

Expressão dos Fatores de Proliferação Celular PCNA e Ki-67 e Receptores de Estrogênio e Progesterona em Tecido Mamário Normal de Mulheres na Pós-Menopausa Submetidas a Dois Esquemas de Terapia de Reposição Hormonal

artigo original

RESUMO

Foram colhidas amostras de tecido mamário de 32 mulheres saudáveis na pós-menopausa: 19 utilizaram esquema cíclico de estrogênio e progestágeno (estrogênios conjugados 0,625mg, 21 dias por mês, associados ao acetato de medroxiprogesterona, 5mg, nos últimos 12 dias) e 13 tomaram apenas estrogênios (estrogênios conjugados, 0,625mg, 21 dias por mês), todas durante 6 meses consecutivos. Foram realizadas biópsias mamárias antes e ao final dos 6 meses de tratamento. A análise imunohistoquímica foi feita com anticorpos anti-PCNA do tipo PC-10, anti-Ki-67 do tipo MIB-1, anti-receptor de estrogênio do tipo 1-D5 e anti-receptor de progesterona do tipo 1-A6. Não houve diferença significativa para os fatores de mediação (receptores) no grupo que utilizou o esquema cíclico (RE: P = 0,326; RP: P = 0,228). No grupo que utilizou apenas estrogênio, obteve-se um valor de P próximo ao limite de significância estatística para o RP (P = 0,053), mas não para o RE (P = 0,203). Com relação aos fatores de proliferação celular, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para o PCNA em ambos os grupos (esquema cíclico: P = 0,121; estrogênio isolado: P = 0,208). Houve tendência para elevação do Ki-67 no grupo que fez uso de estrogênio apenas (P = 0,084), o que não se observou no grupo que fez uso de esquema cíclico (P = 0,776). Estes resultados sugerem que a associação de progestágeno à terapia estrogênica nesse grupo de mulheres pós-menopausa, pode ter contribuído para uma possível redução na expressão do receptor de progesterona e a proliferação celular, estimada pelo marcador Ki-67, agindo como um fator moderador de proliferação celular. Novos estudos são necessários para comprovar esta hipótese. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/1:37-48)

Descritores: Menopausa; Receptores de esteróides; PCNA; Ki-67; Mama

ABSTRACT

Expression of Proliferation Factors PCNA and Ki-67 and Estrogen and Progesterone Receptors in Normal Breast of Post-Menopause Women Submitted to Two Types of Hormonal Replacement Therapy.

Mammary tissue samples were collected from 32 healthy post menopausal women: 19 were using estrogen and progestagen on a cyclical schedule (conjugated estrogens, 0.625mg, for 21 days/month, associated to medroxyprogesterone acetate, 5mg, for the last 12 days) and 13 were using estrogen-only, on a 21 days/month schedule (conjugated estrogens, 0.625mg), all during 6 consecutive months. Biopsies were performed on the external left-hand upper quadrant before and after 6 months of treatment. Immunohistochemical analysis was performed with the antibodies: anti-PCNA of the PC-10 type, anti Ki-67 of the MIB-1 type, anti ER (Estrogen Receptor) of the 1-D5 type and anti-PR (Progesterone Receptor) of the 1-A6 type. No significant differences were observed for the mediation factors in the group using the cyclical schedule (ER: P = 0.326; PR: P = 0.228). In the estrogen-only group, a P value near the statistical probability limit was found for the PR (P = 0.053) but not for ER (P = 0.203). No significant statistical difference was found for the cellular proliferation factor PCNA in both treatment groups (cyclical schedule: P =

**Lizanka P.F. Marinheiro
Márcia Graudenz
Marta Recktenvald
Ricardo M.R. Meirelles
Maira Caleffi**

*Instituto Fernandes Figueira -
Fundação Oswaldo Cruz (LPFM);
Instituto Estadual de Diabetes e
Endocrinologia Luiz Capriglione
(RMRM), Rio de Janeiro, RJ;
Hospital Santa Rita - Santa Casa
de Misericórdia de Porto Alegre
(MC); e Instituto de Patologia de
Porto Alegre (MG, MR),
Porto Alegre, RS.*

*Recebido em 24/03/02
Revisado em 31/07/02 e 16/01/03
Aceito em 27/01/03*

0.121; estrogen-only schedule: $P = 0.208$). However, there was a trend in the estrogen-only group for Ki-67 ($P = 0.084$) but not in the cyclical schedule group ($P = 0.776$). These results suggest that progestagen association to estrogen therapy in this sample of postmenopausal women may have contributed to a possible reduction in the progesterone receptor expression and cellular proliferation, when estimated by Ki-67 marker, like a moderator factor to cellular proliferation. New studies are necessary to confirm this hypothesis. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/1:37-48)

Keywords: Menopause; Steroid receptors; PCNA; Ki-67; Breast

DURANTE A VIDA REPRODUTIVA da mulher, o estrogênio ocupa um papel fundamental no desempenho de funções de vários sistemas do organismo, tais como cérebro, coração, ossos, aparelhos reprodutor e urogenital. Muitos desses efeitos benéficos podem ser estendidos ao período de vida posterior à menopausa, com a instituição e manutenção da terapia de reposição hormonal da menopausa (TRHM), que traz importantes benefícios à saúde da mulher, melhorando a sua qualidade de vida (1). Seu uso, no entanto, ainda é associado a aumento do risco de câncer de mama (2). Os resultados de numerosos estudos epidemiológicos têm sido contraditórios, alguns demonstrando maior incidência de câncer de mama em usuárias de TRHM (3,4), outros não (5,6).

A suposta associação entre os esteróides ovarianos endógenos e exógenos e a maior incidência de câncer de mama, liga-se à influência sinérgica ou isolada do estrogênio e da progesterona, sobre o epitélio ductal mamário. Na espécie humana não foi comprovado que os estrogênios sejam carcinogênicos, isto é, que sejam capazes de transformar uma célula sadia em cancerosa (7). Por outro lado, não se pode refutar a possibilidade de sua influência na proliferação de células com patrimônio genético suscetível, podendo acelerar o crescimento da neoplasia preexistente, tanto em animais de laboratório como em mulheres.

O aumento da proliferação celular das células epiteliais mamárias tem sido ligado ao desenvolvimento de câncer de mama (8). Muitos estudos sobre o epitélio mamário normal, feitos na pré-menopausa, têm mostrado hormônio-dependência, respondendo às mudanças séricas dos esteróides durante o ciclo menstrual (9,10), com o 17- β -estradiol agindo como um dos mais importantes agentes mitogênicos nas células epiteliais da mama. O papel da progesterona na proliferação celular mamária ainda não está claro, existindo estudos descrevendo uma ação inibitória da mesma (11), enquanto outros não encontraram tal efeito (12).

