

# Avaliação da Atividade Proliferativa no Epitélio Mamário Adjacente a Fibroadenoma em Mulheres Tratadas com Tamoxifeno

Evaluation of Proliferative Activity in the Mammary Epithelium Adjacent to Fibroadenoma in Women Treated with Tamoxifen

Juarez Antônio de Sousa, Maria Teresa de Seixas, Geraldo Rodrigues de Lima  
Edmund Chada Baracat, Luiz Henrique Gebrim

## RESUMO

**Objetivo:** estudar a atividade proliferativa do epitélio mamário normal adjacente a fibroadenoma em mulheres na fase lútea do ciclo menstrual, tratadas com tamoxifeno.

**Pacientes e Métodos:** estudou-se por técnica imuno-histoquímica, com o uso do anticorpo monoclonal MIB-1, a atividade proliferativa no epitélio mamário adjacente a fibroadenoma. O estudo foi randomizado e duplo-cego. As 44 mulheres com fibroadenoma foram divididas em 3 grupos: A (n = 16; placebo), B (n = 15; tamoxifeno, 10 mg) e C (n = 13; tamoxifeno, 20 mg). O tamoxifeno foi utilizado por 22 dias, a partir do 2º dia do ciclo menstrual, e a biópsia realizada no 23º dia.

**Resultados:** a porcentagem média de núcleos corados por 1000 células no grupo A foi 9,2, no grupo B, 4,5, e no grupo C, 3,2. O teste de Fisher revelou que o tamoxifeno reduziu de forma significativa a imunoexpressão do MIB-1 nas doses de 10 e 20 mg em comparação com o grupo placebo ( $p < 0,0001$ ) e não houve variação significativa da atividade proliferativa nas doses de 10 e 20 mg de tamoxifeno ( $p = 0,21$ ).

**Conclusão:** conclui-se que o tamoxifeno reduziu de forma significativa a atividade proliferativa do epitélio mamário, nas doses de 10 e 20 mg/dia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Mama: doença benigna. Fibroadenoma. Marcadores tumorais. Imuno-histoquímica. Proliferação celular. Antiestrógenos.

## Introdução

A quimioprevenção do carcinoma de mama com tamoxifeno em mulheres de alto risco vem apresentando resultados animadores<sup>1-3</sup>. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos da droga no tecido mamário normal, tanto na dose usual empregada no tratamento adjuvante do câncer de mama, como em doses menores. O tamoxifeno, droga antiestrogênica não esteróideica, é um isômero trans, derivado trifeniletilênico com efeito antiestrogênico e agonista parcial dos estrogênios, facilmente absorvido por via oral na

Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo - São Paulo, Brasil.

Correspondência:

Juarez Antônio de Sousa  
Rua 7, 247/1303, S. Oeste  
74110-090 - Goiânia - GO  
Fone/Fax: (62) 223-6281  
e-mail: drjuarez@uol.com.br

forma do sal citrato. É metabolizado pelo citocromo P450 no sistema microsomal hepático, resultando em vários metabólitos<sup>4-6</sup>.

O tamoxifeno e seus similares atuam de modo complexo como antagonistas estrogênicos nas células normais e malignas da mama, e agonistas estrogênicos em outros tecidos do corpo, como ossos, útero e sistema cardiovascular. A atuação da droga é mediada pelos receptores estrogênicos celulares por meio de várias reações complexas<sup>7-11</sup>.

A proliferação celular pode ser estudada por vários métodos, como: figuras de mitose, citometria de fluxo, índice de incorporação de timidina, bromodeoxiuridina e por vários marcadores de proliferação, empregando-se métodos imuno-histoquímicos.

O MIB-1 é um anticorpo largamente utilizado no estudo da proliferação celular, que reage com uma proteína (antígeno) nuclear não-

histona, composta por dupla banda com aparente peso molecular de 395 e 345 kDa, regulado por um gene localizado no cromossoma 10<sup>12-18</sup>.

Poucos são os estudos avaliando a presença deste marcador de proliferação na mama normal, apesar de ser um método bem demonstrado e com valor prognóstico em câncer mamário. Quanto à avaliação da proliferação no epitélio mamário normal, Ribeiro<sup>18</sup> estudou quantitativamente a imunoexpressão do MIB-1 no epitélio mamário, observando uma maior expressão do indicador de proliferação na fase lútea do ciclo menstrual<sup>18</sup>.

