Ana Paula Torres Schor

**Associação da proteína S100P e do receptor de estrogênio
com o potencial evolutivo de lesões proliferativas epiteliais
mamárias em pacientes com calcificações radiológicas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Filomena Marino Carvalho

São Paulo
2004

Dedicatória

Dedico esse trabalho ...

... Ao meu marido **Eduardo** e aos meus filhos

Pedro e Carolina,

meus grandes amores

À minha mãe, **Marly**
meu porto sempre seguro

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho, em especial:

Prof. Dra. Filomena Marino Carvalho, Livre Docente pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, responsável pela orientação deste trabalho, mentora na acepção da palavra, docente por natureza, a qual devoto profundo respeito e admiração.

Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Professor Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um mestre paternal para todos nós que passamos pelo Departamento de Patologia, como aluno, residente ou pesquisador, e como tal sempre presente e incentivando, por toda ajuda a mim concedida.

Prof. Dr. Cláudio Kemp, Docente do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), pelo apoio e ajuda na compreensão da parte clínica e radiológica.

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrin Guerreiro da Silva, docente do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNFESP-EPM), pesquisador na sua essência, pelo apoio e ajuda dedicados.

Dra. Carla Guerra Martins Kemp, Mestra em Patologia pela Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, Patologista da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, amiga inseparável desde a residência médica pelo incentivo e ajuda inestimável.

Prof^a. Dra. Thais Mauad, docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, co-responsável pelo laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP pela paciência e ajuda.

Prof^a. Dra. Marisa Dolhnikoff docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, co-responsável pelo laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP por permitir a realização desse trabalho no laboratório e pela colaboração técnica.

Lucília Araújo de Oliveira Ribeiro, chefe do setor técnico da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por todo esforço e ajuda no serviço técnico de preparação do material para esse estudo.

Cristiane de Almeida, técnica do Setor de Anatomia Patológica do Laboratório LEGO, que me ajudou sobremaneira, sempre solicita e gentilmente.

Sandra de Moraes Fernezlían, bióloga do laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo suporte técnico e empenho na realização das reações imuno-histoquímicas.

Esmeralda Mlristeni Eher, técnica do laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela dedicação na realização da parte técnica desse trabalho.

Ângela Batista Gomes dos Santos, técnica do laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela dedicação na realização da parte técnica desse trabalho.

Antonio de Castro Bruni, pelo suporte na análise estatística dos dados.

Sumário

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas.....	xiii
Lista de figuras.....	xvii
Lista de tabelas.....	xx
Resumo	xxii
Summary	xxiv
1. Introdução	1
2. Objetivos.....	16
3. Material e Método.....	18
3.1 Método anatomopatológico	21
3.2 Método imuno-histoquímico	23
3.3 Interpretação imunohistoquímica	25
3.4 Método estatístico	26
4. Resultados.....	28
5. Discussão	45
6. Conclusões.....	57
7. Anexos	60
8. Referências Bibliográficas	66

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de abreviaturas e siglas

°	grau
μ	micra
A	Adenose
ABM	Alteração Benigna da Mama
AE	Adenose esclerosante
AR	alto risco
AF-1	sítio de ligação do receptor de estrogênio ao hormônio esteróide
AF-2	sítio de ligação do receptor de estrogênio ao fator de crescimento
BR	baixo risco
BIRADS	Breast Imaging Report and Data System
C	Cisto
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
cod.	código
DAB	3,3 diaminobenzidine
DAG	diacilglicerol
DD	<i>Differential display</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
ed.	edição
EGF	fator de crescimento epidérmico
ERE	elemento de resposta ao estrogênio

et al.	e outros
FA	Fibroadenoma
FAD	Fibroadenose
FE	Fibroesclerose
G0	fase de repouso, não há divisão celular
G1	intervalo entre o término da mitose e o início da fase de síntese
HAD	Hiperplasia ductal atípica
HDSA	Hiperplasia ductal sem atipias
HMA	Hiperplasia micropapilar apócrina
HPV-16	<i>papillomavirus humano</i> , tipo 16
IGF-1	fator de crescimento insulina símile
I κ -B	bloqueador do fator de transcrição bloqueador da apoptose
IP3	inositol3fosfato
Ki-67	marcador de proliferação celular
LOH	perda de heterozigosidade
MAP-quinase	proteína-quinases ativadas por mitógenos
MC	Metaplasia colunar
MIB-1	nome comercial do marcador de proliferação celular Ki-67
MR	moderado risco
n.	número
NF κ -B	fator de transcrição bloqueador da apoptose

NL1	Neoplasia lobular grau 1 (Hiperplasia lobular atípica)
NL2	Neoplasia lobular grau 2 (Hiperplasia lobular atípica)
p	nível de significância estatístico
p.	página
P	Papiloma
PA	Papiloma atípico
PBS	solução salina fosfatada tamponada
PIP2	fosfatidilinositol2fosfato
PIP3	fosfatidilinositol2fosfato
PIP3 quinase	fosfatidilinositol3quinase
PKA	proteína-quinase A
PKC	proteína-quinase C
PKT	proteína-quinase específica de tirosina
Re	Retículo endoplasmático
RE- α	receptor de estrogênio, alfa
RE- β	receptor de estrogênio, beta
RT-PCR	reação da polimerização em cadeia via transcriptase reversa
SL	a lesão histológica do diagnóstico não está mais presente no material
S100P	proteína ligante de cálcio da família S100
SR	sem risco
TGF- α	fator transformante de crescimento, fração alfa
v.	volume

Lista de figuras

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura do receptor de estrogênio humano, fração alfa (RE- α)...	7
Figura 2 - Estrutura do receptor de estrogênio humano, fração beta. A porcentagem identifica a homologia entre a fração beta e fração alfa do receptor.	7
Figura 3 - Ação do estrogênio via receptor nuclear (fração alfa) RE (receptor de estrogênio); E (estrogênio); HSP (<i>Hot Shock Protein</i>); ERE (<i>estrogen responsive element</i>); TBP (proteína de ligação ao TATA); SRC1 e P300/CRB (TAF: fator associado ao TBP).....	8
Figura 4 - Ativação da transcrição de genes via receptor de estrogênio não dependente do hormônio esteróide. EGF(fator de crescimento epidérmico); IGF-1(fator de crescimento insulina símile); RE- α (receptor de estrogênio-fração alfa)	8
Figura 5 - Histograma das idades	20
Figura 6 - Fotomicrografia de Hiperplasia colunar atípica (caso 37), corada pela hematoxilina-eosina(400x).	35
Figura 7 - Fotomicrografia de Hiperplasia colunar atípica (caso 37). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x).....	35
Figura 8 - Fotomicrografia de Hiperplasia colunar atípica (caso 37). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).	36
Figura 9 - Fotomicrografia de Hiperplasia colunar atípica (caso 37). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).....	36
Figura 10 - Fotomicrografia de Carcinoma ductal <i>in situ</i> (caso 27). Hematoxilina-eosina (400x)	37
Figura 11 - Fotomicrografia de Carcinoma ductal <i>in situ</i> (caso 27). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).....	37
Figura 12 - Fotomicrografia de Carcinoma ductal <i>in situ</i> (caso 27). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).	38
Figura 13 - Fotomicrografia de Carcinoma ductal <i>in situ</i> (caso 27). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x).....	38

Figura 14 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 18). Hematoxilina-eosina (400x)	39
Figura 15 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 18). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).	39
Figura 16 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 18). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).....	40
Figura 17 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 18). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x).....	40
Figura 18 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal atípica (caso 139). Hematoxilina-eosina (400x)	41
Figura 19 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal atípica (caso 139). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).	41
Figura 20 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal com atipias (caso 139). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).....	42
Figura 21 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal com atipias (caso 139). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x).....	42
Figura 22 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 71). Hematoxilina-eosina (400x).	43
Figura 23 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 71). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).	43
Figura 24 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 71). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).....	44
Figura 25 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 71). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x).....	44
Figura 26 - Microcalcificação com expressão positiva para S100P (caso 79) (400x)	54
Figura 27 - Sinergismo entre as vias de ação da S100P e do receptor de estrogênio da membrana plasmática. E (estrogênio); RE (receptor de estrogênio); PKT (proteína-quinase específica de tirosina); EGF (fator de crescimento epidérmico); IGF-1 (fator de crescimento insulina símile); PIP2 (fosfatidilinositol2fosfato); DAG (diacilglicerol); IP3 (inositol3fosfato); PIP3 (fosfatidilinositol3fosfato); PIP3-K (fosfatidilinositol3fosfato-quinase); Re (retículo endoplasmático); PKC (proteína quinase C); NFκB (fator de transcrição anti-apoptótico); MAP-K (proteína-quinases ativadas por mitógenos); DNA (ácido desoxiribonucleico).....	55

Lista de tabelas

Lista de tabelas

Tabela 1 - Distribuição de frequência das variáveis	30
Tabela 2 - Capacidade preditiva por diagnóstico dos marcadores RE, MIB-1 e S100P isoladamente.....	31
Tabela 3 - Associação entre a expressão do RE e o diagnóstico em pacientes com idade inferior a 50 anos.....	31
Tabela 4 - Capacidade preditiva do risco da lesão para os marcadores RE, MIB-1 e S100P isoladamente ($p < 0,001$ para cada um dos marcadores)	32
Tabela 5 - Distribuição conjunta dos marcadores MIB-1 e S100P ($\chi^2 = 13,208$; $p = 0,001$)	33
Tabela 6 - Distribuição conjunta dos marcadores RE e S100P ($\chi^2 = 7,958$, $p = 0,019$)	33
Tabela 7 - Distribuição conjunta dos marcadores RE e MIB-1 ($\chi^2 = 2,779$, $p = 0,596$)	33

Resumo

RESUMO

SCHOR, A. P. T. **Associação da proteína S100P e do receptor de estrogênio com o potencial evolutivo de lesões proliferativas epiteliais mamárias em pacientes com calcificações radiológicas.** São Paulo, 2004. 75p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

As doenças benignas da mama respondem pela maior parte dos diagnósticos em patologia mamária, por esse motivo têm se tornado um problema crescente na prática clínica pela limitação diagnóstica atual em identificar o subgrupo de lesões com maior potencial de risco para neoplasia invasora. O estudo das lesões proliferativas com marcadores prognósticos do câncer de mama mostrou que o estrogênio exerce papel importante na transformação dessas lesões, através do seu receptor nuclear, induzindo a transcrição de genes, mas também pelo receptor de membrana citoplasmática, estimulando a proliferação celular através da ativação das proteína-quinases ativadas por mitógenos. Trabalhos experimentais com culturas de células de diferentes linhagens, incluindo células mamárias, identificaram a proteína S100P, uma proteína ligante de cálcio, como participante da transformação neoplásica maligna e diferenciação celular. No presente trabalho, estudamos a expressão da S100P, do receptor de estrogênio e avaliamos a proliferação celular de 155 pacientes submetidas à biópsia mamária por agulha grossa assistida a vácuo, guiada por estereotaxia, população que corresponde à rotina diagnóstica em patologia mamária. Comprovamos a associação do receptor de estrogênio com as lesões pré-malignas, classificadas segundo seu potencial de risco para neoplasia invasora, principalmente em mulheres abaixo dos 50 anos. Demonstramos haver forte associação entre a S100P e o receptor de estrogênio na distinção do potencial de risco das lesões histológicas, confirmando o papel importante da S100P no processo de transformação maligna. Observamos que a ausência da proteína torna praticamente nula a possibilidade de progressão tumoral, e mais ainda que sua ação depende também do receptor de estrogênio.

