognóstico de Nottingham). Os resultados demonstraram correlação significativa entre o grau de diferenciação dos carcinomas intraductais com a graduação histológica do carcinoma invasivo ($p < 0,0001$). Da mesma maneira, houve significativa correlação entre a diferenciação do componente intraductal e o seguimento das pacientes ($p < 0,001$) e o índice prognóstico de Nottingham ($p = 0,05$). Assim, concluiu-se que o componente intraductal determina a maneira pela qual a sequência de eventos em direção à invasão tumoral será processada e inclusive o tipo de evolução clínica da lesão tumoral como um todo, ou seja, uma lesão *in situ* de baixo grau histológico determinará um componente invasor de mesmo grau histológico e uma lesão *in situ* de alto grau deverá determinar um componente invasor de alto grau histológico. Tais diferenças no comportamento biológico em carcinomas intraductais de graus diferentes pôde ser evidenciado em relação à cinética celular (MOMMERS et al., 1999). Carcinomas intraductais bem diferenciados apresentaram índice mitótico e taxa de renovação celular determinada pela razão do índice mitótico e índice de apoptose 6 vezes menor do que o carcinoma invasor, enquanto que lesões intraductais de alto grau apresentaram taxa de renovação celular 2,5 vezes menor do que o carcinoma invasor. Entretanto, ao estudar lesões invasivas recidivadas após exérese de carcinoma intraductal Millis et al., (2004) verificaram que a correlação entre o grau histológico de ambos os componentes foi baixa ($kappa = 0,241$). Esses mesmos autores não encontraram evidências morfológicas, imuno-histoquímicas ou

moleculares de que uma lesão intraductal de baixo grau evolua para um carcinoma invasor de grau histológico mais avançado.

1.3 ANÁLISE DE DNA EM TUMORES SÓLIDOS. O MÉTODO APLICADO AO ESTUDO DOS TUMORES EPITELIAIS DOS DUCTOS MAMÁRIOS

Os métodos automatizados para análise quantitativa do conteúdo de DNA celular nos tecidos têm por base a utilização de reações estequiométricas. Duas formas possíveis de abordagem existem: a *citometria digital por imagem*, também chamada *citometria estática*, e a *citometria de fluxo*. Na citometria estática, medidas realizadas em nível de microscopia óptica são realizadas em células ou cortes histológicos de tecidos montados em lâminas histológicas previamente corados pela reação histoquímica DNA-específica de Feulgen. Basicamente, essa reação utiliza a hidrólise ácida do DNA para liberar grupos aldeídicos, que são revelados utilizando-se a coloração pelo reagente de Schiff (LEE et al., 1994). A análise propriamente dita é feita em imagens digitalizadas por uma câmera de vídeo. Tal imagem é segmentada em pequenos elementos puntiformes e assim analisada por um programa de computador que, na verdade, quantifica o desvio luminoso produzido pela densidade óptica da imagem, essa proporcional à quantidade de DNA presente no núcleo da célula (LEE et al., 1992; WIED et al., 1994; ROSS et al., 1996). Um número mínimo de 100 células deve ser analisado para que o programa de computador possa montar um histograma de frequências do número de células segundo a densidade óptica do conteúdo de DNA. A partir desse histograma a informação pode ser analisada em dois aspectos. Primeiro, a análise das distribuições do conteúdo de DNA permite a determinação de parâmetros da cinética celular

do tecido tais como a duração total do ciclo celular, a duração das fases G0/G1, S e G2/M e o tempo de duplicação celular (BIBBO et al., 1997), como observado na figura 2. O segundo aspecto refere-se à correlação da ploidia de DNA com os parâmetros citogenéticos propriamente ditos e que nos interessam particularmente para o presente estudo.

Para melhor compreensão de como os parâmetros observados no histograma gerado pelo programa de computador em questão podem ser utilizados para inferência sobre o *status* citogenético de uma dada lesão passamos a uma breve revisão do assunto.

O ciclo celular é o processo através do qual a célula eucarionte gera células-filhas com o objetivo de manutenção da homeostasia ou crescimento tecidual. É um processo complexo e consiste em uma série de reações em cascata estimuladas externamente por fatores de crescimento e mediadas por uma família de proteínas denominadas quinases dependentes de ciclinas que têm, entre outras, a propriedade de adicionar moléculas de fosfato às proteínas efetoras. Essas, por sua vez, têm por função regular a síntese da molécula de DNA. Divide-se o ciclo em quatro fases, a saber, G1 (Gap 1), S (fase de síntese de DNA), G2 (Gap 2) e M (fase de mitose), além de haver uma fase de quiescência denominada G0. É nas fases G1 e G2 que a célula tem um período de tempo para crescer e para corrigir eventuais erros na síntese de DNA. Há pelo menos três momentos para a correção de eventuais danos ocorridos na replicação do DNA, denominados pontos de restrição (“checkpoints”), isto é, momentos nos quais a célula aborta ou continua o processo de replicação (ALBERTS et al., 1983), localizados na parte final da fase G1, na fase S e na porção final da fase G2 (HARTWELL ; WEINERT 1989; KASTAN et al., 1991; O’CONNOR et al., 1994). Uma vez ultrapassados esses pontos, a passagem à fase seguinte é irreversível.

As populações celulares representadas no histograma de DNA e um tecido humano são descritas a seguir (Figuras 2 e 3) (AUER et al., 1980; SHIRATA, 1999):

- Células nas fases G0 e G1, com conteúdo $2n$ designadas diplóides de DNA, correspondendo a dois grupos haplóides de cromossomos, isto é, 23 cromossomos de origem materna e 23 de origem paterna. As células com conteúdo diplóide de DNA contêm 7,18 pg de DNA por célula. Nos tecidos de renovação rápida, cujas células estão constantemente em reprodução, a fase G1 é curta. Há tecidos cujas células não se reproduzem, como as células nervosas e a célula muscular estriada, permanecendo na fase G0.
- Células nas fases G2 e M, com conteúdo de $4n$ designadas tetraplóides de DNA, correspondendo a quatro conjuntos haplóides de cromossomos, Isto é, $2 \times 23 + 2 \times 23$.
- Células em fase S com um conteúdo de DNA que varia entre $2n$ e $4n$, aumentando o seu conteúdo de DNA de 7,18 pg para 14,36 pg por célula.

Figura 2 - Representação esquemática da variação do conteúdo nuclear em DNA de uma população celular não neoplásica de acordo com o ciclo celular (MELLIN et al., 1990, adaptado)

Os valores obtidos então para o histograma podem ser grosseiramente correlacionados com o status cariotípico da célula, sendo assim, uma célula humana com um conteúdo estimado de 7,18pg de DNA deve, por inferência conter 23 pares de cromossomos. Dessa forma, do ponto de vista de nomenclatura no caso de avaliação citométrica do conteúdo

de DNA celular, em vez de se falar em ploidia, deve-se dizer ploidia de DNA. Tal correlação está esquematizada na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo celular, correlacionada ao histograma de DNA ploidia. (MELLIN et al 1990, adaptado)

Segundo a concentração do conteúdo de DNA genômico, as células podem ser classificadas como:

- Células diplóides de DNA ($2n$) - apresentam distribuição de DNA semelhante ao das células do tecido normal, com um pico de G0/G1 no histograma. Em geral, tumores classificados como diplóides estão associados a um prognóstico favorável. Esse parâmetro de conteúdo de DNA não distingue lesões neoplásicas de não neoplásicas por existirem carcinomas e outras neoplasias com padrão diplóide (LEE et al., 1992).
- Células aneuplóides de DNA - são caracterizadas por apresentarem uma distribuição de G0/G1 diferente das células normais. O pico G0/G1 é notoriamente diferente da referência diplóide. Células com pico G0/G1 menor que o valor de referência são denominadas hipodiplóides; se maiores que as normais são classificadas hiperdiplóides; se o valor gira em torno da região tetraplóide, são classificadas

hipertetraplóides; múltiplos aneuplóides são referidos como multiplóides, quando existe mais de um pico de G0/G1 com referência aneuplóide (LEE et al., 1992).