Os receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP) são proteínas nucleares responsáveis pela mediação dos efeitos do estrogênio e da progesterona no epitélio mamário. Existem vários métodos para detecção e quantificação dos receptores hormonais, sendo que os métodos bioquímicos vêm sendo progressivamente substituídos pelas técnicas imuno-histoquímicas (13).

O emprego dos ensaios de imuno-histoquímica demonstrou que o epitélio mamário normal possui um conteúdo relativamente reduzido de receptores estrogênicos, regularmente distribuídos nos ductos galactóforos e nas junções ductolobulares. Apesar de os níveis de RE e RP serem baixos em mamas normais, eles podem ser exatamente aferidos em material de biópsias de tecidos e aspirados de agulhas finas (14).

Tanto os receptores de estrogênios como os receptores de progesterona são importantes indicadores prognósticos no tratamento do câncer de mama, sendo que a positividade para RE e RP se correlaciona com um melhor prognóstico e com uma melhor resposta à hormonioterapia (15,16).

Assim, a dosagem dos receptores do estradiol e da progesterona apresenta um interesse duplo: prognóstico e terapêutico. Enquanto o receptor do estradiol é um marcador da diferenciação tumoral, a presença do receptor da progesterona reflete uma funcionalidade do receptor do estradiol, porque é induzido pelo estradiol.

A utilização dos marcadores biológicos na avaliação do prognóstico do câncer de mama tem sido alvo de inúmeros estudos recentes. A avaliação da proliferação celular através de marcadores, como o PCNA e Ki-67, e o estudo dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona, são os mais usados na atualidade pela facilidade operacional, sendo importantes em termos de prognóstico do câncer de mama (6).

Este trabalho teve por objetivo avaliar e comparar a resposta individual do tecido mamário normal de mulheres na pós-menopausa, submetidas à terapia de reposição hormonal (TRHM), com o uso isolado de estrogênio ou com o uso combinado de estrogênio e progesterona. Para isso, foram analisados os índices de proliferação celular medidos por meio dos marcadores antígeno de proliferação nuclear (PCNA), e antígeno nuclear Ki-67. Estudamos também a expressão dos receptores de estrogênio e de progesterona.

PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Foram incluídas no estudo mulheres que desejavam fazer terapia de reposição hormonal (motivo da consulta); estavam em amenorréia por, no mínimo, um ano e, no máximo, quatro anos; apresentavam quadro clínico compatível com síndrome do climatério; aceitavam voluntariamente fazer parte do protocolo de pesquisa, que envolvia duas biópsias por fragmento (*core-biopsy*); apresentavam mamografia e ultra-sonografia transvaginal normais. Todas assinaram um termo de consentimento informado.

Foram excluídas do estudo pacientes que apresentassem doenças crônico-degenerativas descompensadas; história patológica pregressa de câncer; história familiar de câncer de mama; FSH < 40mUI/mL; estradiol > 60pg/mL; eco endometrial à ultra-sonografia maior ou igual a 5mm; mamografia com qualquer imagem suspeita; condições culturais incompatíveis para avaliar o consentimento informado ou ausência de parênquima mamário na amostra coletada para a primeira análise imuno-histoquímica.

Foram selecionadas inicialmente 56 pacientes do Serviço de Ginecologia do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), do Ambulatório de Climatério, que concordaram voluntariamente em fazer parte de protocolo de pesquisa, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição. Tais pacientes não haviam recebido TRHM previamente, e antes de iniciar o tratamento foram submetidas ao protocolo específico preconizado pelo manual da Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetria — FEBRASGO (Comissão nacional especializada de climatério - manual de orientação).

As pacientes foram divididas em dois grupos:

Grupo A: pacientes não histerectomizadas. Este grupo usou estrogênios conjugados, na dose de 0,625mg/dia, por 21 dias no mês, acrescidos de acetato de medroxiprogesterona, na dose de 5,0mg/dia, nos últimos 12 dias, com pausa de 7 dias/mês, durante 6 meses (esquema seqüencial de TRHM).

Grupo B: mulheres histerectomizadas por causas diversas, que não carcinoma de endométrio. O grupo fez uso apenas de estrogênios conjugados, na dose de 0,625mg/dia, durante 21 dias em cada mês, com pausa de 7 dias/mês, durante 6 meses.

A medicação usada foi fornecida pelo Laboratório Wyeth.

As características dos grupos antes do tratamento (idade média, IMC, tempo e menopausa) estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Características dos grupos antes do tratamento.

GRUPO	A	B
N	19	13
Idade média (anos)	54,2	52,1
Tempo de menopausa (anos)	3,2	3,9
IMC	28,7	30,1
Histerectomizadas	NÃO	SIM

Material e Métodos

Foi utilizado material de biópsias mamárias realizadas sob a forma de punção biópsia por fragmento, nas quais foram retirados cinco fragmentos de tecido mamário em cada punção. O procedimento foi realizado antes e seis meses após o tratamento de reposição hormonal, na primeira semana do ciclo de tratamento em quadrante súpero-lateral esquerdo.

Procedimento histopatológico

O material coletado foi fixado em formaldeído a 10% e incluído em parafina, em no máximo 24 horas (17). De cada bloco de parafina realizaram-se cortes de 4mm para preparação de duas lâminas coradas com a técnica de hematoxilina/eosina (HE). Os blocos foram estocados para realização do procedimento de imuno-histoquímica após o término de todas as coletas.

