

Análise morfométrica de micronúcleos e colágeno intersticial em tumores de mama

Mario Ribeiro Melo-Junior^{1,2}

Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado¹

Jorge Luiz Silva Araújo-Filho¹

Vasco José Ramos Malta-Patur¹

Adriana Maria da Silva Telles^{1,3}

Resumo

O presente trabalho estabeleceu a densidade de micronúcleos e a distribuição do colágeno intersticial no tecido tumoral benigno e maligno de mama humana. Foram utilizadas a reação histoquímica de Feulgen e tricrômico de Masson, e a análise digital de imagens. Foram selecionados fragmentos de tecido mamário, diagnosticados como Fibroadenoma (FA), Doença fibrocística (DF) e Carcinoma Ductal Infiltrante (CDI). Para controle, foram utilizadas amostras de plástica mamária com tecido normal. A reação histoquímica foi realizada através da reação de Feulgen, para evidenciação dos micronúcleos, e, para a análise de colágeno intersticial, foi utilizada a coloração tricrômico de Masson. O número médio de micronúcleos exibiu valores semelhantes em amostra de FA ($90,8 \pm 4,5$), DF ($80,3 \pm 4,0$) e tecido normal ($83,0 \pm 4,1$). Entretanto, valores significativamente menores que aqueles foram encontrados no CDI ($176,5 \pm 88,3$). Quanto à distribuição do colágeno intersticial, constatou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) nos casos de FA ($8101,4 \pm 405,07$) e DF ($7046,78 \pm 352,33$), quando comparados ao tecido mamário normal ($1733,13 \pm 86,65$) e ao CDI ($2165,94 \pm 108,29$). Pode-se concluir que tanto o método de análise de imagem como a reação de Feulgen mostraram-se eficientes para evidenciar as alterações do núcleo celular e da matriz extracelular de tumores de mama.

Palavras-chave: micronúcleos – colágeno – neoplasia mamária.

INTRODUÇÃO

Os distúrbios tumorais compreendem uma variedade de alterações morfológicas na mama, que vão desde lesões inteiramente inócuas até lesões associadas a um risco aumentado de carcinoma. Uma característica de todas essas alterações é o fato de produzirem tumorações palpáveis, que são encontradas em

60% a 90% das mamas examinadas em autópsia de rotina¹.

Dentre os tumores malignos de mama, os carcinomas ductais invasivos representam o maior grupo, constituindo cerca de 65 a 80% dos carcinomas mamários. O quadro

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

²Associação Caruaruense de Ensino Superior – ASCES.

³Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde – CCS. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Correspondência para / Correspondence to:

Mario Ribeiro de Melo-Júnior

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA., Setor de Patologia

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Av. Prof. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário

50670-910. Recife – Pernambuco – Brasil

E-mail: mariormj@gmail.com

morfológico desses carcinomas é bastante heterogêneo, tendo sido caracterizadas algumas variáveis histológicas importantes no prognóstico da doença².

Os diferentes estágios da progressão do carcinoma ductal não estão bem caracterizados. O processo se inicia com uma hiperplasia atípica das células epiteliais ductais, que podem ser difíceis de distinguir nos exames clínicos e de imagem de um carcinoma ductal *in situ* ou mesmo de um fibroadenoma³.

O carcinoma ductal invasivo pode ser de origem familiar ou esporádica, e estima-se que entre 5 e 10% dos casos são de origem familiar. As aberrações cromossômicas encontradas não são específicas para esse tumor, e os cariótipos indicam um alto grau de heterogeneidade nesses tumores⁴.

Dentre os tumores benignos, o fibroadenoma é o mais freqüente em mulheres com menos de 30 anos de idade. Embora classificado entre as neoplasias benignas, alguns autores o consideram uma lesão hiperplásica ou mesmo mal formativa. Como regra geral, o fibroadenoma apresenta-se como nódulo único, bem delimitado, em pacientes jovens⁵.

Atualmente, tem aumentado o número de estudos a respeito do fibroadenoma, principalmente pelo fato de alguns trabalhos terem demonstrado que a presença do fibroadenoma está ligada a um aumento do risco de desenvolver carcinoma na mama⁶.

A vasta exibição de semelhanças histológicas de doença mamária proliferativa atípica, bem como de carcinomas, traduz-se nas manifestações externas de dúzias ou centenas de alterações biológicas, que tomam lugar dentro dessas lesões, e apontam para as vias complexas e variáveis da carcinogênese mamária⁷.

