

GILDA LADEIRA DE ASSIS REPUBLICANO ADORNO

**ANGIOGÊNESE EM CARCINOMAS DE MAMA:
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO
VASCULAR (VEGF) E SUAS CORRELAÇÕES COM OUTROS FATORES
PROGNÓSTICOS.**

BRASÍLIA

2008

GILDA LADEIRA DE ASSIS REPUBLICANO ADORNO

**ANGIOGÊNESE EM CARCINOMAS DE MAMA:
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO
VASCULAR (VEGF) E SUAS CORRELAÇÕES COM OUTROS FATORES
PROGNÓSTICOS.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Ciências da Saúde pela
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade
de Brasília, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da
Saúde.**

Orientador: Prof.Dr.Albino Verçosa de Magalhães

BRASÍLIA

2008

Dedico este trabalho ao amado José e aos nossos filhos Marina e José Victor pelas melhores razões.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo exemplo de retidão por dedicarem tanto carinho, e pela inesgotável confiança que sempre depositaram em mim. Aos amigos que me incentivaram na realização deste trabalho desde quando era apenas um sonho.

Ao Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães, por acolher este projeto, pela orientação e apoio, e pela admirável dedicação ao ensino médico que testemunhei desde os tempos da graduação quando tive a honra de conhecê-lo.

À Rossana Travassos Benck, pela valiosa contribuição na análise estatística dos dados.

À Dr.^a Leonora Vianna, médica patologista do Hospital Regional de Sobradinho exemplar em sua competência, e aos demais funcionários da Unidade de Anatomia Patológica pelo interesse dedicado aos pacientes da Mastologia, que resulta em eficiência e humanização na condução de cada caso. Agradeço o apoio e a confiança que empenharam neste levantamento e na rotina de nossas atividades.

Aos amigos e funcionários do Hospital Regional de Sobradinho, em especial ao Dr. Farid Buitrago e a Sra. Sidney das Graças Martins Dias que se mostraram grandes companheiros ao longo do caminho.

Às nossas pacientes por concordarem em participar deste estudo e por representarem a mais genuína das motivações.

Ser feliz é ter domínio de si pela constância e pela simplicidade.
(Epicuro).

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais freqüente entre mulheres no Brasil e em vários países. Seu comportamento biológico é muito heterogêneo e os riscos de fracasso terapêutico são variáveis. Fatores prognósticos são características capazes de influenciar os resultados de sobrevida, e as chances de recorrência. O reconhecimento destas variáveis permite selecionar pacientes de maior risco e oferecer estratégias de tratamento mais eficazes. O propósito deste estudo é determinar retrospectivamente a expressão de VEGF tecidual por estudo imuno-histoquímico de 54 portadoras de câncer de mama e correlacionando o VEGF com outros fatores prognósticos tais como o estadiamento clínico, grau histológico, receptores hormonais, c-erbB2, MIB-1, p53 e dados clínicos quanto a recorrência e intervalo livre de doença. O progresso das técnicas de imuno-histoquímica vem sendo aplicado à pesquisa da angiogênese tumoral, tanto para determinação da densidade de microvasos com marcadores pan-endoteliais quanto na determinação da expressão tissular de VEGF com anticorpos específicos. O crescimento de um tumor é sempre acompanhado da formação de neovascularização para o suprimento de oxigênio e nutrientes. O carcinoma de mama como a maioria dos tumores sólidos deve adquirir um fenótipo angiogênico para que ocorra crescimento tumoral. Embora o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) desempenhe um papel chave na promoção da angiogênese, seu lugar como fator prognóstico e a sua correlação com outros fatores prognósticos ainda é controversa. A análise estatística dos resultados mostrou significância na associação do VEGF com MIB-1 e c-erbB2, mas não evidenciou significância na sobrevida livre de doença. Em conclusão o VEGF não mostrou significância prognóstica nesta série de pacientes, mas revelou forte associação com c-erbB2 e MIB-1 fatores reconhecidamente eficazes no prognóstico do câncer de mama.

Palavras-chaves:

Angiogênese, Prognóstico, VEGF, Fator de crescimento do endotélio vascular, Câncer de mama

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplasm among women in Brazil and in several countries. Its biological behavior is very heterogeneous and the risks of therapeutic failure are variable. Prognostic factors are characteristics that influence the chances of recurrence and survival. The recognition of these factors allows to select the patients of larger risk and to offer more effective treatment strategies. The growth of a tumor is always accompanied of neovascularization for supply of oxygen and nutrients. Breast carcinoma as most of the solid tumors should acquire an angiogenic phenotype to grow. The progress of the immunohistochemistry techniques have been applied in angiogenesis research for the determination of the tumor microvessel density using panendothelial markers, or in the determination of tissue VEGF using specific antibodies. Although vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a key role in the promotion of angiogenesis, its place as prognostic factor and its correlation with other prognostic factors are still controversial. The purpose of this work is to determine the expression of VEGF in retrospect using the antibody VG-1 in immunohistochemistry assay of 54 patient of breast cancer and to correlate this with other prognostic factors as the tumor size, nodal involvement, histological grade, hormonal receptors, c-erbB2, MIB-1, p53 and clinical data as recurrence and disease-free interval. The statistical analysis did show strong significance in association of VEGF with MIB-1 and c-erbB2, but it did not show any significance with the 5 years disease-free interval. In conclusion VEGF did not show effectiveness to predict the outcome of this patient series, but revealed strong significance in association with c-erbB2 and MIB-1 prognostic factors strongly associated to breast cancer.

Keywords:

Angiogenesis, Breast cancer, VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor, Prognostic

SUMÁRIO

	RESUMO	vi
	ABSTRACT	vii
	LISTA DE FIGURAS E QUADROS	ix
	LISTA DE TABELAS	x
	LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objeto de estudo	16
1.2.1	Objetivo Geral	16
1.2.2	Objetivos Específicos	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1.1	CÂNCER DE MAMA :Importância epidemiológica	17
2.1.2	Câncer de mama no Distrito Federal e em Sobradinho.	20
2.2	ANGIOGÊNESE	20
2.2.1	Breve Histórico e Definições	22
2.2.2	Angiogênese em Território Tumoral	24
2.2.3	Angiogênese em Outras Patologias	28
2.2.4	Técnicas de Investigação da Angiogênese	28
2.2.4.1	Densidade de Microvasos	29
2.2.4.2	Métodos imuno-histoquímicos para determinação do VEGF	32
2.3	Família VEGF: Aspectos biofísicos ,funções e propriedades	33
2.3.1	VEGF e Oncogenes	37
2.3.2	Regulação da Expressão do Gene de VEGF	38
2.3.2	Receptores de VEGF	39
2.3.3	Sinais de transdução	40
2.3.4	Regulação da Expressão Gênica de VEGF	41
2.3.5	O Papel do VEGF na Angiogênese Patológica	41
2.4	Marcadores Prognósticos no Câncer de Mama	42
2.5	VEGF como Fator Prognóstico no Câncer de Mama	61
2.5.1	Terapia Antiangiogênica	65
3	Métodos	68
4	Análise de Resultados	76
5	Discussão	90
6	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXOS	
	Anexo I- Estadiamento do Câncer de Mama	103
	Anexo II- Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa	107

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

QUADRO 01	Estimativa da Distribuição de Casos Novos de Câncer de Mama no Brasil para 2008	17
QUADRO 02	Peptídeos de Ação pró-Angiogênica	36
QUADRO 03	Peptídeos Inibidores de Angiogênese	36
QUADRO 04	Fatores Prognósticos do Câncer de Mama	43
QUADRO 05	Prognóstico do Câncer de Mama Segundo o Tipo Histológico	50
QUADRO 06	Grau Histológico segundo B.Richardson	51
QUADRO 07	Estudos Revisados Sobre a Capacidade Prognóstica do VEGF	64
FIGURA 01	Distribuição das Freqüências segundo Idades Categorizadas	75
FIGURA 02	Distribuição de Freqüências segundo Estadiamento Clínico	76
FIGURA 03	Distribuição de Freqüências Segundo Categorias do Tamanho do Tumor	77
FIGURA 04	Distribuição de Freqüências Segundo o Grau de Diferenciação Histológica	78
FIGURA 05	Distribuição de Freqüências de sobrevida Livre de Doença em 5 Anos	79
FIGURA 06	Distribuição de Freqüências de Expressão de Receptores de Estrogênio	80
FIGURA 07	Distribuição de Freqüências da Expressão Gráfica de Receptores de Progesterona	81
FIGURA 08	Distribuição de Freqüências de Expressão de C-Erbb2	82
FIGURA 09	Distribuição de Freqüências de Expressão de Mib-1	83
FIGURA 10	Distribuição de Freqüências de Expressão de p53	84
FIGURA 11	Distribuição de Freqüências de expressão de VEGF	85
FIGURA 12	Fotomicrografia – IHQ - VEGF +++-Caso N° 18	86
FIGURA 13	Fotomicrografia – IHQ - VEGF ++-Caso N° 1	86
FIGURA 14	Fotomicrografia – IHQ - VEGF +-Caso N° 36	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	Comprometimento Axilar versus Tamanho Tumoral Categorizado	78
TABELA 02	Associações entre a Expressão de Receptores para Estrogênio versus Receptores para Progesterona.	82
TABELA 03	Estudo Correlacional de Todas as Variáveis versus Expressão de VEGF	87
TABELA 04	Associação entre o p53 e o Status Menopausal	88
TABELA 05	Associação entre VEGF E c-ErbB2 segundo o Comprometimento Axilar	88
TABELA 06	Comprometimento Axilar versus Sobrevida Livre de Doença em 5 anos	89
TABELA 07	VEGF versus sobrevida livre de doença em 5 anos	89

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac anti-	Anticorpo
ANG-1	Angiopoetina-1
Bcl-2	Gene ou proteína de ação na membrana mitocondrial, influencia a apoptose
CD 31	Anticorpo de ação pan-endotelial
CD 34	Anticorpo de ação pan-endotelial
c-erb B-2	HER-2/ <i>neu</i> , proto-oncogene relacionado ao câncer de mama
CIAS	Sistema de análise de imagem computadorizado
COX-2	Cicloxigenase-2
DMV	Densidade de microvasos
EGF	Fator de crescimento epidermal
EORTOC-RBG	European Organization for Research and Treatment of Cancer- Reseach Breast cancer group
EPC	<i>Células progenitoras endotheliais</i>
FGF	<i>Fator de Crescimento de Fibroblastos</i>
FGF-b	Fator de crescimento de fibroblastos-básico
Flk-1	Fetal liver kinase-1, homólogo murino do KDR humano, receptor para VEGF, VEGFR-2
Flt-1	Fms like tirosinokinase-1, receptor para VEGF, VEGFR-1
HIF-1	<i>Fator induzido por hipóxia-1</i>
HRS	Hospital Regional de Sobradinho
IGF-1	Fator de crescimento insulina simile-1
IMH	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KDR	Receptor com dominio de inserção da quinase
Ki67	Anticorpo monoclonal capaz de identificar o antígeno MIB-1
MIB-1	Antígeno expresso em todas as fases de divisão celular do ciclo celular exceto a fase G0, marcador de proliferação celular
NCI	National Cancer Institute-(Entidade Americana)
NRP	Neutropilina
p53	Proteína codificada pelo gene TP53 função reguladora do ciclo celular
PAI	Ativador do inibidor do plasminogênio
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIGF	<i>Fator de crescimento placentário</i>
Proto c-met	Proteína proto-oncogenica, receptor para HGF(scatter factor)
RE	Receptor para estrogênio
RP	Receptor para progesterona