O índice de DNA (ID) é a razão entre o conteúdo de DNA na fase G0/G1 das células em análise e o conteúdo de DNA na fase G0/G1 das células de referência sabidamente diplóides (controle). O índice de DNA igual a 1,0 corresponde a 7,18 pg de DNA. Em células normais humanas, o ID diplóide corresponde a 1,0 com 46 cromossomos (2n). Dessa forma, uma determinada lesão tumoral pode ser categorizada como:

- 1- Diplóide: quando o pico G0/G1 é similar com a população diplóide da referência interna (ID=0,9 a 1.1)
- 2- Tetraplóide: quando o ID varia de 1.8 a 2.2
- 3- Aneuplóide e multiplóide: quando os picos não coincidem com nenhuma das acima descritas.(LEE et al., 1992).

A classificação mais utilizada é a proposta por AUER e colaboradores (1980) onde os histogramas são divididos em 4 grupos distintos conforme as descrições e esquemas a seguir:

Figura 4 - Histograma controle

Figura 5 - O Histograma Tipo I é caracterizado por apresentar um pico semelhante às células controle na região diplóide-*near*- diplóide; Isto é, na região $2n$ ou próximo a ele

Figura 6 - O Histograma tipo II é caracterizado por apresentar um pico na região tetraplóide, ou *near*-tetraplóide; ou com dois picos bem definidos ao redor de $2n$ ou $4n$.

Figura 7 - O Histograma tipo III é caracterizado por apresentar dois picos, sendo o primeiro *near*-diploide ou diploide (similar ao controle interno) e o segundo pico variando entre a região 2n a 4n

Figura 8 - O Histograma tipo IV é caracterizado por apresentar uma aneuploidia acentuada e irregular, com picos variando de 2n a 6n. (AUER et al., 1980; SHIRATA, 1999)

A análise do conteúdo de DNA, isto é, a determinação da ploidia de DNA, nas lesões do carcinoma ductal da mama, tem fornecido informações relevantes quando correlacionada ao comportamento biológico do tumor (DIAS, 1999). Tumores diploides de DNA são menos agressivos, isto é, pacientes portadores de neoplasias diploides de DNA têm maior tempo de sobrevida global do que os portadores de neoplasias aneuploides de DNA. Embora numa análise multivariada a ploidia de DNA não seja um indicador independente do prognóstico da lesão, fornece informação complementar para conduta clínica dos pacientes

cujo risco de recidiva é considerado baixo ou intermédio (LEAI et al., 1994, ARNERLOV et al., 1988, PISANI et al., 1999).

Quanto à relação do carcinoma intraductal e da hiperplasia ductal atípica ductal da mama considerando o conteúdo de DNA celular, um estudo que utilizou 25 casos de hiperplasia atípica ductal e 35 carcinomas intraductais observou aneuploidia em 71% dos carcinomas intraductais e 36% nas hiperplasias atípicas, verificando que algumas hiperplasias atípicas apresentam um conteúdo anormal de DNA (CRISSMAN et al., 1990), podendo indicar que esse tipo de alteração pode ocorrer precocemente ao longo da sequência de progressão para o câncer de mama. Outro estudo comparou o conteúdo de DNA de 13 casos de lesão proliferativa atípica e de 12 casos de carcinoma intraductal puro com 16 biopsias que apresentavam carcinoma intraductal associado a carcinoma invasor. Células aneuplóides foram encontradas em 30% das lesões proliferativas atípicas e dos carcinomas intraductais isolados, mas em 88,5% dos tecidos que apresentavam coexistência de carcinoma *in situ* e carcinoma invasor. Nesses, ambos os componentes foram aneuplóides em 68% dos casos, em 6% dos casos ambos foram diplóides e nos restantes 26% o componente intraductal foi aneuplóide enquanto o componente invasor foi diplóide (CARPENTER et al., 1987), mostrando que pode haver relação evolutiva entre o carcinoma *in situ* e carcinoma invasor no que se refere ao conteúdo de DNA celular. Por outro lado, até 3/4 dos carcinomas pré-invasivos da mama são aneuplóides, mas alguns trabalhos indicam que há uma mudança nesse perfil de conteúdo de DNA celular no carcinoma invasor correspondente (VISSCHER et al., 1993).

Assim, permanecem questões básicas sobre os mecanismos biológicos relacionados ao processo de evolução tumoral no epitélio ductal mamário à aquisição do fenótipo invasor e, conseqüentemente, na passagem, em nível morfológico, da fase intraductal da neoplasia para a fase invasiva. Superexpressão de genes que induzem aneuploidia por

alterarem a duplicação e/ou distribuição dos centrossomos e conseqüentemente levar a instabilidade gênica foi recentemente descrita como um evento relativamente precoce na carcinogênese mamária (HOQUE et al., 2003). É de se perguntar, em relação à quantidade de DNA nuclear (ploidia) presente nas células tumorais do componente invasor, se essa é determinada, assim como é possivelmente o grau nuclear, pelo componente intraductal, ou se tal ploidia é um fator independente e não determinante do processo de invasão tumoral, sendo essas alterações geradas pela instabilidade gênica inerente à condição das células neoplásicas estabelecida após o fenótipo invasor ter sido adquirido. No presente trabalho iremos comparar o grau nuclear e os resultados de ploidia de DNA nos componentes intraductal e invasor de uma mesma lesão neoplásica da mama, assim como características arquiteturais desses componentes na tentativa de contribuir para o esclarecimento dessas questões.

2 OBJETIVOS

Determinar e comparar características nucleares (conteúdo de DNA, estimado por citometria estática, e grau nuclear, estimado por microscopia óptica) e características arquiteturais dos componentes *in situ* e invasor em um grupo de tumores epiteliais primários da mama, nos quais ambos os componentes coexistem, a fim de se analisar a influência de cada um desses parâmetros no fenômeno de invasão tumoral nesse tecido e assim contribuir com a construção de um modelo de progressão de doença neoplásica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram separadas e revistas as lâminas de 246 exames anátomo-patológicos de tecido mamário com diagnóstico prévio de carcinoma ductal infiltrante da mama referentes ao período compreendido entre os anos de 1997 e 2001 e pertencentes ao arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Câncer Hospital A.C. Camargo e ao arquivo da Patologia Cardoso de Almeida/Hospital Samaritano. Desses, foram escolhidos 46 casos em cujo tecido tumoral foi identificado coexistência do componente invasor com componente tumoral *in situ* de padrão ductal. Blocos de parafina representativos da lesão foram recuperados sendo realizados novos cortes histológicos que foram corados por hematoxilina e eosina para graduação nuclear de ambos os componentes tumorais e determinação do padrão arquitetural predominante do componente pré-invasivo da lesão, assim como a determinação do índice de formação de túbulos do componente invasor. Um grupo adicional de lâminas foi corado pelo método de Feulgen-Tionina para determinação da ploidia de DNA por citometria estática. Esses métodos são detalhados a seguir.