Diversos critérios morfológicos têm sido utilizados para descrever ou nomear a agressividade de um tumor. Dentre esses critérios, incluem-se o tipo histológico, a presença ou ausência de resposta inflamatória, o número de mitoses, o comprometimento de vasos sanguíneos e linfáticos, as alterações na matriz extracelular e o grau de polimorfismo nuclear⁸.

No que diz respeito aos tumores de mama, o método semi-quantitativo de gradua-

ção histológica da malignidade enfatiza o índice mitótico, o polimorfismo nuclear (aneuploidia de DNA, formação micronúcleos) e a presença ou não de formação tubular. Esses padrões aneuplóides de DNA são considerados fatores associados à malignidade de tumores encontrados em diferentes graus de displasias, incluindo-se os casos de lesões mamárias benignas. Essa ploidia das lesões tem se mostrado estatisticamente preditiva no comportamento biológico dos tumores⁹.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar a densidade de micronúcleos e a distribuição do colágeno intersticial no tecido tumoral benigno e no maligno de mama humana. Para isso, foram utilizadas, respectivamente, a histoquímica da reação de Feulgen e de tricrômico de Masson. Ambas as técnicas tiveram seus resultados quantificados através de um sistema digital de análise de imagens.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE - nº 320-06).

Foram selecionados blocos de parafina dos arquivos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco, com lesões de mama de mulheres com idades entre 13 e 88 anos. Através de triagem, foram selecionados blocos com fragmentos de tecido mamário com carcinoma ductal infiltrante (CDI, n=10), doença fibrocística (DF, n=08) e fibroadenoma (FA, n=10). Para controle, foram utilizados fragmentos de mama sem alterações tumorais (n=10), obtidos de plástica mamária.

Todos os tecidos foram submetidos à rotina histológica e, em seguida, corados pela reação de Feulgen (Reativo de Schiff), segundo o protocolo de Hardie e colaboradores (2002)¹⁰, para verificação da presença e quantificação de micronúcleos, a qual foi feita pelo método de estudo-cego por dois observadores, fazendo-se uma contagem de cinco campos aleatoriamente em cada lâmina e contando-se o número de

micronúcleos em um total de 10 células por campo do microscópio óptico.

Para análise do colágeno intersticial, foi utilizada a coloração de tricrômico de Masson, avaliando-se três campos aleatórios em cada caso; depois, essas amostras foram submetidas à análise de imagem.

A análise das imagens das lâminas histológicas consistiu de um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2). O sistema interativo de análise de imagens utiliza o Software OPTIMAS® 6.1 e Câmera digital CCBBW 410 (Samsung).

O parâmetro morfométrico adotado foi à distribuição da área média de colágeno intersticial por campo captado na lâmina histológica (área total do campo = 12.234 μm^2). Todas as análises foram realizadas na magnificação de 400x. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando os testes de Tukey, com $p < 0,05$, através do programa PRISMA® 3.0.

Na análise histológica, foram contadas 1550 células, para identificação dos micronúcleos. Os critérios utilizados para identificação de micronúcleos foram: 1) presença de material nuclear. 2) ter intensidade de luz maior ou igual à do núcleo; 3) ter forma circular ou oval; 4) possuir área menor do que 1/5 do núcleo; 5) estar completamente separado do núcleo¹¹.

RESULTADOS

A partir da análise de imagem dos depósitos de colágeno nas amostras (GRÁFICO 1), pôde-se constatar um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) da área média de colágeno nos casos de fibroadenoma (8101,4 \pm 405,07) e de doença fibrocística (7046,78 \pm 352,33), quando comparadas à do tecido mamário normal (1733,13 \pm 86,65) e à do carcinoma ductal infiltrante (2165,94 \pm 108,29). (FIGURA 1).

Em relação ao número médio de micronúcleos nas células tumorais, os resultados obtidos indicam valores semelhantes em amostras de fibroadenoma (90,8 \pm 4,5), doen-

ça fibrocística (80,3 \pm 4,0) e tecido normal (83,0 \pm 4,1). Entretanto, valores significativamente maiores ($p < 0,01$) que aqueles foram encontrados no carcinoma ductal infiltrante (176,5 \pm 88) (GRÁFICO 2).