T1,T2,T3	Refere-se a tamanho tumoral onde,T1<2cm,T2 entre 2 e 5 cm e T3>5 cm.
TAF	Tumor angiogenesis factor, antiga designação do VEGF
TRH	Terapia de reposição hormonal
TSP	Trombospondina
uPA/PAI	Uroquinase ativadora do plasminogênio
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VG-1	Anticorpo específico contra VEGF-A
vHLp	Von Hippel Lindau protein, derivada de gene de supressão tumoral atua em resposta celulares hipóxia-induzidas
VPF	Vasculotropina, antiga designação do VEGF

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma neoplasia freqüente, com comportamento biológico heterogêneo. As portadoras, mesmo compartilhando igual estadiamento, apresentam um risco variável de óbito por esta causa, na dependência da agressividade intrínseca do tumor e da capacidade de defesa do hospedeiro.

A análise cuidadosa das variáveis envolvidas neste binômio pode antever a história natural da doença permitindo o delineamento mais adequado da terapêutica em cada caso.

Fatores prognósticos são informações que verificadas no momento do diagnóstico, influenciam o resultado oncológico em termos de sobrevida e intervalo livre de doença. Distinguem-se dos fatores preditivos, que permitem antecipar a resposta clínica a um tipo de terapêutica. Alguns destes parâmetros acumulam as duas propriedades e funcionam tanto como fator prognóstico quanto como fator preditivo, a exemplo, dos receptores de estrogênio e *cerbB2*.

Muitos parâmetros clínicos, epidemiológicos, hormonais, morfológicos, e indicadores moleculares de proliferação celular podem cumprir estas funções e por isso vêm merecendo atenção de pesquisadores, dado o interesse crescente em compreender o comportamento do tumor antes de estabelecer a conduta terapêutica.

Ocorre atualmente, a evidência de que o prognóstico do câncer de mama é influenciado pela capacidade do tumor em promover a formação de novos vasos para sua nutrição e oxigenação no processo denominado angiogênese.

Somente a formação de uma rede vascular capilar pode oferecer aporte adequado de oxigênio e nutrientes essenciais à homeostase celular.

Em situações especiais quando ocorre aumento do metabolismo celular, como é o caso da regeneração e cicatrização tecidual no desenvolvimento de tumores sólidos, as necessidades metabólicas teciduais podem ultrapassar a demanda normal de oxigênio e nutrientes disponível pelos capilares existentes. A

diminuição de oxigênio na área desencadeia uma seqüência intrincada de eventos que resultam na formação de uma nova rede de capilares sanguíneos a partir de células endoteliais locais normalmente quiescentes. As células endoteliais passam a proliferar e a formar novos vasos sanguíneos, no fenômeno denominado de angiogênese.

Em tumores sólidos e em tumores de mama em particular a angiogênese desempenha um papel crucial no desenvolvimento tumoral e na formação de metástases. Uma vez deflagrada a angiogênese, o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes permite o crescimento e a invasão do tumor. Tem sido demonstrado que lesões inativas e em alguns casos pré-malignas passam a progredir quando iniciam o processo de neovascularização (FOLKMAN, 2006).

No câncer de mama vários estudos desde Weidner (1992), vêm demonstrando que a angiogênese é um fator independente e significativo de prognóstico, mostrando correlação direta entre a densidade de microvasos e a ocorrência de metástases ganglionares na axila e a sobrevida nos casos de câncer de mama operáveis.

Gasparini e cols. (1995) determinaram que o grau de vascularização peritumoral associa-se diretamente com o prognóstico de pacientes tratadas em estágio inicial.

O fator de crescimento do endotélio vascular - o VEGF - tem sido muito investigado e a literatura atribui a ele um papel de destaque na angiogênese. Folkman (1971) anteviu a promissora perspectiva de bloquear o desenvolvimento de tumores pelo bloqueio ao VEGF e inibição da angiogênese .

A expressão do VEGF em tumores mamários tem se mostrado importante tanto na avaliação prognóstica do carcinoma, como também no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que envolvendo a sua inibição possam controlar esta doença.

Recentemente testes envolvendo drogas antitumorais com a propriedade de atacar ao VEGF, ou o seu receptor, apresentaram resultados promissores com tolerabilidade adequada em inquéritos clínicos destinados à terapia oncológica com antiangiogênicos. O emprego de inibidores de angiogênese foi aprovado nos

Estados Unidos da América para o tratamento de câncer pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e por mais 28 países incluindo a China, desde fevereiro de 2004, e os bons resultados vêm servindo de estímulo a novas investigações.

O presente levantamento oferece a oportunidade de avaliar qual a expressão deste fator de crescimento, em carcinomas de mama, a partir de uma amostra de mulheres brasileiras de baixa renda, e qual o papel do VEGF na predição da recorrência tumoral. No capítulo de fundamentação teórica apresentam-se as estatísticas oficiais sobre o câncer de mama no Brasil, no Distrito Federal e em outros países, descreve-se detalhadamente o fenômeno da angiogênese e o papel de VEGF neste cenário. Apresenta-se uma revisão atualizada sobre os fatores prognósticos do câncer de mama definindo o papel da angiogênese e do VEGF entre eles e mencionando também estudos recentes sobre a terapia anti-angiogênica.

Neste trabalho foram revisados 54 casos de câncer de mama tratados no Hospital Regional de Sobradinho entre novembro de 1998 e dezembro de 2005. Estas biópsias foram submetidas à imuno-histoquímica, para avaliar a expressão tumoral de VEGF e comparar os resultados a outros fatores consagrados como marcadores de prognóstico, a saber: receptores hormonais para estrogênio e progesterona; *cerbB2*; *p53* e *MIB*. As variáveis foram correlacionadas com as informações clínico - patológicas do tumor e com as informações de seguimento das pacientes relacionadas à recorrência tumoral em cinco anos obtidas no levantamento de prontuário.

1 OBJETO DE ESTUDO

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar expressão do VEGF, através da imuno-histoquímica com anticorpo VG1, em casos de carcinoma de mama e estabelecer suas associações com outros fatores prognósticos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar dados clínicos de prognóstico (idade, status axilar, tamanho tumoral, grau histológico) e dados laboratoriais (imuno-histoquímica).
2. Identificar a expressão do VEGF nos tumores analisados.
3. Identificar a expressão dos antígenos *c-erb-B2*, p53 e MIB-1, dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona comparar com a expressão de VEGF, e analisar suas possíveis associações.
4. Correlacionar os resultados da imuno-histoquímica com os dados de sobrevida em cinco anos de seguimento.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER DE MAMA: IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

O câncer de mama representa um desafio em gestão de saúde pública pela grandeza dos dados estatísticos e pela necessidade premente de implantação de ações em variados graus de complexidade. Estas ações envolvem custos elevados para o tratamento e diagnóstico destes tumores. No Brasil o câncer de mama representa a primeira causa de óbito por neoplasia entre mulheres e a segunda causa na população geral. Considerando sua incidência, câncer de mama ocupa o primeiro lugar excluídos os cânceres de pele (EISENBERG,2004).

O *National Cancer Institute*, dos EUA, estimou para o ano de 2007 que o número de casos novos de câncer em todo o mundo estaria acima de 10 milhões, dentre os quais, 53% ocorreriam nos países em desenvolvimento. Nos EUA a estimativa para 2007 para o câncer de mama foi de 178.480 casos novos, causando 40.400 óbitos entre mulheres e representando 32% de todos os cânceres femininos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007).

Segundo estimativas do relatório de 2007 do INCA (FIGURA 01) o número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2008 será de 49.400 casos, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres entre estes 660 casos novos no Distrito Federal (INCA, 2007).

CASOS NOVOS DE CÂNCER DE MAMA POR REGIÃO-2008	
Região Sudeste	28.430 casos
Região Sul	9.500 casos
Região Nordeste	7.630 casos
Região Centro -Oeste	2.630 casos
Região Norte	1.210 casos

Fonte:(INCA, 2007 – Estimativas 2008)

QUADRO 01: Estimativa de distribuição de casos novos de câncer de mama no Brasil em 2008.

Na região Sudeste, onde o câncer de mama é mais incidente, observa-se segundo o INCA risco estimado de 68 casos novos por 100 mil. Dada a exclusão dos tumores de pele não-melanoma, este tipo de câncer também é o mais freqüente nas mulheres das regiões Sul (67/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (28/100.000). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (16/100.000), visto que os tumores de colo de útero são os mais freqüentes (INCA, 2007).

As mudanças sócio-demográficas na população feminina envolvendo paridade atualmente menor, idade da primeira gestação mais tardia, amamentação por períodos mais curtos, idade da menarca mais precoce, dieta rica em gordura, maior exposição ao alcoolismo e sedentarismo estão implicadas no aumento das taxas de incidência do câncer de mama. Por outro lado, ter filhos antes dos 30 anos, alimentar-se com dieta rica em vegetais e pobre em gordura animal, uso de terapia de reposição hormonal em períodos curtos de quatro anos ou menos, atividade física freqüente, e evitar o tabagismo e o alcoolismo levam a uma diminuição do risco de desenvolver câncer de mama (WISINTAINER, 2006).

No Brasil estes fatores entre outros foram amplamente analisados em uma população de 520 brasileiras de baixa renda, usuárias do Programa Saúde Família na cidade de Teresópolis (RJ). Entre todos os fatores epidemiológicos pesquisados o que apresentou correlação mais forte com o risco de desenvolvimento do câncer de mama foi o antecedente familiar (PINHO, 2007).

