

ROGÉRIO BIZINOTO FERREIRA

**EFEITOS DA TERAPIA DE CURTO PRAZO COM TAMOXIFENO
NO ÍNDICE MITÓTICO DO EPITÉLIO DO CARCINOMA DE MAMA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim

Co-orientador: Dr. Juarez Antônio de Sousa

SÃO PAULO

2005

Ferreira, Rogério Bizinoto

Efeitos da terapia de curto prazo com tamoxifeno no índice mitótico do epitélio do carcinoma de mama. / Rogério Bizinoto Ferreira --São Paulo, 2005.

vii, 41f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: Effects of short-term therapy with tamoxifen in mitotic index of the breast carcinoma epithelium.

1. Tamoxifeno. 2. Mitose. 3. Neoplasias mamárias.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Lévi-Straus

A **DEUS**, que por meios muitas vezes opostos ao que eu esperava,
guiou meus caminhos até o fim dessa jornada.

À minha querida esposa princesa **BRICE**, pelo
apoio constante e pela paciência inesgotável, motivo de felicidade e alegria,
sentimentos semelhantes mas muito diferentes !!

Aos meus pais, **Willy e Zelma**, irmão e irmã, **Rodrigo e Ludmilla**,
pelo conforto e estímulo, mesmo sabendo que o objetivo a ser
alcançado nos mantinha distantes ainda por mais tempo.

Ao primeiro mestre Dr. **Odair Ferraro**, exemplo maior da união entre
conhecimento abundante e humildade inesgotável, exemplo de
caráter e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. **Luiz Henrique Gebrim**, pela atenção, paciência e exemplo,
como médico, profissional e pessoa. Meu respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. **Cláudio Kemp**, pelos conhecimentos dispensados
em abundância, um dos grandes responsáveis por essa
formação rica e completa.

Agradecimentos

Aos preceptores e amigos do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, em especial Eduardo Camargo Millen, Isabela Braga, Fausto Baracat, Joaquim Teodoro de Araújo Neto, Gilberto Takeda, Luis Augusto Freire Lopes, Carlos Tomé, Alípio Varella e Adair Santana, pela amizade, conhecimento, discussões enriquecedoras e companheirismo nos momentos de serenidade e, principalmente, nas adversidades.

Ao Dr. Juarez Antônio de Sousa pela amizade, pela receptividade nos novos momentos, e principalmente pelo estímulo ao término do objetivo iniciado, quando este parecia distante e sem razão.

Aos colegas de pós-graduação, Amanda Machado, Paulo Higo, Paula Faggion, Marcelo Madeira, Isabela Spironelli, e Dalton Ivan, pela amizade e carinho dispensados durante esses anos de convívio, além da oportunidade do aprendizado constante.

Aos demais assistentes e pós-graduandos da Disciplina de Mastologia do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, Simone Elias, Gil Facina, Jorge Shida, Carlos Tanaka, Célia Regina Sakano, e demais residentes e pós-graduandos pela demonstração de competência e compromisso com as pacientes.

À Josi, enfermeira Aline, Margarida, Rai e Maria José, pela paciência inesgotável e carinho imenso, grandes facilitadoras do nosso trabalho assistencial e científico.

A todas as pacientes do HSPE, UNIFESP-EPM e HMI, razão principal pela nossa busca interminável pelo conhecimento.

Índice

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo.....	10
2. PACIENTES E MÉTODOS.....	11
2.1 Pacientes.....	12
2.2 Método Histopatológico.....	12
2.3 Contagem de Mitoses.....	13
2.4 Método Estatístico.....	15
3. RESULTADOS.....	16
4. DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	25
6. ANEXOS.....	27
7. REFERÊNCIAS.....	33
Abstract	

Resumo

Introdução: O tamoxifeno é a mais importante droga utilizada na hormonioterapia do carcinoma de mama. Parece atuar como citostático e pouco se sabe a respeito da proliferação celular após curta exposição ao fármaco. **Objetivo:** Avaliar o efeito da terapia em curto prazo com tamoxifeno na proliferação celular do epitélio do carcinoma de mama, medida pelo índice mitótico. **Pacientes e Métodos:** Estudo prospectivo, em 20 pacientes com carcinoma invasivo de mama, com receptores positivos de estradiol e/ou de progesterona. Foi realizada, em todas as pacientes, biópsia incisional diagnóstica. Em seguida, nos dois dias que antecederam a cirurgia (mastectomia ou quadrantectomia), foram administradas 20 mg/dia de tamoxifeno. Colheu-se outro fragmento do tumor. O material foi fixado em formol tamponado a 10% e corado pela hematoxilina-eosina (HE) para contagem do índice mitótico. Para o estudo quantitativo foram utilizadas fotos digitalizadas em microcomputador em HE (400X), em sistema Windows 98, pelo programa Image-lab 2000[®]. Os resultados foram comparados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. **Resultados:** Após dois dias de tratamento com tamoxifeno houve redução na proliferação celular de 16 dos 20 tumores. O número médio de mitoses foi 11 no Grupo 1 (pré-tratamento) e 7,15 no Grupo 2 (pós-tratamento). A análise estatística revelou significância ($p < 0,001$). **Conclusão:** O tamoxifeno administrado precocemente e por curto período de tempo (2 dias) promoveu diminuição significativa no número de mitoses no epitélio de pacientes com carcinoma de mama. A precoce redução do índice mitótico pode ser um marcador de resposta à terapêutica hormonal primária nas pacientes com carcinoma de mama receptor positivo.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma da mama é a neoplasia maligna mais freqüente dentre todas que acometem mulheres americanas, havendo 212.118 novos casos esperados para 2005, correspondendo a quase 1 entre 3 casos de câncer diagnosticados. Além disso, é a segunda causa de morte nas mulheres dos EUA, havendo 41.250 óbitos previstos para 2005. No Brasil, para este mesmo ano, há a expectativa de 49.470 novos casos (INCA - Ministério da Saúde, 2005), o que coloca o carcinoma de mama como o responsável pelo maior número de mortes por câncer em mulheres no país. Observou-se um aumento considerável da taxa de mortalidade por câncer de mama entre as mulheres, de 1979 a 1999, passando de 5,77/100.000 a 9,75/100.000, correspondendo a uma variação percentual relativa de 69%. A sua incidência vem aumentando praticamente em todo o mundo, o que mobiliza diversos países a realizarem programas de rastreamento e detecção precoce, visando à redução da sua morbimortalidade. Esses programas mostram redução que chega a 25-30% na taxa de mortalidade em mulheres acima dos 50 anos (ACSW, 1993; Fletcher, 1997).

A cinética do lóbulo mamário vem sendo muito estudada, uma vez que possíveis alterações gênicas ligadas à perda da função reguladora dos processos de mitose e apoptose seriam responsáveis tanto pelo desenvolvimento de doenças benignas e quanto pelo câncer. Considerando-se os estrogênios como os principais responsáveis pelo estímulo da divisão celular no epitélio mamário, vêm sendo realizados vários estudos com o interesse de verificar os efeitos das drogas antagonistas deste hormônio (Quadros, 1996).

As substâncias antiestrogênicas começaram a ser utilizadas no tratamento do carcinoma de mama na década de 50. Desde então, foram se aperfeiçoando várias substâncias, minimizando os seus efeitos colaterais e mantendo a sua eficácia (Furr, Jordan, 1984; Higa, 1994).

Agente antiestrogênico não esteróide, o tamoxifeno, foi introduzido na década de 70 com finalidade contraceptiva e, posteriormente, como indutor da ovulação. A baixa toxicidade e sua atividade antiproliferativa nos tumores de mulheres pós-menopausadas fizeram com que fosse usado para o tratamento do câncer avançado de mama e, logo após, na terapia adjuvante nos estádios iniciais (Furr e Jordan, 1984).