## Pacientes e Métodos

Foram incluídas no estudo 44 pacientes, com idade entre 15 e 45 anos, submetidas a exérese de fibroadenomas no ambulatório de Mastologia do Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM). O estudo foi prospectivo tipo caso-controle e duplo-cego.

Fizeram parte do estudo mulheres com nódulos sugestivos de fibroadenoma. Além da obtenção da história clínica, todas as mulheres foram submetidas ao exame físico, ultrasonografia das mamas e PAAF (punção aspirativa por agulha fina), e aquelas com 35 anos ou mais, à mamografia antes da retirada do nódulo, com o intuito de descartar a presença de carcinoma. As pacientes foram distribuídas em três grupos de pesquisa por randomização.

As pacientes do grupo A (n = 16) fizeram uso de um placebo (lactose). No grupo B (n = 15) foi empregado 10 mg/dia de tamoxifeno e no grupo C (n = 13), 20 mg/dia da mesma droga. As pacientes iniciaram o medicamento no 2º dia do ciclo menstrual, por 22 dias. As cirurgias foram executadas no ambulatório, no 23º dia do ciclo. Os espécimes de tecido, considerado epitélio normal, foram retirados a pelo menos 1,0 cm do fibroadenoma, não apresentando alterações histopatológicas<sup>19</sup>.

O nódulo e o tecido adjacente foram fixados em formol a 10% tamponado por 24 horas, fixados em parafina e seccionados em cortes de 4 micrômetros e corados pela hematoxilina e eosina (HE), para confirmar o diagnóstico de fibroadenoma e a normalidade do tecido adjacente. Foram excluídas as pacientes com alterações fibrocísticas ou inflamatórias.

A expressão do MIB-1 foi quantificada pela técnica imuno-histoquímica da estrepto-avidina-biotina-peroxidase para o anticorpo monoclonal

Ki-67, clone MIB-1 (Imunotech, catálogo Nº 0505, lote 001). As lâminas foram desparafinizadas com xilol quente a 60°C por 15 minutos e em temperatura ambiente por mais 15. Os cortes histológicos foram então hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 95, 80 e 70%) por 30 segundos cada e lavados em água corrente e destilada<sup>20</sup>.

A seguir foi feita a recuperação antigênica pelo calor úmido (panela de pressão a 100°C), mergulhando-se as lâminas em solução tampão de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0, durante 5 minutos.

Posteriormente, foram resfriados em temperatura ambiente e lavados em água corrente. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada a 0,3% (diluída em metanol) em três banhos de 5 minutos cada. A seguir foi feita lavagem em água corrente, destilada e em tampão PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01 M e pH entre 7,4 e 7,6).

Seqüencialmente, realizou-se a incubação com o anticorpo monoclonal primário Ki-67 (clone MIB-1) da Imunotech na diluição 1/30 em BSA (albumina sérica bovina a 1%), durante uma noite, a 4°C, seguida de lavagem em solução PBS.

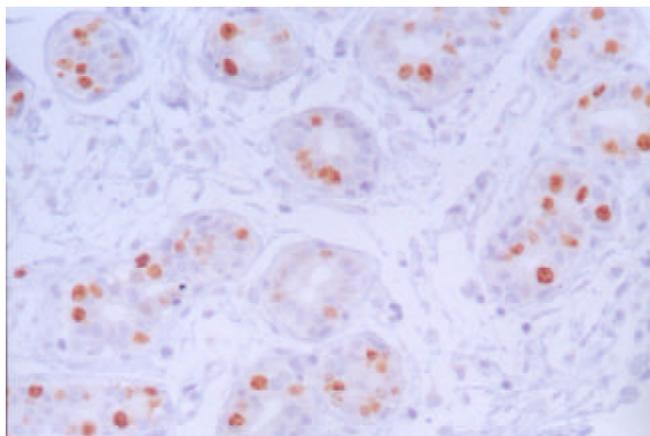
Seguiu-se incubação com *kit* (Dako) strepto ABcomplex/HRP duet, Mouse/Rabbit, código K492, na diluição recomendada, por 30 minutos, seguida de nova lavagem em solução PBS.