3.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS

As 46 amostras coradas pela Hematoxilina-Eosina (H/E) foram avaliadas por pelo menos dois observadores em um microscópio multiocular, sendo um deles patologista com experiência em patologia mamária. O grau nuclear dos componentes invasor e intraductal da neoplasia foi determinado de acordo com os critérios de LAGIOS et al. (1990), descritos previamente no quadro 1. O padrão arquitetural do componente *in situ* da neoplasia foi determinado segundo critérios amplamente divulgados na literatura (ELSTON et al., 1991; ROBBINS et al., 1995; TAVASSOLLI et al., 2003). Simplificadamente, para fins de estudo estatístico, indicamos somente o padrão de carcinoma intraductal predominante na lesão, categorizando-os em padrões papilífero, micropapilífero, cribriforme, sólido e comedocarcinoma (figura 9). Para determinação do índice de formação de túbulos foram utilizados os critérios propostos por Elston e Ellis (1993). Resumidamente, a área total ocupada por formações tubulares no componente invasor foi avaliada, sendo que os casos foram categorizados em 1) alto índice de formação tubular (área total de elementos ductais com luz patente >75%); 2) moderado índice de formação de túbulos (área total de elementos ductais com luz patente entre 10% e 75%); e 3) baixo índice de formação de túbulos (área total de elementos ductais com luz patente <10%).

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR

A quantificação do conteúdo de DNA nuclear (ploidia) foi realizada utilizando-se o Sistema CAS200 de Citometria Estática (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia, U.S.A.) com análise pelo *software* CAS200 DNA *Quantitative Measurement* 3.0 (versão 8.1).

Cortes histológicos de 5µm, seqüenciais àqueles utilizados para a análise dos parâmetros histológicos acima descritos, foram corados pelo método de Feulgen-tionina para serem submetidos à presente análise. Brevemente, após desparafinização e hidratação, os cortes foram refixados em solução de formol neutro tamponado a 10% por 30 minutos e secos ao ar.

Para a coloração propriamente dita das amostras foi utilizado o kit Feulgen-Tionina do sistema *CAS Quantitative DNA Kit da Becton & Dickinson Cellular Imaging Systems*, (TriPath Co., San Jose, Califórnia, U.S.A.). Os protocolos de preparação dos reativos de coloração e de lavagem podem ser encontrados na seção "Anexos". Em resumo, o tecido foi submetido a hidrólise por ácido clorídrico 5N com conseqüente liberação de moléculas de açúcar dos grupos aldeídicos. A presente etapa é importante para prevenir a quebra da molécula de DNA com conseqüente inativação da reação. A seguir, os cortes teciduais são corados com o corante de Feulgen-Tionina, que se liga estequiometricamente, via reação de Schiff, aos grupos aldeídicos previamente liberados pela reação de hidrólise resultando em coloração azulada do núcleo. Assim, a intensidade da cor obtida através da coloração é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA, de acordo com a lei de Lambert-Beer ($D.O. = 1/\log\%T$; onde D.O., densidade óptica e T, transmitância). O citoplasma celular e os nucléolos não são corados pelo método.

A leitura dos cortes histológicos para quantificação do DNA foi realizada com o auxílio do Sistema CAS 200 *Becton & Dickinson System*, que utiliza microscópio Leica Diastar, provido de duas câmeras de vídeo que captam diferentes comprimentos de onda (500nm e 620nm) para captura de imagens. Todo o sistema é interligado a dois monitores de vídeo: um deles com o menu das operações e o outro com as imagens capturadas pela vídeo-câmara. O sistema está programado para gerar gráficos do tipo histograma de frequência e mostra a distribuição do conteúdo de DNA nuclear segundo o número total de núcleos analisados. Para controles foram utilizados um controle externo, hepatócitos murinos diplóides de DNA fornecido pelo fabricante, e o controle interno, células endoteliais não neoplásicas identificadas no tecido em estudo, individualmente.

Em cada caso foram analisados 100 núcleos do componente invasor, 100 núcleos do componente intraductal da neoplasia e 50 células endoteliais aleatoriamente selecionadas, sendo gerados três histogramas: controle interno, componente intraductal e componente invasivo. A interpretação dos histogramas foi baseada nos critérios elaborados por Auer et al., (1991), com pequenas modificações propostas por Shirata (1999) (ver figuras 4 a 8).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o pacote estatístico BIOESTAT 3.0 (AYRES et al., 2003) adotando-se um nível de significância de 5%. Para estudar a relação existente entre o grau nuclear observado no componente *in situ* da neoplasia ductal presente nas amostras estudadas e o grau nuclear do componente invasor ao qual esse estava associado

foi utilizado o teste de kappa (ROSNER, 2000; AYRES et al., 2003) considerando-se variável categórica de grandeza ordinal. A determinação estatística da relação existente entre a ploidia de DNA observada nos componentes acima citados da neoplasia presente nas amostras seguiu a mesma linha de raciocínio. A interpretação dos resultados foi feita segundo os parâmetros de avaliação de kappa descritos por Landis e Koch (1977) (Quadro 3).

Correlação excelente	$\kappa > 0,75$
Correlação boa	$0,4 \leq \kappa \leq 0,75$
Correlação marginal	$0 < \kappa \leq 0,4$

Quadro 3 - Parâmetros para avaliação de Kappa segundo Landis e Koch (1977)

Para testar a relação existente entre o tipo histológico predominante observado no componente *in situ* da neoplasia ductal presente nas amostras estudadas e o índice de formação de túbulos do componente invasor ao qual esse estava associado foi utilizado o teste do qui-quadrado (ROSNER, 2000; AYRES et al., 2003) considerando-se variáveis categóricas de grandeza ordinal em populações relacionadas.

C

D

Figura 9 – Carcinoma intraductal – classificação arquitetural

Carcinoma intraductal padrão cribriforme(A)

Carcinoma intraductal padrão sólido (B)

Carcinoma intraductal padrão papilífero (C)

Carcinoma intraductal padrão comedocarcinoma (D)

Do total de 46 casos selecionados para o presente estudo, verificamos que a idade das pacientes variou de 31 a 87 anos (mediana: 57 anos) e todas apresentavam doença unilateral. Histologicamente, todos os tumores selecionados apresentavam um componente intraductal distribuído irregularmente tanto na periferia da lesão, quanto na sua porção central. Quadros de extensão intraductal do componente invasor da neoplasia ou alterações histológicas caracterizadas como cancerização lobular do tecido não foram considerados para análise do grau nuclear ou da ploidia de DNA do tecido neoplásico. A proporção observada de cada um dos componentes no total da área tumoral era variável e em geral não houve dificuldades para se localizar células em número adequado para avaliação dos parâmetros nucleares ou arquiteturais.

Em relação ao padrão arquitetural do componente *in situ* predominante da neoplasia, 18 (39%) eram do tipo comedocarcinoma, 17 (37%) do tipo cribriforme, 8 (17%) do tipo sólido e 3 (7%) do tipo papilífero. Não houve tumores de tipo micropapilífero puro ou tumores com predomínio desse tipo de neoplasia intraductal. O índice de formação de túbulos x(41%) das lesões. Ao compararmos essas variáveis pelo qui-quadrado, não obtivemos diferença estatisticamente significativa ($X^2=10,5513$; $p=0,1033$) (Tabela 1).

Tabela 1- Correlação entre o tipo histológico predominante observado no carcinoma ductal *in situ* e o índice de formação de túbulos observado no componente invasor associado nas amostras examinadas.