Durante um período de 10 anos, mulheres com carcinoma de mama foram acompanhadas em diversos estudos que comprovaram haver redução significativa da taxa de mortalidade e de recidivas, propiciado pelo tratamento adjuvante com tamoxifeno, especialmente em mulheres na pós-menopausa com tumores ricos em receptores estrogênicos (EBCTCG – *Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group*, 1992).

O tamoxifeno, fórmula química $C_{26}H_{29}NO_7$, é um isômero trans, derivado trifeniletilênico, classificado como modulador seletivo de receptor estrogênico (SERM) do tipo I. Possui ação mista, estrogênica e antiestrogênica (Osborne et al, 2000; Jordan et al, 2001). Seus efeitos são dose e tempo dependentes, reversíveis com a interrupção da medicação e em geral bem tolerados (Jaiyesimi et al, 1995). Administrado por via oral como sal citrato, apresenta pico de concentração sérica após 4 a 7 horas (20mg). Metabolizado pela ação da P450 no fígado, tem meia vida longa de 14 dias, sendo eliminado principalmente por via fecal, havendo expressiva reabsorção da droga pela circulação êntero-hepática, o que explicaria o tempo de meia vida longo. De fato, pode ser detectado no tecido mamário até cinco meses após a sua administração (Furr, Jordan, 1984; Jordan, 1996).

O metabólito 4-hidroxitamoxifeno é um antiestrogênico muito ativo ligando-se com alta afinidade ao receptor estrogênico, inibindo a cornificação vaginal em doses aproximadamente 25 vezes menores que a do tamoxifeno, sendo mais persistente no receptor estrogênico do que este último. Embora este metabólito seja muito ativo, sua concentração sérica e tecidual equivalem a 2% da do tamoxifeno. O n-desmetiltamoxifeno é o mais abundante, tanto no plasma como nos tecidos e sua concentração excede a do tamoxifeno em duas vezes e meia, enquanto o metabólito α -hidroxitamoxifeno geralmente é inativo e ávido por se ligar ao DNA (Daniel et al, 1981; Gallo e Kaufman, 1997).

Utilizado no tratamento adjuvante do carcinoma de mama há mais de 20 anos, o tamoxifeno é, em geral, bem tolerado; menos de 5% das usuárias de 20 mg/dia da droga referem efeitos como fogachos, leucorréia, edema, ganho de peso, nervosismo, depressão, intolerância gástrica, prurido genital e, no menacme, cistos ovarianos, irregularidade menstrual e até amenorréia (Powles et al, 1994; Jaiyesimi et al, 1995).

Outras manifestações menos frequentes, mas de grande importância, ocorrem sobretudo em mulheres acima dos 50 anos, como as oftalmológicas (retinopatias, catarata), endometriais (pólipos, hiperplasias e câncer), fenômenos tromboembólicos (trombose venosa profunda, embolia pulmonar) e alterações hepáticas (elevação de transaminases e esteatose) (Fisher et al, 1996; 1998; Robinson et al, 1996). A atrofia cística, levando ao espessamento endometrial, visto pela ultra-sonografia transvaginal, pode ser encontrada com frequência (Gerber et al, 2000).

Estudos iniciais evidenciam alterações genéticas cromossômicas em pacientes medicadas, por longo tempo, com tamoxifeno. Foram encontradas aneuploidias, mitoses atípicas e outras alterações cromossômicas no fígado de ratos expostos à droga (Busch, 1997; Gelmann, 1997).

No menacme, o tamoxifeno estimula os receptores beta das células da granulosa no ovário, potencializando a esteroidogênese e elevando os níveis de estrogênio e de progesterona. Aumenta, ainda, a concentração da globulina carregadora de hormônios sexuais (SHBG) devido à ação hepática, diminui a fração livre de estrogênios, o que reforçaria a ação antiestrogênica. E, por fim, não altera significativamente a secreção das gonadotrofinas (Kuiper et al, 1997; Bernardes Jr et al, 1999; Gebrim, 1999; Sousa, 1999).

Apresenta efeito antagonista na mama e no centro termo-regulador do hipotálamo. É agonista no esqueleto, onde preserva ou até aumenta a densidade mineral óssea principalmente na coluna lombar após a menopausa. Tem ação agonista no sistema cardiovascular, diminui ainda os níveis séricos da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e do colesterol, em 19% e 13%, respectivamente (Love et al, 1992; Powles et al, 1994; MacGregor, Jordan 1998).

O mecanismo de ação do tamoxifeno é múltiplo e complexo, predominando a ação local sobre a glândula mamária mediada por receptores estrogênicos. Sua semelhança estrutural permite a captação e a ligação aos receptores intracelulares, competindo com os hormônios endógenos na ligação tanto com o receptor como com o elemento de resposta estrogênica (após a formação do complexo tamoxifeno-receptor), atuando, portanto, como agonista parcial (Howell, 1996; Quadros, 1997).

Existem vários tipos de receptores de estrogênio, sendo os mais conhecidos o alfa (α) e o beta (β), que apresentam características funcionais homólogas quanto à ligação com o estrogênio e estrutura molecular semelhante, principalmente nos domínios C e E (Tzukerman et al, 1994; Howell, 1996; Kuiper et al, 1996; Mosselman et al, 1996; Levenson e Jordan, 1999).

O receptor α (Figura 1) está presente tanto no epitélio quanto no estroma e predomina, em número, na fase folicular do ciclo menstrual. É uma proteína de 595 aminoácidos com peso molecular de 66 Kd e tem seis domínios denominados A, B, C, D, E e F, com diferentes funções (Green et al, 1986; Kumar e Tindall, 1998; MacGregor e Jordan, 1998).

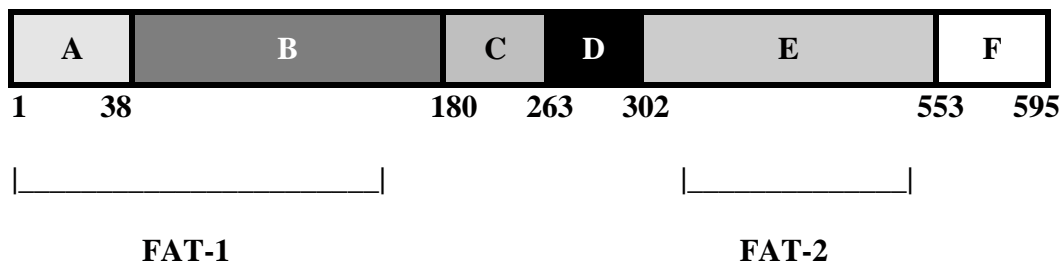


Figura 1 - Domínios do receptor de estrogênio α (MacGregor e Jordan, 1998).

O receptor β (Figura 2) é composto por 485 aminoácidos com peso molecular de 54,2 Kd (Kuiper et al, 1996; Katzenellenbogen et al, 2000; MacGregor e Jordan, 1998).

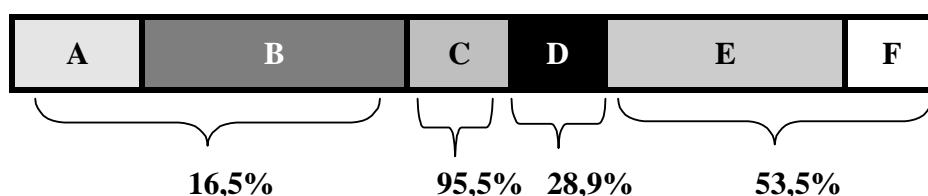


Figura 2 – Semelhança entre os domínios dos RE α e β (MacGregor, Jordan, 1998).