O próximo passo foi revelar a reação com o substrato cromógeno 3-3' diaminobenzidina (DAB) (0,06 g de DAB e 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 volumes) por 3 a 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Foi observada ao microscópio a formação do precipitado castanho escuro, quando foi feita a lavagem com água corrente e destilada.

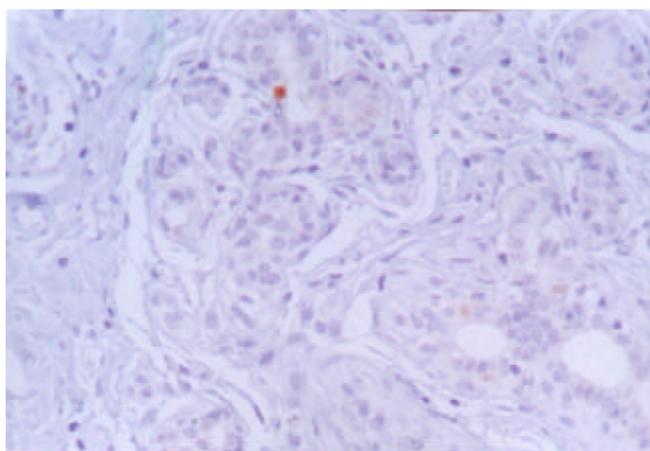
Procederam-se, a seguir, a contracoloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto e, depois, imersão das lâminas em água amoniacal e lavagem em água corrente e destilada.

Posteriormente, foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 95 e 100%) por 3 vezes, por 1 minuto cada, diafanização em 3 banhos de xilol, 1 minuto cada, e montagem da lâmina e lamínula com bálsamo (Entellan®).

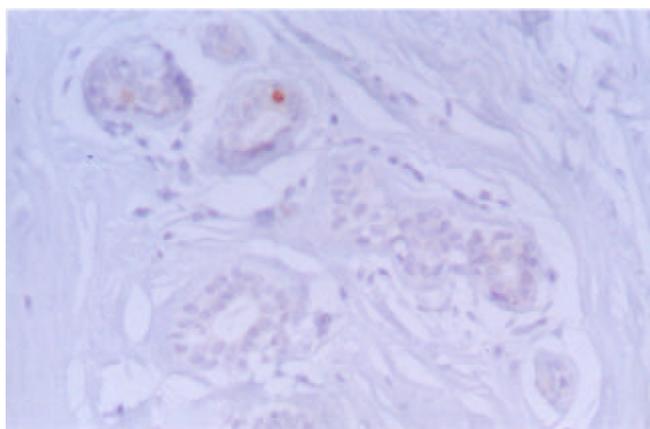
A Figura 1 é uma fotomicrografia de corte histopatológico do epitélio mamário corado pelo MIB-1 do grupo A (placebo), mostrando alta expressão de núcleos com coloração acastanhada característica. A Figura 2 mostra o epitélio adjacente de uma paciente do grupo B (tamoxifeno 10 mg), evidenciando uma baixa expressão, o que também pode ser observado na Figura 3, grupo C (tamoxifeno 20 mg).



**Figura 1** - Fotomicrografia de corte histopatológico do epitélio mamário corado pelo MIB-1 (Imunotech catálogo N° 0505, lote 001) da paciente N° 4 (B97/13588) do grupo A (placebo), mostrando alta expressão de núcleos com coloração acastanhada característica (aumento de 400X).



**Figura 2** - Fotomicrografia de corte histopatológico do epitélio mamário corado pelo MIB-1 (Imunotech catálogo N° 0505, lote 001) da paciente N° 26 (B97/15740) do grupo B (tamoxifeno 10 mg), mostrando baixa expressão de núcleos com coloração acastanhada característica (aumento de 400X).



**Figura 3** - Fotomicrografia de corte histopatológico do epitélio mamário corado pelo MIB-1 (Imunotech catálogo N° 0505, lote 001) da paciente N° 32 (B97/11609) do grupo C (tamoxifeno 20 mg), mostrando baixa expressão de núcleos com coloração acastanhada característica (aumento de 400X).