Procedimento imuno-histoquímico

Para estudar os receptores de estrogênio e de progesterona, bem com os marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67, e com vistas a um bom sistema de amplificação, foi empregada a técnica da streptavidina-peroxidase para as amostras das biópsias mamárias fornecidas na forma de cortes parafinizados (17-19). Para recuperação antigênica foi usado o calor úmido em panela de pressão (20,21). Na reação, utilizou-se o Complexo Streptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC), de acordo com o princípio proposto por Hsu e cols. (18). Os anticorpos primários usados foram soros monoclonais camundongo anti-humano: com o antígeno nuclear Ki-67 (clone MIB-1 da IMMUNOTECH), com o antígeno PCNA (clone PC10 da DAKO), com o receptor de estrogênio (clone 1-D5 da ZYMED), e com o receptor de progesterona (clone 1A6 NCL - PRG da NOVACAstra), todos diluídos apropriadamente e aplicados sobre cada corte separadamente e incubados por cerca de 12 horas (durante a noite) em câmara úmida. O anticorpo secundário usado foi o anticamundongo humano marcado com Biotina (ZYMED), diluído em PBS durante 15 minutos. Como controles negativos para o conjugado, foram utilizadas lâminas das mesmas biópsias, em que a etapa de aplicação do anticorpo primário foi omitida. Foram usados como controles positivos espécimes cirúrgicos de carcinoma de mama. Para revelação, as lâminas

foram incubadas com 50ml de solução substrato cromógeno DAB (3-3' Diaminobenzidina 60mg% - ZYMED cód. 002020). Em seguida, observaram-se ao microscópio as lâminas controle-positivas, o desenvolvimento de precipitado castanho-dourado, como produto final da reação.

O procedimento de imuno-histoquímica foi realizado no Instituto de Patologia de Porto Alegre.

Procedimento quantitativo

A imuno-expressão do receptor de estrogênio (RE), do receptor de progesterona (RP), do PCNA e do Ki-67 foi avaliada no epitélio dos ductos terminais e dos lóbulos mamários. A reação foi considerada positiva quando os núcleos exibiam cor castanha característica, independentemente de sua intensidade, sendo esta avaliação feita utilizando-se microscópio (22,23).

O método utilizado de quantificação foi o H-score, que é um método de estimativa de semiquantificação (24). O índice de H-score (IHA) é calculado somando-se o percentual de células marcadas em intensidade fraca com o percentual de células marcadas em intensidade moderada multiplicado por 2, e com o percentual de células marcadas em intensidade forte, multiplicado por 3. Os índices do H-score foram considerados positivos para os receptores de estrogênio e progesterona quando os valores foram maiores ou iguais a 10 (25).

Para o PCNA, foram considerados como positivos somente os valores acima de 10, sendo índices de coloração menores ou iguais a 10 considerados negativos, em virtude da meia vida longa do PCNA (26). Já para o Ki-67, todo valor diferente de zero foi considerado positivo (27).

Para validação interna do H-score, foi também realizado um pequeno estudo piloto de comparação entre o método tradicional de contagem total e o método semiquantitativo. Os resultados obtidos foram similares pelos dois métodos, tendo-se optado, portanto, pela utilização do H-score, por sua maior praticidade.

Análise estatística

A análise estatística compreendeu a utilização de métodos descritivos e inferenciais. A parte descritiva consistiu de tabelas, cálculos de medidas de posição e de variabilidade. A parte inferencial teve por objetivo avaliar se existe influência da reposição hormonal no parênquima mamário, através de estudo de quatro variáveis: receptores de estrogênio, receptores de progesterona, PCNA e Ki-67. Para responder a essa questão, recorreu-se ao teste não-paramétrico dos *Postos com Sinal de Wilcoxon* (28).

Também foram analisadas as correlações entre as diferenças ('Depois' - 'Antes') encontradas nas quatro variáveis. Correlações de magnitude alta e positiva indicam pares de índices cujas variações ocorrem no mesmo sentido. Foi utilizado o coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman, e na análise apresentadas matrizes de correlação separadamente para cada tratamento.

A comparação entre o percentual de casos positivos antes e após o tratamento foi realizada através do teste de McNemar (28), aplicável a experimentos do tipo 'Antes e Depois', em que cada indivíduo é utilizado como seu próprio controle.

RESULTADOS

Após o encerramento da seleção de pacientes, foi estudado um total de 32 mulheres, sendo 19 pertencentes ao grupo A (estrogênio + progestágeno) e 13 ao grupo B (apenas estrogênio) que obedeceram aos critérios de inclusão e possuíam material histológico adequado para o estudo. As causas de exclusão foram as seguintes: recusa de realizar a 2ª biópsia por fragmento (7 casos); uso incorreto da medicação (3 casos); desejo de interromper o tratamento (2 casos); presença apenas de gordura nas amostras, após estudo por hematoxilina/eosina (6 casos); material autolisado após análise pela hematoxilina/eosina (4 casos); presença de imagem mamográfica suspeita no transcurso do tratamento (2 casos).

Fatores de mediação - receptor de estrogênio (RE) e progesterona (RP)

Para correlacionar entre si os resultados obtidos para o RP e RE, foram criadas novas variáveis para cada um dos dois escores, a partir das diferenças dos valores 'depois' e 'antes' do tratamento. Devido à grande amplitude para análise dos dados, descrevemos as medianas. As modificações dos escores após os tratamentos estão expressos na tabela 2. Estes valores não foram significativamente diferentes entre os grupos de tratamento.

Após os tratamentos, 15,7% das amostras do grupo que usou estrogênio e progestágeno tornaram-se positivas para o RE (3 em 19 casos), enquanto no tratamento com estrogênio esse aumento ocorreu em 30,7% (4 em 13 casos). Já o RP tornou-se positivo em 15,7% das componentes do grupo que usou estrogênio e progestágeno (3 em 19 casos) e em 38,5% das integrantes do grupo que fez uso apenas de estrogênio (5 em 13 casos) (tabela 3). Com o tratamento a base de estrogênio, mais pacientes apresentaram aumento no H-score, para ambos os receptores.

Tabela 2. Descrição das diferenças nos escores do RP e do RE "Antes" e "Depois", por tratamento.

Tratamento	Receptor	N	Diferenças "Depois" - "Antes"	
			Mediana	Amplitude
Estrogênio e Progestágeno	RP	19	0	-10 a 130
	RE	19	0	-60 a 180
Estrogênio	RP	13	10	-10 a 50
	RE	13	0	-40 a 50

RP = receptor de progesterona; RE= receptor de estrogênio.

Tabela 3. Comportamento dos escores RP e RE após os tratamentos com estrogênio isoladamente ou associado a progestágeno.

		Estrogênio/Progestágeno		Estrogênio	
		Freqüência	%	Freqüência	%
RP	Positivo Ø Negativo	0	0	0	0,0
	Negativo Ø Positivo	3	15,8	5	38,5*
	Inalterado	16	84,2	8	46,1
RE	Positivo Ø Negativo	2	10,5	1	7,6
	Negativo Ø Positivo	3	15,7	4	30,7
	Inalterado	14	73,6	8	61,5

RP = receptor de progesterona; RE = receptor de estrogênio.