Os domínios A e B localizam-se na região aminoterminal e são responsáveis pelo primeiro fator da transcrição (TAF-1), que seria hormônio

independente. Contudo, sua ativação parece depender da capacidade de fosforilação do receptor da proteína ativadora. Na região carboxil, localizam-se os domínios E e F, sendo o primeiro responsável pelo segundo fator ativador da transcrição (TAF-2), que é hormônio dependente, também conhecido como “hormone binding domain” (HBD) (Levenson e Jordan, 1999).

O domínio F não é essencial para a ligação hormonal ou para a transcrição, mas pode interferir no efeito farmacológico dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (função agonista, antagonista ou resistência) (Howell, 1996; Osborne, 1998).

Um terceiro fator ativador da transcrição, localizado no início do domínio E, conhecido como TAF-2a, tem significado ainda indeterminado (Osborne, 1998).

O domínio C, também designado de “DNA binding domain” (DBD), contém os elementos de resposta estrogênica (ERE), os quais se ligam aos genes promotores do DNA. O domínio D funciona como “dobradiça”, podendo ser alterado sem afetar a ativação da transcrição (Howell, 1996; Levenson e Jordan, 1999).

Além do mecanismo de ação direta, via receptor, MacGregor e Jordan (1998) descrevem a ação dos estrogênios em estimular a ativação dos fatores de crescimento “transforming growth factor α ” (TGF- α) e “insuline like growth factor” (IGLF) os quais são reconhecidamente estimuladores do crescimento celular na presença deste esteróide. Contrariamente, o TGF- β (“transforming growth factor β ”) produz diferenciação celular e/ou inibição do crescimento tumoral (MacGregor e Jordan, 1998).

O tamoxifeno tem efeito direto sobre a produção de TGF- β em células de câncer de mama (Knabbe et al, 1996; MacGregor e Jordan, 1998)

Butta et al (1992), demonstraram que o tamoxifeno eleva a produção de TGF- β em fibroblastos cultivados e existe um aumento de TGF- β estromal em fragmentos de tumores mamários tratados com tamoxifeno. A observação de que o tamoxifeno reduz a produção de TGF- α e eleva a de TGF- β em tumores RE positivos, representa um mosaico fascinante da comunicação celular no complexo mecanismo de regulação local do crescimento celular mediados por apoptose e mitose (Noguchi et al, 1993; Jordan, 1994).

Outra ação reconhecida é a inibição das proteínas quinases e calmodulina (proteína reguladora que ativa o mecanismo do cálcio como segundo mensageiro à resposta hormonal na proliferação celular), que estimulam a proliferação celular no carcinoma de mama (Gulino et al, 1986; Edwards et al, 1992; Colletta et al, 1994).

A base molecular da carcinogênese pode ser explicada, entre outros fatores, pela perda do controle normal da proliferação celular. Assim, a detecção e a quantificação das células em mitose representa importante marcador biológico do comportamento dos tecidos neoplásicos (Osborne, 1999; Chein, 2001).

O ciclo celular apresenta duas complexas etapas: uma caracterizada pela mitose-citocinese e, outra, pelo intervalo entre duas mitoses sucessivas, denominada de interfase, onde se observa duplicação do material nuclear. Esta fase pode ser subdividida em G1 (Gap), S (síntese) e G2 (Chein, 2001).

Antes do estímulo para a divisão celular, as células diplóides (2N) permanecem na fase G0, consideradas como quiescentes (repouso funcional), efetuando apenas funções fisiológicas, sendo os núcleos pequenos e a cromatina condensada. Na fase G1, a célula cresce a partir da síntese de RNA e de proteínas; o núcleo e o citoplasma tornam-se progressivamente volumosos, em resposta a estímulos liberados por receptores mediados pelos fatores de crescimento. Seu tempo é variável, sendo inversamente proporcional à atividade proliferativa. Na fase S, o núcleo duplica seu volume e o DNA. Na fase G2, com duração aproximada de quatro horas, o núcleo mantém a síntese de RNA. Em seguida, se inicia a mitose onde o núcleo aumenta e depois se fragmenta pela separação dos cromossomos, durante uma ou duas horas (Junqueira e Carneiro, 1997).

O ciclo celular é influenciado por diversas substâncias, principalmente os fatores de crescimento, atuando em sinergismo, e as quinases dependentes das ciclinas. Essas são proteínas sintetizadas progressivamente durante o ciclo, formando os complexos (CDK/ciclinas) que possibilitam a progressão do ciclo com capacidade de reparar possíveis erros decorrentes da síntese ou da divisão celular (Agami e Bernards, 2000).

A ação antiproliferativa do tamoxifeno foi bem estudada, tanto “*in-vivo*” quanto em modelos experimentais. Tendo ação inibitória direta nas células em cultura de carcinoma de mama, causando marcada redução dos índices de proliferação celular, notadamente da fração de células em fase S e, conseqüentemente, acúmulo na fase G0/G1 (Lippman et al, 1976; Osborne et al, 1983; Sutherland et al, 1983; Taylor et al, 1983; Sutherland et al, 1987; Fernando et al, 1994; Jannink et al, 1996; Cameron et al, 2001). Descreveu-se que esse efeito nas células em cultura seria pleno após mais de um ciclo de divisão celular, ou seja, em um período que varia de 72 a 96h (Osborne et al, 1983).

A terapêutica neoadjuvante sistêmica (químio ou hormonioterapia) é muito utilizada no tratamento de pacientes com carcinoma primário da mama. Estudos têm demonstrado que a neoadjuvância consegue não só uma regressão importante no diâmetro dos tumores primários, permitindo maior número de cirurgias conservadoras, como também possibilita avaliar a resposta clínica após um período de três meses. Em cerca de 15% das pacientes, há progressão do tumor apesar do tratamento, por resistência à droga. Seria importante identificar um marcador de resposta que pudesse prever desde o início da terapêutica, que tipo de resposta obter-se-ia, permitindo avaliar a especificidade terapêutica logo no início do tratamento, contribuindo para melhorar a sobrevida das pacientes (Makris et al, 1997; Cameron et al, 2000; Dixon et al, 2002).

Apesar de todos os estudos que procuraram avaliar a ação antiproliferativa do tamoxifeno no carcinoma de mama, não se sabe ainda qual o tempo mínimo necessário para mensurar esta ação *in vivo*, como também não se descreveu um método de avaliação de resposta naquela paciente com tumor receptor-estrogênico positivo, que utilizará o tamoxifeno na adjuvância.

Morena et al (2004) observaram redução no volume celular, menor condensação cromatínica e aumento do fator de crescimento beta-1 e de corpúsculos apoptóticos em tumores com receptores positivos após dois dias de tratamento com tamoxifeno.

Tanaka (2004) estudou, quantitativamente, os corpúsculos apoptóticos e a positividade do Bcl-2 nos tumores receptores positivos de mulheres tratadas durante dois e 14 dias com tamoxifeno. Registrou aumento do número de corpúsculos, o que não ocorreu com a positividade do Bcl-2.

Millen (2004) comprovou, neste material de estudo, resultados semelhantes ao de Tanaka (2004), ou seja, incremento do número de corpúsculos apoptóticos após dois dias de tratamento com tamoxifeno.

Ao comparar a positividade dos receptores de estradiol e de progesterona no epitélio da neoplasia, Uehara (2005) não observou variação significativa nos dois primeiros dias de tratamento, mas sim após 14 dias. Tais resultados seriam decorrentes do efeito parácrino do fator de crescimento beta 1 ou pela ativação dos receptores beta de estradiol.

Assim, em virtude dos dados da literatura ainda não conclusivos, propusemo-nos a realizar o presente estudo.

1.1 Objetivo

Quantificar, pela microscopia de luz, o índice mitótico no carcinoma primário de mama, antes e após o tratamento com 20mg de tamoxifeno durante dois dias.