Summary

Summary

SCHOR, A. P. T. **S100P and estrogen receptor associated with evolutive potential of epithelial proliferative breast lesions in patients with radiologic calcifications.** São Paulo, 2004. 75p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

The benign breast diseases represent the major diagnose in breast pathology, so they have become an increasing problem concerning the clinical practice for limited capability diagnosis to identify a subgroup in this category with greater risk to evolve to invasive breast cancer. Studies with proliferative breast lesions and prognostic markers of breast cancer have shown that estrogen plays an important roll in malignant transforming process through its nuclear receptor which activates the transcriptional process. Moreover, the surface estrogen receptor stimulates the cell proliferation as a result of activation of mitogen-activated protein-kinases cascade. In vitro experiments with differents cell lines, including breast cell ones, have identified a protein, called S100P, a calcium-binding protein, as participating of the malignant transforming process and cell differentiation. In the present work, we studied the immunoexpression expression of S100P, estrogen receptor and evaluated the cell proliferation of 155 patients submitted to vacuum assisted core biopsy with stereotactic guidance of breast, a population that corresponds to the routine diagnose in breast pathology. We have proved the association between estrogen receptor and premalignant lesions, stratified by the relative risk for developing invasive breast cancer, mainly among women under the 50 years. We also have demonstrated a strong association of S100P and estrogen receptor concerning the distinctive relative risk of breast histologic lesions; bring up the important contribution of S100P in the carcinogenetic process. Meanwhile, the presence of S100P rises up the transforming possibility. We finally have found that the action of S100P depends on the estrogen receptor status.

1. Introdução

1. Introdução

As Alterações Benignas da Mama (ABM) representam o maior contingente de diagnósticos em patologia mamária e compreendem uma gama de padrões histológicos, de aspectos morfológicos distintos, que se interpõem entre o tecido mamário normal e o carcinoma invasor. Sua prevalência, assim como a do carcinoma invasor, vem crescendo em função do rastreamento mamográfico e detecção de alterações não palpáveis. O advento, na década de 90, da biópsia percutânea por agulha grossa assistida a vácuo, guiada por ultra-sonografia ou estereotaxia colaborou para o aumento do diagnóstico histológico das ABM. Essa técnica de biópsia minimamente invasiva que possibilita boa amostragem do tecido mamário, tem sido utilizada não apenas para diagnóstico, como também na terapêutica de lesões até 2 cm. (NISBET et al., 2000; BURBANK et al., 1996; FINE et al., 2002; CANGIARELLA et al., 2000, MARIOTTI et al., 2003; BECK et al., 2000, Kemp C., 2003).

A associação entre ABM e câncer de mama é antiga e remonta ao início do século XIX, através da observação de que algumas dessas alterações eram mais comuns nas pacientes com câncer (ALLRED et al.,

2000). No fim do século XX, estudo comparando populações de alto e baixo risco para câncer de mama mostrou que na primeira a incidência de lesões precursoras ou lesões pré-malignas é maior reforçando a hipótese de que as mesmas correspondem a estratos evolutivos intermediários, que culminam com o surgimento do carcinoma invasor. Essas lesões constituiriam então uma das vias de transformação maligna na complexa rede da carcinogênese mamária (STOLL et al., 1999).

Um dos mais importantes estudos epidemiológicos sobre risco relativo das ABM de desenvolver o carcinoma mamário invasor foi feito por DUPONT e PAGE (1985). Neste estudo retrospectivo com seguimento de 17 anos, os autores demonstraram que a presença de proliferação celular (hiperplasias), atipia, calcificação e história familiar pregressa de carcinoma de mama conferem riscos relativos elevados à paciente. Pressentindo a necessidade de classificar e organizar as ABM para que seus resultados pudessem ter impacto prático, PAGE (1986) agrupou os diferentes padrões histológicos em quatro categorias segundo o risco de câncer subsequente, a saber: **sem risco**, correspondente às alterações não proliferativas como as alterações fibrocísticas, adenoses, fibroadenoma; **baixo risco** (1,5 a 2 vezes), correspondente às hiperplasias sem atipias; **risco moderado** (4,5 a 5 vezes), composto pelas hiperplasias atípicas, e **alto risco** (8 a 10 vezes), grupo dos carcinomas lobular “in situ” e ductal “in situ” de baixo grau. Essa classificação contribuiu muito para o entendimento da progressão tumoral dessas lesões, assim como enfatizou a hipótese do potencial progressivo das lesões benignas na complexa via da carcinogênese mamária. Estudos

posteriores se seguiram confirmando os resultados de DUPONT e PAGE (LONDON et al., 1992; BODIAN et al., 1993), entretanto, a magnitude dos riscos divergia devido a diferenças nas populações estudadas quanto ao estado hormonal das pacientes, idade, bem como pela dificuldade de uniformização dos critérios histológicos para o diagnóstico das lesões proliferativas que, como demonstrado por ROSAI (1991), possuem variabilidade alta mesmo entre observadores com alto grau de expertise em patologia mamária.

Apesar da contribuição epidemiológica na caracterização dos grupos de risco das lesões histológicas, os elementos morfológicos pressentem de especificidade para definir com maior precisão o risco relativo da paciente decorrente da lesão histológica, por tanto não possibilitam a distinção clara de risco para a paciente individualizada (BODIAN et al., 1993). Muito embora o diagnóstico histológico acurado constitua o alicerce fundamental da patologia mamária, o uso de técnicas subsidiárias como exames imunohistoquímicos e hibridização *in situ* permitem o refinamento diagnóstico (ROSEN, 2001). Entre estes marcadores destacamos o receptor de estrogênio e o marcador de atividade proliferativa Ki-67.

O estrogênio, cujo principal representante é o estradiol, exerce no tecido mamário normal, em situações fisiológicas (ciclo menstrual e gravidez), efeito promotor da proliferação celular. Dois são os mecanismos responsáveis pelo estímulo proliferativo: o encurtamento da fase G1 do ciclo celular e o recrutamento de células para divisão celular.

Do ponto de vista carcinogenético, além do estímulo proliferativo, que pode facilitar a ocorrência de mutações ou perpetuar alterações já ocorridas, o estrogênio parece atuar também como fator intermediário na transcrição de proto-oncogenes que interferem com o ciclo celular como as ciclinas G1 e o *c-myc* (SCHMITT, 1995). Essas ações dependem da interação do hormônio esteróide com o seu receptor e são consideradas promotoras na via carcinogenética, já que não interferem na iniciação. Contudo, uma ação iniciadora do estrogênio tem sido sugerida através da ação de um metabólito do estrogênio (catecol-estrogênio) que exerceria efeito citotóxico, favorecendo a ocorrência de mutações e diminuindo a reparação ao DNA (RUSSO et al., 2001).

O conhecimento adquirido sobre a importância do estrogênio como fator promotor e, eventualmente, iniciador, no processo de carcinogênese, conduziu ao estudo do receptor de estrogênio, responsável pela maior parte do efeito do hormônio esteróide no estímulo proliferativo ao tecido mamário. Na década de 80, o que se acreditava ser o único receptor de estrogênio, foi inteiramente seqüenciado e, posteriormente clonado (GREENE et al. 1986a, GREENE et al. 1986b, PONGLIKITMONGKOL et al. 1988). Mais recentemente, na década de 90, foi identificado um novo receptor de estrogênio, codificado, como o anterior por oito exons, localizados em diferentes cromossomos, o primeiro, agora denominado alfa, no braço longo do cromossoma 6 e o último, denominado beta, no braço longo do cromossoma 14 (ENMARK et al. 1997). Estes receptores apresentam analogia estrutural (Figuras 1 e 2), porém com algumas funções antagônicas

quanto à proliferação celular (ROGER et al., 2001). Ambos receptores podem mediar a transcrição gênica através de duas vias, a clássica, através do elemento de resposta ao estrogênio (ERE) ou por meio dos fatores de transcrição *jus* e *fos*. Na sinalização celular através da via clássica ambos receptores atuam estimulando a atividade proliferativa, enquanto que na via através dos fatores de transcrição, o receptor alfa (RE- α) estimula a proliferação celular e o beta (RE- β) inibe a proliferação celular (PAECH et al. 1997). O conhecimento da estrutura do RE- α permitiu esclarecer parte das ações desencadeadas pela sua ativação, a partir da identificação dos domínios dependentes da interação com o estrogênio (AF-2) e não dependentes do estrogênio (AF-1) (SHAO e BROWN, 2004; SPEIRS e KERIN, 2000).

A ativação do RE- α desencadeia um processo de transcrição genética. Tal ativação pode decorrer da interação do receptor com o estrogênio (Figura 3) ou da interação do receptor com fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e insulina-símile (IGF-1) e da proteína-quinase A (Figura 4). Na última década, identificou-se ainda um receptor de estrogênio na membrana citoplasmática, estruturalmente idêntico ao RE- α responsável pela ação rápida, não genômica do estradiol, ativando os receptores dos fatores de crescimento EGF, IGF-1 (HANSTEIN et al., 2004)

No tecido mamário normal a quantidade de células positivas para RE é pequena, variando entre 10 a 15% (CLARKE et al., 1997; DICKSON e LIPPMAN, 2001). Dependendo do método utilizado para detecção. Da

mesma forma a avaliação da atividade proliferativa, através do Ki-67, epitopo presente na molécula de DNA que se expõe durante todas as fases do ciclo celular exceto a G0 (fase de inatividade), é baixa (2%) (DICKSON e LIPPMAN, 2001). No tecido mamário normal a expressão desses antígenos se faz de maneira excludente, de forma que a célula que expressa o receptor de estrogênio não expressa o antígeno de proliferação celular. Entretanto, nas lesões proliferativas e mais ainda, nos carcinomas, além da observação de co-expressão desses antígenos na mesma célula, a quantidade de células positivas também é maior do que no tecido normal (ALLRED e MOSHIN, 2000; WALKER et al., 1992; KHAN et al., 1997; KHAN et al., 1994; CLARKE et al., 1997, RUSSO et al., 2001).

Seguiram-se então vários estudos sobre a expressão do receptor de estrogênio e marcador de atividade proliferativa em lesões proliferativa epiteliais mamárias. SHOKER et al. (1999) demonstraram que nas lesões proliferativas somente as hiperplasias ductais usuais mantêm a relação entre idade e expressão do receptor de estrogênio, como observado na mama normal. Nas hiperplasias ductais atípicas e carcinomas *in situ* o aumento na expressão do RE ocorre independentemente da idade, sendo maior quanto maior o risco da lesão. O MIB-1 apresenta relação inversa com RE em mama normal, sendo progressivamente menor com o aumento da idade. Contudo a partir das lesões atípicas há aumento na expressão do MIB-1. A similaridade na expressão entre hiperplasia ductal atípica e carcinoma ductal *in situ* consolida a natureza pré-maligna da proliferação, fazendo destas

lesões estágios evolutivos intermediários da transformação maligna mamária.

Outra lesão proliferativa de relevância clínica pela frequência é a hiperplasia ductal usual (sem atipias). Durante muito tempo às hiperplasias usuais foram compreendidas como entidades benignas, autolimitadas, sem participação no desenvolvimento do câncer de mama, pelo baixo risco relativo conferido a elas (1,5 a 2,0 vezes). Contudo, SHAABAN et al. (2002), em estudo de caso-controle, demonstraram que as hiperplasias usuais que evoluem para carcinoma mamário invasivo expressam mais acentuadamente Ki-67 (MIB-1) e RE do que aquelas que permanecem como hiperplasias usuais. FUQUA et al. (2000) identificaram expressão aumentada de RE mutado num subgrupo de hiperplasias sem atipias, que apresentam maior sensibilidade ao estrogênio. Esses autores conseguiram demonstrar que as hiperplasias usuais fazem parte do espectro de lesões precursoras, bem como promoveram novas perspectivas para pesquisas de terapias profiláticas para pacientes com hiperplasias usuais e RE positivo, dando novo significado ao diagnóstico histológico dessas lesões.