Este dados refletem os percentuais de aumento para cada escore.

* P < 0,05

(A comparação entre o percentual de casos positivos antes e após o tratamento foi realizada através do teste de McNemar que, segundo Siegel (1975), é particularmente aplicável a experimentos do tipo "Antes e Depois", em que cada indivíduo é utilizado como seu próprio controle. A hipótese nula do teste de McNemar é a igualdade na proporção de casos negativos que migraram para positivos e casos positivos que migraram para negativos após o tratamento. Quando a significância do teste de McNemar for inferior a 0,05, deve-se rejeitar a hipótese de nulidade).

A análise da associação entre os fatores de medição (RE e RP) mostra que, em ambos os grupos, quando o índice de H-score do RE aumenta, o índice de H-score do RP também tende a aumentar. Essas correlações são visualizadas nas figuras 1 e 2.

A comparação entre o percentual de casos positivos antes e após o tratamento, realizada através do teste de McNemar (28), indicou que em nenhum dos tratamentos ocorreu uma migração significativa de casos negativos para positivos, embora tenha sido detectada uma tendência à positividade dos receptores de progesterona com o tratamento estrogênico não antagonizado por progestágeno (p = 0,063) (tabela 4).

Fatores de proliferação - PCNA e Ki-67

Para o PCNA, as células coradas com intensidade fraca, isto é, com valores menores ou iguais a 10, foram consideradas como negativas, em virtude de este marcador ter meia-vida longa e poder, assim, refletir coloração de células que já estiveram no ciclo celular, mas não estão mais no ciclo no momento da análise (29). Para o Ki-67, considerou-se positiva toda célula com qualquer gradação de coloração, mesmo que tênue, uma vez que esse marcador tem meia-vida

curta, com o antígeno sendo degradado em até uma hora após a mitose (30).

Para o PCNA, antes do tratamento, no grupo que usou estrogênio e progestágeno havia 6 casos positivos (31,6%); no grupo que usou só estrogênio, esse número era de 8 (61,5%). Após o tratamento, esses números foram de 12 (63,2%) e 10 (76,9%), nos tratamentos com estrogênio e progestágeno (grupo A), e estrogênio (grupo B), respectivamente. Para o PCNA, o percentual de casos positivos aumentou em 42,1% no grupo que usou estrogênio e progestágeno e em 23,1% no grupo que usou estrogênio. Em relação ao Ki-67, antes do tratamento, no grupo A (estrogênio e progesterona), haviam 5 casos negativos que se tornaram positivos (26,3%), e no grupo B (estrogênio), também 5 casos negativos que positivaram (38,5%). Para este marcador, o percentual de casos positivos aumentou em 26,3% no grupo A e 38,5% no grupo B. O teste de McNemar indica que em nenhum dos tratamentos ocorreu uma migração significativa de casos negativos para positivos (tabela 5). Também neste caso observou-se uma tendência à positividade do Ki-67 com o tratamento estrogênico não antagonizado por progestágeno (p = 0,063) (tabela 5).

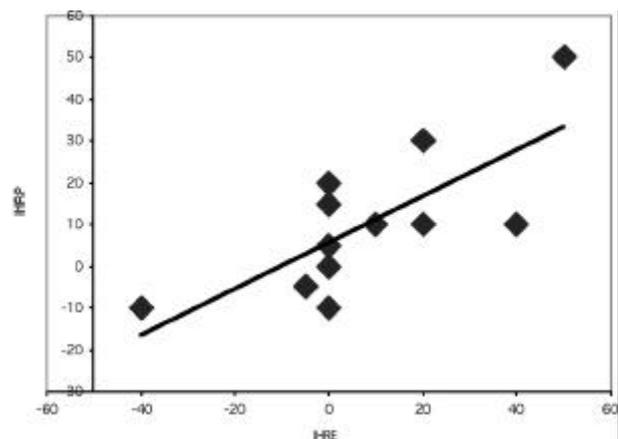


Figura 1. Gráfico de dispersão e linha de tendência entre os aumentos dos índices de H-score para o RE e o RP no tratamento com estrogênio e progestágeno.

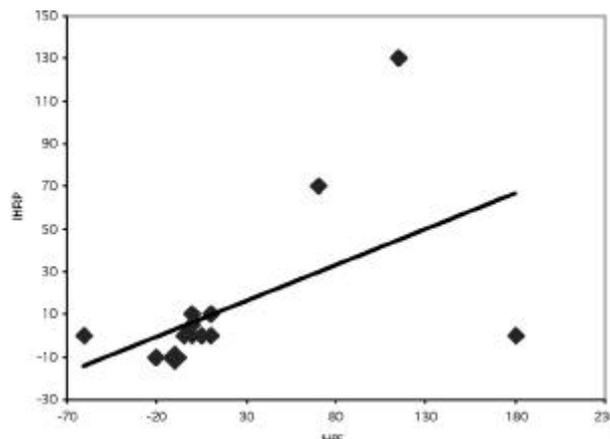


Figura 2. Gráfico de dispersão e linha de tendência entre os aumentos dos índices de H-score, para o RE e o RP, no tratamento com estrogênio.

Tabela 4. Significância do teste de McNemar.

Tratamento	Receptor	Significância Teste de McNemar
Estrogênio e Progesterona	RP	a
	RE	1,000
Estrogênio	RP	0,063*
	RE	0,375

a Não foi possível calcular aqui a significância do teste de McNemar, pois 100% dos casos eram negativos antes do tratamento.

RP = receptor de progesterona; RE= receptor de estrogênio

Tabela 5. Positização dos fatores de proliferação (PCNA e Ki-67) nos tratamentos com estrogênio isoladamente ou associado a progestágeno (Teste de McNemar).

Tratamento	Receptor	P
Estrogênio e Progestágeno	PCNA	0,109
	Ki-67	1,000
Estrogênio	PCNA	0,625
	Ki-67	0,063*

P = probabilidade estatística.

Análise do H-score: teste de Wilcoxon

A comparação entre os escores obtidos antes e após os tratamentos, através do teste de Wilcoxon, mostrou que, para os fatores de mediação RE e RP, não houve diferença estatisticamente significativa no grupo que usou estrogênio e progestágeno combinados (RE, $p = 0,326$; RP, $p = 0,228$) (tabela 6). Já no grupo que usou apenas estrogênio, apesar de ter havido valor próximo ao estatisticamente significativo para o RP ($p = 0,053$), não houve diferença estatisticamente significativa para o RE ($p = 0,203$).