2. PACIENTES E MÉTODOS

2.1 Pacientes

Foram selecionadas pacientes atendidas pela Disciplina de Mastologia do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), no período de fevereiro de 2000 a outubro de 2001. Todas apresentavam diagnóstico clínico, radiológico e comprovação citológica de carcinoma mamário. Após comprovação citológica de carcinoma, realizou-se biópsia incisional do tumor, obtendo-se pequeno fragmento para o estudo histopatológico. Foram excluídas gestantes, lactantes, usuárias de medicação hormonal há até 12 meses, bem como as pacientes com tumores negativos para receptores de estrogênio e/ou de progesterona.

Dois dias antes da cirurgia para o tratamento do carcinoma de mama, mastectomia ou quadrantectomia, foram administradas 20mg de tamoxifeno, repetindo-se a mesma dosagem no dia seguinte. Durante a cirurgia, colheu-se, para o estudo, novo fragmento do tumor na porção oposta à primeira biópsia.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética Médica desta UNIFESP-EPM, sob nº CEP 1001/02. Todas as pacientes foram previamente informadas da realização da pesquisa e assinaram termo de consentimento de participação (Anexos 1 e 2).

2.2 Método Histopatológico

Os fragmentos de tumores obtidos foram fixados em formol tamponado a 10%, com pH de 7,3, e em seguida incluídos em blocos de parafina. Os blocos foram seccionados com espessura de 4 micrômetros e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Iniciou-se o estudo quantitativo em áreas de maior celularidade, aleatorizando-se os campos posteriores, até totalizar o mínimo de 1000 células.

2.3 Contagem de mitoses

Para a identificação das mitoses baseou-se em suas características morfológicas: ausência de membrana nuclear; cromossomos condensados e/ou agregados; citoplasma maior, entre outros (Jannink et al, 1996; Mommers et al, 1999). Para o estudo quantitativo foram utilizadas fotos digitalizadas em microcomputador pelo programa Image-lab 2000[®] em ambiente Windows 98 do laboratório de Ginecologia Molecular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM. O sistema consiste de um microscópio ZEISS série n° 34729, acoplado a uma videocâmera colorida digital Sony, modelo SSC-DC54, que transmite a imagem a um microcomputador Pentium II, equipado com placa digitadora, com o software Image-lab 2000[®]. A celularidade foi avaliada com uma objetiva de 40x (quarenta vezes), com aumento final de 400x (quatrocentas vezes), contando-se no mínimo 1000 células de cada lâmina (pré e pós-tratamento) e, dentre estas, foram identificadas as figuras de mitose. O índice mitótico foi expresso como o número de células em mitose dividido por 1000 células.

A seguir, exemplo de campo microscópico com várias figuras de mitose com as características citadas acima (Figura 3) e um segundo campo, após a utilização do tamoxifeno, com apenas uma mitose (Figura 4).

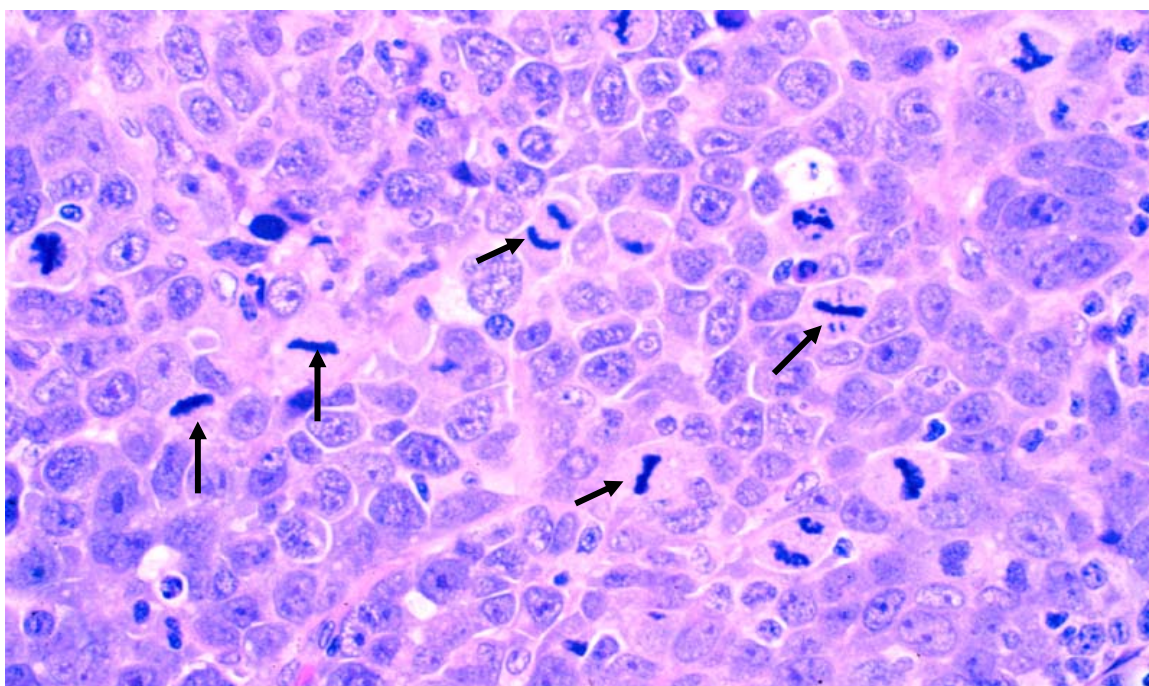


Figura 3 – Fotomicrografia de carcinoma de mama (paciente 1) pré-tratamento, com várias figuras de mitose (setas) (HE x 400).

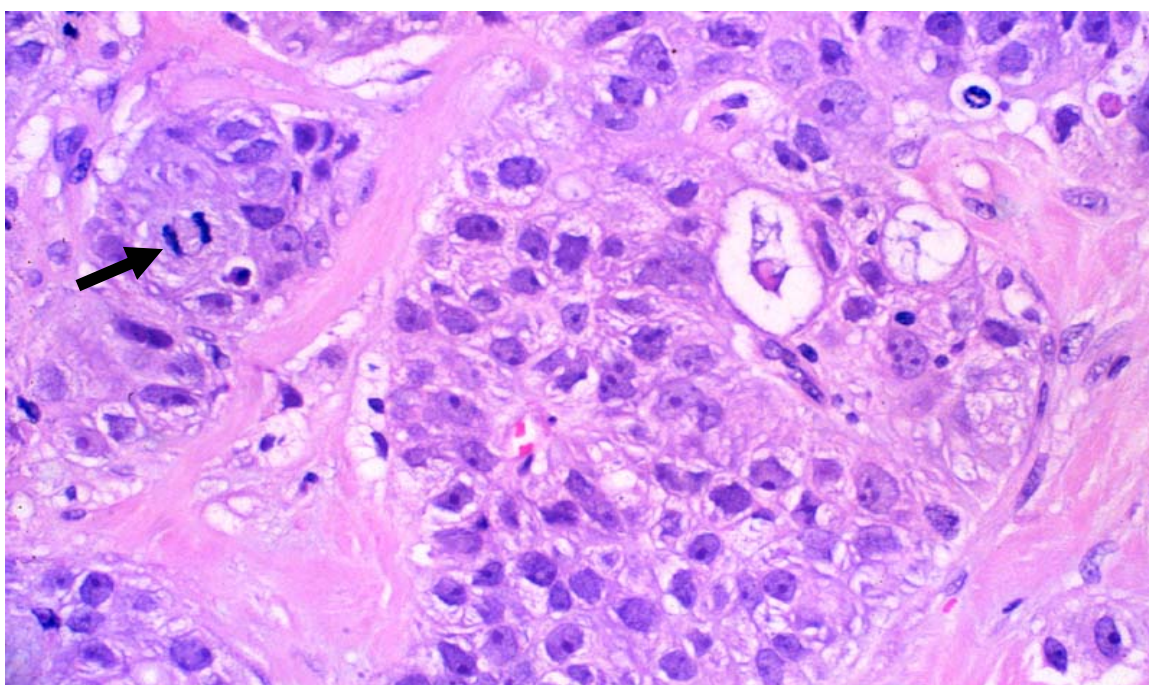


Figura 4 – Fotomicrografia de carcinoma de mama (paciente 19) pós-tratamento, com 1 figura de mitose (seta) (HE x 400).