Os avanços alcançados na detecção e tratamento precoce do câncer de mama vêm demonstrando melhora nas taxas de mortalidade. Em países onde existe uma política de implantação de programa de rastreamento através da mamografia as taxas de mortalidade têm declinado. Nos EUA 60% dos casos de câncer de mama são diagnosticados com diâmetro inferior a 2 cm. O incremento na capacidade de diagnóstico dessa patologia em mulheres assintomáticas através da mamografia representa um grande avanço na detecção precoce e perspectiva de maior eficácia de tratamento em tumores mamários nos países desenvolvidos. (EISENBERG, 2004)

A incidência do câncer de mama feminino para todos os grupos étnicos, nos E.U.A. aumentou cerca de 3,8 % por ano entre 1980 e 1987, permanecendo estável

até 1998. Este aumento no número de casos detectados deveu-se também ao uso da mamografia, que provocou um “surto” de detecção nesse período. A taxa de mortalidade passou a diminuir anualmente: 1,6% de 1989 a 1995 e 3,4% ao ano desde então. A diminuição da mortalidade a partir da década de 80 entre mulheres americanas é um benefício atribuído aos programas de rastreamento mamográfico, embora devam ser considerados os progressos alcançados no tratamento desses carcinomas (Wisintainer, 2006).

Distintamente ao observado nos E.U.A., a mortalidade no Brasil vem aumentando significativamente nas duas últimas décadas. O aumento percentual das taxas brutas de mortalidade está em torno de 70%, ampliando-se de 5,77 em 1979 para 10 por 100 mil mulheres no ano de 2000 (EISENBERG,2004). Para 2008 estima-se a taxa bruta de 15,62 por 100 mil (INCA, 2007).

O diagnóstico de câncer de mama no Brasil ocorre mais comumente nos estádios mais avançados III e IV que costumam qualificar a apresentação de até 60% dos casos identificados. O predomínio de diagnósticos avançados evidencia a dificuldade de acesso ao exame clínico das mamas e à mamografia entre as mulheres brasileiras (WISINTAINER, 2006).

Encontra-se em fase de implantação pelo Ministério da Saúde, através do INCA, o Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama que pretende rastrear pelo menos bienalmente mulheres entre 50 e 69 anos e submeter ao exame clínico anual das mamas mulheres entre 40 a 49 anos. O exame clínico da mama como parte do atendimento integral à saúde da mulher deve ser realizado em todas as pacientes que procurem o serviço de saúde, independente da faixa etária e do motivo da consulta. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama (p.ex. com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau) recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente a partir de 35 anos de idade (INCA,2007).

Embora seja considerado um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil. Isto porque a doença é diagnosticada frequentemente em

estádios avançados. Para a reversão deste quadro é necessária a adoção eficaz de um programa nacional de rastreamento mamográfico (INCA, 2007).

2.1.1 O CÂNCER DE MAMA NO DISTRITO FEDERAL E EM SOBRADINHO

Quanto à incidência do câncer de mama a partir dos Registros de Câncer de Base Populacional, os dados do INCA para 2008 apontam, no Distrito Federal, uma taxa estimada de 51,11 para 100.000 mulheres (INCA,2007).

Segundo o Relatório 2005 - Síntese de Informações Sócio-econômicas - a população no Distrito Federal naquele ano alcançou o número de 2.333.108 habitantes, com estimativa de 146.493 habitantes para a cidade de Sobradinho.

O Hospital Regional de Sobradinho é unidade da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, onde ocorreu o presente levantamento.

Esta unidade hospitalar responsabiliza-se entre várias ações, pelo atendimento à população feminina da cidade de Sobradinho. Segundo dados oficiais do Governo do Distrito Federal a cidade de Sobradinho acolhe uma população de 69.516 mulheres dentre as quais 35.351,287 com idade superior a 25 anos em faixa etária de risco para desenvolver doenças de mama nessa localidade. Esta é a população alvo nas ações de prevenção e tratamento da patologia mamária. (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL, 2005)

2.2 ANGIOGÊNESE

Em organismos adultos a formação de vasos sanguíneos a partir da rede vascular pré-existente é denominada angiogênese e depende da proliferação de células como os angioblastos nos tecidos periféricos ou das células progenitoras endoteliais provenientes da medula óssea (BERGERS,2003).

Na embriogênese os sistemas hematopoiético e vascular têm uma origem comum a partir de seu precursor o hemangioblasto, célula-tronco capaz de gerar células hematopoiéticas e angioblastos, estes últimos precursores do sistema vascular.

Os angioblastos proliferam e migram para sítios anatômicos periféricos formando uma rede primitiva de vasos sanguíneos que se alargam e interconectam em um processo de remodelação. Ao se diferenciarem passam a formar veias, artérias e vasos linfáticos maduros ricos em células endoteliais. Este processo ocorrido na fase embrionária é denominado angiogênese. A vascularização é geralmente quiescente no organismo adulto e as células endoteliais estão entre as mais longevas células do corpo humano, antecedidas apenas pelas células do sistema nervoso. Sua renovação (*turnover*) é lenta, é medido em anos nos tecidos que não requerem angiogênese contínua como é o caso do trato genital feminino (CARMELIET, 2000; FOLKMAN, 2006).

A angiogênese inicia-se a partir de vasodilatação induzida pelo óxido nítrico em situações de baixa tensão de oxigênio. Frente à queda da tensão tecidual de oxigênio, uma bateria de genes é ativada para a transcrição de mediadores HIF's (*fatores de transcrição induzidos por hipóxia*). Por ação dos HIF's inicia-se a síntese do VEGF entre outras proteínas igualmente capazes de estimular as células endoteliais. Sob estímulo do VEGF formam-se fenestrações na rede capilar e a permeabilidade vascular aumenta. (PUGH, 2003).

Passa a ocorrer extravasamento de proteínas, que servirão de substrato para células endoteliais em migração. Nesta matriz provisória formam-se cordões endoteliais sólidos que irão adquirir lúmen e se fundir a vasos preexistentes permitindo o aumento de seu comprimento e largura. Na vida adulta, as células progenitoras endoteliais (EPC's) podem ser recrutadas nos tecidos para iniciar a angiogênese em processos de reparo tissular, em situações de cicatrização de ferida, revascularização de órgãos isquemiados e também na reendotelização de implantes vasculares. Neste cenário as células endoteliais precursoras (EPC's) são mobilizadas a partir da medula óssea pelo VEGF, PlGF (fator de crescimento placentário) ou pela ANG1(angiopoetina-1) (DE CASTRO, 2006; BROWN, 1999).

A apoptose endotelial é mecanismo natural de regressão vascular encontrado em tecidos normais como o ovário, as cicatrizes em geral e na retina. É efeito freqüente dos inibidores de angiogênese na rede vascular dos tumores. É induzida pela privação de nutrientes ou de sinais biofísicos. A apoptose possivelmente decorre de uma mudança do perfil genético angiogênico que interrompe a comunicação celular com as macromoléculas da matriz. Em situações particulares o aporte excessivo de oxigênio pode resultar em estresse oxidativo e formação de radicais livres deletérios aos tecidos. Por isso a apoptose desempenha um papel adaptativo importante na sobrevivência dos tumores e das cicatrizes em geral (CARMELIET, 2000).

Comparativamente na angiogênese fisiológica os vasos recém-formados tornam-se estáveis e maduros e deixam de se multiplicar rapidamente, para adquirirem as características próprias da microcirculação do órgão envolvido, o que não acontece na angiogênese tumoral (DE CASTRO, 2006).

2.2.1 Breve Histórico e Definições

Em 1927, Warren Lewis na Universidade *John Hopkins* (FERRARA, 2002) descreveu em detalhes a vascularização de diversos tumores em ratos, concluindo que o ambiente do tumor tinha uma influência significativa no desenvolvimento e nas características de concentração e tortuosidade de vasos sangüíneos.

A existência de fatores angiogênicos foi postulada a partir dos trabalhos de Gordon Ide em 1939 na Universidade de Rochester quando este autor demonstrou intensa formação vascular induzida por um fragmento de tumor testicular de coelho, “epitelioma” transplantado de seu sítio primário para câmara da orelha da cobaia.

Neste estudo foi observada por transparência a rápida formação de uma trama vascular *in vivo*, e na seqüência o crescimento do tumor implantado. A partir desta observação o autor foi o primeiro a atribuir o fenômeno angiogênico à presença de algum fator sintetizado pelo tumor que fosse capaz de induzir a neoformação vascular (IDE, 1939).

Alguire (1945), no Instituto Nacional do Câncer-EUA utilizou a técnica descrita por Gordon, adaptada para câmara anterior da orelha de ratos. Pela primeira vez realizou-se uma abordagem quantitativa do crescimento vascular dada pela contagem diária de vasos neoformados e suas correlações com o volume tumoral. A equipe de Glenn Alguire concluiu que o rápido crescimento tumoral dependia diretamente do desenvolvimento de rico suprimento vascular.

Judah Folkman e equipe (1971) cunharam o termo angiogênese para nomear o processo complexo em que são formados novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente. Os autores propuseram-se a isolar um Fator de Angiogênese Tumoral (neste trabalho denominado TAF) de tumores humanos e de animais. O fator mostrava-se capaz de promover angiogênese em um modelo experimental com ratos. Também demonstraram que células tumorais em cultura possuíam a atividade-TAF com habilidade de promover crescimento de novos vasos. Surge pela primeira vez na literatura a dedução de que o TAF fosse um elemento produzido pelas células tumorais e que a sua inativação poderia ter grandes aplicações terapêuticas.

Senger e cols.(1983 *apud* FERRARA, 2002) descreveram a purificação parcial de uma proteína capaz de induzir permeabilidade vascular em pele de porco da guiné. Esta proteína foi nomeada fator de permeabilidade vascular (VPF) e foi apresentada como reguladora específica de permeabilidade de vasos sanguíneos do tumor.

Em 1989, Ferrara e Henzel [lo] e Ploiet e cols., (FERRARA, 2002) informaram a purificação e seqüenciamento de um mitógeno de célula endotelial específico que chamaram, respectivamente, Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e vasculotropina (VPF). Estudos subseqüentes demonstraram que as atividades de VEGF e VPF estavam incorporadas pela mesma molécula. Sendo sinônimos o termo VEGF passou a ser o mais empregado na literatura.

Muito citado o estudo de Dvorak (1986) que comparou o estroma de cicatrizes com o de tumores e pontificou “*Tumores são feridas que não cicatrizam*” referindo-se à capacidade dos tumores de mimetizar a cicatrização e manter um rico estroma vascular em seu território para garantir seu crescimento

No final da década de 80 o VEGF estava definido como fator potente para a proliferação vascular, difusível e específico para células do endotélio. Essas definições conduziram à hipótese que esta molécula desempenhasse papel sem igual na regulação do crescimento vascular, fosse fisiológica ou patológica (FERRARA, 1997).