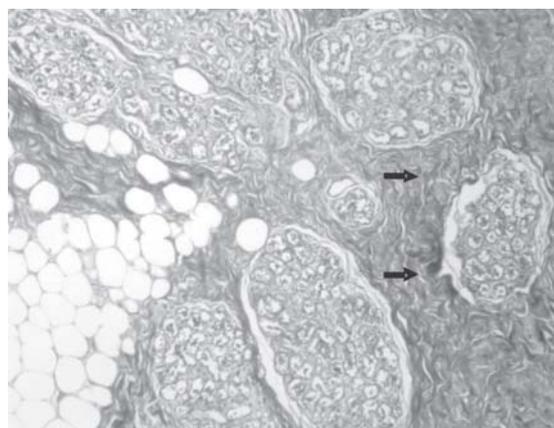


Figura 1- Distribuição do colágeno intersticial (setas) em fibroadenoma

Nota: Coloração Tricrômico de Masson; Magnificação 100x.

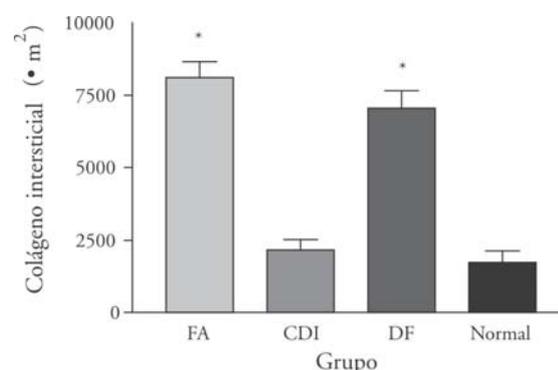


Gráfico 1 - Análise digital de imagens da área média de colágeno intersticial em tumores demama.

Notas: - Área do campo = 12234 μm^2 .

- FA =Fibroadenoma; CDI =Carcinoma ductal infiltrante; DF = Doença fibrocística; * = $p < 0,01$.

DISCUSSÃO

A investigação dos micronúcleos foi inicialmente proposta como um método simples para detecção de lesão no núcleo celular. Os

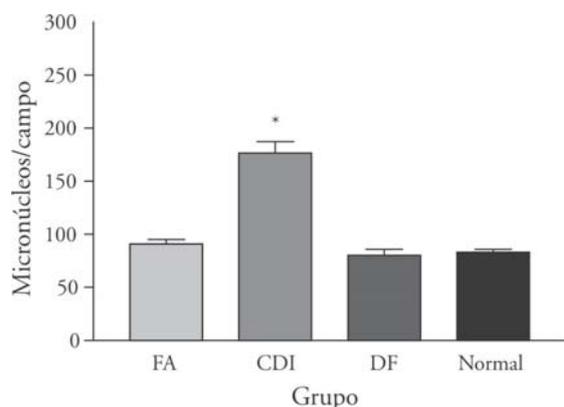


Gráfico 2- Número de médio de micronúcleos em células tumorais de mama

Notas: - Análise Digital de imagem - Sistema OPTIMAS® 6.1; Área do campo = 12234 μm^2 .
-FA =Fibroadenoma; CDI =Carcinoma ductal infiltrante; DF =Doença fibrocística; * = $p < 0,01$.

micronúcleos são classificados como corpúsculos intra e extracelulares, originados de fragmentos acêntricos de cromossomos degenerados da etapa de metáfase do ciclo celular¹².

O diagnóstico e o prognóstico da medida da ploidia do DNA foram definitivamente comprovados por estudos em várias lesões neoplásicas¹³. Nesse mesmo ritmo, pesquisas recentes também avaliaram anormalidades na ploidia do DNA e no ciclo de células numa ampla variedade de patologias não-tumorais¹⁴.

A reação de Feulgen foi amplamente estudada desde 1924 por vários autores para sua especificação e, ao final dos anos quarenta, tornou-se uma das reações químicas mais investigadas para a quantificação de DNA¹⁵.

O estudo dos micronúcleos tem servido para avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos^{16,17} e o biomonitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos^{18,19}. Entretanto, existem poucos estudos que utilizam a análise de micronúcleos em tecidos neoplásicos, embora se saiba das diversas alterações nucleares comuns às células tumorais¹⁴.

Quanto aos resultados obtidos no presente estudo, em relação à quantidade aumentada de micronúcleos em lesões malignas, estudos recentes afirmam que tumores malignos

com alta incidência de metástases, como os carcinomas de MAM, têm uma alta frequência de alterações no arranjo cromossomal, o que resulta em padrões aberrantes de organização das regiões nucleares²⁰.