2.4 Método Estatístico

Para análise estatística foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon para a medida da variação do índice mitótico entre os grupos.

As probabilidades de significância (valor-p) apresentadas tiveram valores menores que 0.05 considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

Na Tabela 1 observa-se o número de figuras de mitose (M) no Grupo I (pré-tratamento), que variou de 2 a 35 / 1000 células, sendo a média do índice mitótico de 11,1.

Tabela 1 – Número de figuras de mitose nos tumores das pacientes do grupo I (pré-tratamento)

Paciente	RG	Idade (anos)	M
1	1072705	44	35
2	1106211	74	08
3	1061730	65	11
4	1059880	40	17
5	1067691	85	06
6	1059918	57	11
7	1073842	54	09
8	1146313	49	12
9	672085	40	03
10	1060461	53	03
11	1181020	68	11
12	1186517	30	04
13	1184650	61	02
14	1127205	74	16
15	1162422	73	12
16	1153739	48	17
17	771469	66	17
18	1202623	44	12
19	1034041	49	10
20	1109498	78	06
Média		57,6	11,1
Erro Padrão			1,6

N= 20 pacientes

M = Figuras de mitose em 1000 células

Na Tabela 2 observa-se o número de figuras de mitose (M) no Grupo II (pós-tratamento), que variou de 2 a 30 / 1000 células, sendo a média do índice mitótico de 7,15.

Tabela 2 – Número de figuras de mitose nos tumores das pacientes do grupo II (pós-tratamento)

Paciente	RG	Idade (anos)	M
1	1072705	44	30
2	1106211	74	04
3	1061730	65	04
4	1059880	40	05
5	1067691	85	05
6	1059918	57	05
7	1073842	54	08
8	1146313	49	11
9	672085	40	02
10	1060461	53	04
11	1181020	68	05
12	1186517	30	03
13	1184650	61	04
14	1127205	74	05
15	1162422	73	08
16	1153739	48	17
17	771469	66	04
18	1202623	44	09
19	1034041	49	03
20	1109498	78	07
Média		57,6	7,15
Erro Padrão			1,43

N= 20 pacientes

M = Figuras de mitose em 1000 células

Utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon para comparar os índices pré e pós, concluímos que houve redução do índice mitótico ($p < 0,001$).

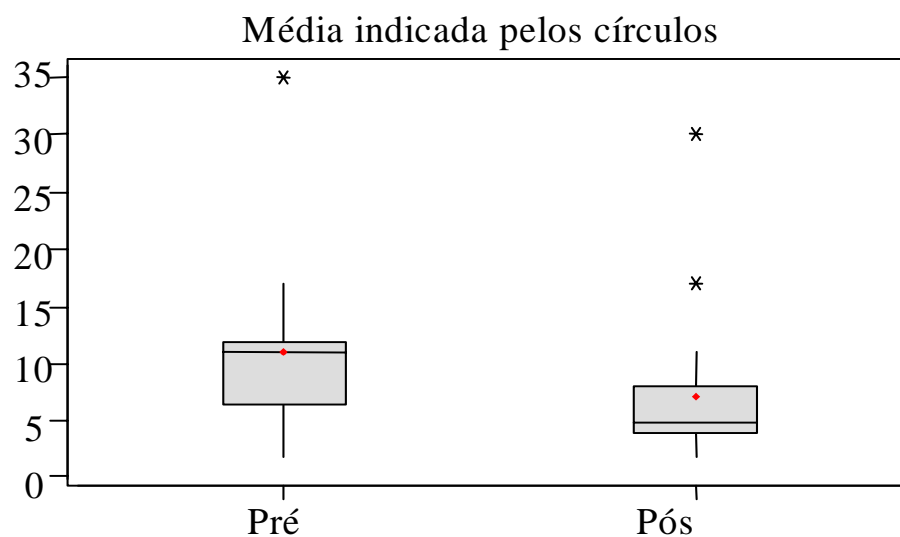


Figura 5 – Box-plot do número de figuras de mitose para cada grupo estudado.

4. DISCUSSÃO

Nossa pesquisa foi fundamentada na tendência atual de se avaliar os biomarcadores como preditivos de resposta terapêutica sistêmica, com intuito de se obter a especificidade das drogas, identificando precocemente se há ou não resistência à droga (Powles, 1997).

Com o surgimento de novos fármacos para a hormonioterapia do carcinoma de mama, há crescente interesse em avaliar a resposta terapêutica neoadjuvante (pré-operatória ou primária) com o objetivo de aquilatar a resposta celular *in-vivo*, permitindo não só reduzir a radicalidade da cirurgia mas, principalmente, analisar a eficácia no tratamento de possíveis micrometástases, possibilitando a interrupção ou a troca da medicação nos casos de resistência (Bonadonna et al, 1990; Fisher et al, 1998).

Sabe-se que a resposta à terapia hormonal oscila entre 50 a 60% nos tumores positivos para receptores de estrogênio, chegando a 70-80% quando ambos os receptores são positivos. Além disso, por mecanismos ainda não completamente conhecidos, 10% dos tumores receptores negativos, respondem ao tamoxifeno. Sendo assim, seria importante saber, por meio de um biomarcador celular, quais as pacientes receptores-positivo que responderiam melhor e por período prolongado de tempo ao tamoxifeno.

Observando nossa casuística, 17(85%) das pacientes tiveram diminuição das figuras de mitose, sendo 11(55%) com resposta mais intensa e 6(30%) com resposta pouco evidente. Apenas 3(15%) pacientes não responderam ao tamoxifeno.

Jordan (1994) sugere que a interação entre os fatores de crescimento estrogênio-dependentes seria um dos possíveis mecanismos de inibição da proliferação celular, tanto em tumores RE positivos como negativos. Observa-se a inibição de TGF- α e estímulo à produção de TGF- β . Em cultura de células RE positivas, a ativação de TGF- β ocorreria através de alça autócrina, enquanto em cultura de células RE negativas é possível que esse fator possa exercer função parácrina, regulando a proliferação adjacente às células de câncer de mama RE negativas (Arteaga et al, 1988; Robinson e Jordan, 1989).

Os estudos com propósito semelhante ao nosso, foram baseados em cultura de células e o efeito antiproliferativo do tamoxifeno nessas células

seria pleno após mais de uma passagem completa da célula pelo ciclo de divisão, período este que varia entre 72 e 96h, maior que o de nosso estudo (Osborne, 1983).

Nossos achados demonstraram duas características importantes na terapia de curto período com o tamoxifeno. Pudemos observar que o período de 48 horas foi suficiente para se identificar o efeito celular antiestrogênico do fármaco, pela redução no número de mitoses. Esse dado demonstra que o ciclo de divisão celular na grande parte dos carcinomas estudados foi menor que o descrito por Osborne em 1983. Restaria saber se essa resposta seria persistente em longo prazo para aqueles tumores com menor velocidade de divisão celular e, assim, poder estabelecer uma relação entre a preditividade da resposta terapêutica.

A contagem das figuras de mitose é método simples, que utiliza lâminas com coloração habitual, ou seja, hematoxilina-eosina, e tem menor custo que os demais métodos de avaliação da proliferação celular.