índice de formação de túbulos Ca invasor	n	Ca <i>in situ</i>		tipo histológico	
		comedocarcinoma	papilífero	sólido	cribriforme
1	12	3	2	1	6
2	15	4	0	3	8
3	19	11	1	4	3
		$X^2=10,5513$		$p=0,1033$	

A análise do grau nuclear nos componentes invasor e intraductal da neoplasia, obtido por pelo menos dois observadores em microscópio multiocular, mostrou que há alto nível de concordância entre esses componentes, quando eles coexistem em uma mesma massa tumoral ($K=0,713; p<0,001$). Brevemente, em todos os casos nos quais o componente intraductal apresentou grau nuclear 1, a celularidade do componente invasor apresentou grau nuclear semelhante, a concordância para esses componentes tumorais com grau nuclear 2 foi de 85% e àqueles com grau nuclear 3, 75% (Tabela 2).

Tabela 2 - Correlação entre o grau nuclear observado no carcinoma ductal *in situ* e o grau nuclear observado no componente invasor associado nas amostras examinadas.

Grau nuclear Ca invasor	n	Grau nuclear Ca <i>in situ</i>		
		1	2	3
1	5	5	0	0
2	21	1	18	2
3	20	1	4	15
		k=0,713	p<0,001	

O estudo dos gráficos tipo histograma de frequência do conteúdo de DNA celular (ploidia) segundo o número de células analisadas nos componentes invasor e intraductal da neoplasia, gerados pelo *software* CAS200 DNA *Quantitative Measurement* 3.0 (versão 8.1) no Sistema CAS200 de Citometria Estática (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia, U.S.A.), mostrou que há bom nível de concordância entre esses componentes, quando eles coexistem em uma mesma massa tumoral ($k=0,501; p=0,0002$). Brevemente, 80% nos quais o componente intraductal apresentou-se diplóide de DNA, a celularidade do componente invasor apresentou grau nuclear semelhante, a concordância para aneuploidia de DNA nesses componentes tumorais foi de 87,8% (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação entre a DNA ploidia observada no carcinoma ductal *in situ* e a DNA ploidia observada no componente invasor associado nas amostras examinadas.

DNA ploidia Ca invasor	n	DNA ploidia Ca <i>in situ</i>	
		diplóide	aneuplóide
diplóide	5	4	1
aneuplóide	41	5	36
		k=0,5018	p=0,0002

A figura 10 demonstra a coexistência do Carcinoma ductal invasivo adjacente ao Carcinoma intraductal (A e B) ainda a formação de túbulos no componente invasor (caso 13 – Grau nuclear 1). Os histogramas correspondentes aos dois componentes revelaram conteúdo de DNA *near*-diplóide (E e F). A figura 11 demonstra o carcinoma intraductal com padrão histológico do tipo comedocarcinoma (A), Grau nuclear 3 (B) (ver critérios expostos nos quadros 1 e 2), ainda os histogramas correspondentes aos dois componentes (caso 19) evidenciando conteúdo de DNA aneuplóide para ambas as lesões.

Figura 10- Fotomicrografias e Histogramas representativos

Carcinoma intraductal associado ao carcinoma invasivo (A e B) Caso 13

Coloração HE

Carcinoma intraductal associado ao carcinoma invasivo (C e D) Caso 13

Coloração Feulgen-Tionina.

Histogramas correspondentes ao caso 13. *near*-diplóide

Figura 11- Fotomicrografias e Histogramas representativos
Carcinoma intraductal comedocarcinoma e grau nuclear 3 (A e B) caso 19
Coloração HE.
Carcinoma intraductal e carcinoma ductal invasor (C e D) caso 19
Coloração Feulgen-Tionina.
Histogramas correspondentes ao caso 19 - Aneuplóide

Observações clínicas, epidemiológicas e morfológicas indicam que a carcinogênese pode ser entendida como fenômeno polifásico no qual estão envolvidas alterações genotípicas que apresentam tradução morfológica. Sendo assim, é possível caracterizar por meio de microscopia óptica as etapas sequenciais de progressão tumoral através de lesões ditas pré-neoplásicas que apresentam indícios de menor diferenciação celular culminando na ruptura da membrana basal, ie, na invasão tumoral do estroma, dando assim acesso às células neoplásicas à vasculatura do hospedeiro com a possibilidade de metastatização (ROBBINS et al., 2000; SUGIMURA et al., 1992).

A literatura recente aceita, baseada em evidências epidemiológicas, que o carcinoma invasor da mama pode ser resultado de um fenômeno de múltiplas etapas iniciando-se em estados hiperplásicos do epitélio, passando pelo carcinoma *in situ* (DUPONT et al. 1993; TAVASSOLI, 1998, 1999). Assim, alguns modelos de progressão de doença foram propostos baseados na morfologia das lesões (DAWSON et al., 1996; GUPTA et al., 1997; MILLIS et al., 1998; BUERGER et al., 1999; ROYLANCE et al., 1999; LEONG et al., 2001; MOMMERS et al., 2001; BURSTEIN et al., 2004). Alguns autores acreditam que, durante a progressão tumoral, a neoplasia torna-se cada vez mais anaplásica, menos diferenciada, i.e., uma lesão bem diferenciada torna-se pouco diferenciada em função do tempo. Outros autores pensam que, ao adquirir o fenótipo invasor, independente dos mecanismos moleculares envolvidos, o grau morfológico de diferenciação da neoplasia já foi determinado na fase pré-invasiva, isto é, lesões *in situ* dariam origem a lesões invasivas com o mesmo grau

histológico. Como alternativa a essas hipóteses poder-se-ia imaginar que cada lesão de alto risco epidemiológico, no tecido mamário, tivesse sua origem “de novo” a partir, talvez, de uma lesão ancestral comum (SONTAG ; AXELROD, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo abordar esse tópico em tecidos neoplásicos de padrão ductal do tecido mamário que se caracterizavam por conter os componentes neoplásico intraductal e o invasor sincronicamente. Para tal, lançamos mão de uma técnica de avaliação subjetiva do tecido, que é a graduação histológica do grau nuclear e de características arquiteturais do tecido neoplásico. Utilizamos, também, uma técnica que, associada à morfologia, pode trazer informações adicionais. Trata-se da quantificação do conteúdo de DNA nuclear por citometria estática, uma técnica que para funcionar adequadamente depende do controle de algumas variáveis importantes. Na etapa de fixação do tecido deve-se evitar grande fragmentação do DNA, de preferência utilizando-se formol tamponado para a operação. Os cortes histológicos devem ser feitos também de maneira controlada de modo que a variação da espessura entre os cortes dos vários casos seja a menor possível e a comparação entre os resultados a mais adequada possível. Os histogramas gerados pelo *software* utilizado devem ser estudados no conjunto da amostra porque a grande variação observada em uma mesma amostra torna difícil a aplicação prática individual caso a caso (MARIUZZI et al., 1994).

Nossos resultados mostraram que embora haja um alto grau de correlação entre as características nucleares do componente *in situ* e do invasor quando esses estão presentes na mesma neoplasia, as características arquiteturais não apresentam relação estatisticamente significativa. Resumidamente, ao estudar e comparar o grau nuclear em lesões pré-invasivas e invasivas presentes em uma mesma massa tumoral encontramos relação estatisticamente significativa ($\kappa=0,713$; $p<0,001$) entre os grupos, o mesmo acontecendo com o conteúdo de DNA nuclear ($\kappa=0,5018$ $p=0,0002$). Por outro lado, ao compararmos o aspecto

arquitetural do componente intraductal com o índice de formação de túbulos do componente invasor, não encontramos correlação estatisticamente significativa ($p=0,1033$).