Quanto aos fatores de proliferação celular, PCNA e Ki-67, não se registrou diferença estatisticamente significativa no grupo que usou estrogênio e progestágeno ($p = 0,121$ e $p = 0,776$ respectivamente), nem no que usou estrogênio isolado ($p = 0,208$ e $p = 0,084$, respectivamente) (tabela 7).

Como todas as probabilidades foram superiores ao nível de significância adotado ($p = 0,05$), deve-se

aceitar a hipótese de que não há diferenças nas variáveis medidas antes e depois do tratamento, não se podendo afirmar que houve proliferação celular estatisticamente significativa. Pode-se, entretanto, perceber que há uma tendência de os escores aumentarem após a realização do tratamento. Os dados sugerem que há uma tendência de maior expressão para o receptor de progesterona (RP) no grupo que fez o tratamento apenas com estrogênio, caso em que a probabilidade estatística se situou apenas ligeiramente acima do limite de significância.

Com a aplicação do teste de McNemar, e adotando-se como nível de significância $p = 0,05$, não se observou aumento na probabilidade de ocorrerem casos positivos após a aplicação dos tratamentos. Percebeu-se, contudo, que houve dois aumentos no percentual de casos positivos, com o tratamento com estrogênio isoladamente, que tangenciaram o limite de significância: o do Ki-67 ($p = 0,063$) e o do RP ($p = 0,053$) (tabelas 5 e 6).

Tabela 6. Comparação dos escores RP e RE antes e após os tratamentos com estrogênio isoladamente ou associado a progestágeno (Teste dos postos com sinal de Wilcoxon).

	Comparação Índice	Ranks	n	P
Estrogênio e Progestágeno	RP (Depois - Antes)	-	2	0,228
		+	5	
	Empates	12		
	RE (Depois - Antes)	-	4	
		+	7	0,326
		Empates	8	
Estrogênio	RP (Depois - Antes)	-	3	0,053*
		+	8	
	Empates	2		
	RE (Depois - Antes)	-	2	
		+	5	0,203
		Empates	6	

P = probabilidade estatística

DISCUSSÃO

É sabido que o estrogênio tem o efeito de promover a proliferação celular nas células epiteliais mamárias, e por isso está envolvido com o desenvolvimento e crescimento do câncer de mama. A maior controvérsia é com relação ao papel da progesterona. Esta, no endométrio, age inibindo a proliferação celular causada pelo estrogênio, diminuindo, assim, o risco de câncer de endométrio (31). No entanto, na mama, a literatura existente com relação à ação da progesterona é conflitante.

São bem documentados os estudos sobre o epitélio mamário normal na fase reprodutiva. Eles evidenciam que, durante a fase lútea, há maior intensidade da atividade proliferativa e metabólica do lóbulo mamário. A divisão celular e a síntese de DNA atingem o máximo em torno do 25º dia do ciclo, coincidindo com o pico de progesterona e com a segunda elevação do estrogênio (10,32-35).

Názario e cols. (36), em estudo sobre o epitélio mamário humano normal nas duas fases do ciclo menstrual, concluíram que o volume nuclear médio e o índice mitótico foram significativamente maiores na fase lútea. Seguindo a mesma linha de pesquisa, outros estudos se desenvolveram. Tarricone Jr. (37), avaliando a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), e Ribeiro (38), a expressão do anticorpo monoclonal MIB-1, também no epitélio mamário normal, obtiveram resultados positivos em ambas as fases do ciclo menstrual, porém significativamente maiores na segunda fase do ciclo, evidenciando maior proliferação nessa fase.

São muito poucos os estudos na pós-menopausa, de forma que se possa ter um entendimento claro das interações entre estrogênio e progesterona, bem como

Tabela 7. Comparação dos escores PCNA e Ki-67 antes e após os tratamentos com estrogênio isoladamente ou associado a progestágeno (Teste dos postos com sinal de Wilcoxon).

	Comparação Índice	Ranks	n	P
Estrogênio e Progestágeno	PCNA (Depois - Antes)	-	4	0,121
		+	14	
	Empates	1		
	Ki-67 (Depois - Antes)	-	7	
		+	7	0,776
		Empates	5	
Estrogênio	PCNA (Depois - Antes)	-	4	0,208
		+	8	
	Empates	1		
	Ki-67 (Depois - Antes)	-	1	
		+	8	0,084
		Empates	4	

P = probabilidade estatística

de sua ação na mama nesse período da vida. Evidências epidemiológicas sugerem que a adição de progestágeno ao estrogênio na TRHM não protege a mama (3). Já outro grupo mostrou que a aplicação tópica de altas doses de progesterona exerce uma ação anti-proliferativa na mama submetida à TRHM com estrogênio (11).

A escassez de estudos sobre os receptores de estrogênio e de progesterona, bem como sobre proliferação celular na mama normal na pós-menopausa, em comparação com os muitos existentes sobre a mama com câncer, se deve, provavelmente, à dificuldade para se obterem amostras de tecidos normais. Muitos autores têm usado amostras recolhidas de mamoplastia redutora ou amostras periféricas a lesões benignas ou malignas, que nem sempre refletem normalidade quando, por vezes, demonstram conteúdo aumentado de RE (14).

Em estudo de 40 pacientes na pós-menopausa, sem TRHM prévia, com o objetivo de determinar a ação do estradiol, deste associado à progesterona e da progesterona isolada, no tecido mamário normal, Foidart e cols. (39) observaram que a administração de progesterona por 14 dias reduziu a proliferação celular induzida pelo estradiol. Este grupo advoga que os baixos índices de PCNA encontrados no grupo que usou TRHM combinando estrogênio e progesterona podem refletir a capacidade da progesterona em manter as células epiteliais na fase G1 do ciclo celular. A progesterona, então, participaria na regulação da proliferação celular das células epiteliais da mama. Sendo assim, a progesterona administrada via percutânea, poderia ter um valor terapêutico, antagonizando os efeitos proliferativos estradiol induzidos, quando aplicados por 14 dias na mama (39).

Cline e cols. (40) estudaram o efeito dos estrogênios conjugados e do acetato de medroxipro-

gesterona (MPA) em macacas, mostrando um aumento da proliferação celular com a adição da MPA, porém não induzida pelo uso de MPA isolado.