A biologia molecular adicionou fatos consoantes com a teoria evolutiva das lesões proliferativas epiteliais mamárias. Partindo da premissa de que parte dos carcinomas invasores origina-se de lesões proliferativas pré-existentes, os estudos compararam o DNA das lesões com a neoplasia invasora e puderam verificar os desbalanços alélicos compartilhados. A alteração mais característica é a perda de heterozigosidade (LOH) a qual

leva a inativação de genes supressores de tumores ou ativação de oncogenes (ALLRED e MOSHIN, 2000).

As LOH são significativamente maiores nas hiperplasias ductais usuais, hiperplasias atípicas e carcinomas *in situ*, contrapondo-se à pequena quantidade encontrada no tecido mamário normal. Cerca de 30% das hiperplasias usuais e 40% das atípicas apresentam uma ou mais perdas de heterozigosidade. As hiperplasias ductais atípicas apresentam LOH em locos e cromossomos semelhantes aos carcinomas ductais *in situ*, e essas alterações são menos freqüentes nas hiperplasias usuais. Comparando-se as LOH entre lesões pré-malignas em mamas com carcinoma invasor com lesões semelhantes em mamas normais o número de alterações é o mesmo no total. Porém, em alguns locos o aumento é significativo (ALLRED E MOSHIN, 2000; ZHUANG et al., 1995; RADFORD et al., 1997; MA et al., 2003; DICKSON e LIPPMAN, 2001). No estudo de O'CONNELL et al. (1998) a LOH do loco 11p passava de 10 a 20% nas hiperplasias usuais; de 10 a 40% nas atípicas e de 20 para 70% nos carcinomas ductais *in situ*. O gene que codifica a ciclina D1 encontra-se próximo desse loco.

SILVA et al. (2000) identificaram a proteína citoplasmática S100P, um promissor marcador da carcinogênese mamária. Nesse estudo, utilizando técnicas como *Differential Display* e *Northern blots*, eles demonstraram que a S100P está superexpressa em linhagens de células imortalizadas espontaneamente, bem como nas linhagens de células epiteliais mamárias transformadas por agentes e ausente em células epiteliais mamárias normais. Os dados foram confirmados em fragmentos de tecido mamário por

método imuno-histoquímico, que demonstraram ausência do antígeno em mamas normais e positividade citoplasmática gradativamente maior nas hiperplasias usuais, hiperplasias atípicas, carcinomas ductais *in situ* e carcinomas ductais invasivos. Por ser a S100P uma proteína ligante ao cálcio, íon intracitoplasmático que participa do controle de várias funções nas células, uma delas o ciclo celular, os autores postularam que a proteína faria parte dos eventos metabólicos iniciais da carcinogênese mamária, bem como da gênese da calcificação. Esse trabalho abriu novos caminhos no entendimento da complexa e multifatorial via carcinogênica mamária.

A S100P (4p16) foi descrita inicialmente por EMOTO (1992) na placenta. Essa proteína pertence à família S100 (1q21), proteínas ligantes de cálcio, que estão relacionadas a várias neoplasias em diferentes topografias. A S100A4 está relacionada a metastatização do carcinoma de mama, carcinoma de cólon e fibrohistiocitoma maligno. A S100A6 está relacionada às neoplasias malignas de mama, pulmão, cólon, tireóide e melanoma (ENGELKAMP et al., 1993; PEDROCCHI et al., 1994; ILG et al., 1996; RUDLAND et al., 2000).

Embora vários estudos tenham sido conduzidos com a S100P, pouco se sabe sobre sua função, tampouco foi identificado seu alvo, possivelmente filamentos intermediários e enzimas citoplasmáticas (KOLTZSCHER e GERKE, 2000). Todavia, sua estrutura espacial foi bem elucidada, sendo constituída por duas porções N-terminais, com baixa afinidade pelo cálcio, e uma porção C-terminal de alta afinidade pelo íon. A ligação da proteína ao cálcio determina alterações em sua estrutura tridimensional, que possibilitam

a interação da mesma com seu alvo, através da exposição de resíduos hidrofóbicos (BECKER et al., 1992; KOLTZSCHER e GERKE, 2000; ZHANG et al., 2003).

Através do estudo dos perfis de expressão gênica por diferentes métodos como Serial Analysis of Gene Expression (SAGE, 2004) ou *MAGE* (RYO et al., 1998) a S100P tem sido identificada em grande quantidade nos carcinomas intra-ductais e em outros tecidos (SAGE, 2004). Recentemente, MACKAY et al. (2004) estudando linhagens de células mamárias imortalizadas que expressavam espontaneamente o gene *erbB2* e tumores primários da mama positivos para *erbB2*, pelas técnicas de *Differential Display* (DD) e RT-PCR, observaram que os genes da S100A4 e S100P estão superexpressos, constituindo potenciais alvos para terapia e prognóstico desse subgrupo especial de carcinomas invasores.

Em próstata, a S100P tem sido associada ao carcinoma não dependente de hormônio e ao perfil metastático (AVERBOUKH et al., 1996; GRIBENKO et al., 1998; AMLER et al., 2000; MOUSSES et al., 2002).

Outros autores têm descrito a S100P em neoplasias do trato digestivo. No esôfago é responsável pela diferenciação celular sendo identificada em estratos suprabasais do epitélio estratificado escamoso (SATO et al., 2002), com expressão elevada nos carcinomas escamosos (ZHI et al., 2003). No estômago sua expressão elevada é induzida pela presença do ácido retinóico (SHYU et al., 2003). A presença é grande também nos carcinomas de pâncreas (CRNOGORAC-JURCEVIC et al., 2003; LOGSDON et al., 2003; SATO et al., 2004).

HELLUNG et al. (2000), estudando a oncoproteína E7, principal oncoproteína codificada pelo papillomavírus humano 16 (HPV-16), responsável pela imortalização e transformação celular nas neoplasias cervicais, identificou a presença da S100P em grande quantidade, teorizando que a proteína participaria do controle do crescimento celular induzido pelo vírus. Já ROBAK et al. (2002), identificaram a S100P em uma paciente com histiocitose de células de Langerhans.

Os estudos têm demonstrado que a S100P parece exercer papel importante na imortalização e transformação em diferentes tecidos. Desta maneira, é possível que a proteína S100P funcione como marcador precoce da transformação maligna das células epiteliais mamárias. A associação dessa proteína ao RE e ao MIB-1, respectivamente marcadores de diferenciação e proliferação celular, talvez nos permitirá identificar com maior precisão quais, entre as lesões hiperplásicas e carcinomas *in situ*, têm maior potencial de progredir para carcinoma invasor. Estes resultados poderão contribuir para o avanço diagnóstico em patologia mamária no que se refere com a abordagem profilática do câncer de mama, permitindo a identificação de subgrupos de lesões de risco para tratamentos através de drogas (anti-estrogênicas ou até bloqueadores de proteínas como a S100P) e mesmo, esquemas de seguimentos mais adequados, todos visando interromper a sucessão de eventos que ocorrem durante a progressão tumoral, diminuindo assim o número de doentes e os gastos públicos com internações hospitalares necessárias ao tratamento mais complexo do câncer estabelecido. Trazendo, desta forma, a patologia mamária para uma nova

era na qual a profilaxia sobrepor-se-á ao diagnóstico precoce do câncer e desta maneira, a prevenção sobrepujando o tratamento do câncer instalado.

2. Objetivos

2. Objetivos

1. Avaliar a expressão imuno-histoquímica da proteína S100P, RE e Ki-67 em tecido mamário de pacientes com lesões pré-malígnas associadas a calcificações radiológicas submetidas à biópsia por agulha grossa assistida a vácuo.
2. Estabelecer possíveis associações entre a expressão imunohistoquímica da proteína S100P, RE e Ki-67 com os diferentes padrões histológicos das lesões mamárias, classificadas segundo seu potencial de risco para neoplasia invasiva.
3. Verificar associação entre a expressão imunohistoquímica da proteína S100P e a expressão do receptor de estrogênio e do Ki-67.

3. Material e Método

3. Material

O estudo foi retrospectivo e incluiu as pacientes portadoras de microcalcificações mamográficas encaminhadas ao Laboratório Especializado em Ginecologia e Obstetrícia (Laboratório Lego), em São Paulo, para biópsia por agulha grossa assistida a vácuo (mamotomia) e exame anatomopatológico no período de novembro de 2001 a novembro de 2003. As mamografias foram reavaliadas e reclassificadas pelo Mastologista Chefe do Serviço (Prof. Dr. Cláudio Kemp) usando o sistema de BIRADS (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 1998). Foram incluídas no estudo apenas as pacientes com BIRADS 3, 4, ou 5, com calcificações não associadas a densidades, distorções ou nódulos e cuja biópsia não tivesse revelada carcinoma invasivo.

Obtivemos 155 pacientes, com idade entre 32 a 81 anos, média de 51,9 anos e mediana de 50 anos (figura 5). Cento e trinta pacientes (84,4%) apresentavam calcificações BIRADS 4 e apenas 3 (2,0%) BIRADS 5. Os 13,6% remanescentes apresentavam calcificações BIRADS 3. Para 1 das 155 pacientes foi perdido o registro da classificação radiológica da calcificação.

A biópsia foi realizada por orientação esterotáxica. Foi utilizado o Mamotomme Lorad M-IV (Lorad, USA) com sistema de estereotaxia Stereoloc-II, com agulha de 11 gauge. Em todos os casos foi realizado controle radiológico dos fragmentos obtidos que confirmou a retirada das calcificações desejadas. Foram obtidos de 07 a 25 fragmentos por paciente (média= 12). Os fragmentos com microcalcificações foram separados dos demais.

Figura 5 – Histograma das idades

3.1 Método anatomopatológico

O material, encaminhado ao setor de Anatomia Patológica do mesmo Serviço, foi fixado em formol a 10% por 8 a 12 horas, submetido, inteiramente, a processamento histológico a frio habitual, com desidratação em álcool etílico e clareamento pelo xilol seguidos de impregnação e inclusão em parafina. Os fragmentos com calcificação e os demais receberam numeração independentes, seqüenciais.

Cortes histológicos de 5 μ foram corados pela hematoxilina-eosina para diagnóstico histológico das lesões. Todos os casos foram revistos pela autora e os achados histológicos foram classificados segundo proposta de FITZGIBBONS et al. (1998) nos seguintes grupos de risco:

➤ **Sem risco**

- Cistos
- Ectasia ductal
- Fibrose
- Mastite
- Metaplasia apócrina simples (sem hiperplasia)
- Adenose simples (exceto esclerosante)
- Metaplasia secretora
- Hamartoma
- Fibroadenoma (exceto complexo)

➤ **Baixo risco**

- Papiloma intraductal solitário
- Fibroadenoma complexo
- Adenose esclerosante
- Hiperplasia ductal sem atipia

➤ **Risco moderado**

- Hiperplasia ductal atípica
- Hiperplasia lobular atípica

➤ **Alto risco**

- Carcinoma lobular *in situ*
- Carcinoma ductal *in situ* de baixo grau

As lesões colunares, não contempladas na classificação de FITZGIBBONS et al (1998) foram por nós consideradas pertencentes aos grupos de baixo e moderado risco quando não apresentavam atipias e as atípicas, respectivamente.

No exame microscópico foi confirmada a presença de calcificações e selecionamos a lâmina que continha o diagnóstico histológico de maior risco relativo para neoplasia invasora, independente da presença da calcificação na lesão histológica.