Leong et al. (2002) ao estudar o perfil molecular do carcinoma intraductal e do carcinoma ductal invasivo observaram semelhanças entre as lesões e propuseram que há evolução clonal entre lesões de graus histológicos semelhantes. Estudos que utilizaram hibridização genômica comparativa e marcadores de microssatélites mostraram que uma lesão invasiva grau I provavelmente não evolui para uma lesão grau III, tornando a hipótese de desdiferenciação improvável (ROYLANCE et al., 1999). Mommers et al. (2001) analisaram as alterações nucleares das lesões precursoras do carcinoma ductal invasor da mama e concluíram que há vias diferentes na evolução das lesões bem diferenciadas e das lesões pouco diferenciadas. Entretanto, embora as lesões associadas à progressão tumoral apresentem aumento do tamanho nuclear médio calculado morfometricamente, parece não haver associação do fenômeno de invasão estromal com mudanças significativas desse parâmetro (SKJØRTEN et al., 1991). Gupta et al. (1997) mostraram em 300 casos que tanto o grau de diferenciação tumoral, quanto o comportamento da lesão invasiva deve ser determinado em uma fase pré-invasiva.

Sontag e Axelrod (2005) em um estudo matemático retrospectivo consideraram quatro tipos de desenhos de modelos para a evolução do carcinoma mamário. Três modelos descreveriam diferentes vias de progressão direta do carcinoma intraductal para o carcinoma invasor, podendo o fenômeno de invasão tumoral processar-se de maneira "linear", "não linear" ou "ramificada". O quarto modelo propõe que a evolução do carcinoma intraductal e do carcinoma invasor se faz independentemente, "em paralelo", a partir de uma terceira lesão precursora comum que, na verdade, gera um tumor de colisão in situ e invasor. Os resultados desse trabalho mostraram que o último modelo produziu melhores resultados para explicar a correlação com os dados clínicos disponíveis.

Neste trabalho verificamos que as lesões intraductais e invasivas que coexistem em uma mesma massa tumoral estão relacionadas no que refere ao grau nuclear e à ploidia de DNA, mas não a parâmetros arquiteturais, o que parece indicar que, se for verdade que há uma relação clonal evolutiva entre as lesões, embora haja mecanismos moleculares agindo sobre o conteúdo genômico da célula, esse pode não ser expressado no que se refere ao perfil fenotípico arquitetural da lesão como um todo. Alternativamente, parece ser mais fácil imaginar que, havendo uma lesão precursora comum a ambos os componentes da neoplasia, essa adquiriu um fenótipo que se reflete no conteúdo nuclear e como cada lesão evoluiu de forma heterogênea, o padrão arquitetural se apresenta de forma diversa. Hoque et al. (2003) descreveram recentemente superexpressão de genes que induzem à instabilidade gênica por gerarem aneuploidia alterando a duplicação e/ou distribuição de centrôssomos durante a fase de mitose do ciclo celular. Ao que parece, esse é um evento relativamente precoce na carcinogênese mamária e portanto pode estar situado na lesão progenitora comum aos componentes *in situ* e invasor em casos como os que selecionamos para este estudo.

Os resultados deste estudo deverão ter importantes implicações para o estudo da biologia relacionada à progressão tumoral durante a carcinogênese mamária. Perguntas aqui levantadas sobre os mecanismos que induzem a progressão ao carcinoma intraductal e se este realmente é uma lesão precursora ou se na verdade é uma lesão que pode ocorrer simultaneamente ao carcinoma invasor deverão ser respondidas em nível molecular. Finalmente, os dados quantitativos aqui apresentados deveriam servir de modelo para novos estudos tanto no componente parenquimatoso, quanto no componente estromal das lesões precursoras e nas lesões neoplásicas da mama a fim de se chegar a um perfil amplo e específico da inter-relação dessas lesões e ao melhor entendimento da carcinogênese mamária.

6. CONCLUSÕES

1-Há correlação estatisticamente significativa entre os parâmetros nucleares estudados (ploidia de DNA e grau nuclear) do componente intraductal e os parâmetros nucleares do componente invasor nos tecidos tumorais em que ambas as lesões coexistem .

2- O padrão arquitetural determinado histologicamente para o carcinoma intraductal não mostrou relação estatística com o índice de formação de túbulos determinado para o carcinoma invasivo presente em tecidos tumorais em que ambas as lesões coexistem.

3- Características nucleares do carcinoma ductal invasivo da mama são possivelmente determinadas em um estágio pré-invasivo da lesão.

4- Características arquiteturais de um dado carcinoma invasivo da mama são possivelmente determinadas num estágio tardio após a aquisição do fenótipo invasivo pela célula tumoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell** 3a. ed. New York: Garland Pub., 1983, p. 863-910.

ALLRED, D. C.; CLARK, M. G.; MOLINA, R.; TANDON, K. A.; SCHINITT, J. S.; GILCRIST, W. K.; OSBORNE, K. C.; TORMEY, C. D.; MCQUIRE, L. W. Overexpression of HER-2/*neu* and its relationship with other prognostic factors change during the progression of *in situ* to invasive breast cancer. **Human Pathology**, v.23, p. 974-978, 1992.

ARIAS, V. E. A. **Cinética celular em lesões proliferativas pré-malignas e malignas do epitélio mamário**. Papel da apoptose, proteína bcl-2, produto de oncogene HER-2/*neu*, proteínas reguladoras do ciclo celular e proliferação celular: um modelo de progressão de doença. 2002 Tese (Doutorado) – Fundação Antonio Prudente, São Paulo, 2002.

ARNERLOV, D. C.; EMDIM, S. O.; ROOS, G.; ANGSTROM, L.; BJERSING, K.; ANGQUIST, L.; LARSSON, G.; JONSSON, H. Prognostic factors in locally advanced breast cancer (t3, t4) with special reference to tumor cell DNA content. **Acta Oncologica**, v. 27, n. 3, p. 221-226, 1988.

AUER, F.; CASPERSON, T.; WALGREN, A. DNA content and survival in mammary carcinoma. **Analytical Quantitative Cytology**, v. 2, p. 161-169, 1980.

AYRES, M.; AYRES, JR. M.; AYRES, D. L.; DOS SANTOS, A. S. **Bioestatística 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá, 2003.

BADVE, S. A.; HERN, R. P.; WARD, A. M. A long-term comparative study of the ability of 5 classifications of ductal carcinoma *in situ* of breast to predict local recurrence after surgical excision. **Human Pathology**, v. 29, p. 915-923, 1998.

BAI, M.; AGNANTIS, N. J.; KAMINA, S. *in vivo* cell kinetics in breast carcinogenesis. **Breast Cancer Research**, v. 3, p. 276-283, 2001.

BARRASSO, R.; GROSS, G. E. **Infecção por papilomavirus humano** – Atlas clínico, Porto Alegre: Artmed, p. 8-16, 1999.

BIBBO, M.; BARTELS, P. H.; CHRISTEN, R.; XIAO, J.; WIED, G. L. Cell image analysis: comprehensive cytopathology 2a. ed. Philadelphia: W. D. Saunders, 1997.

BIECHE, J.; LIDEREAU, R. Genetic alterations in breast cancer, genes chromosomes. **Cancer**, v. 14, p. 227-251, 1995.

BLACK, M. M.; OPLER, S. R.; SPEER, F. D. Survival in breast cancer cases in relation to structure of the primary tumor and regional lymph nodes. **Surgical Gynecological Obstetric**, v. 100, p. 543-551, 1955.

BOCKING, A.; STRIEPECKE, E.; AUER, H.; FUZESI, L. Static DNA cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpretation. In compendium on the computerized cytology and histology laboratory. In: Wied, G.; Bartels, P. H.; Rosenthal, D. L. (Ed.). **Tutorials of cytology**. Chicago: Illinois, U.S.A., 1994.

BODIAN, C. A.; PERZIN, K. H.; LATTES, R.; HOFFMANN, P.; ABERNATHY, T. G. Prognostic significance of benign proliferative breast disease. **Cancer**, v. 71, p. 3896-3907, 1993.