Há um aumento de evidências que indicam que a ploidia tumoral e as alterações na organização morfológica do DNA de células tumorais de mama têm valor prognóstico considerável, como é relatado em diversos trabalhos que utilizam metodologias semelhantes àquelas utilizadas no presente estudo^{21, 22, 23}.

Os estudos apontam diversas discordâncias na avaliação de micronúcleos. Entretanto, um fator que pode interferir na discussão dos resultados obtidos com aqueles encontrados na literatura deve-se ao fato de que diferentes estudos^{24, 25} foram elaborados utilizando-se das adaptações ao protocolo da reação de Feulgen.

Pode-se observar que tanto o método de análise de imagem quanto a reação modificada de Feulgen que utiliza o corante de Schiff demonstram ser eficientes para a análise das alterações nucleares e a contagem de micronúcleos, bem como de elementos alterados da matriz extracelular, por exemplo, a distribuição do colágeno intersticial.

Embora a presença da fibrose em tumores de mama tenha sido anteriormente relatada²⁶, de acordo com nossos resultados esse dado não foi confirmado, sendo encontrada uma distribuição similar à do tecido mamário normal.

No presente trabalho, ficou evidente que as alterações na deposição de colágeno nas lesões tumorais da mama provavelmente se devem ao fato de que tumores malignos com alta incidência de metástases, como os carcinomas de mama, apresentam uma menor adesividade entre as células, pois a matriz extracelular, mais especificamente, o colágeno e a elastina, nesses tumores, apresenta um déficit de seus componentes estruturais, principalmente as fibras colágenas²⁷.

O câncer de mama é a neoplasia mais prevalente em mulheres, representando 22% de todos os carcinomas diagnosticados em 2000 nos EUA, e a segunda maior causa de morte

por câncer (15% das mortes por neoplasia) nessa população²⁸. Embora associado a fatores genéticos, estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes populações determinaram que fatores de risco como idade, localização geográfica, status socioeconômico e eventos reprodutivos (idade da menarca e da menopausa, infertilidade, gravidez e amamentação) estão associados à maior incidência de carcinoma de mama²⁹.

O estágio final da carcinogênese na mama caracteriza-se pela transição do carcinoma limitado pela membrana basal aos ductos e lóbulos (carcinoma *in situ*) ao carcinoma invasivo³⁰. O desequilíbrio cromossomal que pode ser evidenciado pelo padrão aneuplóide e surgimento de micronúcleos ocorre com os ganhos ou perdas em múltiplos lócus, como em lesões hiperplásicas que progridem para carcinoma ductal *in situ* até carcinoma ductal invasivo. Não obstante, as mudanças cromossômicas compartilhadas com ambos os carcinomas ductal *in situ* e adjacente ao carcinoma ductal invasivo demonstram sua relação clonal e evolucionária³¹.

O perfil da ploidia do DNA pode ser um indicador útil no prognóstico das neoplasias intraepiteliais cervicais. De acordo com Hanselaar e colaboradores (1998), lesões com padrões aneuplóides do DNA (micronúcleos) têm sido relatadas com taxas mais altas de persistência ou recorrência do que em lesões com diploidia ou poliploidia³².

A reação de Feulgen, proposta por Feulgen e Rossenbeck há mais de 75 anos, é atualmente bastante utilizada como técnica de citohistoquímica para evidenciar micronúcleos. A intensidade de coloração é proporcional à concentração de DNA. As aplicações atuais da reação de Feulgen estão principalmente relacionadas com a quantificação de DNA em núcleos de células, através de imagens para avaliação da ploidia em doenças tumorais¹⁵.

Fibroadenoma da mama é um freqüente tumor benigno, formado por componentes epiteliais e estromais, que ocorre geralmente em mulheres jovens e raramente está associado ao desenvolvimento de malignidade. Entretanto,

em revisão de 22 anos da literatura, Abe e colaboradores (2004) encontraram 16 casos de carcinoma com fibroadenoma, em que 18,8% eram carcinomas ductais *in situ*, 37,5% eram carcinomas ductais invasivos, 37,5% carcinomas lobulares *in situ*, e 6,3% carcinomas lobulares invasivos³³. O pequeno número de casos de fibroadenoma com carcinoma é apresentado em poucos trabalhos e estudos de casos, além do fato de que o comportamento desses tumores ainda não está bem definido³⁴.