A imunoexpressão do Ki-67 (MIB-1) foi avaliada contando-se no mínimo 1000 células. Foi avaliado somente o elemento epitelial da amostra, excluindo-se o estroma<sup>12</sup>. Para a con-

tagem foi utilizado o sistema de análise digital de imagem "Image-Pro® Plus version 3.0 for Windows™", desenvolvido pela Media Cybernetics, L.P., constituído por um microscópio Olympus BX 40, acoplado a uma videocâmara colorida Sony, modelo CCD-IRIS, que transmite a imagem a um microcomputador Pentium MMX 233 MHz, com 64 megabytes de memória RAM.

O teste de Levene foi utilizado para avaliar a homogeneidade entre os grupos A, B e C em relação às variáveis de controle (idade, menarca, número de partos, lactação e índice de massa corpórea)<sup>21</sup>.

A análise de variância foi utilizada para verificar a igualdade das médias de expressão do MIB-1 nos grupos A, B e C. Posteriormente, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Fisher, objetivando encontrar diferenças de expressão do MIB-1 entre os grupos A, B e C<sup>21,22</sup>.

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ( $\alpha \leq 5\%$ ) o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

## Resultados:

A porcentagem média de núcleos corados no grupo A (placebo) foi 9,2, com erro padrão (Ep) de 1,4. No grupo B (tamoxifeno 10 mg), a média foi 4,5 (Ep = 0,8) e no grupo C (tamoxifeno 20 mg), a porcentagem média foi 3,2 (Ep = 0,6) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Porcentagem de núcleos corados pelo MIB-1 nos grupos A (controle), B (tamoxifeno 10 mg) e C (tamoxifeno 20 mg) por 1000 células contadas (aumento de 400X).

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
	5.9	2.8	3.6
	8.3	8.4	1.1
	13.9	3.4	0.8
	20.6	3.0	1.1
	16.5	5.3	5.6
	10.2	2.8	2.5
	14.7	1.4	2.3
	3.4	2.9	5.2
	14.8	6.4	2.2
	4.0	4.3	2.7
	8.5	11.9	1.7
	10.0	8.6	6.2
	2.0	1.1	6.8
	2.7	1.9	
	3.9	3.0	
	7.3		
Média	9.2	4.5	3.2

Análise de variância (grupos A x B x C)  $p < 0.001^*$

Teste de Fisher para comparações múltiplas

Grupo A x B  
 $p = 0.0078^*$

Grupo A x C  
 $p < 0.001^*$

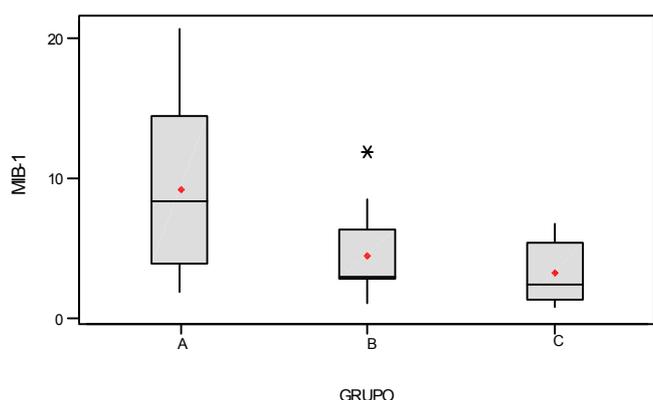
Grupo B x C  
 $p = 0.21$

\* = Significante; Erro padrão: Grupo A = 1.4 Grupo B = 0.8 Grupo C = 0.6

O tamoxifeno reduziu de forma significativa a imunexpressão do MIB-1 no epitélio mamário adjacente ao fibroadenoma, nas doses de 10 e 20 mg em comparação com o grupo placebo  $p < 0,0001$  (Tabela 1, Figura 4).

Os grupos B e C foram considerados semelhantes em relação à imunexpressão do MIB-1, não havendo, portanto, diferenças com o emprego de 10 ou 20 mg de tamoxifeno ( $p = 0,21$ ).