O conceito da ativação angiogênica "*Angiogenic switch*", surgiu a partir de Folkman (1991), para descrever o processo dinâmico e complexo regulado pela interação de moléculas de ação angiogênicas e anti-angiogênicas que resulta na aquisição de um fenótipo angiogênico a partir do qual o desenvolvimento tumoral é viável.

Gasparini (1994) demonstrou que a densidade de microvasos tumorais era preditor de metástases mais significativa no câncer de mama, quando comparado a outros fatores como p53 e c-erbB2. Assim deu início a uma série de pesquisas sobre o papel da angiogênese como fator de prognóstico no câncer de mama. Estes trabalhos serão descritos na seção 2.2.4-Técnicas de Investigação da Angiogênese.

2.2.2 Angiogênese em Território Tumoral

A angiogênese é essencial à sobrevivência de tumores. Apesar das anormalidades genéticas que promovem o crescimento tumoral, a sobrevivência das células neoplásicas agrupadas em formações sólidas não seria possível a partir do diâmetro de 1mm^3 não fosse a ativação angiogênica. A exígua medida de 1mm^3 , representa a distância máxima através da qual oxigênio e nutrientes podem ser oferecidos por simples difusão nos tecidos, dispensando a irrigação de vasos sangüíneos próprios. Além deste tamanho, na ausência de vascularização neoformada, o tumor deixa de aumentar e ocorre morte celular induzida pela hipóxia e pela formação de óxido nítrico (FOLKMAN, 1990; KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2004; GASPARINI, 2000). Essa transição é conhecida como 'ativação angiogênica'. Quando o tumor ultrapassa essa fase, novos vasos são formados continuamente. A hipóxia em áreas necróticas do tumor é um estímulo permanente para o crescimento da vascularização (BROWN, 1999; FOLKMAN, 2006).

A maior parte dos carcinomas iniciam seu desenvolvimento a partir de pequenos nódulos avasculares equilibrados entre a proliferação e apoptose até iniciarem a ativação angiogênica. O déficit na tensão tecidual de oxigênio e a conseqüente liberação de óxido nítrico suscitam a ativação de genes para a transcrição de VEGF (HICKLIN, 2005).

O VEGF é um dos mais potentes indutores de permeabilidade vascular sendo 50.000 vezes mais potente que a histamina. Sua síntese e liberação resulta em vasodilatação na rede vascular mais próxima. A permeabilidade vascular aumenta a partir da formação de fenestrações nesta rede capilar que possibilita a fuga de macromoléculas, proteínas e diversos fatores que retardam a absorção do edema intersticial e transformam um estroma normalmente antiangiogênico em um ambiente pró-angiogênico (HICKLIN, 2005).

Roberts e cols. sugeriram que VEGF é o fator responsável pela formação de fenestrações entre as células endoteliais. Demonstraram que a partir da administração tópica de VEGF ocorre o surgimento de fenestrações do endotélio de pequenas vênulas e capilares mesmo em regiões em que normalmente o endotélio não apresenta tais fenestras (ROBERTS, 1995).

Dvorak e cols. (1986) propuseram que o aumento da permeabilidade vascular é um passo essencial na angiogênese associada tanto ao desenvolvimento tumoral quanto à cicatrização de feridas. De acordo com esses autores a ação do VEGF induz aumento da permeabilidade e fuga de proteínas plasmáticas, formando assim um gel extra-vascular de fibrina rico em mediadores que facilitam o desenvolvimento de células tumorais e endoteliais.

A capacidade de produção de VEGF, PIGF e ANG-1 pelas células neoplásicas influencia a vascularização normal do hospedeiro e é essencial à sobrevivência do tumor (BERGERS, 2002).

A indução do aumento de condutividade hidráulica de microvasos isolados é mediada por influxo de cálcio. Bates (2002) demonstrou que o efeito de incremento na condução de fluidos é mediado por aumento do influxo de cálcio através da membrana plasmática possivelmente decorrente da ativação da oxido nítrico

sintetase (NOS) e pelo próprio VEGF, já que inibidores da NOS bloqueiam a permeabilidade vascular em processos crônicos e agudos mediados por VEGF.

A membrana basal vascular e a matriz extracelular são degradadas por enzimas proteolíticas como as metaloproteinases e ocorre ativação da via de plasminogênio no local. Este fenômeno parece influenciar a migração de células endoteliais subjacentes para o espaço perivascular. Sob estímulo quimiotático elas se multiplicam e se agrupam formando colunas ou tubos de células endoteliais. É o VEGF que induz a atividade de várias enzimas e proteínas envolvidas no processo de degradação da membrana basal (BERGERS, 2003).

O crescimento vascular no ambiente tumoral passa a ser constante, o que é atribuído por Bergers (2003) à perda do balanço apropriado entre fatores pró e anti-angiogênicos. Como reflexo deste desequilíbrio a vasculatura tumoral tem características particulares em relação à forma, dilatação, tortuosidade e a ocorrência, freqüente, de terminações em fundo cego. Os novos vasos em torno do tumor não chegam a se organizar em vênulas, arteríolas e capilares, possuem fluxo caótico e lento, são frágeis e tendem a sangrar facilmente, por influência da super produção de VEGF. Em tecidos normais, contrariamente, a densidade de vasos é controlada dinamicamente pelas necessidades metabólicas de nutrientes e de oxigênio. Segundo a autora as anormalidades estruturais e funcionais refletem sua natureza patológica e o desequilíbrio na expressão e função dos fatores angiogênicos.

Neste conjunto anômalo de veias, artérias e vasos linfáticos, a maturação se completa com a formação de um lúmen. Quando o lúmen se alarga, células perivasculares são atraídas e uma nova lâmina basal vascular é formada à sua volta. Ao final deste processo o tecido tumoral passa a contar com uma rede vascular própria capaz de prover adequadamente suas necessidades. Na estrutura vascular normal a associação de pericitos às células endoteliais reduz sua proliferação e diminui a sensibilidade do novo endotélio a produção endógena de VEGF. Em tumores esta associação celular é menos freqüente o que pode explicar ao menos em parte o diâmetro anormal dos vasos tumorais e sua sensibilidade na resposta a agentes anti-VEGF (BERGERS, 2003).

As células endoteliais recém formadas à volta de um tumor sólido são, provavelmente, o grupo mais ativo biologicamente entre as células de seu estroma e chegam a representar 25% do global da massa tumoral. Estas células promovem a secreção de várias substâncias de ação angiogênica além do VEGF, por exemplo, o Fator de crescimento insulina-*simile* (IGF-1), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e o Fator de crescimento placentário (PIGF). Todos estes fatores são capazes de desencadear séries de eventos que envolvem a formação de rede capilar peritumoral. Contudo VEGF é o fator mais ubíquo e eficaz. O primeiro sinal da iniciação angiogênica é a superexpressão de receptores específicos para VEGF seguido de sua síntese, e do estímulo à secreção de integrinas α e β . Estas integrinas atuam como receptores para fragmentos de fibronectina e outros componentes da matriz extra-celular degradada como as efrinas que vão definir o sentido da diferenciação vascular se venosa ou arterial (GASPARINI, 2001).

A cicloxigenase 2 (COX 2), que tem sua produção estimulada por FGF-básico, sintetiza prostaglandina E2 que, por sua vez, estimula a angiogênese e inibe o plasminogênio 1 (PAI-1). Finalmente para permitir a ligação da nova rede vascular com a rede pré-existente entram em ação as E-caderinas e as integrinas α e β que promovem a adesão molecular (GRAÇA, 2004).

As células progenitoras endoteliais (EPC's) podem ser recrutadas da medula óssea para compor a formação de novos vasos em território tumoral, contudo a participação na neovascularização de tumores se dá predominantemente a partir dos angioblastos locais. O equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos irá definir o resultado no fenômeno da angiogênese em um cenário parcialmente desconhecido, no qual ocorre a ativação angiogênica (BROWN, 1999 FOLKMAN, 2003).

O VEGF é produzido tanto pelas células tumorais quanto pelas células endoteliais próximas. Áreas de hipóxia e necrose tumoral funcionam com estímulo permanente à angiogênese garantindo o aporte nutricional necessário e oferecendo via de acesso para que células tumorais possam atingir a circulação do hospedeiro e migrar para outros tecidos distantes na formação das metástases. (BERGERS, 2003)

2.2.3 Angiogênese em outras Patologias

A angiogênese está envolvida na patogênese de várias outras doenças incluindo retinopias proliferativas, degeneração macular e artrite reumatóide. Nas retinopias e degeneração macular os vasos neoformados podem causar descolamento retiniano e danos irreversíveis à mácula capazes de ocasionar cegueira. VEGF encontra-se aumentado nos humores vítreo e aquoso de pacientes portadores de retinopia proliferativa. Várias séries demonstraram correlação entre o nível de VEGF e a instalação de retinopia proliferativa, associada ao Diabetes, na oclusão da veia retiniana central e na prematuridade. A neovascularização decorrente das injúrias é a maior causa de perda visual senil relacionada à degeneração macular. Estudos recentes comprovaram por imuno-histoquímica a localização de VEGF na membrana coróide de pacientes com degeneração macular (FERRARA, 1999).

Em pacientes com artrite reumatóide ocorrem níveis elevados de VEGF no fluido sinovial o que também sugere alguma participação do VEGF na patogênese da doença já que não foi observado a mesma ocorrência em pacientes com outras formas de artrite ou degeneração articular (FERRARA 1999).

2.2.4 Técnicas de Investigação da Angiogênese

A pesquisa da angiogênese atualmente representa um campo de investigação de grande importância clínica. A proliferação descontrolada de células endoteliais tem papel relevante na fisiopatologia de diversas doenças não neoplásicas, contudo a doença que apresenta a maior dependência da angiogênese em seu desenvolvimento é o câncer. Srivastava, segundo Gasparini, foi o primeiro pesquisador a utilizar a imuno-histoquímica para avaliar a vascularização em uma série de melanomas primários.(GASPARINI, 2000)

2.2.4.1 Densidade de Microvasos

A técnica mais empregada para estimar a vascularização em tumores de mama foi desenvolvida por Weidner e consiste no uso do marcador pan endotelial, anti-fator VIII, utilizando o método da imuno-histoquímica, para a identificação e contagem de microvasos. A contagem de microvasos vai caracterizar a densidade de microvasos intratumoral (DMV). O primeiro passo é a identificação da área de maior neovascularização chamada pelo autor de “*hot-spot*” vascular. Após identificação da área de mais alta neovascularização, micro-vasos individuais foram contados com o aumento de 200x (objetiva de 20x, o que corresponde à área de 0,7386 mm² por campo) e com o aumento de 400x (objetiva de 40x, o que corresponde à área de 0,1885 mm² por campo). Toda célula endotelial ou aglomerado separado de microvaso adjacente ou outro elemento estromal é considerado como um microvaso contável. Não é necessária a identificação de lúmen vascular. Cada contagem vai expressar o número de microvasos identificados no *hot-spot* (WEIDNER, 1995).