3.2 Método imuno-histoquímico

Dos blocos correspondentes de cada lâmina selecionada no exame histológico foram feitos 5 cortes adicionais, de mesma espessura (5 μ), em lâmina de vidro preparada com 3-aminopropyltriethoxisilane (SIGMA) para realização de exame imuno-histoquímico. Foram pesquisados os seguintes antígenos: proteína S100P (monoclonal, clone 16, BD Transduction Laboratories, cód 610307, KY), receptor de estrogênio (RE) (monoclonal, clone 1D5, Dako, USA) e MIB-1 (policlonal, clone Ki-67, Dako, USA). O material foi desparafinado em xilol quente a 60° por 20 a 30 minutos e em xilol à temperatura ambiente (3 banhos), hidratado em 4 banhos, com álcool absoluto, 95% e 70%, depois lavados em água (corrente e destilada). A recuperação antigênica para o RE e MIB-1 foi feita em alta temperatura (panela a vapor), a 95° por 40 minutos em tampão citrato, com pH 6 por 20 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada a 3% (7 banhos de 5 minutos), seguida por banho em leite em pó desnatado a 2% por 20 minutos.

Para a proteína S100P a recuperação antigênica foi feita com proteinase K (DAKO, USA, cód S3020) por 10 minutos à 37° em câmara úmida, seguida por bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 3% (20 banhos de 5 minutos), seguido por banho em leite em pó desnatado

a 2% por 20 minutos. O material permaneceu a temperatura ambiente por 20 minutos, e depois lavado por três vezes, de 5 minutos cada em solução salina fosfatada tamponada (PBS).

Após o bloqueio procedeu-se à incubação com anticorpo primário: S100P à diluição de 1:150; RE à diluição de 1:100; MIB-1, à diluição de 1:400, por 16 horas. O material foi então lavado com PBS (3 banhos de 3 minutos cada) seguido pelo complexo secundário biotinilado por uma hora à temperatura ambiente (37°C). Após nova lavagem com PBS (três banhos de 3 minutos cada), incubou-se o material com o complexo secundário avidina-biotina por uma hora à temperatura ambiente (LSAB plus, DAKO, USA, cód K0690). Depois de nova lavagem com PBS (3 banhos de 3 minutos cada), incubou-se o material com DAB (3,3 diaminobenzidine, SIGMA, USA cód D-8001), para a revelação. O S100P foi revelado com DAB líquido (código K3468, Dako, USA) As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente e desidratadas em 3 banhos de álcool (70%, 95% e absoluto) e xilol.

3.3 Interpretação imunohistoquímica

Proteína S100P

Foi considerada positiva coloração citoplasmática e/ou nuclear, de qualquer intensidade. A graduação da positividade foi feita de maneira semiquantitativa estimando-se a porcentagem de células marcadas em relação ao total de células presentes na lesão.

Controles positivo (placenta) e negativo (tecido mamário normal) adequados validaram a reação.

Receptor de estrogênio

O receptor de estrogênio foi avaliado, considerando-se a porcentagem de células que expressaram o antígeno no total de células presentes na lesão. Segundo nossos próprios dados em estudo piloto, estabelecemos valor de corte de 10% de células positivas na lesão. Desta forma as lesões foram divididas em 3 subgrupos: negativo, até 10% de células coradas e mais de 10% de células positivas. Foram consideradas apenas marcações nucleares em células epiteliais, de qualquer intensidade.

Controle positivo de carcinoma mamário adequado validou a reação.

MIB-1

O Mib-1, foi avaliado considerando-se a porcentagem de células coradas no total de células presentes na lesão, levando-se em conta o intervalo habitualmente usado na rotina cirúrgica para quantificação da positividade, a saber: Negativo; $\leq 10\%$; $>10\%$. Os intervalos até 25%, entre 25 e 50% e acima de 50% representaram pequenas quantidade de casos e foram por nós agrupados como maiores que 10% para fins estatísticos.

Controle positivo de tecido linfóide (amígdala) validou a reação.

3.4 Método estatístico

A técnica de *Regressão Logística Multinomial* (KLEINBAUM, 1994) foi aplicada aos dados objetivando avaliar a capacidade preditiva individual de diagnóstico dos marcadores e avaliar a associação dos marcadores com o risco. Nessa abordagem a idade da paciente e o nível de microcalcificação foram incorporados ao modelo possibilitando assim avaliarmos suas interferências tanto no diagnóstico quanto no risco. Elas foram analisadas como *covariadas* e suas contribuições para o diagnóstico e grupo de risco foram então quantificadas e suas significâncias foram testadas.

Foram ajustados modelos para o Diagnóstico e Grupo de Risco (variáveis resposta), considerando os marcadores (individualmente e o conjunto deles) como variáveis preditivas (ou independentes), a idade e o nível de microcalcificação foram incorporados à análise como covariáveis.

As associações entre os resultados observados pelos marcadores foram testadas através da estatística *Qui-quadrado de Pearson*. (McCALL, 1970).

Análise Discriminante foi aplicada visando avaliar o poder discriminante dos marcadores, da idade e nível de microcalcificação (MORRISON, 1967).

4. Resultados

4. Resultados

Foram avaliadas 155 pacientes com calcificações radiológicas, quanto à expressão imunohistoquímica do receptor de estrogênio, do antígeno de proliferação celular Ki-67 (MIB-1) e a proteína S100P. Em alguns casos não foi possível a análise dos 3 marcadores, pois nos cortes histológicos para realização do exame imuno-histoquímico a lesão histológica não estava mais representada (2 casos para o receptor de estrogênio e MIB-1, 17 casos para a S100P). A distribuição das frequências dos diagnósticos, classificação quanto ao grupo de risco, e dos marcadores está demonstrada na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição de frequência das variáveis

Variável	Nível da variável	n	%
Diagnóstico	HDA	33	21,3
	HDSA	39	25,2
	CDIS	24	15,5
	NL (1+2)	10	6,5
	OUTROS	49	31,5
Risco	Sem risco	35	22,6
	Baixo	52	33,5
	Moderado	44	28,4
	Alto	24	15,5
RE	0	9	5,9
	0<RE<10	59	38,6
	RE>10	85	55,5
Ki-67	0	5	3,3
	0<Ki-67<10	98	64,0
	Ki-67>10	50	32,7
S100P	Negativa	33	23,9
	Positiva	105	76,1

Nota: HDA (Hiperplasia ductal atípica); HDSA (Hiperplasia ductal sem atipias); CDIS (Carcinoma ductal *in situ*); Neoplasia lobular (Graus 1 e 2); Outros (Cistos, Adenoses; Adenose esclerosante, Fibroadenoma, Papiloma intraductal, Fibroesclerose, Hiperplasia micropapilar apócrina, Cisto apócrino).

Na tabela 2 apresentamos os resultados relativos aos ajustes dos modelos de regressão logística multinomiais, para cada um dos marcadores individualmente, prevendo o diagnóstico histopatológico.

Tabela 2 - Capacidade preditiva por diagnóstico dos marcadores RE, MIB-1 e S100P isoladamente

	Marcadores		
	RE (n=153)	MIB-1 (n=153)	S100P (n=138)
Nível descritivo do modelo final ajustado (p)	<0,001	<0,001	<0,001
Capacidade preditiva			
% geral de acerto	36,2%	32,9%	27,5%
HDA	6,1%	93,9%	0,0%
HDSA	68,4%	2,6%	81,8%
CDIS	79,2%	4,3%	100,0%
NL	0,0%	0,0%	0,0%
Outros	36,4%	65,2%	47,8%

A idade teve influência significativa na expressão do receptor de estrogênio ($p= 0,024$), sendo a associação mais evidente no grupo de pacientes com idade inferior a 50 anos ($p= 0,003$). Esses dados são apresentados na tabela 3. Quanto ao MIB-1, há indícios de que a idade também exerça influência na expressão do marcador de proliferação celular, contudo o número de casos pode ter limitado a visão estatística dessa associação ($p= 0,074$).

Tabela 3 - Associação entre a expressão do RE e o diagnóstico em pacientes com idade inferior a 50 anos

Diagnóstico	RE N (%)			Total
	0	<10	>10	
HDA	1 (6,3%)	8 (50,0%)	7 (43,8%)	16
HDSA	2 (9,1%)	16 (72,7%)	4 (18,2%)	22
CDIS	0 (0,0%)	0 (0,0%)	12 (100,0%)	12
NL	0 (0,0%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)	6
OUTROS	3 (14,3%)	10(47,6%)	8(38,1%)	21
TOTAL	6(7,8%)	36(46,8%)	35(45,5%)	77

Nota: Qui-quadrado de Pearson=24,00, graus de liberdade=8, $p= 0,002$.

Analizamos também a capacidade preditiva de cada marcador isoladamente quanto ao grupo de risco da lesão histológica. O receptor de estrogênio revelou gradientes crescentes, significativos a partir do grupo de lesões com baixo potencial de risco para desenvolver neoplasia invasora. O MIB-1 mostrou maior associação com as lesões de risco moderado. Do mesmo modo, com valores um pouco mais significativos o fez a proteína S100P. Esses dados estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 - Capacidade preditiva do risco da lesão para os marcadores RE, MIB-1 e S100P isoladamente (p <0,001 para cada um dos marcadores)

Capacidade preditiva (%)	Marcador		
	RE (n=153) p <0,001	MIB-1 (n=153) p <0,001	S100P (n=138) p <0,001
% geral de acerto	41,2	39,2	33,3
Sem Risco	11,4	57,1	0,0
Baixo Risco	60,8	5,9	33,3
Risco Moderado	65,1	84,1	86,1
Alto Risco	95,8	39,1	100,0

Utilizando o teste do Qui-quadrado, avaliamos a associação dos marcadores entre si. A S100P mostrou forte associação com MIB-1 (tabela 5) e receptor de estrogênio (tabela 6). Este último não revelou associação estatística significativa com o marcador de proliferação celular (MIB-1) (tabela 7).

Tabela 5 - Distribuição conjunta dos marcadores MIB-1 e S100P ($\chi^2 = 13,208$; $p = 0,001$)

		S100P		Total n (%)
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
MIB-1	Zero n (%)	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (100,0)
	< 10 n (%)	13 (15,1)	73 (84,9)	86 (100,0)
	> 10 n (%)	17 (36,2)	30 (63,8)	47 (100,0)
Total		33 (24,1)	104 (75,9)	137 (100,0)

Tabela 6 - Distribuição conjunta dos marcadores RE e S100P ($\chi^2 = 7,958$, $p = 0,019$)

		S100P		Total n (%)
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
RE	Zero n (%)	3(42,9)	4(57,1)	7(100)
	Até 10 n (%)	18(34,6)	34(65,4)	52(100)
	> 10 n (%)	12(15,2)	67(84,8)	79(100)
Total		33(23,9)	105(76,1)	138(100)

Tabela 7 –Distribuição conjunta dos marcadores RE e MIB-1 ($\chi^2 = 2,779$, $p = 0,596$)

		RE			TOTAL n (%)
		ZERO n (%)	ATÉ 10 n (%)	>10 n (%)	
MIB-1	Zero n (%)	1 (11,1)	1 (1,7)	3 (3,6)	5 (3,3)
	< 10 n (%)	5 (55,6)	36 (62,1)	56 (66,7)	97 (64,2)
	> 10 n (%)	3 (33,6)	21 (36,2)	25 (29,8)	49 (32,5)
Total n (%)		9 (100,0)	58 (100,0)	84 (100,0)	151 (100,0)

Analisamos conjuntamente os 3 marcadores utilizando o modelo de regressão logística multinomial para estabelecer a sua capacidade preditiva da associação considerando o diagnóstico e o grupo de risco da lesão. A idade e a classificação BIRADS não apresentaram contribuição significativa na análise conjunta dos marcadores, tanto para o diagnóstico como para o grupo de risco. Apesar de cada marcador apresentar maior peso, isoladamente para determinadas lesões e grupos de risco, como mostrado nas tabelas 2 e 4, a análise conjunta dos mesmos permitiu melhor caracterização tanto do diagnóstico quanto do potencial de risco ($p < 0,005$).