BURGER, H.; OTTERBACH, F.; SIMON, R.; SCHAFER, K. L.; POREMBA, C.; DIALLO, R.; BRINKSCHMIDT, C.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B.; BOECKER, W. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 4, p. 521-526, 1999.

BURSTEIN, H. J.; POLYAK, K.; WONG, J. S.; LESTER, S. C.; KAELIN, C. M. Ductal Carcinoma *in situ* of the breast. **New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 1430-1441, 2004.

CAREY, F. A. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: principles and applications. **Journal of Pathology**, v. 172, p. 307-312, 1994.

CARPENTER, R.; GIBBST, N.; MATTHEUS, J.; COOKE, T. Importance of cellular DNA content in pre-malignant breast disease and pre-invasive carcinoma of the female breast. **British Journal of Surgery**, v. 74, p. 905-906, 1987.

COSTA, F. S. **Introdução ilustrada à estatística**. 3^a. ed. São Paulo Harbra Editora, 1998.

CRISSMANN, J. D.; VISSCHER, D. W.; KUBUS, J. Image cytophotometric DNA analysis of atypical hyperplasias and intraductal carcinomas of the breast. **Archives Pathology Laboratory Medicine**, v. 114, p. 1249-1253, 1990.

DAWSON, P. J.; WOLMAN, S. R.; TAIT, L.; HEPPNER, G. H.; MILLER, F. R. MCF10AT: A model for the evolution of cancer from proliferative breast disease. **American Journal of Pathology**, v. 148, p. 313-319, 1996.

DÔRES, G. B. **Papilomavirus humano** – genitália feminina, São Paulo: Multigraf, 1994, p. 33-39.

DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia geral** - mecanismo da doença, São Paulo: Robe Editorial, 2000. p. 1110-1126.

DUPONT, W. D.; PAGE, D. L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p. 146-151, 1985.

DUPONT, W. D.; PARL, F. F.; HARTMANN, W. H. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. **Cancer**, v. 71, p. 1258-1265, 1993.

ELLDGE, R. M.; ALLRED, D. C. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 32, p. 39-47, 1994.

ELSTON, C. W.; ELLIS, J. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403-410, 1991.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. **Sistemic pathology**. 3a. ed., Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988. v. 13, p. 239-285.

ELSTON, C. W.; SLOANE, F. P.; AMENDOEIRA, I.; APOSTOLIKAS, N.; BELLOCQ, J. P.; BIANCHI, S.; BOECKER, W.; BUSSOLATI, G.; COLEMAN, D.; CONNOLY, C. E.; DERVAN, P.; DRIJKONINGEN, M.; EUSEBI, V.; FAVERLY, D.; HOLLAND, R.; JACQUEMIER, J.; LACERDA, M.; MARTINEZ-PENUELA, J.; De MIGUEL, C.; MOSSI, S.; MUNT, C.; PETERSE, J. L.; RANK, F.; REINER, A.; SYLVAN, M.; WELLS, C. A.; ZAFRANI, B. Causes of inconsistency in diagnosing and classifying intraductal proliferations of the breast. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1769-1772, 2000.

FARABEGOLI, F.; CHAMPEME, M. H.; BIECHE, I.; SANTINI, D.; CECCARELLI, C.; DERENZINI, M.; LIDEREAU, R. Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma *in situ*. **Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 280-286, 2002.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, p. 759-767, 1990.

FISHER, E. R.; GREGÓRIO, R. M.; FISHER, B. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Cancer Project. **Cancer**, v. 36, p. 144-156, 1975.

FITZGIBBONS, P. L.; HENSON, D. E.; HUTTER, R. V. P. Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. **Archives Pathology Laboratory Medicine**, v. 122, p. 1053-1055, 1998.

GATENBY, R. A.; VINCENT, T. L. An evolutionary model of carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 63, p. 212-220, 2003.

GERALDO FILHO, B. **Patologia**, 6^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 538-562.

GUPTA, S. K.; DOUGLAS, A. G.; FENN, N.; MORGAN, J. M.; MANSEL, R. E. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma *in situ*). **Cancer**, v. 80, p. 1740-1745, 1997.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HOLLAND, R.; PETERSE, J. L.; MILLIS, R. R.; EUSEBI, V.; FAVERLY, D.; VAN DE VIJVER, M. J.; ZAFRANI, B. Ductal carcinoma *in situ*: a proposal for a new classification. **Seminars Diagnostic Pathology**, v. 11, p. 167-180, 1994.

HOQUE, A.; CARTER, J.; XIA, W.; HUNG, M. C.; SAHIN, A. A.; SEM, S.; LIPPMAN, S. M. Loss of Aurora A/STK15/BTAK overexpression correlate with transition of *in situ* to invasive ductal carcinoma of the breast. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 12, n. 12, p. 1518-1522, 2003.

HUTTER, R. V. P. Consensus meeting: Is “fibrocystic disease” of the breast precancerous?. **Archives Pathology Laboratory Medicine**, v. 110, p. 171-173, 1986.

KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, G.; CRAIG, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Research**, v. 51, p. 6304-6311, 1991.

LAGIOS, M. D. Duct carcinoma *in situ*: pathology and treatment. **Surgical Clinics of North America**, v. 70, p. 853-871, 1990.

LAGIOS, M. D. Heterogeneity of duct carcinoma *in situ* (DCIS): relationship of grade and subtype analysis to local recurrence and risk of invasive transformation. **Cancer Letter**, v. 90, p. 97-102, 1995.

LANDIS, J. R.; KOCK, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-154, 1977.

LEAL, C. B.; SCHMITT, F. C.; BENTO, M. J.; MAIA, N. C.; LOPES, C. S. Ductal carcinoma *in situ* of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, pr3, and c-erbB-2 protein. **Cancer**, v. 75, p. 2123-2131, 1995.

LEE, A. K.; WILEY, B.; DUGAN, J. M.; HAMILTON, W. H.; LODA, M.; HEATLEY, G. J.; COOK, L.; SILVERMAN, M. L. Quantitative DNA analysis and proliferation in breast carcinomas. A comparison between image analysis and flow cytometry. **Pathology Research and Practice**, v. 188, p. 428-432, 1992.

LENNINGTON, W. J.; JENSEN, R. A.; DALTON, L. W.; PAGE, D. L. Ductal carcinoma *in situ* of the breast: heterogeneity of individual lesions. **Cancer**, v. 73, p. 118-124, 1994

LEONG, A. S.; SORMUNEN, R. T.; VINUYAT, S.; HAMDANI, R. W.; SUTHIPINTAWONG, C. Biologic markers in ductal carcinoma *in situ* and concurrent infiltrating carcinoma. A comparison of eight contemporary grading systems. **American Journal Clinical Pathology**, v. 115, n. 5, p. 709-718, 2001.

Comment in: **American Journal Clinical Pathology**, v. 117, n. 4, p. 664, 2002.

LINELL, F.; LJUNGBERG, O.; ANDERSON, I. Breast carcinoma. Aspects of early stages progression and related problems. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 272, p. 225-233, 1980.

MARIUZZI, L.; MOMBELLO, A.; GRANCHIELLI, G.; RUCCO, V.; TAROCCO, E.; FRANK, D.; DAVIS, J.; THOMPSON, D.; BARTELS, H.; MARIUZZI, G. M.; BARTELS, P. H. Quantitative study of breast cancer progression: different pathways for various *in situ* cancers. **Model Pathology**, v. 15, n. 1, p. 18-25, 2002.

MATSUKUMA, A.; ENJOJI, M.; TOYOSHIMA, S. Ductal carcinoma of the breast. An analysis of the proportion of intraductal and invasive components. **Pathology Research and Practice**, v. 187, p. 62-67, 1991.