Hargreaves e cols. (41) estudaram a proliferação celular, mediada pelo Ki-67, e a expressão do receptor de progesterona (RP) no epitélio mamário normal de mulheres na pós-menopausa, que receberam TRHM com estrogênio isolado e combinado à progesterona. A proliferação celular não apresentou alteração estatisticamente significativa nas pacientes que usaram TRHM ($p = 0,61$). Distintamente, no presente trabalho, houve uma tendência à proliferação celular ($p = 0,063$, no teste de McNemar, próximo do limite de significância estabelecido de 0,05, e $P = 0,084$, no teste de Wilcoxon). Talvez isto possa se dever ao fato de a mama na pós-menopausa ser menos sensível à estimulação estrogênica, ou porque as doses de estradiol administradas na TRHM não sejam suficientes para estimular proliferação celular, embora suficientes para aliviar sintomas e prevenir complicações do hipoestrogenismo.

Com relação à expressão do receptor de progesterona (RP), no estudo acima citado (41) ela foi maior nos dois grupos (que usaram estrogênio isolado, e associado à progesterona – $p = 0,01$), havendo evidências também que a dose do estradiol necessária para regular a expressão do RP seja mais baixa do que a requerida para induzir proliferação na mama humana.

De acordo com a literatura disponível, cuja maioria dos trabalhos foi realizada no período reprodutivo, seria esperado que na mama de mulheres pós-menopausa submetidas à TRHM, os fatores de proliferação celular, tais como o PCNA e o Ki-67, tivessem uma maior expressão do que antes do tratamento. Esperava-se, ainda, maiores índices de proliferação celular nas mulheres submetidas a esquemas terapêuticos associados de estrogênio e progesterona, a exemplo do que ocorreu em alguns estudos, realizados na fase reprodutiva.

Talvez pela forte heterogeneidade existente no tecido mamário haja em nosso trabalho uma grande variabilidade nos escores obtidos antes e após o tratamento nas amostras analisadas. Também com relação à data da coleta, teria sido desejável que a coleta da segunda amostra tivesse sido feita sempre no período de uso do progestágeno, no grupo que o utilizou. Isto, entretanto, não ocorreu por impossibilidade de algumas pacientes comparecerem na data solicitada.

O papel do RE e do RP no câncer de mama é bem estabelecido, sendo eles descritos na literatura como tendo valor prognóstico e terapêutico (42). Já no tecido mamário não patológico, sua importância reside nos fatos seguintes: a) é sabido que o estrogênio

desempenha um papel no câncer de mama, e sua concentração na mama normal talvez possa refletir um risco para o mesmo, o que o torna possível de ser usado como marcador (14); b) a maior expressão de RE, a amplificação do gene que codifica para o RE, ou mutações que ocorrem no gene, podem ser um fator significativo no controle da sensibilidade a hormônios endógenos e exógenos, tais como os esteróides hormonais contidos nos anticoncepcionais e na terapia de reposição hormonal, ambos implicados na promoção do câncer de mama (43).

Existe a possibilidade de atenuação da sensibilidade da proliferação induzida por estradiol, mas não da expressão do RP na mama na pós-menopausa (44). Há evidências de que a expressão do RP seja sensível a baixos níveis de estradiol, enquanto que, para gerar resposta de proliferação celular, níveis mais altos talvez sejam necessários (45). Talvez isto possa explicar a tendência a uma alta expressão do RP no epitélio mamário na pós-menopausa após instituída TRHM com estrogênio em nosso trabalho ($p = 0,063$, no teste de McNemar, e $P = 0,053$, no teste de Wilcoxon), embora tal explicação não se aplique ao que aconteceu com um dos fatores de proliferação estudados, o Ki-67 no grupo que usou estrogênio isolado.

Clarke e cols. (46) observaram que os receptores de progesterona não variam em relação à fase do ciclo, e as células que expressam tais receptores não estão ativamente em proliferação. Em estudo posterior, os mesmos autores também verificaram expressão simultânea dos receptores de progesterona e estrogênio nas mesmas células, ocorrendo também uma dissociação entre os receptores de estrogênios (RE) e as células em proliferação, estando essas duas populações de células, ou seja, as que contêm receptores e as em processo de proliferação, próximas entre si (45). Eles propuseram que, na mama normal, as células RE positivas atuariam como sensores, e que as outras células seriam as efetoras no processo de proliferação, por meio de um efeito parácrino mediado por fatores de crescimento das células receptor-positivas sobre as células receptor-negativas. No presente trabalho, a expressão do RE aumentou após os dois tratamentos, embora tenha sido observada uma tendência de maior aumento no grupo que usou estrogênio associado ao progestágeno.

Em relação aos receptores de progesterona, que não variam em relação à fase do ciclo menstrual normal (46), no estudo aqui realizado eles tiveram maior aumento da expressão após o tratamento com estrogênio, em concordância com o trabalho de Hargreaves e cols. (41), em mulheres menopau-

sadas, onde houve aumento nos dois grupos, que usaram estrogênio isolado e estrogênio associado ao progestágeno.

Com relação aos fatores de proliferação PCNA e Ki-67, observou-se um dado interessante: para os dois marcadores, o número de casos positivos antes do tratamento de reposição hormonal (TRHM) foi grande, o que indica que outros fatores que estimulam a proliferação celular na mama, a exemplo dos fatores de crescimento, hormônio de crescimento, dentre outros, deviam estar ativos.

A observação dos dois marcadores de proliferação (PCNA e Ki-67) permite mostrar a diferença de comportamento entre os mesmos após os tratamentos. Não houve uma tendência uniforme de aumento de proliferação celular, evidenciada por esses dois fatores nos dois grupos estudados. Essa diferença entre os dois fatores de proliferação celular pode decorrer do fato de serem marcadores imonohistoquímicos com características diferentes, com uma mesma finalidade, ou seja, avaliar proliferação celular.

Sabe-se que o PCNA tem meia-vida longa (20 horas aproximadamente), o que resulta na coloração persistente em células que recentemente saíram do ciclo celular (26). Também se sabe que o PCNA pode ser expresso em associação com a reparação de DNA, tendo sido visto inclusive expressado em lóbulos mamários normais adjacentes aos tumores mamários, onde não se espera que as células estejam no ciclo (29). Isso pode representar a influência de fatores de crescimento parácrinos ou autócrinos regulando a estabilidade e expressão do RNAm PCNA, mas sem representação de aumento de síntese de DNA. Alguns estudos de imunofluorescência e outros dados indicam que o PCNA está presente em baixos níveis, porém detectáveis, pelo menos em um número mínimo de células que não estão no ciclo celular (29). Devido a esse fato, no presente estudo, os casos cujos índices de H-score foram menores ou iguais a 10 foram considerados como negativos.