O mesmo autor publicou os resultados da análise de uma série prospectiva de 165 pacientes na qual a densidade de microvasos intratumoral foi comparada com o tempo livre de doença. Encontrou-se uma correlação muito significativa entre estas variáveis. Assim o autor foi o primeiro a atribuir à densidade de microvasos um papel importante como indicador prognóstico do câncer de mama (WEIDNER, 1992).

Kato apresentou dados do acompanhamento de 377 pacientes de câncer de mama, que indicaram que a densidade de microvasos, o *status* linfonodal, o grau histológico e o diâmetro do tumor foram significantes quanto ao prognóstico para 20 anos de seguimento em pacientes japonesas portadoras do carcinoma ductal tanto no intervalo livre de doença, quanto na sobrevivência global. O impacto foi mais significativo nos carcinomas T2 e T3, sendo menor nos tumores T1. A densidade foi o mais poderoso fator independente de prognóstico no grupo axila-negativa, concluindo que a angiogênese é um fator preditivo para o câncer de mama entre mulheres japonesas (KATO, 2001).

Em seu estudo, Axelsson (1995), usando anti-fator VIII, avaliou a densidade de microvasos como fator preditivo da sobrevida livre de doença em 386 mulheres tratadas para carcinoma ductal de mama. Nesta análise o referido autor não encontrou correlação entre a densidade vascular e sobrevida livre de doença, mas observou grande variabilidade na distribuição de vasos em um mesmo tumor, e subjetividade na análise entre observadores.

Outras técnicas de avaliação da vascularização tumoral foram criadas como o método de Chalkley, assim denominado em homenagem ao pesquisador que criou uma gradícula na ocular no microscópio que contém 25 círculos randomicamente distribuídos. detalhadamente descritos por Vermeulen e cols. (1996). Os autores propuseram metodologia e critérios de avaliação segundo os quais a quantificação da angiogênese pudesse ser confiavelmente mensurada. A gradícula de Chalkley configura uma tentativa de simplificação da metodologia de contagem de vasos. As áreas a serem investigadas são aquelas na secção de tecido em que a reação imuno-histoquímica é mais intensa, denominadas pelos autores como “*hot-spots*”. A gradícula é posicionada de maneira a incluir nos círculos o maior número de *hot-spots* em cada observação. Na contagem ao invés de vasos, o observador conta o número de círculos preenchidos. Persiste como um método observador-dependente no que diz respeito à seleção dos “*hot-spots*” e ainda provoca críticas de subjetividade embora seja este um facilitador na contagem.

Os reagentes CD-31 e CD-34 são marcadores pan-endoteliais, ambos capazes de demarcar as áreas mais ricas em vasos para que se proceda a contagem dos mesmos. CD-31 é capaz de identificar um número maior de vasos que o anti-fator VIII, até um terço a mais, segundo Toi (1993 *apud* GASPARINI, 1995).

Apesar do CD-31 mostrar superioridade para a aplicação em material parafinado, MARTIN (1995 *apud* VERMEULEN, 1996) considera CD-34 mais aplicável à rotina de pesquisa.

Vermeulen e cols. (1996) também mencionam o uso de técnicas computadorizadas para análise de imagem, o CIAS, sistema de análise de imagem computadorizado, é usado com o objetivo de minimizar a subjetividade da avaliação quantitativa pela contagem dos vasos. Utiliza sistemas dotados de recursos

multiparamétricos que permitem analisar a área vascular e o perímetro de vasos. O programa é incapaz de perceber a intensidade da coloração.

Os Autores esclarecem que a contagem por este método é demasiado demorada, embora represente a perspectiva de padronização do método de contagem de microvasos corados pela imuno-histoquímica. O grau de subjetividade relacionado à seleção do *hot spot* é considerado aceitável por estes Autores.

Ao incluir os estudos de análise multivariada, Linderholm relata que mais de 85% dos autores reconheceram a densidade intratumoral de microvasos (DMV) como uma variável prognóstica independente, apesar de não oferecer informação sobre o padrão molecular envolvido na atividade angiogênica de cada tumor (LINDERHOLM, 1998).

Gasparini (2001) revisou retrospectivamente 43 trabalhos publicados sobre prognóstico da densidade de microvasos intratumoral (DMV) e o câncer de mama totalizando 7.202 tumores avaliados. Não se trata de verdadeira meta-análise, pois estes trabalhos observaram pacientes de diferentes nacionalidades, em diferentes estadiamentos submetidas a esquemas terapêuticos distintos e com características clínicas variadas. Entretanto este estudo revela que mais de 75% dos autores demonstraram uma associação positiva entre o prognóstico clínico e a densidade intratumoral de microvasos (DMV).

Fitzgibbons e cols.(2000) em publicação de consenso do *College of American Pathologists*, consideram a densidade de microvasos um fator prognóstico fraco, classificado-a em categoria III. Os autores enumeram como variáveis que comprometem a análise da densidade vascular: a seleção variável do anticorpo (CD-31; CD-34; fator VIII); as diferentes técnicas de fixação; método de contagem de vasos variável (contagem em um *hot spot* ou média da contagem em três *hot spots*); variação de interpretação entre observadores; experiência do observador; variação biológica e a definição de positividade e da heterogeneidade de imunomarcagem.

Em revisão publicada em 2002 Hlatky, afirma que apesar sua importância como indicador prognóstico a densidade de microvasos não se mostra válida para prever resposta ou avaliar a eficácia de um tratamento anti-angiogênico (HLATKY,2002).

2.2.4.2 Métodos imuno-histoquímicos para determinação do VEGF e seu significado clínico:

Toi, em 1994, desenvolveu um anticorpo anti-VEGF e aplicando-o no estudo de tumores sugeriu ser um método altamente específico e sensível. Em seguida Gasparini buscou detectar o VEGF no citossol congelado de amostras de carcinoma mamário, rotineiramente usadas, para a determinação de receptores hormonais. Seguiram-se três publicações do mesmo autor que demonstraram valor prognóstico significativo entre VEGF e pacientes portadoras de câncer de mama (Toi,1995; 1996; 1997).

Os estudos envolvendo a detecção de VEGF no plasma, no sangue e na urina de portadoras de câncer de mama, mostraram por ensaio imunoenzimático, uma significância pequena. A mensuração de VEGF no soro inclui inevitavelmente a fração plaquetária de VEGF, já o plasma apresenta concentrações menores devido a ausência nele das plaquetas.(HARMEY,2004)

Gasparini (2001) considera que ainda não há um método que *per si* ofereça informação confiável sobre a atividade angiogênica. Contudo o advento da terapia antiangiogênica serve de estímulo a novas investigações.

Turley (1998) apresentou um anticorpo monoclonal capaz de reagir com VEGF em material fixado sendo específico e sensível. Este anticorpo, denominado VG1, detecta as isoformas 121, 165 e 189 de VEGF. Seus resultados foram comparáveis aos resultados de outros estudos utilizando hibridização *in situ* e imuno-histoquímica com anti-soro policlonal, provando assim sua aplicabilidade em estudos sobre a angiogênese em neoplasias e em outras patologias.

Nessa revisão dois outros estudos usando anticorpo VG1 foram identificados: para avaliação prognóstica de carcinoma de endométrio (GIATROMANOLAKI, 2001) e na doença de Hodgkin (DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU, 2002).

2.3 A FAMÍLIA VEGF: ASPECTOS BIOFÍSICOS, FUNÇÕES E PROPRIEDADES

VEGF (referido também como VEGF A) pertence a uma família de genes que inclui o fator de crescimento placentário, VEGF-B, VEGF-C e VEGF D.

O fracionamento do éxon de VEGF humano gera pelo menos seis espécies moleculares diferentes que formam a família de genes, que inclui: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário.

VEGF-A é o regulador-chave do crescimento vascular fisiológico e patológico, é o membro protótipo dessa família e está organizado em oito éxons separados por sete introns, codificando uma região de aproximadamente 14 kilobases localizando-se no cromossomo 6p21.3. Trata-se de uma glicoproteína homodimérica de 45kD, ligante de heparina.(HARMEY, 2003). Um éxon alternativo pode gerar as seis isoformas diferentes de VEGF-A que possuem respectivamente 121, 145, 165, 183, 189, e 206 aminoácidos seguindo a seqüência de clivagem - VEGF121, VEGF145, VEGF 183, VEGF 165, VEGF 189, VEGF 206 - (DE CASTRO, 2006).

VEGF - C e D regulam a angiogênese linfática. A perda do gene VEGF-B se expressa em células endoteliais e afeta a função coronariana após a sua oclusão (HARMEY, 2003).

Voltando ao VEGF-A, o VEGF-165 é sua isoforma mais freqüente e pode ser produzido por células normais e neoplásicas. Liga-se fortemente à heparina.

VEGF121 é um polipeptídeo ácido fraco que falha na ligação com a heparina, sendo livremente difusível.

VEGF-189 e VEGF-206 são mais básicos e tem grande afinidade na ligação com a heparina sendo mais intensa que a afinidade de VEGF-165.

VEGF-121, VEGF-189 e VEGF-206 são quase completamente retirados na matriz extracelular. Entre as seis isoformas de VEGF, aquelas que são solúveis são mais ativas biologicamente na promoção da neovascularização (FERRARA, 1999).

VEGF é um regulador fundamental da angiogênese normal e patológica, participa da vasculogênese e angiogênese embrionária, da proliferação cíclica de vasos sanguíneos do trato reprodutor no ciclo menstrual, do crescimento longitudinal

do osso e da formação endocondral e na cicatrização de feridas. Na angiogênese patológica o emprego de anticorpos anti-VEGF e outros inibidores específicos podem bloquear o desenvolvimento de tumores em cobaias (FERRARA, 1999).

Sua presença está aumentada nos humores vítreo e aquoso de pacientes com retinopatia proliferativa e degeneração macular senil. VEGF também foi caracterizado como um mediador fundamental de neovascularização associada a desordens intra-oculares como a degeneração macular (FERRARA, 2006).

VEGF promove crescimento vascular a partir de células endoteliais derivadas de artérias, veias e linfáticos. Tem a propriedade de ser um potente mitógeno e quimiotático para o endotélio vascular e sobre outros tipos celulares, induz poderosa resposta angiogênica em diversos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (DE CASTRO, 2006).

Os sítios de alta afinidade de VEGF estão localizados no endotélio vascular de grandes e pequenos vasos. A perda de um único alelo de VEGF resulta em vascularização defeituosa e morte embrionária em gestações iniciais o que aponta para a importância deste fator no desenvolvimento do sistema vascular na embriogênese (FERRARA, 2003).