MELLIN, W. Cytophotometry in tumor pathology. A critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis. **Pathology Research and Practice**, v. 186, p. 37-62, 1990.

MILLIS, R. R.; BARNES, D. M.; LAMPEJO, O. T.; EGAN, M. K.; SMITH, P. Tumor grade does not change between primary and recurrent mammary carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 34, p. 548- 553, 1998.

MILLIS, R. R.; PINDER, S. E.; RYDER, K.; HOWITT, R.; LAKHANI, S. R. Grade of recurrent *in situ* and invasive carcinoma following treatment of pure ductal carcinoma *in situ* of the breast. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 1538-1542, 2004.

MOMMERS, E. C. M.; VAN DIEST, P. J.; LEONHART, A. M.; MEIJER, C. J.; BAAK, J. P. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 58, p. 163-169, 1999.

MOMMERS, E. C.; POULIN, N.; SANGULIN, J.; MEIJER, C. J.; BAAK, J. P.; VAN DIEST, P. J. Nuclear cytometric changes in breast carcinogenesis. **Journal of Pathology**, v. 193, n. 1, p. 33-39, 2001.

MOMMERS, E. C.; LEONHART, A. M.; FALIX, F.; MICHALIDES, R.; MEIJER, C. J.; BAAK, J. P.; DIEST, P. J. Similarity in expression of cell cycle proteins between *in situ* and invasive ductal breast lesions of same differentiation grade. **Journal of Pathology**, v. 194, n. 3, p. 327-333, 2001.

O'CONNEL, P. O.; PEKKEL, V.; FUQUA S.; OSBORNE, D. K.; CLARKE, G. M.; ALLRED, D. C. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 697-703, 1998.

O'CONNOR, P. M.; FERRIS, D. K.; HOFFMANN, I.; JACKMAN, J.; DRAETTA, G.; KOHN, K. W. Role of the cdc25C phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 9480-9484, 1994.

OTTESEN, G. L.; GRAVERSEN, H. P.; BLICHER-TOFT, M.; ZEDELER, K. ANDERSEN, J. A. Ductal carcinoma *in situ* of the female breast: short-term results of a prospective nationwide study. **American Journal Surgery and Pathology**, v. 16, p. 1183-1196, 1992.

PAGE, D. L. Câncer risk assessment in benign breast biopsies. **Human Pathology**, v. 17, p. 871-874, 1986.

PALLI, D.; GALLI, M.; BIANCHI, S.; BUSSOLATI, G.; DI PALMA, S.; EUSEBI, V.; GAMBACORTA, M.; ROSSELLI, M. Reproducibility of histological diagnosis of breast lesions: results of a panel in Italy. **European Journal of Cancer**, v. 32, p. 603-607, 1996.

PISANI, T.; DE IORIO, T.; CENCI, M.; MIDULLA, C.; VALLI, C.; VECCHIONE A. Vallutazione dell'attività proliferativa cellulare e della ploidia come fattori prognostici del carcinoma della mammella. **Minerva Ginecologica**, v. 51, p. 1-5, 1999.

POLLER, D. N.; SILVERSTEIN, M. J.; GALEA, M.; LOCKER, A. P.; ELSTON, C. W.; BLAMEY, R. W.; ELLIS, I. O. Ideas in pathology. Ductal carcinoma *in situ* of the breast: a proposal for a new simplified histological classification association between cellular proliferation and c-erbB-2 protein expression. **Model Pathology**, v. 7, n. 2, p. 257-262, 1994.

PUZTAL, C.; LEVIS, C. E.; YAP, E. **Cell proliferation in cancer**. Regulatory mechanism of neoplastic cell growth. Oxford Oxford University press. 1995, p. 27-44.

RADFORD, D. M.; ZEHNBAUER, B. A. Inherited breast cancer. **Surgery Clinics North America**, v. 76, n. 2, p. 205- 220, 1996.

ROBBINS, P.; PINDER, S.; KLERK, N. Histological grading of breast carcinomas. A study of interobserver agreement. **Human Pathology**, v. 26, p. 873-879, 1995.

ROBBINS, S. **Patologia estrutural e funcional**. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.979-1002.

ROSNER, B. **Fundamentals of bioestatistics**. 5th ed. CA. Duxbury: Pacific Grove, 2000.

ROSEN, P. P.; KINNE, D. W.; LESSER, M.; HELLMAN, S. Are prognostic factors for local control of breast cancer treated by primary radiotherapy significant for patients treated by mastectomy ? **Cancer**, v. 57, p. 1415-1420, 1986.

ROSS, J. S. **DNA ploidy and cell cycle analysis in pathology**. New York: Igaku Shoin Medical Publishers, 1996. p. 1-27.

ROYLANCE, R.; GORMAN, P.; HARRIS, W.; LIEBMANN, R.; BARNES, D.; HANBY, A.; SHEER, D. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. **Cancer Research**, v. 59, p. 1433-1436, 1999.

RUIZ, A.; ALMENAR, S.; CALLAHAN, R. C.; LOMBART, A. Benign, preinvasive and invasive ductal breast lesions: a comparative study with quantitative techniques: morphometry, image and flow cytometry. **Pathology Research Practice**, v. 195, p. 741-746, 1999.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Biology of disease Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Laboratory Investigation**, v. 57, n. 2, p. 112-134, 1987.

SCHMITT, F. C. Histologic categorization, biologic markers and role of the pathologist **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 32, p. 8-13, 1996.

SCHNITT, S. J.; CONNOLY, J. L.; HARRIS, J. R.; HELLMAN, S.; COHEN, R. B. Pathologic predictors of early local recurrence in stage I and II breast cancer treated by primary radiation therapy. **Cancer**, v. 53, p. 1049-1057, 1984.

SHIRATA, N. K. **Comparação dos achados histopatológicos e de ploidia em neoplasia intraepitelial cervical: um tema de impacto em saúde pública.** 1999. São Paulo. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SHIRLEY, S. E. Beyond fibrocystic disease: the evolving concept of pre-malignant breast disease. **West Indian Medicine Journal**, v. 48, p. 173-178, 1999.

SHOCKER, B. S.; SLOANE, J. P. DCIS grading schemes and clinical implications. **Histopathology**, V. 35, p 393-400, 1999.

SILVERSTEIN, M. J.; POLLER, D. N.; WAISMAN, J. R.; COLBURN, W. J.; GAMAGAMI, P. Prognostic classification of breast ductal carcinoma *in situ*. **Lancet**, v. 345, p. 1154-1157, 1995.

SKJORTEN, F.; KAARESEN, R.; JACOBSEN, U.; SKAANE, P.; AMLIE, E. Nuclear morphometry of benign and malignant breast lesions. **European Journal of Surgical oncology**, v. 17, p. 350-353, 1991.

SLOANE, J. P.; ELLMAN, R.; ANDERSON, T. J.; BROWN, C. L.; COYNE, J.; DALLIMORE, N. S.; DAVIES, J. D.; EAKINS, D.; ELLIS, I. O.; ELSTON, C. W. Consistency of histopathological reporting of breast lesions detected by screening: finding of the U.K. National External Quality Assessment (EQA) scheme. U.K. National Coordinating Group for Breast Screening Pathology. **European Journal of Cancer**, v. 30A, n. 10, p. 1414-1419, 1994.