Os grupos A, B e C foram considerados homogêneos em relação às seguintes variáveis de controle: idade A = 23, B = 27, C = 24,  $p = 0,380$ ; menarca: A = 12, B = 12, C = 13,  $p = 0,744$ ; paridade: A = 1, B = 1, C = 1,  $p = 0,495$ ; amamentação em meses: A = 3, B = 8, C = 3,  $p = 0,177$ ; índice de massa corpórea: A = 22, B = 22, C = 21,  $p = 0,765$ .



**Figura 4** - Boxplot da variável MIB-1 para cada grupo estudado mostrando uma diminuição das médias de expressão do MIB-1 nos grupos B (tamoxifeno 10 mg) e C (tamoxifeno 20 mg) em relação ao grupo A (placebo), porém sendo B e C semelhantes.

## Discussão

A atividade proliferativa do epitélio mamário tem sido alvo de vários estudos. A avaliação de figuras de mitose, largamente utilizada, é pouco sensível, pois a mitose possui curta duração e reflete apenas a fase final do ciclo celular<sup>23-28</sup>. A escolha do MIB-1, produzido de partes recombinantes do Ki-67, como marcador de proliferação, foi devida à sua expressão nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular e ausência em G0<sup>13,14,29-31</sup>.

A avaliação do índice de proliferação celular com o emprego do anticorpo monoclonal MIB-1 possui valor prognóstico no carcinoma<sup>1,4,12,21,22</sup>. Mas poucos são os estudos empregando o MIB-1 em epitélio mamário humano normal<sup>32</sup>. O tecido mamário adjacente ao fibroadenoma sofre pouca influência do fibroadenoma, que é uma neoplasia benigna autolimitada que não induz angiogênese<sup>33,34</sup>.

Estudando-se os diferentes campos selecionados na contagem das células coradas pelo marcador, notou-se grande variabilidade na ati-

vidade proliferativa dos lóbulos. A explicação para a redução da proliferação celular pode ser fundamentada no efeito celular modulador atuando nos receptores  $\beta$  de estrogênio do lóbulo mamário, reduzindo a proliferação<sup>9,35</sup>, promovendo *down regulation* nos receptores alfa, caracterizando um efeito agonista parcial do estrogênio<sup>9,35</sup>.

Conclui-se que o tamoxifeno reduziu de forma significativa a expressão do MIB-1 no epitélio normal adjacente ao fibroadenoma, tanto nas doses de 10 como de 20 mg de tamoxifeno. Esses resultados poderão contribuir para que estudos clínicos e moleculares possam elucidar melhor os efeitos da droga no lóbulo mamário normal na pré-menopausa e uma possível redução na dose quando utilizada na quimioprevenção do câncer.

## SUMMARY

**Purpose:** to study the monoclonal antibody MIB-1 in the normal breast epithelium adjacent to a fibroadenoma in women in the luteal phase of the menstrual cycle treated with tamoxifen.

**Patients and methods:** the proliferative activity of the mammary epithelium adjacent to the fibroadenoma was studied by immunohistochemistry based on immunoreaction of the monoclonal antibody MIB-1. The study was randomized and double blind and was conducted on 44 women with fibroadenomas, divided into 3 groups: A (n = 16; placebo), B (n = 15; tamoxifen, 10 mg), and C (n = 13; tamoxifen, 20 mg). Tamoxifen was administered for 22 days starting on the 2nd day of the menstrual cycle and a biopsy was taken on the 23rd day. Results: the mean percentage of stained nuclei per 1000 cells was 9.2 in group A, 4.5 in group B, and 3.2 in group C. Fisher's test revealed that tamoxifen significantly reduced the immunoreaction of MIB-1 at the doses of 10 and 20 mg compared to the placebo group ( $p < 0.0001$ ), with no significant differences between doses in terms of proliferative activity ( $p = 0.21$ ).

**Conclusion:** we conclude that tamoxifen significantly reduced the proliferative activity of the mammary epithelium at the doses of 10 and 20 mg/day.

**KEY WORDS:** Breast: benign diseases. Fibroadenoma. Tumoral markers. Immunohistochemistry. Antiestrogens.

## Referências

- Forbes JF. The control of breast cancer: the role of tamoxifen. *Semin Oncol* 1997; 24 Suppl 1:S1-5-S1-19.
- Forbes JF. The incidence of breast cancer: the global burden, public health considerations. *Semin Oncol* 1997; 24 Suppl 1:S1-20-S1-35.