De acordo com nossos resultados, os casos de fibroadenoma demonstraram características estruturais mais condizentes com as doenças fibrocísticas do que com as alterações comuns aos carcinomas mamários analisados. Embora a literatura sugira uma possível correlação entre as alterações fibrocísticas e o câncer de mama, não houve semelhanças quanto ao padrão de ploidia das células (número de micronúcleo) ou deposição de matriz extracelular (colágeno intersticial).

CONCLUSÕES

Estudos como o nosso confirmam uma tendência atual de se investigar, além das células neoplásicas, também evidências das alterações comuns aos tecidos subjacentes, que desempenham um papel importante no desenvolvimento das alterações tumorais da mama³⁵. Além disso, na investigação do câncer de mama, é necessária uma maior atenção a lesões benignas, como as alterações fibrocísticas, que podem estar envolvidos na carcinogênese do tecido mamário.

Esses resultados nos permitem concluir que a técnica de Feulgen demonstrou ser satisfatória para evidenciar micronúcleos em tecido parafinizado de mama. Além disso, também se podem observar dados significantes no que se refere à distribuição do colágeno intersticial nos tecidos tumorais do fibroadenoma e da doença fibrocística, quando comparada à do carcinoma de mama e do tecido normal.

Morphometric analysis of micronucleuses and interstitial collagen in breast tumors

Abstract

The present work aims to establish the density of micronucleus and interstitial collagen distribution of benign and malign tumoral diseases from human breast. The Feulgen reaction and Thricromic of Masson histochemical methods associated to digital image analysis were used. Slices (4 µm) were selected containing biopsy fragments, diagnosed as Fibroadenoma (FA), Fibrocystic disease (FD) and Infiltrated ductal carcinoma (IDC). The results of the mean number of micronucleus exhibited similar values in FA (90.8 ± 4.5), FD (80.3 ± 4.0) and normal tissue (83.0 ± 4.1). However, significantly lower values than those were found in IDC (176.5 ± 88). The interstitial collagen distribution showed a significant increase (p < 0,001) in the FA (8101.4 ± 405.07) and FD (7046.78 ± 352.33) cases, when compared to the normal mammary tissue (1733.13 ± 86.65) and IDC (2165.94 ± 108.29). These findings suggested that the Feulgen reaction associated with digital image analysis can be used to evidence important and specific nuclear and extracellular alterations in the breast tumor diseases.

Keywords : Micronucleus- Collagen- Breast neoplasm.

REFERÊNCIAS

- 1 ROBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. ***Patologia estrutural e funcional***. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.
- 2 DANTAS, K.A.N.; SANTOS, G. da C.; GIANNOTTI FILHO, O. Sistemas de graduação para carcinoma: estudo comparativo da concordância cito-histológica. ***R. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro***, v.25, n.2, p.361-368, 2003.
- 3 IAN, S.F.; D'ARRIGO, C. Pathogenesis of breast carcinoma. ***Int. J. Clin. Pract.***, Oxford, v.58, n.1, p.35-40, 2004.
- 4 HOFFMANN, W.; SCHALAG, P.M. Brca1 and Brca2 breast cancer susceptibility genes. ***J. Cancer Res. Clin. Oncol.***, Berlin, v.126, n.9, p.487-496, 2000.
- 5 BURBANO, R. et al. Cytogenetic description of breast fibroadenomas: alterations related solely to proliferation? ***Braz. J. Med. Biol. Res.***, São Paulo, v.34, p.1003-1006, 2001.
- 6 CALADO, S.S.; LIMA, M.C.C.A. Estudo morfológico dos fibroadenomas da mama: uma análise comparativa entre grupos etários. ***J. Bras. Patol. Med. Lab.***, Rio de Janeiro, v.40, n.6, p.411-419, 2004.
- 7 MIRTRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: the role of polymorphic genes involved in estrogen biosynthesis and metabolism. ***Mutat. Res.***, Amsterdam, v.544, p.9-41, 2003.
- 8 PAES, R. Marcadores prognósticos em neoplasias mamárias. In: WAKAMATSU, A. et al. ***Manual de imuno-histoquímica***. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1995. p.62-69.
- 9 ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. ***R. Bras. Cancerol., Rio de Janeiro***, v.48, n.1, p.113-131, 2002.
- 10 HARDIE, D.C.; GREGORY, T.R.; HEBERT, P.D.N. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. ***J. Histochem. Cytochem.***, New York, v.50, n.6, p.735-749, 2002.