Quanto ao Ki-67, sabe-se que ele tem meia-vida muito curta, de 1 hora ou até menos após a mitose (30), o que garante que células que já saíram do ciclo não apresentem o antígeno. O fato de células em fase G1 precoce, que acabaram de sair de G0, não apresentarem o antígeno faz com que freqüentemente se argumente que a marcação do Ki-67 levaria a alguma subestimação da fração de crescimento de um tecido. De qualquer forma, parece claro que a marcação do Ki-67 resulta numa avaliação bastante aproximada da fração de crescimento de uma população celular. Mesmo uma coloração tênue pode ser considerada

positiva, ou seja, mesmo minimamente marcada, a célula encontra-se no ciclo celular. É possível que essas diferenças entre o Ki-67 e o PCNA expliquem a variação de resposta nos grupos estudados. Há estudos na literatura realizados em tecido mamário patológico que mostram correlação razoável do anticorpo PC10 com o Ki-67 (47); outros estudos, porém, não têm mostrado correlações entre a imunorreatividade do PC10 e Ki-67 (48).

Poder-se-ia dizer que a ocorrência, no presente trabalho, de positividade de índices de proliferação em alguns casos, antes de se instituir a terapia de reposição hormonal, se deva ao fato de que o tecido mamário normal pode proliferar mesmo com baixos níveis de estrogênio e progesterona encontrados na pós-menopausa, em razão da presença de outros estímulos de proliferação celular, que estariam ativos (49-51).

Os trabalhos sobre a influência dos hormônios sobre o tecido mamário humano, a exemplo dos anti-concepcionais orais, são escassos. Apenas dois trabalhos na pós-menopausa com estímulo de TRHM foram encontrados na literatura disponível (39-41), talvez em decorrência de questão ética que dificulta a obtenção de amostras para o estudo. No presente trabalho, por exemplo, sete pacientes não desejaram repetir o procedimento de realização da segunda biópsia por fragmento. Verificou-se que a sensibilidade dolorosa em tal procedimento variou para cada paciente, sendo esse o motivo pelo qual algumas pacientes não desejaram realizar a segunda biópsia. Além disso, o material retirado neste tipo de procedimento é escasso e, algumas vezes, ele não é acompanhado de parênquima mamário, contendo as amostras apenas gordura, sendo este também motivo de perda de casos. Talvez este não seja o método ideal para coleta de material na pós-menopausa, em virtude da substituição gordurosa do parênquima mamário.

Percebe-se uma tendência de aumento da proliferação celular após a estimulação com hormônios na menopausa, seja de forma combinada, seja de forma isolada; no entanto, os resultados aqui obtidos não são estatisticamente significativos para estes fatores de proliferação (tabelas 4 e 5).

A tendência observada à maior proliferação celular no grupo que usou estrogênio sem antagonização progestogênica sugere que, de alguma forma, o progestágeno protegeria a mama contra os efeitos proliferativos dos estrógenos. Seria, portanto, razoável recomendar a terapia combinada inclusive em pacientes hysterectomizadas. Cabe aqui ressaltar que estamos falando de progestágenos sintéticos, a exemplo da medroxiprogesterona, que foi utilizada em nosso traba-

lho. A literatura especializada, entretanto, sugere que a progesterona natural possa ter uma ação semelhante, ou mesmo superior à dos progestágenos sintéticos. Não temos conhecimento de estudo semelhante ao presente com o uso de progesterona natural, o que seria desejável. Novos trabalhos avaliando a cinética celular na mama não patológica submetida à reposição hormonal na pós-menopausa devem ser realizados, a fim de elucidar de forma clara a influência dessa terapia no epitélio da mama normal. São necessários estudos prospectivos com maior número de casos e tempo de seguimento maior para conclusões mais precisas.

CONCLUSÃO

Após a terapia de reposição hormonal feita com os dois esquemas usados (estrogênio e progestágeno combinados e estrogênio isolado), não houve aumento estatisticamente significativo da proliferação celular, medida por meio dos marcadores de proliferação adotados: o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o antígeno nuclear Ki-67.

Também não houve modificação estatisticamente significativa da expressão dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) após o tratamento feito com os dois esquemas utilizados.

Percebemos, contudo, que houve tendência a aumento da positividade dos receptores de progesterona e do Ki-67 no grupo de mulheres que utilizou estrogênio isoladamente, sugerindo que a associação com progestágeno tenha contribuído para menor efeito proliferativo da reposição hormonal agindo como um fator moderador de proliferação celular, suscitando novas questões sobre um possível papel protetor da progesterona no epitélio mamário.

REFERÊNCIAS

1. Daly E, Gray A, Barlow D, McPherson K, Roche M, Vessey M. Measuring the impact of menopausal symptoms on quality of life. *BMJ* 1993;307:836-40.
2. Proceedings of the Canadian Menopause Consensus Conference. *J Soc Obstet Gynaecol Can* 1994;16:4-40.
3. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1995;332:1589-93.
4. Steinberg KK, Thacker SB, Smith SJ, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD, et al. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *JAMA* 1991;265:1985-90.
5. Nachtigall MJ, Smilen SW, Nachtigall RD, Nachtigall RH, Nachtigall LE. Incidence of breast cancer in a 22-year study of women receiving estrogen-progestin replacement therapy. *Obstet Gynecol* 1992;80:827-30.
6. Stanford JL, Weiss NS, Voigt LF, Daling JR, Habel LA, Rossing MA. Combined estrogen and progestin hormone replacement therapy in relation to risk of breast cancer in middle-aged women. *JAMA* 1995;274:137-42.
7. Luca LAD, Zambotti RP, Tobias P, Uemura G, Schmitt FC. Terapêutica de reposição hormonal e câncer de mama. *Rev Bras Mastol* 1998;45-51.
8. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 1990;50:7415-21.
9. Anderson TJ, Ferguson DJ, Raab GM. Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *Br J Cancer* 1982;46:376-82.
10. Potten CS, Watson RJ, Williams GT, Tickle S, Roberts SA, Harris M, et al. The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *Br J Cancer* 1988;58:163-70.
11. Chang KJ, Lee TT, Linares-Cruz G, Fournier S, de Lignieres B. Influences of percutaneous administration of estradiol and progesterone on human breast epithelial cell cycle *in vivo*. *Fertil Steril* 1995;63:785-91.
12. Laidlaw IJ, Clarke RB, Howell A, Owen AW, Potten CS, Anderson E. The proliferation of normal human breast tissue implanted into athymic nude mice is stimulated by estrogen but not progesterone. *Endocrinology* 1995;136:164-71.
13. Schmitt FC, Bento MJ, Amendoeira I. Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. *Diagn Cytopathol* 1995;13:347-51.
14. Ricketts D, Turnbull L, Ryall G, Bakhshi R, Rawson NS, Gazet JC, et al. Estrogen and progesterone receptors in the normal female breast. *Cancer Res* 1991;51:1817-22.
15. Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA 3rd, McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980;46:2884-8.
16. Yoo KY, Tajim K, Muira S, Takeuchi T, Herose K, Risk H, et al. Breast cancer risk factors according to combined estrogen and progesterone receptor status: a case-control analysis. *Am J Epidemiol* 1997;146:307-14.
17. Swanson PE, Dehner LP, Sirgi KE, Wick MR. Cytokeratin immunoreactivity in malignant tumors of bone and soft tissue. A reappraisal of cytokeratin as a reliable marker in diagnostic immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem* 1994;2:103-12.
18. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.