Tendo estabelecido a associação entre os marcadores, bem como seu papel conjunto na caracterização da lesão e grupo de risco, utilizamos a análise discriminante para avaliar a contribuição de cada marcador no diagnóstico histológico das pacientes. Essa análise considerou também a idade e a classificação radiológica pelo sistema BIRADS. O resultado demonstrou que primeira função explicou 65,4% da variação dos níveis de risco e apresentou associação direta com os marcadores RE e S100P. Vale ressaltar que no caso da S100P negativa está associada quase sempre a lesão sem risco de progressão histológica. Por outro lado, a presença da S100P aumenta o risco histológico, sendo este máximo quando associado a níveis elevados de RE e MIB-1, ou seja, maior que 10%.

As expressões histológicas dos marcadores nas hiperplasias ductais sem e com atipias e carcinomas ductais *in situ* estão ilustradas nas figuras de 6 a 25.

Figura 6 - Fotomicrografia de Hiperplasia colunar atípica (caso 37), corada pela hematoxilina-eosina(400x).

Figura 7 - Fotomicrografia de Hiperplasia colunar atípica (caso 37). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x).

Figura 8 - Fotomicrografia de Hiperplasia colunar atípica (caso 37). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).

Figura 9 - Fotomicrografia de Hiperplasia colunar atípica (caso 37). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).

Figura 10 – Fotomicrografia de Carcinoma ductal *in situ* (caso 27). Hematoxilina-eosina (400x)

Figura 11 – Fotomicrografia de Carcinoma ductal *in situ* (caso 27). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).

Figura 12 - Fotomicrografia de Carcinoma ductal *in situ* (caso 27). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).

Figura 13 - Fotomicrografia de Carcinoma ductal *in situ* (caso 27). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x).

Figura 14 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 18). Hematoxilina-eosina (400x)

Figura 15 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 18). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).

Figura 16 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 18). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x)

Figura 17 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 18). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x)

Figura 18 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal atípica (caso 139). Hematoxilina-eosina (400x)

Figura 19 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal atípica (caso 139). Reação imunohistoquímica para RE (400x).

Figura 20 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal com atipias (caso 139). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).

Figura 21 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal com atipias (caso 139). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x).

Figura 22 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 71). Hematoxilina-eosina (400x).

Figura 23 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 71). Reação imuno-histoquímica para RE (400x).

Figura 24 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 71). Reação imuno-histoquímica para MIB-1 (400x).

Figura 25 - Fotomicrografia de Hiperplasia ductal sem atipias (usual) (caso 71). Reação imuno-histoquímica para S100P (400x)

5. Discussão

5. Discussão

A transformação neoplásica maligna das células epiteliais mamárias resulta de múltiplos e complexos fatores, inter-relacionados ou não. A progressão das lesões proliferativas epiteliais ductais a partir da hiperplasia sem atipias, passando pela atípica e pelo carcinoma ductal *in situ* constitui uma possível via de transformação maligna. Essas lesões, que correspondem à maioria dos diagnósticos de lesões mamárias, trazem angústia à prática clínica, pois uma parte delas representa estágios iniciais de transformação, cujos indicadores de progressão não são conhecidos.

Ao avaliarmos o valor preditivo da microcalcificação no diagnóstico da lesão pudemos comprovar que, a despeito da evolução das técnicas radiológicas e de sistemas de classificação de maior reprodutibilidade, como o BIRADS (AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY, 1998) a variabilidade dos diagnósticos histológicos é bastante grande. Na nossa população estudada, 84,4% apresentavam calcificações suspeitas (BIRADS 4) e 2,0 % exibiam calcificações altamente sugestivas de malignidade (BIRADS 5), todavia, apenas 43,3% exibiam lesões proliferativas atípicas, incluindo as hiperplasias ductais, as neoplasias lobulares e os carcinomas *in situ*. De tal

forma que as calcificações funcionaram apenas como um sinalizador para métodos propedêuticos auxiliares no diagnóstico, como a indicação de estudo anatomopatológico, com baixíssimo valor preditivo isolado.

Estudos referentes à expressão do marcador de proliferação celular (Ki-67) e do receptor de estrogênio, em mama normal, demonstram que estes apresentam valores baixos, de 2% e 10%, respectivamente. Tais valores aumentam nas lesões proliferativas chegando a níveis de 5% de células em divisão celular para as hiperplasias e carcinomas *in situ* de baixo grau. Já nas lesões proliferativas intra-epiteliais de padrão lobular os níveis permanecem semelhantes à mama normal (ALLRED et al., 2000). Demonstrou-se ainda que os marcadores estão associados, mais ainda que a expressão é exclusiva, de forma que a célula que expressa o receptor de estrogênio, não é a célula que está se dividindo, MIB-1 positiva. A descoberta da célula tronco mamária revelou a hierarquia existente entre os componentes epiteliais nas unidades ducto terminais-lobulares. As células luminais apresentam 3 perfis diferentes: **efetoras**, que estão em divisão celular por estimulação estrogênica, expressam apenas MIB-1; **sensoras** não estão em divisão celular, expressam somente receptor de estrogênio; e as células em estado **inativo** que completaram o seu desenvolvimento e que portanto não expressão nem o receptor de estrogênio, tampouco o MIB-1. A célula tronco é responsável pela proliferação celular estimulada por fatores de crescimento (TGF- α), com potencial para diferenciar-se em células epiteliais nos perfis acima e células mioepiteliais. A ruptura desse padrão caracteriza a transformação neoplásica (CLARKE ET AL., 1997).

Nossos dados não nos permitiram concluir haver associação entre a expressão do receptor de estrogênio e o MIB-1, o que difere da literatura. Tal fato pode ser explicado pela limitação estatística em enxergar essa associação considerando o número de casos estudados. Contudo, observamos que a maioria dos casos (64%) apresentou níveis de MIB-1 menores que 10%. Dentre os demais, 32,7% apresentaram MIB-1 maior que 10%, correspondendo principalmente aos carcinomas *in situ* e mais raramente a hiperplasias. O MIB-1 elevado no grupo de lesões sem risco evidenciou um subgrupo de lesões que não expressam S100P, ou apresentavam expressão de receptor de estrogênio em níveis dentro da normalidade, padrões de expressão que se assemelhavam ao padrão de exclusão da mama normal. Observamos também associação significativa entre o marcador de proliferação celular e a S100P, fato que comprova o efeito estimulador da proteína na proliferação celular. Por outro lado, apesar de ser um ótimo marcador de atividade proliferativa, permitindo identificar células em todas as fases do ciclo celular, o MIB-1 não discrimina o estímulo pelo qual a célula está se dividindo, dificultando numa análise global a identificação da relação deste com os estímulos proliferativos do receptor de estrogênio ativado e da proteína S100P. Todavia, através da análise discriminante pudemos demonstrar que o valor preditivo passa a ser significativo quando associamos os 3 marcadores.

Avaliando a expressão do receptor de estrogênio pudemos confirmar que esta é influenciada pela idade, tendo sido maior nas mulheres abaixo de 50 anos. Tal fato corresponde à literatura que tem demonstrado o forte papel do estrogênio na gênese e, possivelmente, na progressão das lesões

proliferativas epiteliais em mulheres na pré-menopausa. SHOKER et al. (1999) haviam demonstrado que a partir das hiperplasias usuais até o carcinoma *in situ*, passando pelas hiperplasias ductais atípicas, o aumento na expressão do receptor ocorre de forma independente do aumento da idade, diferentemente do que acontece com a mama normal. Nós pudemos observar que todos os carcinomas ductais *in situ*, nessa faixa etária foram receptor de estrogênio positivo, com níveis superiores a 10%. Verificamos ainda que uma fração das pacientes com lesões hiperplásicas usuais e atípicas apresentava expressão do receptor em mais de 10% das células, nos moldes observados nos carcinomas ductais *in situ* e que essa porcentagem foi progressivamente maior com o aumento do risco histológico. Assim, 18,2% das hiperplasias usuais e 43,8% das hiperplasias atípicas constituíram um subgrupo de lesões com perfil imuno-histoquímico semelhante ao do carcinoma *in situ*, embora a sua morfologia fosse igual as demais lesões do mesmo grupo de risco histológico, porém sem tal perfil imuno-histoquímico. Nas pacientes acima de 50 anos nossos dados não mostraram significância estatística. Nessa faixa etária a expressão do receptor de estrogênio foi elevada (> 10%) em grande parte das lesões histológicas, mesmo naquelas não proliferativas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos de lesões.

Terapêuticas anti-estrogênicas têm sido indicadas em grupos de risco de câncer significativo com resultados favoráveis. Ensaios clínicos com o uso do tamoxifen em mulheres de alto risco mostraram redução do risco de câncer invasivo de 40% e de carcinoma “*in situ*” de 50% (LO e VOGEL,

2004). Entretanto no grupo de usuárias a porcentagem de tumores receptor-positivo caiu 69%, sugerindo que a proteção se restrinja a tumores receptor-positivo, não afetando os RE-negativo (LO e VOGEL, 2004). Na reunião de consenso de St. Gallen de 2003 a negatividade na expressão dos receptores, não só em tumores invasivos, mas em carcinomas “in situ”, foi apontada como fator de falha ao controle de recidivas com o uso de antiestrogênios (SENN et al., 2003). Se para os carcinomas ductais “in situ” a presença do RE define grupo favorável quanto à prevenção de recidivas, é de se supor se para as lesões proliferativas a sua determinação também não teria importância no sentido de avaliar o efeito protetor das terapias anti-estrogênicas. Nossos resultados nos permitiram ir um pouco além, sugerindo que a combinação do RE com S100P e MIB-1 possibilite selecionar melhor as pacientes, devido a forte associação entre eles, como veremos adiante.

Nossa avaliação sobre o receptor de estrogênio demonstrou também que esse apresenta maior valor preditivo de potencial evolutivo quando associado aos demais marcadores testados. Isso fica mais bem demonstrado quando comparamos a porcentagem das lesões proliferativas e carcinomas *in situ*, que responderam por 62,0% dos diagnósticos, com os valores de expressão de receptor de estrogênio superiores a 10%, que totalizaram 55,5% dos casos. De tal forma que valores de receptor de estrogênio superiores a 10% isoladamente foi preditivo do risco de uma parte das lesões. Nossos dados referentes às categorias diagnósticas, bem como aos grupos de risco demonstraram forte associação entre a S100P e o receptor de estrogênio. Na ausência da proteína S100P as chances de progressão dessa lesão são

bastante baixas. Esse fato permitiu-nos inferir o forte papel da proteína S100P na transformação maligna das células epiteliais mamárias.

A comparação da expressão imuno-histoquímica dos 3 marcadores observamos que houve associação significativa entre a S100P e o receptor de estrogênio, e da proteína com o Ki-67. Não houve associação do antígeno de proliferação celular com o receptor de estrogênio, dado já mencionado. A associação do receptor de estrogênio e da proteína S100P permitiu-nos identificar positividade progressivamente maior com o risco da lesão histológica e paralela dos marcadores, em níveis discretamente maiores para a S100P, caracterizando o sinergismo entre os marcadores no que se refere ao processo de transformação maligna das células epiteliais mamárias e mais ainda, a importância da S100P nesse processo. Pudemos notar também que a associação dos 3 marcadores pareceu identificar um subgrupo de pacientes com lesões proliferativas, com perfil imuno-histoquímico semelhante ao do carcinoma *in situ*, por tanto, com maior potencial evolutivo na complexa via carcinogenética.