- 11 Reis, S.R.A. et al. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Pesq. Odontol. Bras.*, São Paulo, v.16, n.3, p.221-225, 2002.
- 12 ANDERSON, J.E.; HANSEN, L.L.; FRANK, C. Methods and biomarkers for the diagnosis and prognosis of cancer and other diseases: towards personalized medicine personalized medicine. *Drug Resist. Updat.*, Edinburgh., v.9, n.4/5, p.198-210, 2006.
- 13 MELLIN, W. Cytophotometry in tumor pathology: a critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis. *Pathol. Res. Pract.*, Stuttgart, v.186, p.37-62, 1990.
- 14 GONÇALVES, S. et al. Citometria de imagem do conteúdo de DNA nuclear de células epiteliais do colo uterino. *R. Bras. Anal. Clin., Rio de Janeiro*, v.39, n.1, p.71-78, 2007.
- 15 CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem. Cell Biol.*, Berlin, v.111, p.345-358, 1999.
- 16 MAFFEI, F. et al. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.514, p.49-58, 2002.
- 17 DING, G.R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSH, J. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis*, Oxford, v.18, n.5, p.439-443, 2003.
- 18 LAFFON, B.; PASARO, E.; MENDEZ, J. Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology*, Limerick, v.171, n.2/3, p.175-186, 2002.
- 19 BOLOGNESI, C. et al. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.557, n.2, p.109-117, 2004.
- 20 ERDEM, C. et al. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells of head and neck cancer patients and their first degree relatives. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.172, n.1, p.S165, 2007.
- 21 RODENBURG, J. et al. Ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer*, New York, v.59, p.317-323, 1987.
- 22 KRUTMAN-ZVEIBIL, D.; BRANDT, R.A.; GUIDUGLI NETO, J. Ploidia de DNA em astrocitomas. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v.57, n.4, p.959-964, 1999.
- 23 SALES, A.; RUIZ, A.; LLOMBART-BOSCH, A. Comparative morphometric evaluation of microvessel density and nuclear in ductal carcinoma in situ and hyperplastic ductal breast lesions. *Breast*, Edinburgh, v.8, p.21-25, 1999.
- 24 DIAS, V.M.; OLIVEIRA, R.M.; SANTELLI, G.M.M. Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.565, p.173-179, 2005.
- 25 NORPPA, H.; FALCK, G.C. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, Oxford, v.18, n.3, p.221-233, 2003.
- 26 NAZÁRIO, A.C.P.; REGO, M. F.; OLIVEIRA, V.M. Benign breast masses: a review on diagnosis and management. *R. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro*, v.29, n.4, p.211-219, 2007.
- 27 TÖZEREN, A.; COWARD, C.W.; PETUSHI, S.P. Origins and evolution of cell phenotypes in breast tumors. *J. Theoretical Biol.*, Amsterdam, v.233, n.1, p.43-54, Mar. 2005.
- 28 PARKIN, D.M. International variation. *Oncogene*, Basingstoke, v.23, p.6329-6340, 2004.
- 29 DUMITRESCO, R.G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk: where do we stand in 2005? *J. Cell Mol. Med.*, Bucharest, v.9, n.1, p.208-221, 2005.
- 30 PORTER, D. et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol.*

Cancer Res., Philadelphia, v.1, n.5, p.362-375, 2003.

31 MENEZES, M.V.M. et al. Protein expression of cerbB-2 and p53 in normal ducts, ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the same breast. **São Paulo Med. J.**, São Paulo, v.124, n.3, p.121-124, 2006.

32 HANSELAAR, A.G. et al. DNA cytometry of progressive and regressive cervical intraepithelial neoplasia. **Anal. Cell Pathol.**, Amsterdam, v.16, n.1, p.11-27, 1998.

33 ABE, H. et al. Invasive ductal carcinoma within a fibroadenoma of the breast. **Int. J. Clin. Oncol.**, Tokyo, v.9, p.334-338, 2004.

34 MARUBASHI, S. et al. A case of breast cancer arising in fibroadenoma. **J. Japan Surg. Assoc.**, Tokyo, v.60, n.8, p.2057-2061, 1999.

35 LEE, J.S.; JUNG, J.J.; KIM, J. Quantification of angiogenesis by computerized image analysis system in renal cell carcinoma. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v.22, n.6, p.469-474, 2000.

Recebido em / Received: 03/01/2008
Aceito em / Accepted: 28/03/2008