SLOANE, J. P.; AMENDOEIRA, I.; APOSTILIKAS, N.; BELLOQ, J. P.; BIANCHI, S.; BOECKER, W.; BUSSOLATI, G.; COLEMAN, D.; CONNOLY, C. E.; EUSEBI, V.; DE MIGUEL, C.; DERVAN, P.; DRIJKONINGEN, R.; ELSTON, C. W.; FAVERLY, D.; GAD, A.; JACQUEMIR, J.; LACERDA, M.; MARTINEZ-PENUELA, J.; MUNT, C.; PETERSE, J. L.; RANK, F.; SYLVAN, M.; TSAKRAKLIDES, V.; ZAFRANI, B. Consistency achieved by 23 european pathologists from 12 countries in diagnosing breast disease and reporting prognostic features of carcinoma. **Virchows Archives**, v. 434, p. 3-10, 1999.

SONTAG, L.; AXELROD, D. E. Evolution of pathways for progression of heterogeneous breast tumors. **Journal of Theoretical biology**, v. 232, p. 179-189, 2005.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2^a. ed. São Paulo: Manole, 2002, p. 79-103.

STRATTON, M. R.; COLLINS, N.; LAKHANI, S. R.; SLOANE, J. P. Loss of heterozygosity in ductal carcinoma *in situ* of the breast. **Jornal of Pathology**, v. 175, n. 2, p. 195-201, 1995.

SUGIMURA, T.; TERADA, M.; YOKOTA, J.; HIROSHI, S.; WAKABAIASHI, K. Multiple genetic alterations in human carcinogenesis. **Environmental Health Perspective**, v. 98, p. 5-12, 1992.

TAVASSOLLI, F.A. **Pathology of the breast**. 2nd ed. Norwalk: Connecticut Appleton Lange: Stamford, 1999.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILLE, P. World Health Organization Classification of Tumors. International Agency for Research on Cancer (IARC). **Pathology and Genetics of tumors of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC Press, 2003, p. 13-76.

VAN DONGEN, J. A.; HOLLAND, R.; PETERSE, J. L.; FENTIM, I. S.; LAGIOS, M. D.; MILLIS, R. R.; RECHT, A. Ductal carcinoma *in situ* of the breast Second EORTC consensus meeting. **European Journal of Cancer**, v. 28, n. 2-3 , p. 626-629, 1992.

VISSCHER, D. W.; SHAHEEN, C.; DROZDOWICZ, S.; CRISSMAN, J. D. Image cytophotometric DNA histogram heterogeneity in adenocarcinoma of the breast. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 15, p. 206-212, 1993.

VISSCHER, D. W.; MICALÉ, M. A.; CRISSMAN, J. D. Pathological and biological relevance of cytophotometric DNA content to breast carcinoma genetic progression. **Journal Cell Biochemistry**, v. 17G, p. 114-122, 1993. Supplement.

WIED, L. G., BARTELS, P. H.; ROSENTHAL, D. L.; SCHENK, U. Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. **Tutorials of cytology**. Chicago: 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Histological typing of breast tumors. Second edition. Geneva, 1981. **Annals Pathologies**, v. 2, p. 91-105, 1982.

APÊNDICE

(continua)

Relação dos casos estudados, ploidia, grau nuclear e padrão arquitetural

		Ploidia dos casos		Grau Nuclear		
		Componente		Componente		
Casos	Biopsia	In situ	Invasivo	In situ	Invasivo	Padrão
1	547354	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Comedo
2	550429	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Pap+Com
3	550632	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Sol+Com
4	339371	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Sólido
5	8841	Diplóide	Diplóide	2	3	Papilífero
6	42650	Aneuplóide	Aneuplóide	1	1	Cribriforme
7	4873	Tetraplóide	Tetraplóide	1	2	Cribriforme
8	37549	Triplóide	Aneuplóide	2	2	Papilífero
9	46041	Triplóide	N-tetraplóide	1	1	Cribriforme
10	336022	Aneuplóide	Aneuplóide	1	3	Cribriforme
11	10242	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Cribriforme
12	21913	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Sólido
13	823	N-diplóide	N-diplóide	1	1	Cribriforme
14	335478	Aneuplóide	Triplóide	1	1	Cribriforme
15	336313	N-diplóide	N-diplóide	2	2	Crib+Pap
16	1435	Aneuplóide	Tetraplóide	2	2	Comedo
17	3061	Aneuplóide	Aneuplóide	2	3	Comedo
18	339692	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Cribriforme
19	340972	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Comedo
20	2486	Aneuplóide	N-diplóide	2	2	Sol+Crib

(continuação)

Caso	Biopsia	<i>In situ</i>	Invasivo	<i>In situ</i>	Invasivo	Padrão
21	3353347	N-diplóide	Aneuplóide	3	3	Sólido
22	335942	Aneuplóide	Aneuplóide	2	3	Com+Crib
23	335349	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Comedo
24	22058	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Comedo
25	3883	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Sol+Com
26	336314	Tetraplóide	Tetraplóide	3	3	Comedo
27	336073	N-diplóide	Aneuplóide	2	3	Comedo
28	341037	N-diplóide	N-tetraplóide	3	3	Comedo
29	2582	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Crib+Necro
30	339069	Aneuplóide	Aneuplóide	3	2	Crib+Necro
31	1792	Aneuplóide	Aneuplóide	3	2	Cribiforme
32	8707	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Comedo
33	337193	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Cribiforme
34	9054	Tetraplóide	Aneuplóide	2	2	Sólido
35	10191	Diplóide	Diplóide	2	2	Crib+Sólido
36	16124	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Cribiforme
37	19079	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Cribiforme
38	950	Aneuplóide	Aneuplóide	1	1	Cribiforme
39	1036	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Comedo
40	10478	Diplóide	Aneuplóide	2	2	Comedo
41	34042	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Comedo
42	340790	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Crib+Com

(conclusão)

Caso	Biopsia	<i>In situ</i>	invasivo	<i>In situ</i>	Invasivo	Padrão
43	6577	Aneuplóide	Aneuplóide	2	2	Crib+Soli
44	6568	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Sol+Come
45	2742	Aneuplóide	Aneuplóide	3	3	Crib+Come
46	3686	Diplóide	Aneuplóide	2	2	Papilífero

ANEXOS

1 PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO CORANTE DE FEULGEN-TIONINA

1. Preparação de solução de HCl 0,1N;
2. Adição de 100 ml da solução preparada em um frasco de Erlenmayer juntamente com o reagente da coloração disponibilizado em forma de comprimido;
3. O frasco da solução é vedado com papel parafilme para não haver contato com o ar e haver liberação do ácido sulfídrico;
4. O frasco vedado é mantido em agitador magnético por 1 hora para completa dissolução do reagente.

2 PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO REATIVO DE LAVAGEM

1. Adição de 300 ml de HCl 0,05N em frasco de Erlenmayer com o reagente de lavagem também disponibilizado em comprimido;
2. Para acelerar a dissolução do reativo de lavagem usou-se um agitador magnético.

3 PROTOCOLO DE COLORAÇÃO

1. Hidrólise com HCl 5N por 60 minutos.
2. Coloração com reagente de Feulgen (acetato de tionina) por 60 minutos. Cobrir a cuba com parafilme para prevenir o excesso de liberação de ácido sulfídrico.

3. Passar as lâminas por 3 vezes na solução de lavagem, por 30 segundos, 5 minutos e 10 minutos, respectivamente.
4. Lavar as lâminas em água deionizada por 5 minutos.
5. Colocar as lâminas em álcool-ácido 1% por 5 minutos.
6. Desidratar as lâminas em etanol absoluto por 6 minutos: 2 mudanças de 3 minutos cada.
7. Clarificar as lâminas em xilol por 6 minutos : 2 mudanças de 3 minutos cada.
8. Montar lâminas em Entelan e cobrir com lamínula 24 x 32 mm.