Apesar do pouco conhecimento sobre a via de ação da S100P, sabemos que a alteração na sua conformação espacial, a qual é dependente da ligação da proteína com o íon cálcio, leva a exposição de resíduos hidrofóbicos, responsáveis pela ligação da S100P à proteína alvo (ZHANG et al., 2003; KOLTZSCHER e GERKE, 2000). Mais recentemente, estudando-se a expressão e ação da proteína S100P em culturas de células, ARUMUGAM et al. (2004), postularam que a proteína S100P agiria de maneira autócrina, em receptores da superfície do tipo imunoglobulina de superfície, semelhante

ao receptor dos fatores de crescimento, denominado **RAGE** (receptor para o produto final glicosilado ativado). A idéia de que a proteína S100P exercesse também efeito extracelular já havia sido descrita por Guerreiro et al., que haviam observado a presença da proteína no meio de cultura e também nos depósitos de cálcio extracelulares (SILVA et al., 2000). Corroborando para essa hipótese, nós pudemos observar, em alguns casos que a microcalcificação apresentava marcação positiva para S100P. Outro fato que suplanta essa hipótese é que algumas células apresentam marcação na borda apical da membrana citoplasmática e não difusa no citoplasma.

O cálcio como mensageiro intracelular de suma importância, participa de vários processos como proliferação e secreção celular, contração muscular e morte celular programada por apoptose. Em condições fisiológicas a concentração do cálcio no citosol é mantida a níveis bastante baixos, contra o gradiente osmótico, através de bombas que transportam o cálcio para fora da célula, e também para organelas armazenadoras, o retículo endoplasmático e a mitocôndria. A concentração citoplasmática do íon se eleva decorrente da metabolização de fosfolípidos da membrana citoplasmática, que determina a formação do inositoltrifosfato (IP3), o qual se liga ao seu receptor na superfície do retículo endoplasmático, levando a liberação do cálcio das organelas para o citosol (COOPER; 1997; ALBERTS et al., 1997).

Recentemente, HANSTEIN et al. (2004) descreveram a presença de um receptor de estrogênio na membrana plasmática de diferentes células de diversos tecidos, responsável pela ativação rápida e não genômica da transcrição de genes. A ligação do estrogênio ao receptor ativa os

receptores dos fatores de crescimento na superfície da célula, conhecidos como proteína-quinases específicas de tirosina, ativando as proteínoquinases ativadas por mitógenos (MAP-quinases) bem como fosfatidilinositol3quinase (PIP3-quinase), enzima responsável pela fosforilação do fosfolípide de membrana (PIP2) com a formação do fosfatidilinositol3fosfato (PIP3), que leva ao aumento da cálcio intracelular e ativa as MAP-quinases com um estímulo mais duradouro.

Baseados nos nossos achados, no conhecimento atual sobre a fração alfa receptor de estrogênio na membrana citoplasmática e na descoberta do receptor da proteína S100P, postulamos um modelo para explicar a interdependência entre a proteína S100P e o receptor esteróide e sua ação na transformação maligna através da indução da proliferação celular. Neste modelo, o receptor de estrogênio na membrana citoplasmática, quando ligado ao hormônio, ativaria em cascata os receptores dos fatores de crescimento epidérmico (EGF) e insulina símile (IGF-1), os quais através da hidrólise do fosfatidilinositol2-fosfato ativariam as proteínoquinases ativadas por mitógenos (MAP-quinases), levando a transcrição de genes, bem como aumentariam a concentração do cálcio intracelular por mobilização das reservas do retículo endoplasmático através do IP3 (inositol3-fosfato). Outro produto da hidrólise do PIP2, o diacilglicerol ativaria a proteína quinase C (PKC), a qual aceleraria duas vias que levam a transcrição de genes: as **MAP-quinases** e o **fator de transcrição bloqueador da apoptose** (NF- κ B) que atuam no DNA determinando a transcrição de genes. Em condições normais o NF- κ B está bloqueado pela ligação ao I κ -B. O cálcio liberado do

retículo endoplasmático se ligaria a S100P, alterando sua conformação espacial, permitindo, dessa maneira, a passagem da proteína através da membrana citoplasmática. A proteína se ligaria então ao receptor de superfície reiniciando a cascata a partir da hidrólise do PIP2, criando um sistema de retro-alimentação positiva. A secreção da proteína, aliada ao cálcio, explicaria com ela impede a senescência celular em meio de cultura, pois a retirada do íon do citosol diminui sua concentração citoplasmática, impedindo a morte celular programada. A secreção do cálcio estaria relacionada ainda a gênese da calcificação, como postulado por de SILVA et al. (2000). Nós pudemos observar. Na figura 26 observamos calcificações luminal acinar e estromal que expressão a proteína S100P, enquanto o epitélio de revestimento não exibe positividade da reação.

Figura 26 - -Microcalcificação com expressão positiva para S100P (caso 79) (400x)

Figura 27 – Sinergismo entre as vias de ação da S100P e do receptor de estrogênio da membrana plasmática. E (estrogênio); RE (receptor de estrogênio); PKT (proteína-quinase específica de tirosina); EGF (fator de crescimento epidérmico); IGF-1 (fator de crescimento insulina símile); PIP2 (fosfatidilinositol2fosfato); DAG (diacilglicerol); IP3 (inositol3fosfato); PIP3 (fosfatidilinositol3fosfato); PIP3-K (fosfatidilinositol3fosfato-quinase); Re (retículo endoplasmático); PKC (proteína quinase C); $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (fator de transcrição anti-apoptótico); MAP-K (proteína-quinases ativadas por mitógenos); DNA (ácido desoxiribonucleico)

Nosso estudo corroborou na compreensão do importante papel da S100P na carcinogênese mamária, tendo sido o primeiro a estudá-la em material humano. Pudemos, além disso, identificar que a S100P atua sinergicamente com o receptor de estrogênio no que se refere ao estímulo proliferativo através da transcrição de genes. Determinamos ainda que lesões morfológicamente semelhantes possuem padrões distintos de expressão dos marcadores estudados, com associação significativa com os grupos de risco. De tal maneira, que uma porcentagem das lesões proliferativas, mostrou perfil imuno-histoquímico semelhante ao demonstrado pelo carcinoma *in situ*, abrindo perspectivas para novos estudos, prospectivos, comprovarem e precisarem o envolvimento de ambos os marcadores. A evidência dos papéis sinérgicos entre a proteína S100P e o receptor de estrogênio, além do envolvimento na via proliferativa dos receptores para os fatores de crescimento epidérmico e insulina-símile, possivelmente relacionados ao receptor de superfície nos mesmos moldes da S100P, necessitam de comprovação e despertam o interesse científico na busca de novas possibilidades em diagnóstico precoce e terapia profilática das lesões proliferativas.

6. Conclusões

6. Conclusões

A análise dos resultados permitiu-nos concluir que:

1. A expressão imunohistoquímica isolada de RE, S100P e MIB-1 está associada ao grupo histológico de risco e com os diagnósticos histológicos de lesões proliferativas de padrão ductal.
2. Não há associação entre os marcadores estudados e o diagnóstico histológico de neoplasia intra-epitelial lobular.
3. A expressão imuno-histoquímica da proteína S100P tem associação significativa com a expressão do receptor de estrogênio ($p= 0,001$), e com o marcador de proliferação celular MIB-1 ($p= 0,019$).
4. A expressão imuno-histoquímica da proteína S100P e do receptor de estrogênio se associa ao padrão histológico da lesão, classificada segundo seu grupo de risco para neoplasia invasora.
5. A expressão de RE acima de 10% associada à atividade proliferativa alta ($>10\%$) e positividade da proteína S100P apontam para lesão de alto risco de progressão

6. A ausência de expressão da proteína S100P indica grupo de risco histológico praticamente nulo.
7. A associação dos marcadores S100P e receptor de estrogênio permite identificar um subgrupo de lesões com maior probabilidade de progressão na via carcinogénica, apontando para um provável sinergismo entre o papel dos marcadores na transformação maligna de lesões precursoras.

7. Anexos

Anexo 1

Tabela de dados

CASO	IDADE	MICRO	BIÓPSIA	DIAGNÓSTICO HIST.	GRUPO RISCO	RE	Ki-67	S100P
1	50	3	304949	HDSA	BR	<10	<10	P
2	58	4	0304947A	HDSA	BR	>10	<10	P
3	53	4	304689	HDSA	BR	>10	<10	P
4	57	4	0304530B	HDA	MR	>10	<10	P
5	76	4	0304244B	HDSA	BR	>10	<10	P
6	57	4	0304242B	AE	BR	<10	0	N
7	52	4	303875B	HDSA	BR	<10	SL	SL
8	51	5	0303531A	HDSA	BR	<10	<10	N
9	45	4	306120	HDSA	BR	<10	<10	P
10	47	4	0305983A	HDSA	BR	<10	<10	P
11	49	4	0305769A	HDA	MR	>10	<10	P
12	42	4	305619	HCA	MR	<10	<10	SL
13	55	4	0305617B	HDSA	BR	>10	<10	P
14	46	4	0305434A	AE	BR	>10	<10	P
15	55	4	0305432B	HCA	MR	>10	<10	P
16	53	3	305130	HDA	MR	>10	<10	P
17	36	4	0307123B	NL1	MR	>10	<10	P
18	53	3	307278	HDSA	BR	>10	<10	P
19	42	4	307485	HDSA	BR	<10	<10	P
20	43	4	307795	NL2	MR	<10	<10	N
21	64	4	307892	NL1	MR	>10	0	P
22	44	4	310020	HCA	MR	>10	<10	P
23	47	4	309995	HCA	MR	<10	<10	P
24	50	4	0310660D	HDA	MR	<10	<10	P
25	69	4	0310659B	CDIS	AR	>10	<10	P
26	80	4	310478	PA	MR	>10	<10	P
27	53	4	310158	CDIS	AR	>10	>10<25	P
28	40	4	0310156A	HCA	MR	<10	<10	P
29	42	4	310633	HDSA	BR	<10	<10	P
30	47	4	310342	HDA	MR	<10	<10	P
31	72	4	315099A	CDIS	AR	0	<10	P
32	49	4	0308439B	HCA	MR	<10	<10	P
33	53	4	0308465C	HDA	MR	<10	<10	N
34	68	4	0308743B	NL2	MR	<10	<10	P
35	50	4	308937	HCA	MR	<10	<10	P
36	59	4	309354	HCA	MR	<10	<10	P
37	62	4	0309356B	HCA	MR	>10	<10	P
38	56	4	311718	CDIS	AR	>10	>10<25	P
39	50	4	0312877B	HDA	MR	>10	<10	P
40	64	4	0313087B	CDIS	AR	>10	<10	P
41	52	4	313741	CDIS	AR	>10	<10	P
42	52	3	0314104A	HDA	MR	>10	<10	P