Resultados semelhantes aos nossos foram observados em tecido mamário humano não neoplásico, adjacente a fibroadenomas, em mulheres tratadas com tamoxifeno por período variável entre 10 e 22 dias, utilizando-se a mesma técnica histológica (Quadros, 1996; Uehara et al, 1998; Chein, 2001).

Se o método já se revelou sensível o suficiente para identificar os diferentes graus de resposta, não justificaria utilizar métodos mais sofisticados e específicos para avaliar a proliferação celular, como o índice de ligação à timidina, a citometria digital computadorizada e a determinação de marcadores de fase S como MIB1 e Ki67 (Hedley et al, 1993; Rose et al, 1994). Optou-se pela medida do índice mitótico pela paucidade de dados na literatura e por ser um método de menor custo. Não se justificaria, assim, iniciar com um método mais sofisticado sem antes auferi-lo.

Tanaka (2004) e Millen (2004) observaram, nesse mesmo material, aumento de corpúsculos apoptóticos no epitélio neoplásico, usando a técnica de coloração por HE. Tanaka (2004) encontrou melhor sensibilidade de resposta na contagem desses corpúsculos do que a imuno-reatividade de células epiteliais com o antígeno Bcl-2.

Morena et al (2004), por sua vez, demonstraram redução no volume celular, menor condensação cromatínica e aumento do fator de crescimento beta-1 e de corpúsculos apoptóticos nos tumores receptores positivos após dois dias de tratamento com tamoxifeno.

Ao comparar a variação da positividade dos receptores de estradiol e de progesterona no epitélio da neoplasia, Uehara (2005) não registrou variação significativa nos dois primeiros dias de tratamento. Entretanto, encontrou significativa redução na sua positividade após terapêutica mais prolongada, ou seja, 14 dias.

Tais resultados poderiam ser explicados pela ativação dos receptores beta de estradiol que, por via parácrina, aumentariam o fator de crescimento beta-1 ou reduziriam o fator alfa.

De acordo com os dados obtidos com os biomarcadores, comparando-se a resposta do tumor primário à administração por curto período desse antiestrogênio, poderíamos melhor conhecer, numa fase inicial, ou seja, período pré-operatório, as pacientes que, apesar da positividade de receptores estrogênicos, provavelmente não se beneficiarão com o tamoxifeno. Além disso, poderemos modificar precocemente o tratamento hormonal adjuvante.

Se o índice mitótico for também um marcador preditivo de resposta clínica, é possível que outros marcadores de proliferação que necessitam de técnicas mais complexas e onerosas acrescentem pouco ao método por nós estudado.

Nossos dados fundamentam um modelo para futuras pesquisas, com outras formas de endocrinoterapia, como os inibidores da aromatase, onde, com o auxílio de um biomarcador ideal que seja preditivo da resposta endócrina, poderíamos iniciar precocemente a terapêutica específica, sem a necessidade de se aguardar três ou mais meses para avaliar a resposta clínica. Isto permitirá individualizar precocemente a terapêutica das pacientes com carcinoma de mama, como também trazer resultados favoráveis na redução da mortalidade por essa doença.

5. CONCLUSÃO

O tamoxifeno reduziu significativamente o índice mitótico do epitélio mamário de pacientes com carcinoma, tratadas durante dois dias.

ANEXO 1

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 14 de novembro de 2002.
CEP 1001/02

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ROGÉRIO BIZINOTO FERREIRA
Disciplina/Departamento: Mastologia/Ginecologia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Efeitos da terapia a curto prazo com tamoxifeno no índice mitótico do epitélio do carcinoma de mama".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **13/maio/2003**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **09/novembro/2003**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

ANEXO 2

Informações sobre o objetivo da pesquisa

O câncer de mama é um tumor muito freqüente entre as mulheres na atualidade.

Há mais de trinta anos o Tamoxifeno vem sendo utilizado no tratamento desta doença com bons resultados. A segurança da medicação em questão e os seus efeitos colaterais pouco expressivos vêm estimulando os pesquisadores a estudar melhor a sua atividade tanto em doenças benignas como no próprio câncer.

Existem ainda várias coisas a serem descobertas a respeito da correlação do uso do Tamoxifeno e seus efeitos sobre o câncer de mama.

É nesta etapa que você pode nos ajudar a desvendar alguns dados importantes sobre o tratamento e até prevenção desta doença de grande importância nos dias atuais.

O objetivo deste estudo é avaliar se já existe interferência no crescimento (índice mitótico) do tumor dois dias após o início da terapêutica com o Tamoxifeno.

Procedimentos

O diagnóstico do câncer de mama será feito através de biópsia (pequena cirurgia para retirada de um fragmento do tumor). Parte desta biópsia será utilizada neste trabalho. Lembramos que a biópsia é o método habitualmente realizado para a confirmação do diagnóstico da doença. Desta forma, você não estará sendo submetida a um desconforto que já não estivesse previsto anteriormente.

Uma vez confirmado o diagnóstico de câncer de mama, será planejado o seu tratamento. Esta etapa independe de você estar ou não participando da pesquisa. Dois dias antes da cirurgia será administrado o medicamento Tamoxifeno (um comprimido de 10mg por dia).

A data da cirurgia vai variar de uma a três semanas de acordo com o tempo de realização dos exames pré-operatórios e a disponibilidade do Centro Cirúrgico do Hospital São Paulo.

Vale ressaltar que nenhuma paciente terá a sua cirurgia postergada em função do estudo e o medicamento será fornecido gratuitamente, sem necessidade de espera da liberação pelo SUS que às vezes demora até 60 dias.

Riscos e Desconforto

Não existem medicamentos isentos de efeitos colaterais. Todas as precauções serão tomadas para garantir que estes, caso ocorram, sejam tratados imediatamente.

O Tamoxifeno é um medicamento amplamente utilizado e sua grande contra-indicação é o antecedente de embolia ou flebites. A grande maioria das pacientes com câncer de mama é tratada com o remédio após a cirurgia. Alguns desconfortos são razoavelmente previsíveis ao uso do Tamoxifeno: fogachos (ondas de calor), prurido vulvar, enjôos passageiros, cefaléia, tonturas e alterações endometriais, que incluem desde pólipos (mais freqüente) até carcinoma (complicação considerada muito rara: risco calculado de 1/8000 em mulheres utilizando o medicamento por mais de seis anos e em doses altas de 40 mg, apresentando diagnóstico precoce através de rastreamento ultra-sonográfico realizado de rotina).

Além do rastreamento ultra-sonográfico, utiliza-se de rotina a administração de progestágenos na dose de 10 mg/dia por sete dias ao mês com o intuito de reduzir a proliferação endometrial e diminuir as possibilidades desta neoplasia. Neste intuito, não há relato de câncer de endométrio nos últimos 10 anos da UNIFESP em pacientes tratadas com tamoxifeno e câncer de mama.

É sabido que o câncer de mama apresenta mortalidade de 50 % e que a administração de tamoxifeno reduz em 30 % a mortalidade desta neoplasia.

Benefícios e Participação Voluntária

O benefício principal é receber o medicamento logo após a confirmação da doença. Além disto, a biópsia prévia tem sido um procedimento de rotina por dispensar a congelação no dia da operação, facilitando o planejamento prévio da cirurgia. Esta pesquisa trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de que mesmo a curto prazo de utilização, o medicamento Tamoxifeno já apresenta efeitos sobre o câncer de mama.

Sua participação nesta pesquisa é inteiramente voluntária. Você pode recusar-se a participar desta pesquisa ou poderá desistir de sua participação em

qualquer momento. Sua decisão não resultará na perda dos benefícios ou tratamento médico para o qual estava designada. Ressaltamos novamente que o medicamento (Tamoxifeno) poderá ser tomado de rotina, mesmo que você não participe do estudo, uma vez que ele é prescrito como tratamento para o câncer de mama.