A angiogênese VEGF-induzida demonstra efeito terapêutico em modelos animais de isquemia coronária ou de membros, e também, em humanos afetados por isquemia grave de membros inferiores (FERRARA, 1999).

Jin Kim, Napoleone, Ferrara e cols. descreveram a supressão de tumores *in vivo* a partir da utilização de anticorpos monoclonais anti-VEGF em linhagens celulares de ratos reforçando a idéia de que o crescimento tumoral é angiogênese-dependente. (KIM, 1993)

VEGF exibe também efeitos regulatórios em células sangüíneas, promove ação quimiotática sobre monócitos e induz a formação de colônias de granulócitos-macrófagos. Estas propriedades, possivelmente, decorrem da origem comum entre as células endoteliais e hematopoéticas a partir do hemangioblasto, célula precursora muito rica em receptores para VEGF. (FERRARA, 1999)

VEGF também é capaz de induzir vasodilatação em regime dose-dependente *in vitro* e produz taquicardia e hipotensão transitórias quando injetado sistemicamente, esses efeitos parecem mediados primariamente pelo óxido nítrico derivado de células endoteliais. A vasodilatação pode produzir taquicardia transitória, hipotensão e redução do débito cardíaco experimentalmente em ratos (Bergers, 2002). A angiogênese decorre da interação destas moléculas com outras de ação anti-angiogênicas. A angiostatina está entre as mais importantes. A angiostatina e a endostatina são derivadas respectivamente do plasminogênio e colágeno XVIII. São inibidores naturais da angiogênese capazes de induzir a decadência celular tanto de células endoteliais quanto de células tumorais. Os quadros a seguir enumeram peptídeos de ação pró e anti-angiogênica identificados e seqüenciados, segundo Folkman. (2006)

Peptídeos de Ação Pró-angiogênica

VEGF

Fator de crescimento de fibroblastos ácido e básico (FGF)

Fator de crescimento transformadores α e β

Fator de crescimento epidermal (EGF)

Fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PDGF)

Leptina

Peptídeo PR-39 derivado de macrófagos

Interleucinas 6 e 8

Angiopoietina

Angiogenina

Fator de crescimento placentário (PIGF)

Osteopontina

Proliferina

Eritropoetina recombinante humana

QUADRO 02: Peptídeos de ação pró angiogênica

Peptídeos Inibidores de Angiogênese

Angiostatina

Trombospondina-1

Endostatina

Tumistatina

Interleucina-12

Interferon α

Fator plaquetário-4

Análogo de fumagalina

tetrahydrocortisol

QUADRO 03: Peptídeos Inibidores de Angiogênese

2.3.1 VEGF e Oncogenes

A expressão de certos oncogenes protege o tumor contra a apoptose e incentiva a atividade angiogênica. VEGF induz a expressão de Bcl-2 prevenindo a apoptose e evitando a perda celular no endotélio e no tumor. Bcl-2 é um gene capaz de influenciar a atividade mitocondrial e a permeabilidade da membrana em ações anti-apoptóticas. Trata-se de uma família de 25 genes cuja sigla deriva do linfoma de células B-2 aonde foi primeiramente identificado (FOLKMAN, 2003).

Bcl-2 é capaz de induzir a expressão tumoral de VEGF em tipos histológicos diferentes: mama; próstata; ovário; cólon; pulmão; melanoma e linfoma de células B. Este gene pode ser identificado em níveis elevados em todos estes tipos histológicos e desempenhar papéis biologicamente distintos na progressão tumoral e na quimio-resistência destes tumores (FERRARA, 2004).

Proto-c-met, também conhecido como fator de dispersão (*“scatter factor”*), inibe a trombospondina-1 (de ação inibitória) e promove neovascularização e progressão tumoral (FERRARA, 2004).

Outros oncogenes como, *ras*, *fos*, *HER-2/neu*, *Src* e *raf* estimulam VEGF e incrementam a angiogênese. Em contraste, alguns genes de supressão tumoral bloqueiam a angiogênese. O p53 é um gene multifuncional que opera como um fator de transcrição envolvendo o ponto de checagem do ciclo celular e a apoptose. O p53 aumenta a expressão da trombospondina-1 incrementando suas ações antiangiogênicas. Note-se que mais de 50% dos cânceres em humanos possuem mutações em p53, a mutação inativa o gene supressor e pode afetar o equilíbrio angiogênico facilitando a neovascularização (HARMEY, 2003).

Kerbel (2002 *apud* BERGERS e cols., 2003), afirmou que células cancerosas com mutação em p53 são selecionadas pela habilidade de sobreviver em condições de hipóxia. A mutação de p53 altera o gene e provoca resistência à apoptose. As células portadoras desta mutação mostram uma infra-regulação na expressão de TSP-1, um estado de refratariedade, e uma supra-regulação na expressão do VEGF. O autor afirma que a ação normal de p53 não mutado é inibir a transcrição de VEGF.

Existem vias comuns entre a angiogênese e a apoptose, por exemplo, BRAF - gene envolvido no controle da apoptose - é um fator de mediação importante para a vasculogênese e angiogênese. Este gene codifica a RAS-quinase reguladora que media o crescimento celular e a transformação maligna pela ativação da via das quinases (HARMEY, 2003).

A perfeita compreensão dos mecanismos de angiogênese abre um grande rol de possibilidades terapêuticas ao explorar os agentes que são pró-angiogênicos, por exemplo, em doenças de patogenia isquêmica e aqueles de ação antiangiogênica bloqueando a angiogênese patológica (FOLKMAN, 2006).

2.3.2 Regulação e Expressão do Gene VEGF

A expressão de VEGF pode ser induzida pela hipóxia, genes supressores alterados, interleucina, fatores de crescimento como IGF1 (*insulin growth factor*) e progestinas sob condições experimentais. A expressão deste gene será induzida em variadas condições fisiopatológicas, mas em todas elas a pressão de oxigênio nos tecidos tem o papel principal (FERRARA, 2003).

O mRNA-VEGF é induzido pela exposição à baixa pO_2 tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em tumores com grande componente necrótico o mRNA de VEGF é expresso fortemente em células isquemiadas do tumor que estão justapostas à área de necrose. Está bem estabelecido na literatura que estados de hipóxia induzem o HIF1 (Fator Induzido pela Hipóxia 1) ou um homólogo capaz de translocar-se ao núcleo celular e se ligar a promotores específicos que desencadeiam a transcrição de genes hipóxia-induzidos envolvidos na angiogênese como VEGF, PDGF-beta, e mesmo a eritropoetina.

A inativação de HIF-1 resulta em morte celular e parada de desenvolvimento, em embriões. Foi observado defeito de tubo neural, malformação vascular e acentuada perda celular. Na presença de oxigênio HIF se liga à proteína VHL-p (*Von Hippel-Lindau protein*) hidroxilada e se degrada rapidamente através da ativação da via proteasoma-ubiquitina. Estas observações sugerem ser HIF-1 a chave reguladora da homeostase celular de O_2 (YANCOPOULOS, 2007).

Segundo Ryan e cols.. (1998 *apud* GASPARINI, 1999) a inativação do HIF-1 α leva ao rápido decréscimo da tumorigênese.

2.3.2 Receptores de VEGF

As proteínas solúveis de VEGF se ligam a dois receptores específicos de tirosina quinases: VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2(Flk-1/KDR) estes receptores se expressam comumente na superfície celular de células endoteliais células e em células originadas na medula óssea. Ambos os receptores possuem sete domínios tipo-imunoglobulinas extracelulares. Além disso, as neuropilinas 1 e 2 (NRPs) têm sido apontadas como co-receptores para VEGF. A maioria dos efeitos do VEGF-A é mediada pelo VEGFR-2 (FERRARA,1999).

Estudos em auto-radiografia de ligantes *in situ* em tecidos adulto e fetal de ratos têm demonstrado a alta afinidade da ligação do VEGF aos sítios localizados no endotélio vascular de grandes e pequenos vasos. A ligação ocorre não apenas em áreas de proliferação, mas, também em células endoteliais quiescentes.

O homólogo murino do KDR e Flk compartilham 85% da seqüência de identidade com o KDR humano. Alguns estudos de mapeamento sugeriram um sitio de ligação para o VEGF ocorra no segundo domínio IgG-símile da Flt e KDR na porção intracelular do receptor. Isto porque a deleção deste domínio abole completamente a ligação com o VEGF e a introdução de um segundo domínio mutante restaura a ligação suprimida (FERRARA, 2003).

Estudos Wiesmann e cols. (1997 *apud* FERRARA 1999) indicaram que dos 7 domínios IgG-símile apenas 2 ou 3 são necessários para a ligação forte do VEGF com o receptor KDR. Solucionaram a estrutura do VEGF/Flt-1 domínio 2. Estes autores mostraram que o segundo domínio tem interação predominantemente hidrofóbica com os pólos do dímero de VEGF. Muitos resíduos especialmente o Asp187 são importantes para manter a integridade do 2º domínio embora não esteja diretamente envolvido na interface do complexo ligante-receptor.

Segundo Park (1994 *apud* FERRARA, 2003) o VEGFR-1 (Flt-1) não seria um receptor primário, função de KDR, mas um descodificador, que induz a síntese de outros fatores de crescimento.

2.3.3 Sinais de Transdução

Os efeitos do VEGF são mediados pela ativação de várias vias de transdução intracelulares que se iniciam após a ligação com o receptor-2. A ativação do receptor-2 de VEGF segue os mesmos passos observados em outros receptores com atividade de tirosinoquinase. Estudos sobre a resposta celular à ativação do receptor-2 do VEGF identificaram, pelo menos, 46 moléculas sinalizadoras que se submetem à fosforilação em resposta à ligação do VEGF ao receptor-2 de VEGF (BATES, 2002)

VEGF tem se mostrado indutor da fosforilação de pelo menos 11 proteínas no endotélio aórtico de bovinos. A fosforilase CY e outras duas proteínas associadas à fosfolipase CY são fosforilados em resposta ao VEGF.

Estudos demonstraram que Flt-1 e KDR têm sinais de transdução diferentes. Há evidências que a proteína HIF-1/tat interage com KDR e esta interação resulta da autofosforilação do receptor e em mitogênese da célula endotelial. Estes achados concordam com outras pesquisas que mostram que PlGF (fator de crescimento placentário) se liga com alta afinidade ao Flt-1, mas não ao complexo Flk-1/KDR, diminui a mitogênese e as propriedades de incremento de permeabilidade ou a capacidade de estimular a fosforilação de tirosina em células endoteliais.