43	60	4	314351	HCA	MR	>10	<10	P
44	48	4	313739	HDA	MR	>10	<10	P
45	72	3	0313873B	HDA	MR	>10	<10	N
46	43	4	0315509A	CDIS	AR	>10	>25<50	P
47	50	4	315941	CDIS	AR	>10	>10<25	P
48	33	4	0400162A	CDIS	AR	>10	<10	P
49	55	4	0400273A	CDIS	AR	>10	<10	P
50	49	4	0400537A	CDIS	AR	>10	>10<25	P
51	54	4	0400834B	CDIS	AR	>10	>10<25	P
52	44	4	303703	HCSA	BR	<10	<10	N
53	62	4	303877	AE	BR	>10		0 N
54	47	4	304240	MC	SR	>10	<10	P
55	46	4	303874	CDIS	AR	>10		0 P
56	50	4	301083	CDIS	AR	>10	<10	P
57	52	4	110219	HDSA	BR		0 <10	SL
58	47	4	110220	HDSA	BR	<10	<10	SL
59	46	4	110297	HDSA	BR	<10	<10	N
60	46	4	110365	AE	BR	<10	SL	N
61	55		110556	AE	BR	<10		0 N
62	50	4	110656	HDSA	BR	>10	<10	SL
63	44	3	110658	HCSA	BR	<10	<10	SL
64	47	4	110780	CDIS	AR	>10	>10<25	P
65	51	4	110915	HDA	MR	>10	<10	P
66	55	4	111139	C	SR	>10		0 N
67	55	4	111140	HCA	MR	>10		0 SL
68	39	4	111147	CDIS	AR	>10	<10	P
69	48	4	111153	MC	SR	<10		0 SL
70	42	4	200127	HMA	BR		0	0 P
71	56	4	200243	HDSA	BR	>10	<10	N
72	53	4	200245	FA	SR	<10	<10	N
73	49	3	211041	HDSA	BR		0	0 N
74	50	3	205518	HDSA	BR	>10	<110	P
75	45	4	206000	NL1	MR	>10		0 SL
76	64	4	206062	FE	SR	<10	SL	N
77	56	4	206097	C	SR	>10	<10	P
78	48	4	206115	HDSA	BR	<10	<10	P
79	46	4	206244	NL1	MR	>10	<10	N
80	45	4	206870	C	SR	<10		0 N
81	60	4	207209	HDSA	BR	<10		0 P
82	56	4	207649	NL1	MR	>10		0 N
83	48	4	208554	NL1	MR	>10		0 P
84	56	4	208734	HCSA	BR	SL	<10	SL
85	63	4	209528	FA	SR	<10		0 N
86	56	4	209885	HDA	MR	>10	<10	P
87	55	4	209887	HDA	MR	>10	<10	P
88	81	3	211234	FE	SR	>10		0 N
89	41	3	211646	HCA	MR	>10	<10	P
90	56	4	211849	MC	SR	>10		0 P
91	66	3	211851	FE	SR		0	0 N
92	61	4	211853	CDIS	AR	>10		0 P

93	48	5	211976	CDIS	AR	>10	>10<25	P
94	43	3	211983	HCA	MR	<10	<10	P
95	47	4	212320	AE	BR	>10	0	P
96	48	3	212326	MC	SR	>10	0	P
97	46	3	212468	HDSA	BR	<10	<10	P
98	57	4	212517	CDIS	AR	>10	<10	P
99	51	4	212780	HCA	MR	>10	<10	P
100	SR	4	212847	FA	SR	<10	0	P
101	50	4	213095	MC	SR	>10	<10	P
102	39	4	213097	CDIS	AR	>10	<10	P
103	61	4	213144	HDSA	BR	>10	<10	P
104	59	4	213196	AE	BR	<10	0	N
105	43	4	213301	CDIS	AR	>10	<10	P
106	42	4	213303	FAD	SR	<10	0	P
107	68	3	213508	HDA	MR	>10	<10	SL
108	67	4	213510	FA	SR	>10	<10	N
109	45	4	213610	A	SR	0	<10	P
110	40	4	213614	AE	BR	<10	<10	SL
114	51	4	213780	HDSA	BR	<10	<10	P
112	49	3	213782	A	SR	<10	0	P
113	75	4	214283	FA	BR	>10	0	N
114	58	3	214289	HDSA	BR	<10	<10	P
115	56	4	214291	MC	SR	>10	<10	P
116	58	4	214458	FE	SR	>10	0	P
117	73	4	214461	FA	SR	<10	0	P
118	44	3	214571	HDSA	BR	<10	<10	N
119	42	4	214833	MC	SR	0	<10	P
120	57	4	215374	HCA	MR	<10	0	P
121	57	4	215376	MC	SR	<10	0	P
122	56	4	215380	MC	SR	>10	<10	P
123	58	4	215381	AE	BR	>10	0	N
124	53	4	215525	CDIS	AR	>10	<10	SL
125	55	4	215567	AE	BR	<10	0	N
126	39	4	215685	CDIS	AR	>10	<10	P
127	49	4	215878	HDSA	BR	<10	<10	P
128	52	4	300018	HCSA	BR	<10	0	P
129	44	4	300176	MC	SR	>10	<10	N
130	58	4	300255	AE	BR	<10	<10	N
131	43	4	300258	HMA	BR	<10	0	P
132	52	4	300260	HCSA	BR	>10	0	N
133	53	3	300261	MC	SR	>10	0	P
134	32	4	300265	MC	SR	<10	<10	P
135	44	4	300557	NL1	MR	<10	<10	SL
136	48	4	300694	HCA	MR	>10	<10	SL
137	42	4	300760	P	SR	>10	<10	P
138	52	3	300852	FE	SR	>10	0	N
139	51	4	300856	HCA	MR	>10	<10	N
140	55	4	301042	HDSA	BR	<10	<10	P
141	47	4	301124	NL1	MR	SL	0	SL
142	49	4	301385	HCSA	BR	>10	<10	P

143	48	4	301880	MC	SR	>10	<10	P
144	43	4	302234	HCA	MR	>10	<10	P
145	74	4	302413	CDIS	AR	>10	<10	P
146	56	4	302504	C	SR	>10	0	N
147	45	3	303141	HDSA	BR	<10	0	P
148	50	4	303151	HDSA	BR	<10	0	P
149	46	4	303312	AE	BR	<10	0	N
150	46	4	303386	HCA	MR	0	<10	SL
151	40	4	303388	A	SR	<10	<10	N
152	49	4	303518	A	SR	<10	<10	P
153	47	4	303521	MC	SR	0	0	N
154	50	5	303532	HDSA	BR	>10	<10	P
155	57	4	303534	FA	SR	<10	0	P

Anexo 2**Classificação de BIRADS (1998)**

<i>Classificação</i> <i>BIRADS</i>	<i>Significado</i>
0	Necessita de estudo complementar
1	Negativo
2	Negativo, provavelmente benigno
3	Provavelmente benigno, necessita de segmento
4	Suspeito de malignidade, biópsia deve ser considerada
5	Altamente sugestivo de malignidade

8. Referências Bibliográficas

8. Referências bibliográficas *

ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D. **Biologia Molecular da Célula**, 3ª Ed., Ed. Artes Médicas, Porto Alegre, p. 743-52, 1997.

ALLRED D. C., MOSHIN S. K., Biological Features of Human Premalignant Breast Disease. In: HARRY J. R., LIPPMAN M. E., MORROW M., OSBORNE C. K. **Diseases of the Breast**, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.

AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY. Breast Imaging – Reporting and Data System (BI – RADS). Reston, VA, 1998 apud LACQUEMENT M. A., MITCHELL D., HOLLINGSWORTH A. B. Positive predictive value of the Breast Imaging Reporting and Data System. **J. Am. Coll. Surg**, v. 189, p. 34-40, 1999.

AMLER L. C., AGUS D. B., LEDUC C., SAPINOSO M. L., FOX W. D., KERN S., LEE D., WANG V., LEYSENS M., HIGGINS B., MARTIN J., GERALD W., DRACOPOLI N., CORDON-CARDO C., SCHER H. I., HAMPTON G. M. Dysregulated expression of androgen-responsive and nonresponsive genes in the androgen-independent prostate cancer xenograft model CWR22-R1. **Cancer Res.**, v. 60, n. 21, p. 6134-41, 2000.

* De acordo com:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. **Estrutura e apresentação de dissertações e teses**. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha. São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação, 1996.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS.

ARUMUGAM T., SIMEONE D. M., SCHMIDT A. M., LOGSDON C. D. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 7, p. 5059-65, 2004.

AVERBOUKH L., LIANG P., KANTOFF P. W., PARDEE A. B. Regulation of S100P expression by androgen. **Prostate**, v. 29, n. 6, p. 350-5, 1996.

BECKER T., GERKE V., KUBE E., WEBER K. S100P, a novel Ca^{2+} -binding protein from human placenta. cDNA cloning, recombinant protein expression and Ca^{2+} -binding properties. **Eur. J. Biochem.**, v. 207, p. 541-7, 1992.

BODIAN C. A., PERZIN K. H., LATTES R., HOFFMANN P., ABERNATHY T. G. Prognostic significance of benign proliferative breast disease. **Cancer**, v. 71, n. 12, p. 3896-907, 1993.

BURBANK F., PARKER S. H., FOGARTY T. J. Stereotactic breast biopsy: improved tissue harvesting with the Mammotome. **Am. Surg.**, v. 62, p. 738-44, 1996.

CANGLIARELLA J., WAISMAN J., SYMMANS W. F., GROSS J., COHEN J., WU H., AXELROD D. Mammotome core biopsy for mammary microcalcification. Analysis of 160 biopsies from 142 women with surgical and radiologic follow-up. **Cancer**, v. 91, n. 1, p. 173-7, 2001.

CLARKE R. B., HOWELL A., POTTEN C. S., ANDERSON E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. **Cancer Res.**, v. 57, p. 4987-91, 1997.

COOPER G. M. **The Cell – A Molecular Approach**, Ed. ASM, Washington, p. 521-47, 1997.

CRNOGORAC-JURCEVIC T., MISSIAGLIA E., BLAVERI E., GANGESWARAN R., JONES M., TERRIS B., COSTELLO E., NEOPTOLEMOS J. P., LEMOINE N. R. Molecular alterations in pancreatic carcinoma: expression profiling shows that dysregulated expression of S100 genes is highly prevalent. **J. Pathol.**, v. 201, n. 1, p. 63-74, 2003.

CUNHA A. C. **Estrutura e apresentação de dissertações e teses**. 2. ed., São Paulo, Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Serviço de Biblioteca e Documentação, 1996.

DICKSON R. B., LIPPMAN M. E. Molecular Biology of the Breast Cancer. In: DEVITA V. T., HELLMAN S., ROSENBERG S. A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.

DUPONT W. D., PAGE D. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. **N. Eng. J. Med.**, v. 312, n. 3, p. 146-51, 1985.

EMOTO Y., KOBAYASHI R., AKATSUBA H., HIDAKA H. Purification and characterization of a new member of the S100 protein family from human placenta. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 182, p. 1246-53, 1992 apud SILVA I. D. C. G., HU Y. F., RUSSO I. H., AO X., SALICIONI A. M., YANG X., RUSSO J, 2000, p. 238.

ENGELKAMP D., SCHÄFER B. W., MATTEI M. G., ERNE P., HEIZMANN C. W. Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: Identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 6547-51, 1993.

ENMARK E., PELTO-HUIKKO M., GRANDIEN K. Human estrogen receptor [beta]-gene structure, chromosomal localization and expression pattern. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, p. 4258-65, 1997.

FINE R. E., BOYD B. A., WHITWORTH P. W., KIM J. A., HARNESS J. K., BURAK W. E. Percutaneous removal of benign breast masses using a vacuum-assisted hand-held device with ultrasound guidance. **Am. J. Surg.**, v. 184, p. 332-6, 2002.

FITZGIBBONS P. L., HENSON D. E., HUTTER R. V. P. for the Cancer Committee of the College of American Pathologists. Benign Breast Changes and the Risk for Subsequent Breast Cancer an update of the 1985 Consensus Statement **Arch. Pathol. Lab. Mod.**, v. 122, p. 1053-55, 1998.