3. Breast cancer prevention trial shows major benefit, some risk. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28:417-8.
4. Jordan VC. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 31:41-52.
5. Jordan VC. Estrogen receptor antagonists. In: Adashi, EY, Rock JA, Rosenwaks Z, editors. *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.527-45.
6. Furr BJA, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 1984; 25:127-205.
7. Carlson RW. Scientific review of tamoxifen. Overview from a medical oncologist. *Semin Oncol* 1997; 24 Suppl 1:S1-151-S1-157.
8. Gallo MA, Kaufman D. Antagonistic and agonistic effects of tamoxifen: significance in human cancer. *Semin Oncol* 1997; 24 Suppl 1:S1-71-S1-80.
9. Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME, McInerney EM. William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 44:23-38.
10. Nazário ACP, Rodrigues de Lima G, Simões MJ, Novo NF. Cell kinetics of the human mammary lobule during the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 1995; 79:23-7.
11. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39:741-8.
12. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17:489-503.
13. Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168:357-63.
14. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133:1710-5.
15. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138:867-73.
16. Key G, Becker MH, Baron B, et al. New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993; 68:629-36.
17. Kubbutat MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Flad HD, Gerdes J. Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *J Clin Pathol* 1994; 47:524-8.
18. Ribeiro LM. Avaliação da imunoexpressão do anticorpo monoclonal MIB1 no epitélio mamário normal durante as fases folicular e lútea do ciclo menstrual [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1997.
19. Fanger H, Ree HJ. Cyclic changes of human mammary gland epithelium in relation to the menstrual cycle - an ultrastructural study. *Cancer* 1974; 34:574-85.
20. Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E, et al. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet* 1989; 83:297-9.
21. Neter J, Wasserman W, Kutner MH. *Applied linear statistical models: regression, analyses of variance and experimental designs*. 3<sup>a</sup> ed. Homewood: Irwin; 1996. p.1181.
22. Bussab WO, Morettin PA. *Estatística básica: métodos quantitativos*. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atual; 1987. p.321.
23. Facina G, Rodrigues de Lima G, Simões MJ, Novo NF, Gebrim LH. Estrogenic activity of tamoxifen on normal mammary parenchyma in the luteal phase of the menstrual cycle. *Int J Gynaecol Obstet* 1997; 56:19-24.
24. Facina G, Simões MJ, Nazário ACP, Kemp C, Gebrim LH, Rodrigues de Lima G. Estrogenic activity of tamoxifen on the epithelium of normal mammary and fibroadenoma in the luteal phase of the menstrual cycle. *Breast J* 1998; 4:452-7.
25. Howell A. New endocrine treatments for breast cancer: biological and clinical aspects. *Breast* 1996; 5:170-4.
26. Howell A, DeFriend DJ, Robertson, JFR, et al. Clinical studies with the specific pure antioestrogen ICI 182780. *Breast* 1996; 5:192-5.
27. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110:1001-20.
28. Tanaka CI, Gebrim LH, Rodrigues de Lima G, Simões MJ. Study of the action of tamoxifen on the mammary gland epithelium of premenopausal patients by lysosome quantification. *São Paulo Med J* 1997; 115:1390-4.
29. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31:13-20.
30. Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37:101-13.
31. Leonardi E, Girlando S, Serio G, et al. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992; 45:416-9.
32. Powles TJ. Efficacy of tamoxifen as treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 1997; 24 Suppl 1:S1-48-S1-54.
33. Silva ID, Salicioni AM, Russo IH, Higgs NA, Gebrim LH, Russo J. Tamoxifen down-regulates CD36 messenger RNA levels in normal and neoplastic human breast tissues. *Cancer Res* 1997; 57:378-81.
34. Uehara J, Nazario AC, Rodrigues de Lima G, Simões MJ, Juliano Y, Gebrim LH. Effects of tamoxifen on the breast in the luteal phase of the menstrual cycle. *Int J Gynaecol Obstet* 1998; 62:77-82.
35. MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998; 50:151-96.