19. Elias JM, Margiotta M, Gaborc D. Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods. **Am J Clin Pathol** 1989;92:62-7.
20. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **J Pathol** 1992;168:357-63.
21. 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.
22. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology** 1990;17:489-503.
23. Olsson H, Jernstrom H, Alm P, Kreipe H, Ingvar C, Jonsson PE, et al. Proliferation of the breast epithelium in relation to menstrual cycle phase, hormonal use, and reproductive factors. **Breast Cancer Res Treat** 1996;40:187-96.
24. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **J Clin Pathol** 1995;48:876-8.
25. Pereira MB, Leitão D, Schmitt FC: Expressão de receptores de estrogênio e progesterona no tecido mamário normal coexistente com carcinomas. **Anais do Congresso Nacional de Técnicos de Anatomia Patológica**. Porto, 1998.
26. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP, et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. **J Pathol** 1991;165:173-8.
27. Mello ES, Alves VAF. Determinação da fração de proliferação celular no carcinoma de mama através da marcação imuno-histoquímica do antígeno nuclear Ki-67: uma comparação dos métodos visuais para avaliação na prática diária. **J Bras Patol** 1998;33(supl.):9.
28. Siegel S. **Estatística não-paramétrica**. São Paulo: Mc Graw Hill do Brasil, 1975.
29. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **J Pathol** 1990;162:285-94.
30. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. **Cell Prolif** 1992;25:31-40.
31. Pike M: Hormonal contraception with LHRH agonists and the prevention of breast and ovarian cancer. In: Mann R, ed. **Oral contraceptives and breast cancer: the implications of the present findings for informed consent and informed choice**. Lancaster: Parthenon Publishing Group, 1990:323-48.
32. 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.
33. Ferguson DJ, Anderson TJ. Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast. **Br J Cancer** 1981;44:177-81.
34. Masters JR, Drife JO, Scarisbrick JJ. Cyclic Variation of DNA synthesis in human breast epithelium. **J Natl Cancer Inst** 1977;58:1263-5.
35. Meyer JS. Cell proliferation in normal human breast ducts, fibroadenomas, and other ductal hyperplasias measured by nuclear labeling with tritiated thymidine. Effects of menstrual phase, age, and oral contraceptive hormones. **Hum Pathol** 1977;8:67-81.
36. Nazario AC, De Lima GR, Simoes 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.
37. Tarricone-Jr V. Expressão do antígeno de proliferação celular (PCNA) no epitélio mamário normal nas fases folicular e lútea [Mestrado]. UNIFESP; 1997.
38. Ribeiro LM: Estudo quantitativo da imunoexpressão do anticorpo monoclonal MIB-1 no epitélio mamário normal nas fases folicular e lútea do ciclo menstrual [Mestrado]. UNIFESP; 1997.
39. Foidart JM, Colin C, Denoo X, Desreux J, Béliard A, Fournier S, et al. Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells. **Fertil Steril** 1998;69:963-9.
40. Cline JM, Soderqvist G, von Schoultz E, Skoog L, von Schoultz B. Effects of conjugated estrogens, medroxyprogesterone acetate, and tamoxifen on the mammary glands of macaques. **Breast Cancer Res Treat** 1998;48:221-9.
41. Hargreaves DF, Knox F, Swindell R, Potten CS, Bundred NJ. Epithelial proliferation and hormone receptor status in the normal post-menopausal breast and the effects of hormone replacement therapy. **Br J Cancer** 1998;78:945-9.
42. Herchenhorn D, Rezende IM, Thuler IC, Maia RC, Medina M, Costa MAD. Quimioterapia neo-adjuvante em câncer de mama localmente avançado: a análise imuno-histoquímica é preditiva da resposta à quimioterapia. **Rev Bras Mastol** 1999;9:92-100.
43. McPherson K, Coope PA. Early oral contraceptive use and breast cancer risk. **Lancet** 1986;1:685-6.
44. Walker KJ, Price-Thomas JM, Candlish W, Nicholson RI. Influence of the antioestrogen tamoxifen on normal breast tissue. **Br J Cancer** 1991;64:764-8.
45. Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. **Cancer Res** 1997;57:4987-91.
46. Clarke RB, Howell A, Anderson E. Estrogen sensitivity of normal human breast tissue *in vivo* and implanted into athymic nude mice: analysis of the relationship between estrogen-induced proliferation and progesterone receptor expression. **Breast Cancer Res Treat** 1997;45:121-33.
47. Dervan PA, Magee HM, Buckley C, Carney DN. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed

- paraffin- embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. **Am J Clin Pathol** 1992;97:S21-8.
48. Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, et al. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. **J Clin Pathol** 1992;45:416-9.
49. Carpenter G, Wahl MI. The epidermal growth factor family. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. **Peptide growth factors and their receptors**. Berlin: Springer Verlag, 1990; 69-133.
50. Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. **Endocr Rev** 1995;16:559-89.
51. Musgrove EA, Sutherland RL. Cell cycle control by steroid hormones. **Semin Cancer Biol** 1994;5:381-9.

Endereço para correspondência:

Lizanka P.F. Marinheiro
Rua Joaquim Nabuco 46/901
22080-030 Rio de Janeiro, RJ
Fax: (21) 2512-1125 / (21) 2247-7794
e.mail: lizanka@centroin.com.br