FUQUA S. A. W., WILTSCHKE C., ZHANG Q. X., BORG A., CASTLES C. G., FRIEDRICHS W., HOPP T., HILSENBECK S., MOHSIN S., O'CONNELL P., ALLRED D. G. A hypersensitive estrogen receptor α mutation in premalignant breast lesions. **Cancer Res.**, v. 60, p. 4026-29, 2000.

GREEN S, WALTER P, KUMAR V. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. **Nature**, v. 320, p. 134-9, 1986.

GREENE GL, GILNA P, WATERFIELD M. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, v. 231, p. 1150-4, 1986.

GRIBENKO A., LOPEZ M. M., ROCHARDSON J. M. 3rd, MAKHATADZE G. I. Cloning, overexpression, purification, and spectroscopic characterization of human S100P. **Prot. Scie.**, v. 7, n. 1, p. 211-5, 1998.

HANSTEIN B., DJAHANSOUZI S., DALL P., BECKMANN M. W., BENDER H. G. Insights into the molecular biology of the estrogen receptor defines novel therapeutic targets for breast cancer. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 150, p. 243-55, 2004.

HELLUNG SCHONNING B., BEVORT M., MIKKELSEN S., ANDERSEN M., THOMSEN P., LEFFERS H., Norrild B..Human papillomavirus type 16E7-regulated genes: regulation of S100P and ADP/ATP carrier protein genes identified by differential-display technology. **J. Gen. Virol.**, v. 81, n. Pt 4, p. 1009-15, 2000.

ILG E. C., SCHÄFER B. W., HEIZMANN C. W. Expression patterns of S100 calcium-binding proteins in human tumors. **Int. J. Cancer**, v. 68, p. 325-32, 1996.

KEMP C. Biópsia percutânea com agulha grossa vácuo-assistida por USG (mamotomia). In: KEMP C., BARACAT F. F., ROSTAGNO R., ed. **Lesões não palpáveis da mama. Diagnóstico e tratamento**. São Paulo, Revinter, 2003, p.115-29.

KHAN S. A., ROGERS M. A. M., KHURANA K. K., MEGUIDE M. M., NUMANN P. J. Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, p. 37-42, 1997.

KHAN S. A., ROGERS M. A. M., OBANDO J. A., TAMSEN A. Estrogen receptor expression of benign breast epithelial and its association with breast cancer. **Cancer Res.**, v. 54, p. 993-7, 1994.

KLEINBAUM D. G. **Statistics in the Health sciences: Logistic regression**. New York: Springer-Verlag; 1994

KOLTZSCHER M., GERKE V. Identification of Hydrophobic amino acid residues involved in the formation of S100P homodimers in vivo. **Biochemistry**, v. 39, p. 9533-39, 2000.

LAWRANCE I. C., FIOCCHI C., CHAKRAVARTI S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. **Hum. Mol. Genetics**, v. 10, n. 5, p. 445-56, 2001.

LOGSDON C. D., SIMEONE D. M., BINKLEY C., ARUMUGAM T., GREENSON J. K., GIORDANO T. J., MISEK D. E., KUICK R., HANASH S. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. **Cancer Res.**, v. 63, n. 10, p. 2649-57, 2003.

LONDON S. J., CONNOLLY J. L., SCHHNITT S. J., COLDITZ G. A. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. **JAMA**, v. 267, n. 7, p. 941-4, 1992.

MA X., SALUNGA R., TUGGLE J. T., GAUDET J., ENRIGHT E., MCQUARY P., PAYETTE T., PISTONE M., STECKER K., ZHANG B. M., ZHOU Y., VARNHOLT H., SMITH B., GADD M., CHATFIELD E., KESSLER J., BAER T. M., ERLANDER M. G., SGROI D. C. Gene expression profiles of human breast cancer progression. **Cancer Res.**, v. 100, n. 10, p. 5974-79, 2003.

MACKAY A., JONES C., DEXTER T., SILVA R. L., BULMER K., JONES A., SIMPSON P., HARRIS R. A., JAT P. S., NEVILLE A. M., REIS L. F., LAKHANI S. R., O'HARE M. J. cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. **Oncogene**, v. 22, n. 17, p. 2680-8, 2003.

MARIOTTI C., FELICIOTTI F., BALDARELLI M., SERRI L., SANTINELLI A., FABRIS G., BACCARINI M., MAGGI S., ANGELINI L., MARCO M., LEZOCHÉ E. Digital stereotactic biopsies for nonpalpable breast lesion. **Surg. Endosc.**, v. 17, p. 911-7, 2003.

MCCALL R. B. **Fundamental Statistics for Psychology**, Ed. Hardcourt, Brace & World, Inc., p. 284-91, 1979.

MORRISON D. **Multivariate Statistical Methods**. McGraw-Hill, New York, p. 130-3, 1967.

MOUSSES S., BUDENDORF L., WAGNER U., HOSTETTER G., KONONEN J., CORNELISON R., GOLDBERGER N., ELKAHOLOUN A. G., WILLI N., KOIVISTO P., FERHLE W., RAFFELD M., SAUTER G., KALLIONIEMI O. P. Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays. **Cancer Res.**, v. 62, n. 5, p. 1256-60, 2002.

NISBET A. P., BORTHWICK-CLARKE A., SCOTT N. 11-gauge vacuum assisted directional biopsy of the breast calcifications, using upright stereotactic guidance. **Eur. J. Radiol.**, v. 36, p. 144-6, 2000.

O'CONNELL P., PEKKEL V., FUQUA SAW, OSBORNE CK, ALLRED DC. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, p. 697, 1998 apud ALLRED e MOSHIN, 2000.

PAECH K., WEBB P., KUIPER GGJM. Differential ligand activation of estrogen receptors ER[alpha] and ER[beta] at AP1 sites. **Science**, v. 277, p. 1508-10, 1997.

PAGE D. L. Cancer risk assessment in benign breast biopsies. **Hum. Pathol.**, v. 17, n. 9, p. 871-4, 1986.

PEDROCCHI M., SCHÄFER B. W., MUELLER H., EPPENBERGER U., HEIZMANN C. W. Expression of Ca²⁺-binding proteins of the S100 family in malignant human breast-cancer cell lines and biopsy samples. **Int. J. Cancer**, v. 57, p. 684-990, 1994.

PONGLIKITMONGKOL M., GREEN S., CHAMBON P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. **EMBO J**, v. 7, p. 3385-8, 1988.

RADFORD D. M., PHILLIPS N. J., FAIR K. L., RITTER J. H., HOLT M., DONIS-KELLER H. Allelic loss and the progression of breast cancer. **Cancer Res.**, v. 55, n. 22, p. 5180-83, 1995.

ROBAK E., KORDEK R., ROBAK E., BARTKOWIAK J., BIERNAT W., LIBERSKI P., BLONSKI J. Langerhans cell histiocytosis in a patient with systemic lupus erythematosus: a clonal disease responding to treatment with cladribine and cyclophosphamide. **Leuk. Lymphoma**, v. 46, n. 10, p. 20141-6, 2002.

ROGER P., SAHLA M. E., GUSTAFSSON J. A., BALDET P., ROCHEFORT H. Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. **Cancer Res.**, v. 61, p. 2537-41, 2001.

ROSAI J. Borderline Epithelial Lesion of the Breast. **Am J. Surg. Pathol.**, v. 15, p. 209-21, 1991 apud ROSEN P. P., 2001, p. 237.

ROSEN P. P., **Rosen's Breast Pathology**, 2^a Ed., Philadelphia, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 229-48, 2001.

RUDLAND P. S., PLATT-HIGGINS A., RENSHAW C., WEST C. R., WINSTANLEY J. H. R., ROBERTSON L., BARRACLOUGH R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. **Cancer Res.**, v. 60, p. 1595-603, 2000.

RUSSO J., HU Y. F., TAHIN Q., MIHAILA D., SLATER C., LAREEF M. H., RUSSO I. H. Carcinogenicity of estrogens in human breast epithelial cells. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v. 109, n. 1, p. 39-52, 2001.

SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/index.cgi?cmd=tagsearch&org=Hs&tag>. Acesso em 23 abr. 2004.

SATO N., FUKUSHIMA N., MATSUBAYASHI H., GOGGINS M. Identification of maspin S100P as a novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. **Oncogene**, v. 23, n. 8, p. 1531-8, 2004.

SATO N., HITOMI J. S100P expression in human esophageal epithelial cells: Human esophageal epithelial cells sequentially produce different S100 proteins in the process of differentiation. **Anat. Rec.**, v. 267, n. 1, p. 60-9, 2002.

SCHMITT F. C. Multistep progression from an oestrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis. **Eur. J. Cancer**, v. 31A, n. 12, p. 2049-52, 1995.

SENN H. J., THÜRLIMANN B., GOLDBIRSCH A., WOOD W. C., GELBER R. D., COATES A. S. Comments on the St. Gallen Consensus 2003 on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Breast**, v. 12, p. 569-82, 2003.

SHAABAN A. M., SLOANE J. P., WEST C. R., FOSTER C. S. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor- α and Ki-67 expression. **Am. J. Pathol.**, v. 160, n. 2, p. 597-604, 2002.

SHAO W., BROWN M. advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in target breast cancer therapy. **Breast Cancer Res.**, v. 6, p. 39-52, 2004.

SHOKER B. S., JARVIS C., CLARKE R. B., ANDERSON E., HEWLETT J., DAVIES M. P. A., SIBSON D. R., SLOANE J. P. Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. **Am. J. Pathol.**, v. 155, n. 6, p. 1811-15, 1999.

SHOKER B. S., JARVIS C., SIBSON D. R., WALKER C., SLOANE J. P. Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast. **J. Pathol.**, v. 188, p. 237-44, 1999.

SHYU R. Y., HUANG S. L., JIANG S. Y. Retinoic acid increases expression of the calcium-binding protein S100P in human gastric cancer cells. **J. Biom. Sci.**, v. 10, n. 3, p. 313-9, 2003.

SILVA I. D. C. G., HU Y. F., RUSSO I. H., AO X., SALICIONI A. M., YANG X., RUSSO J. S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells *in vitro* and early stages of breast cancer development *in vivo*. **Int. J. Oncol.**, v. 16, p. 231-40, 2000.

SPEIRS V., KERIN M. J. Prognostic significance of oestrogen receptor [beta] in breast cancer. **Br. J. Surg.**, v. 87, n. 4, p. 405-9, 2000.

STOLL B. A. Premalignant breast lesions: role for biological markers in predicting progression to cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 35, n. 5, p. 693-7, 1999.

WALKER K. J., MCCLELLAND R. A., CANDLISH W., BLAMEY R. W., NICHOLSON R. I. Heterogeneity of oestrogen receptor expression in normal and malignant breast tissue. **Eur. J. Cancer**, v. 28, n. 1, p. 34-7, 1992.

ZHANG H., WANG G., DING Y., WANG Z., BARRACLOUGH R., RUDLAND P. S., FERNIG D. G., RAO Z. The crystal structure at 2 Å resolution of the Ca²⁺-binding protein S100P. **J. Mol. Biol.**, v. 325, p. 785-94, 2003.

ZHI H., ZHANG J., HU G., LU J., WANG X., ZHOU C., WU M., LIU Z. The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 106, n. 3, p. 327-33, 2003.

ZHUANG Z., MERINO M. J., CHUAQUI R., LIOTTA L. A., EMMERT-BUCK M. R. Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer. **Cancer Res.**, v. 55, n. 3, p. 467-71, 1995.