Curiosamente altas concentrações de PlGF que poderiam saturar os sítios de Flt-1 e diminuir a ação de VEGF são capazes de potencializar a atividade de VEGF *in vivo* e *in vitro*.

Possivelmente Flt-1 não é o receptor primário de sinalização, mas um chamariz capaz de regular de forma negativa a atividade de VEGF no endotélio vascular por seqüestro e tradução deste ligante mais raro que o Flk/KDR.

O Flt-1 desempenha possivelmente um papel na angiogênese como molécula ligante mais que como receptor de sinal de transdução, pelo menos dentro dos

critérios convencionais. Tomados em conjunto estes estudos apóiam a hipótese que a interação com Flk-1/KDR é um pressuposto que justifica o largo espectro de respostas biológicas do VEGF.(FERRARA, 2003; FERRARA, 1999)

2.3.4 Regulação da Expressão Gênica de VEGF

A expressão dos receptores Flt-1 e Flk-1/KDR está restrita ao endotélio vascular. A hipóxia tem sido proposta como reguladora da expressão gênica do receptor de VEGF. A exposição à hipóxia aguda ou crônica leva a estímulo pronunciado de ambos os genes de Flt-1 e Flk/KDR em vascularização pulmonar de ratos. A hipóxia aumenta em 50% o número de receptores para VEGF em cultura de células de capilares retinianos bovinos, contudo a expressão de KDR não é induzida. Mostra-se paradoxalmente uma inibição (FERRARA, 1999).

Estudos recentes descobriram o papel de um produto do gene von Hippel-Lindau (VHL), gene de supressão tumoral, nas respostas hipóxia-dependentes do HIF-1. Na síndrome de von Hippel-Lindau o gene está relacionado à presença de hemangioblastomas na retina e no cerebelo e, esporadicamente, carcinoma renal de células claras. Uma função da VHL é regular negativamente o VEGF e outros genes hipóxia-induzidos.

O oxigênio promove a hidroxilação do HIF-1 para um resíduo de prolina que é requisito para a associação com VHL (FERRARA, 2003).

2.3.5 Papel do VEGF na angiogênese patológica

Desde os trabalhos de Alquire em 1951, vários pesquisadores vem se dedicando à identificação e caracterização de fatores envolvidos na angiogênese tumoral. O câncer de mama vem servindo de paradigma para o entendimento da biologia da angiogênese e seus efeitos no desenvolvimento tumoral e no prognóstico de pacientes (FERRARA, 2002).

Weidner (1992), usando anticorpo anti-fator VIII como marcador endotelial, demonstrou uma relação quase linear entre a densidade de microvasos e a ocorrência de metástases no câncer de mama. Pacientes portadoras de tumores

ricos em VEGF tiveram uma resposta pior quanto à sobrevida livre de doença quando comparadas ao grupo que apresentava tumores pobres em VEGF. Assim os estudos sugerem que o estímulo à angiogênese está associado à recidiva precoce em casos de câncer de mama. A mesma correlação foi descrita em pacientes com câncer gástrico.(ADAMS, 2000)

Foi possível demonstrar experimentalmente supressão tumoral em animais tratados com anti-VEGF. O tratamento com anticorpos anti-VEGF resulta em redução tempo-dependente da permeabilidade vascular. Estes efeitos se fazem acompanhar de mudanças morfológicas nos vasos tumorais como redução do diâmetro e da tortuosidade chegando à completa regressão após a administração repetida de anticorpos anti-VEGF (GASPARINI, 2000). Evidência adicional que VEGF é requerido para a angiogênese tumoral é a expressão de um receptor Flk mutante mediada por um retrovirus capaz de inibir o sinal de transdução natural do receptor Flk -1 suprimindo o crescimento do glioblastoma multiforme e outras células tumorais in vitro (FERRARA, 1999).

No caso das neoplasias embora as células tumorais sejam as principais produtoras de VEGF, ocorre também estímulo à produção deste fator nas células estromais de tecidos normais vizinhos (BERGERS, 2003).

2.4 MARCADORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER DE MAMA

Marcadores prognósticos são freqüentemente utilizados para a escolha de estratégias terapêuticas, além de ter um papel relevante no desenho, análise e interpretação de inquéritos clínicos. Fitzgibons (2000), em conferência do Colégio Americano de Patologistas, estratificou os fatores prognósticos estabelecendo categorias que refletem a força de evidências publicadas (FIGURA 04).

Define-se como fator prognóstico qualquer característica do tumor seja clínica, histológica, imuno-histoquímica ou genética e que no momento do diagnóstico ou do tratamento cirúrgico guarde correlação com o tempo livre de doença ou com a sobrevida global na ausência de terapia sistêmica adjuvante. De uma forma geral um fator prognóstico é uma característica da paciente que pode predizer o curso provável da doença e seu efeito final. O resultado individual pode

ser difícil de prever considerando a variação de resposta das pacientes às diversas formas de terapia (Barros AC, 2007).

De acordo com Dahlberg (1992) é útil dividir os fatores prognósticos potenciais em dois tipos: fatores conhecidos antes do início do tratamento (demográficos, estadiamento e histopatologia) e fatores que dependem de informações obtidas a partir do início do tratamento (doses recebidas, esquemas terapêuticos utilizados, tempo de tratamento e resposta).

Quadro de Fatores Prognósticos, segundo Fitzgibbons	
Categoria 1	Estadiamento TNM
	Tipo histológico
	Grau histológico
	Contagem de mitoses
	Status de receptores hormonais
Categoria 2	<i>c-erbB-2</i>
	MIB-1
	Invasão vascular/linfática
	p53
	DNA fração S
Categoria 3	Ploidia de DNA
	Angiogênese tumoral
	Receptor para fator de crescimento epidérmico
	Fator de crescimento transformador α
	Bcl-2, PS2
Catepsina D	

QUADRO 04: Fatores prognósticos segundo Fitzgibbons (2000).

A terapia antilástica sistêmica resulta em grandes vantagens de sobrevida às portadoras de câncer de mama, contudo a toxicidade associada ao tratamento é importante. Recomenda-se a quimioterapia a todas as pacientes do subgrupo axila-positiva, visto que a taxa de recidiva entre elas se aproxima de 70%. As pacientes do subgrupo axila-negativa, sem comprometimento axilar, poderão receber a indicação de quimioterapia na dependência dos fatores prognósticos envolvidos. Por exemplo, em relação ao diâmetro tumoral, 88% dos pacientes com tumores menores

que 1cm têm sobrevida livre de doença por 10 anos. Estas taxas decrescem na medida em que aumente o tamanho tumoral. Quando o tumor mede mais que 1cm, apenas 15% das pacientes axila-negativas irão se beneficiar com a quimioterapia, enquanto 85% podem sobreviver sem a mesma.

Quanto aos fatores preditivos, são elementos que se associam à capacidade de resposta do tumor a uma terapia específica como é o caso do *c-erbB-2* e trastuzumab e VEGF que pode ser bloqueado pelo Bevacizumab. Modernamente a terapia com anticorpos monoclonais tem como alvo estas proteínas e apresenta resultados muito satisfatórios criando mais uma estratégia terapêutica.

Receptores hormonais, *cerbB2* e VEGF constituem exemplos em que a influência destas variáveis pode se dar tanto como fator prognóstico como fator preditivo da resposta ao tratamento (WISINTAINER, 2006; BARROS AC, 2007).

Portanto o conjunto destas variáveis é determinante na escolha da terapêutica e tem contribuído para a melhora dos resultados na sobrevida livre de doença e na diminuição da mortalidade (EISENBERG, 2004). Apresenta-se a seguir alguns estudos que demonstram as relações destes fatores prognósticos com o carcinoma de mama.

Idade:

É muito conhecida a correlação entre idade e o prognóstico do câncer de mama. Esta patologia ocorre mais freqüentemente em torno da quinta década de vida e esta característica se confirma em várias comunidades no mundo.

Além do fator sexo, (o câncer de mama atinge indivíduos do sexo masculino na proporção aproximada de 1:100) é a idade o fator clínico demográfico mais relevante no prognóstico do câncer de mama.

A incidência do câncer de mama cresce rapidamente na faixa etária dos 50 aos 54 anos, coincidindo com a menopausa, onde as taxas são superiores a 200 por 100.000 mulheres; nas faixas etárias seguintes até mesmo entre 60-64 anos o risco praticamente não cresce, voltando a aumentar até taxas de 300 por 100.000 mulheres nas faixas de idade superior a 70 anos (VERONESI, 2002).

Este declínio ocorrido na idade da menopausa é percebido nos gráficos de incidência por idade e é denominado *Clemmensen's hook*. Esta curva etária é típica em países de risco relativo mais baixo e deixou de ser observada em Genebra, segundo um estudo divulgado em 2006, comprovando aumento do risco relativo da população suíça para o desenvolvimento do câncer de mama. Os gráficos ascendentes são característicos de países com as taxas de risco-relativo mais elevadas (SPRATT, 1995). Maior incidência passou a ser observada entre mulheres de 60 a 64 anos e decresce fortemente em mulheres mais velhas. O pico de incidência foi observado apenas com estágio inicial e receptores de estrogênio positivos e exposição à terapia de reposição hormonal (BOUCHARDY, 2006).

Muitos autores estabelecem que, felizmente mais raro, o câncer de mama em mulheres jovens é mais agressivo e de pior prognóstico que em mulheres mais velhas. Sidoni (2003) analisou retrospectivamente uma amostra de 50 pacientes de câncer de mama com idade inferior a 40 anos e confrontou os achados com outro grupo, randomicamente selecionado, com idade superior a 60 anos. No grupo de mulheres jovens a ocorrência de câncer familiar foi mais alta, a média de diâmetro tumoral foi de 2,3 mm maior que a média no grupo mais idoso. A invasão vascular e linfonodal foi mais freqüente no grupo mais jovem.

Ao avaliar um grupo de portadoras com idade inferior a 35 anos, Walker verificou sobrevida livre de doença em 62% dos casos enquanto aquelas com idade superior a 35 a sobrevida foi de 72% (WALKER, 1996).

Daidone (2003) estudou portadoras de câncer de mama com idade superior a 65 anos e demonstrou a tendência de taxa de proliferação mais baixa, menor expressão de p53 e maior expressão de receptores hormonais e discreto aumento de expressão do *c-erb B-2* comparando-se ao grupo mais jovem. Este Autor concluiu que as características biológicas tumorais de ploidia e expressão de *c-erb B-2* e p53 devem ser consideradas nas decisões terapêuticas apesar da consideração geral que estes tumores em mulheres idosas tenham uma evolução mais favorável. O Autor verificou também que o prognóstico foi mais desfavorável nas séries com pacientes muito idosas, com idade superior a 75 anos o que é atribuível ao retardo no tratamento e à escolha de estratégias terapêuticas de menor morbidade, quase sempre justificadas pelo padrão de menor agressividade tumoral nesta faixa etária.