Os pesquisadores podem retirar você do estudo por qualquer uma das seguintes razões:

- Você apresentou efeitos colaterais indesejáveis.
- Seu médico decidiu que é de seu interesse.
- Você não segue as regras do estudo.
- Surgiu nova informação que sugere que você não é uma paciente apropriada para este estudo em particular.
- Você apresenta doenças clínicas que contra-indiquem intervenção cirúrgica ou o uso de Tamoxifeno.

Tratamento Médico

Todas as precauções adequadas serão tomadas para garantir a sua segurança no decorrer deste estudo. Eventuais efeitos indesejáveis por resultado direto dos efeitos da medicação em estudo, serão tratados sem qualquer despesa.

Não lhe será negado o cuidado que receberia normalmente tenha você abandonado o estudo voluntária ou involuntariamente ou ainda se escolher não participar nesta pesquisa médica.

Custos Adicionais

Você não terá custos adicionais como resultado de sua participação nesta pesquisa médica. Todos os exames prévios ao estudo e testes laboratoriais de acompanhamento e os exames realizados especificamente para esta pesquisa serão gratuitos durante seu recrutamento no estudo.

Confidencialidade e Garantia de Acesso

As informações desta pesquisa médica estarão aos cuidados dos médicos e coordenadores responsáveis pelo andamento deste estudo. Poderão ser inspecionados

pelo Comitê de Ética Institucional e apresentadas em encontros profissionais ou em publicações. Entretanto, a sua identidade não será revelada em nenhum momento.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Rogério Bizinoto Ferreira, que pode ser encontrado no Setor de Mastologia (rua Botucatu, 527. Telefone: 5576 4618). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572, 1º andar, conj. 14 – fones: 5539-7162, 5571-1062.

Observações Finais

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Ressalta-se a importância da não realização de nenhum procedimento adicional aos habitualmente já realizados para o diagnóstico e terapêutica de rotina do departamento de Mastologia da EPM-UNIFESP para a realização deste estudo.

ANEXO 3

Termo de Consentimento Pós Informação

Confirmo ter revisado o conteúdo da informação precedente, relativa à pesquisa intitulada “**Efeitos da terapia de curto prazo com tamoxifeno no índice mitótico do epitélio do carcinoma de mama**”

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o Dr. Rogério Bizinoto Ferreira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ___/___/___

Assinatura da paciente / representante legal

_____ Data ___/___/___

Assinatura da testemunha

Eu, Rogério Bizinoto Ferreira, declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data ___/___/___

Assinatura do Pesquisador

7. REFERÊNCIAS

ACSW – American Cancer Society Workshop – On guidelines and screening for breast cancer. Report of the evaluation committee. *Cancer suppl* 1993;69:7-9.

Arteaga CL, Tandon AK, Von Hoff DD, Osborne CK: Transforming Growth factor: potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor negative breast cancer cells. *Cancer Res* 1988;48:3898-04.

Bernardes Jr. JR, Nonogaki E, Seixas MT, Rodrigues de Lima G, Baracat EC, Gebrim LH. The effect of a half dose of tamoxifen in the proliferative activity in normal breast epithelium. *Int J Gynecol Obstet* 1999;67(1):33-8.

Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, Ferrari L, Luini A, Greco M, Bartoli C, Coopmans de Yoldi G, Zucali R, Rilke F, et al Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. *J Natl Cancer Inst* 1990;oct;82(19):1539-45.

Busch H. Adducts and tamoxifen. *Semin Oncol* 1997;24(Suppl 1):98-104.

Butta A, MacLennan K, Flanders KC, Sacks NPM, Smith I, McKinna A, Dowsett M, Wakefield LM, Sporn MB, Baum M, Colletta AA: Induction of transforming growth factor in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer res* 1992;52:4261-64.

Cameron DA, Keen JC, Dixon JM, Bellamy C, Hanby A, Anderson TJ, Miller WR.- Effective tamoxifen therapy of breast cancer involves both antiproliferative and pro-apoptotic changes. *Eur J Cancer* 2000;36:845-51.

Chein MBC. Índice mitótico e volume nuclear do epitélio mamário de pacientes no menacme tratadas com diferentes doses de tamoxifeno. [Tese – Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina; 2001.

Colletta AA, Benson JR, Baum M. Alternative mechanisms of action of anti-oestrogens. *Br Cancer Res Treat* 1994;31(1):5-9.

Daniel P, Gaskell SJ, Bishop H, Campbell C, Nicholson RI - Determination of tamoxifen and biologically active metabolites in human breast tumours and plasma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1981;17(11):1183-9.

Dixon JM, Anderson TJ, Miller WR. Neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer: a surgical perspective. *Eur J Cancer* 2002;38:2214-21.

EBCTCG – Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group – Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* 1998;351:1451-67.

Edwards KJ, Laughton CA, Neidle S.- A molecular modeling study of the interactions between the antiestrogen drug tamoxifen and several derivatives, and the calcium-binding protein calmodulin. *J Med Chem* 1992;35(15):2753-61.

Ellis MJ. Neoadjuvant endocrine therapy for breast cancer: medical perspectives. *Clin Cancer Res* 2001;Dec;7(12 suppl):4388s-91s.

Facina G, Rodrigues de Lima G, Simões MJ, Baracat EC, Gebrim LH. Estudo da atividade estrogênica do tamoxifeno sobre o epitélio do fibroadenoma na fase lútea do ciclo menstrual. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1997;19(4):283-92.

Fernando IN, Titley JC, Powles TJ, Dowsett M, Trott PA, Ashley SE, Ford HT, Ormerod MG. Measurement of S-phase fraction and ploidy in sequential fine-needle aspirates from primary human breast tumors treated with tamoxifen. *Br J Cancer* 1994;70(6):1211-6.

Fletcher SW. Twither scientific deliberation in health policy recommendations? *N Engl J* 1997;336:1180-85.

Fisher B, Dignam J, Bryant J, Decillis A, Wickerham DL, Wolmark N, Constantino J, Redmond C. Five versus more than five years of tamoxifen for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor positive tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1529-42.

Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer; report of the national surgical adjuvant breast and bowel project p-1 study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(18):1371-88.

Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;Aug;16(8):2672-85.

Fisher B, Pawls TJ, Pritchard KJ. Tamoxifen for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer* 2000;36(2):142-50.

Furr BJA, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmac Ther* 1984;25:127-205.

Gallo MA, Kaufman D. Antagonistic And Agonistic Effects Of Tamoxifen: Significance In Human Cancer. *Semin Oncol* 1997;24(Suppl 1):71-80.

Gebrim LH. Estudo da apoptose do lóbulo mamário de mulheres tratadas com tamoxifeno no menacme [Tese – Livre Docência]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 1999.

Gelmann EP - Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Oncol* 1997;24(Suppl 1):65-70.

Gerber B, Krause A, Muller H, Reimer T, Kulz T, Makovitzky J, Kundt G, Friese K. – Effects of adjuvant tamoxifen on the endometrium in postmenopausal women with breast cancer: a prospective long-term study using transvaginal ultrasound. *J Clin Oncol* 2000;18(20):3464-70.

Green S, Walter P, Kumar VL, Krust A, Bornet JM, Argos P, Chambon P. Human estrogen receptor cDNA sequence, expression and homology with v-erb. *Nature* 1986;320:134-9.

Gulino A, Barrera G, Vacca A, Farina A, Ferretti C, Screpanti I, Dianzani MU, Frati L.- Calmodulin antagonism and growth-inhibiting activity of triphenylethylene antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1986;46(12):6274-8.

- Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D. Consensus review of clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry* 1993;14(5):48-5.
- Higa GM. Tamoxifen: 25-year perspective. *Am J Hosp Pharm* 1994;51:400-3.
- Howell A. New endocrine treatments for breast cancer: biological and clinical aspects. *The Breast* 1996;5:170-4.
- Instituto Nacional de Câncer. INCA, do Ministério da Saúde. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil [monograph online], 2003. Available from: URL: www.inca.gov.br/estimativa/2005/conteudo_view.asp
- Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, Hortogabyi GN. Use of tamoxifen for breast cancer: twenty eight years later. *J Clin Oncol* 1995;13(2):513-29.
- Jannink I, van Diest PJ, Baak JPA. Comparison of the prognostic value of Mitotic Frequency and Mitotic Activity Index in breast cancer. *The Breast* 1996;5:31-36.
- Jordan VC. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Br Cancer Res* 1994;Treat 31:41-52.
- Jordan VC. Estrogen receptor antagonists. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.527-45.
- Jordan VC, Gapstur S, Morrow M. Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J Natl Cancer Inst* 2001;3;93(19):1449-57.
- Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *Endocrinology* 2000;141(12):4503-11.
- Knabbe C, Kopp A, Hilgers W, Lang D, Muller V, Zugmaier G and Jonat W: Regulation and role of TGF beta production in breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1996;784: 263-76.
-

Kuiper GG, Enmark EP, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA – Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5925-30.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark EP, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-70.

Kumar MV, Tindall DJ. Transcriptional regulation of the steroid receptor genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;59:289-306.

Levenson AS, Jordan VC. Selective oestrogen receptor modulation: Molecular pharmacology for the millennium. *Eur J Cancer* 1999;35:1628-39.

Levine M, Moutquin JM, Walton R, Feightner J. Chemoprevention of breast cancer. A joint guideline from the Canadian Task Force on Preventive Health Care and the Canadian Breast Cancer Initiative's Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast Cancer. *CMAJ* 2001;164(12):1681-90.

Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res* 1976;dec;36(12):4595-601.

Love RR, Mazes RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP, Demets DL. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med* 1992;326:852-6.

MacGregor JI; Jordan VC. Basic guide to mechanisms of anti-estrogen action. *Pharmacol Rev* 1998;50:151-96.

Mommers ECM, van Diest PJ, Leonhart AM, Meijer CJLM, Baak JPA. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis *Breast Cancer Res Treat* 1999;58:161-9.

Millen Ed. Estudo da apoptose no carcinoma de mama em pacientes tratadas com tamoxifeno [Tese – Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal De São Paulo - Escola Paulista De Medicina; 2003.

Morena AM, Oshima CT, Gebrim LH, Egami MI, Silva MR, Segreto RA, Giannotti Filho O, Teixeira VP, Segreto HR. Early nuclear alterations and immunohistochemical expression of Ki-67, Erb-B2, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF-beta1) and integrine-linked kinase (ILK) two days after tamoxifen in breast carcinoma. *Neoplasma*. 2004;51(6):481-6.

Noguchi S, Motomura K, Inoji H, Imaoka S, Koyama H. Down regulation of transforming growth factor alpha by tamoxifen in human breast cancer. *Cancer* 1993;72:131-6,.

Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Osborne CK, Trott PA, Fernando IN, Ashley SE, Ormerod MG, Titley JC, Gregory RK, Allred DC. Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997;3:593-600.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. RE β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 1996;392:49-53.

Osborne CK, Boldt DH, Clarck GM, Trent JM. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res* 1983;43(8):3583-5.

Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management – *Br Cancer Res Treat* 1998;51:227-38.

Osborne MP. Breast cancer prevention by antiestrogens. *Ann N Y Acad Sci* 1999;889:146-51.

Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol* 2000;18(17):3172-86.

Pinotti JA, Tolosa HA, Sivini F. Emprego experimental de um antiestrogênico no tratamento de casos de displasia mamária rebelde a outros processos terapêuticos: resultados preliminares. *J Bras Ginec* 1979;87(1):57-9.

Powles TJ, Jones AL, Ashley S, O'Brien MER, Tidy VA, Treleavan J, Cosgrove D, Nash AG, Sacks N, Baum M, McKinna JA, Davey JB. The Royal Marsden Hospital pilot tamoxifen chemo prevention trial. *Br Cancer Res Treat* 1994;31:73-82.

Powles TJ - Efficacy of tamoxifen as treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 1997;24(1 Suppl 1):S1-48-S1-54.

Quadros LGA. Avaliação da atividade proliferativa do epitélio mamário humano normal durante a administração de tamoxifeno [Tese – Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 1997.

Robinson SP, Jordan VC: Antiestrogenic action of toremifene on hormone dependent, independent and heterogeneous breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Res* 1989;49:1758- 62.

Robinson E, Kimmick GG, Muss HB – Tamoxifen in postmenopausal women. A safety perspective. *Drugs Aging* 1996;8:329-37.

Rose DSC, Maddox PH, Brown DC.- Which proliferation markers for routine immunohistology ? A comparative of five antibodies. *J Clin Pathol* 1994;47(11):1010-4.

Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW. Tamoxifen induces accumulation of MCF-7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19(5):615-21.

Sutherland RL, Watts CK, Hall RE, Ruenitz PC. Mechanisms of growth inhibition by nonsteroidal antioestrogens in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem* 1987;27(4-6):891-7.

Sousa JA. Avaliação da imunoexpressão do anticorpo monoclonal mib-1 no epitélio mamário adjacente ao fibroadenoma de mulheres no menacme tratadas com tamoxifeno [Tese – Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 1999.

Sousa JA, Seixas MT, Lima GR, Baracat EC, Gebrim LH. Evaluation of monoclonal antibody MIB-1 in the mammary epithelium adjacent to fibroadenomas in premenopausal women treated with tamoxifen. *Breast J.* 2001; 7(6):392-7.

Tanaka C. Avaliação da apoptose em pacientes com câncer de mama tratadas com tamoxifeno [Tese – Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2004.

Taylor IW, Hodson PJ, Gressn MD, Shuterland RL. Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 1983;43(9):4007-10.

Tzukerman MT, Esty A, Santino-Mere D, Danelian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP – Human estrogen receptor transactivation capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 1994;8:21-30.

Uehara J. Avaliação da positividade dos receptores de estradiol e progesterona em pacientes com câncer de mama tratadas com tamoxifeno [Tese – Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2005.

Viviani RSO. Avaliação do volume ultra-sonográfico do fibroadenoma de mama em mulheres tratadas com tamoxifeno [Tese – Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2000.

Abstract

Introduction: Tamoxifen is the most important drug in hormone therapy for breast cancer. It seems to have a cytostatic action and very little is known about cell proliferation after short-term exposure to tamoxifen. **Objective:** assessing the effect of short-term therapy with tamoxifen on cell proliferation in breast cancer, as measured by the mitotic index. **Patients and Methods:** prospective study including 20 patients with invasive breast carcinoma, and positive receptors for estradiol and/or progesterone. An incisional biopsy for diagnostic purposes was performed in all the patients. Then, on the 2 days that preceded surgery (mastectomy or quadrantectomy), the patients were given 20 mg/day of tamoxifen. Another tumor fragment was then harvested. The material was fixed in buffered formaldehyde at 10% and stained with hematoxylin and eosin (HE) to determine the mitotic index. A quantitative study was done on the basis of digital photographs. The hardware and software used were a HE (400X) computer, running Windows 98, and Image-lab 2000[®]. The results were then compared using the non-parametric Wilcoxon test. **Results** After 2 days of treatment with tamoxifen, cell proliferation decreased in 16 of the 20 tumors. The mean for the mitotic index was 11 in group 1 (pre-treatment) and 7.15 in group 2 (post-treatment). Statistical analysis proved to be significant ($p < 0.001$). **Conclusion:** This early reduction in the mitotic index can serve as a response marker for primary hormonal therapy in patients with receptor-positive breast cancer.