Pacientes portadoras de mutações germinativas de BRCA-1 e BRCA-2 manifestam precocemente o tumor e tem um prognóstico pior, este fator de prognóstico incidirá naturalmente sobre a parcela da amostra com mulheres jovens.

As mulheres de idade inferior a 35 anos têm maior chance de cursar com retardo de diagnóstico, pois o tumor raramente é encontrado pelo médico ao exame clínico e em virtude da elevada densidade mamária pequenos tumores podem igualmente não ser identificados na mamografia. A associação com a gravidez é mais freqüente (17%) que em faixas de idade superior a 35 anos representando uma dificuldade adicional ao diagnóstico (BARROS, 2007).

Os dados quanto à recorrência e óbito pela causa merecem sempre correção segundo o estadiamento e sugerem um prognóstico pior entre as jovens no Brasil (CRIPPA, 2007).

A influência do fator idade é tão relevante que Zavagno (2000) chega a postular que o câncer de mama deve ser considerado como patologias diferentes segundo o critério idade. O autor considera a observação de que vários indicadores de agressividade tumoral se manifestam preferencialmente no grupo mais jovem. O diâmetro tumoral afeta drasticamente o prognóstico do grupo com idade superior a 75 anos sugerindo um ponto de corte acima desta idade bem como aquele já estabelecido na faixa abaixo dos 35 anos.

Raça e nível socioeconômico:

Estudos populacionais impetrados nos Estados Unidos demonstraram que mulheres hispânicas e afro-americanas apresentam pior prognóstico em relação ao câncer de mama tendo em vista o mesmo estadiamento clínico e tratamentos equivalentes. O câncer de mama é mais freqüente entre afro-americanas que entre caucasóides, o estadiamento costuma ser mais tardio e as taxas de sobrevida mais baixas na população negra. Os autores, entretanto, observam que nos E.U.A. a etnia, correlaciona-se com nível socioeconômico e condição de assistência médica, sua avaliação isolada está comprometida por muitos vieses (TAYLOR, 2003).

Nos Estados Unidos são observadas sérias disparidades entre populações delimitadas segundo critérios socioeconômicos, étnicos e culturais. Variações do impacto do câncer de mama entre mulheres vêm sendo observadas segundo a incidência, sobrevivência, e modalidade de tratamento. O autor atribui estas variações à combinação de diversos fatores sociais, culturais, hereditários, de estilo de vida e histórico reprodutivo. A observação mais relevante é que as taxas de mortalidade são particularmente mais elevadas entre mulheres afro-americanas. Embora esta característica venha merecendo maior atenção em publicações médicas atualmente permanece pouco entendida (NEWMAN, 2007).

Status menopausal :

Está bem estabelecida na literatura a correlação entre a função ovariana e o prognóstico do câncer de mama. As pacientes na pós-menopausa desfrutam de prognóstico melhor, ao inverso das pacientes na pré-menopausa cuja função ovariana está preservada. Este fator guarda correlação com o fator idade de maneira direta conforme o apresentado em item anterior, e com a expressão de receptores hormonais para estrogênio e progesterona como descreveremos a seguir. A menopausa tardia é sistematicamente associada a maior risco. A menopausa ocorrida após os 55 anos apresenta o risco duas vezes maior do que quando ocorre em torno de 45 anos (VERONESI, 2002).

Índice de massa corporal:

Considera-se que a obesidade esteja associada ao maior risco de desenvolvimento de câncer de mama e a agravo prognóstico no seguimento da doença. Em mulheres menopausadas vários parâmetros de obesidade como o índice de massa corporal, peso absoluto, e ganho de peso mostram associação significativa com o risco de desenvolvimento do câncer de mama. O mesmo Autor demonstra nesta meta-análise que o ganho de peso em adulto e a obesidade central aumentam o risco de desenvolver câncer de mama também na pré-menopausa e que a obesidade no momento do diagnóstico é um fator significativo de agravo prognóstico (CARMICHAEL, 2006).

Dentre os fatores de risco a obesidade é o único fator que pode ser modificado e por apresentar correlação independente e forte com prognóstico das portadoras de câncer de mama, as pacientes devem ser encorajadas a seguir um programa de controle de peso e exercícios físicos visando alcançar maior vantagem na sobrevida livre de doença. As mudanças relacionadas à obesidade interferem no metabolismo do estrogênio e podem ter associações diferentes quanto ao risco do câncer de mama em mulheres americanas de origem hispânica e não-hispânica. Os resultados deste estudo indicam que o índice de massa corporal e o ganho de peso na vida adulta são fatores prognósticos independentes e fortes, mas parecem ter pouca influência no grupo de mulheres hispânicas obesas quando comparado ao grupo de americanas não hispânicas obesas, levando a inferir uma genética mais favorável na etnia latina (BAUMGARTNER, 2004).

Comprometimento de linfonodos regionais:

Trata-se do fator prognóstico anátomopatológico de maior relevância no câncer de mama por predizer de forma confiável o tempo livre de doença e a sobrevida no câncer de mama. Desde Halsted está estabelecido que 20 a 30% das pacientes com axila-negativa tendem a recorrer com metástases à distância. O número de gânglios comprometidos guarda relação direta com a probabilidade de metastatização. Entre os casos de axila-negativa, 75% permanecem livres de doença após 10 anos de seguimento, contrariamente apenas 25% das pacientes com axila comprometida (superior a 10 linfonodos afetados) encontravam-se bem no mesmo período. A invasão extra-capsular, outrora valorizada, vem perdendo significância como fator negativo de prognóstico (FITZGIBBONS, 2000).

É tema atual e controvertido no prognóstico do câncer de mama o papel das micrometástases linfonodais. Definidas como agrupamentos tumorais que meçam de 0,2 a 2,0 mm as micrometástases têm sido frequentemente observadas a partir da difusão da metodologia do linfonodo sentinela. Esta análise se baseia na execução de cortes seriados do linfonodo sentinela e também no emprego assíduo do diagnóstico imuno-histoquímico. A análise do linfonodo sentinela inclui toda a peça com maior número de cortes e muitas vezes o emprego de técnicas especiais como

PCR e a IHQ havendo desta forma maior probabilidade de identificarem-se as metástases não ocultas e as micrometástases. O seguimento destas pacientes em longo prazo deve oferecer novas informações que ratifiquem o protocolo.

Atualmente percebe-se na literatura a tendência de valorizar as micrometástases como fator prognóstico negativo concorrendo com 30% de aumento nas chances de mortalidade quando comparadas ao grupo de pacientes que apresentaram axila-livre (KUIJT, 2005 *apud* BARROS, 2007).

Tamanho Tumoral:

O diâmetro do tumor é uma variável de grande influência no prognóstico. Quanto maior, mais elevada é a probabilidade de recorrência tumoral sendo a repercussão clínica mais forte entre as pacientes que pertençam ao grupo de axila-livre de doença. A correlação entre o tamanho tumoral e a probabilidade de metástases linfonodais é quase sempre direta. Atualmente considera-se que toda a paciente com tumor de tamanho superior a 1 cm apresenta até 20% de chance de recorrência. Este risco é atribuído à probabilidade de metástases subclínicas e de células tumorais em circulação na fase de diagnóstico. Este risco independe de outros fatores. As pacientes portadoras de tumores de diâmetro maior que 1cm podem merecer alguma forma de terapia sistêmica, mesmo quando os linfonodos apresentam-se livres. A sobrevida em 10 anos dessas mulheres chega alcançar 90% das portadoras (WISINTAINER, 2006).

O tamanho tumoral deverá ser tomado em duas dimensões sendo a maior medida empregada para estadiamento. A medida do tumor na macroscopia pode ser enganosa em alguns casos, o carcinoma lobular pode ser consideravelmente maior à microscopia do que aparenta ser visualmente, por outro lado tumores com reação estromal extensa podem ter uma medida menor quando avaliados pela microscopia. As áreas de tumor *in situ* devem ser desconsideradas, apenas as áreas invasivas tem valor quanto ao prognóstico (FITZGIBBONS, 2000).

Muitas vezes a estimativa precisa do tamanho tumoral ao exame clínico, requer a complementação por ultrassonografia mamária para evitarmos o subestadiamento (RAKHA, 2007).

Tipo histológico:

Os tipos histológicos mais comuns são os carcinomas ductal e lobular que apresentam prognóstico muito similar. O padrão lobular está associado com idade mais avançada, tamanho tumoral maior, positividade para receptores hormonais e negatividade para o *c-erb B-2*. Portadoras de carcinoma lobular apresentam bilateralidade com freqüência duas vezes maior e chance igualmente maior de exibir metástases para os ovários e trato gastrintestinal. A sobrevida comparada em cinco anos foi de 85,7% para o lobular e 83,5% para o tipo ductal (ALPINO, 2004 *apud* BARROS, 2007).

Existem subtipos histológicos mais favoráveis à cura, principalmente o tubular e o mucinoso, que apresentam sobrevida em cinco anos de 95% dos casos. Estes tumores apresentam crescimento lento e raramente ultrapassam o diâmetro de quatro centímetros, tendem a não invadir a cadeia linfática, apresentam células bem diferenciadas e ricas em receptores hormonais. De excelente prognóstico são os tumores cribiformes puros. Nem tão favoráveis, contudo melhores que os carcinomas em geral estão os carcinomas do subtipo medular (BARROS, 2007).

Tábar (1999) classifica os tipos histológicos segundo o prognóstico em três categorias descritas na figura 5.

Bom prognóstico RR=1	Carcinoma ductal invasor grau1
	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
	Carcinoma tubular
	Carcinoma mucinoso
Prognóstico intermediário RR=3,3	Carcinoma ductal invasor grau 2
	Carcinoma medular
	Carcinoma lobular
	Carcinoma apócrino
Prognóstico ruim RR= 7,4	Carcinoma ductal invasor grau3

QUADRO 05: Prognóstico do câncer de mama segundo o tipo histológico

O carcinoma inflamatório é o que exibe maior agressividade: apenas 30% de suas portadoras sobrevivem após cinco anos do tratamento. Os sarcomas mostram prognóstico muito heterogêneo, mas por apresentarem maior tendência à metastatização hematogênica são considerados de mau prognóstico (WISINTAINER, 2006).

Grau histológico e grau nuclear:

O grau histológico e o grau nuclear são variáveis importantes na análise prognóstica do câncer de mama. Estão baseados na morfologia celular e se associam significativamente com a sobrevida das portadoras. O grau histológico permite estratificar o risco de recorrência dado um determinado estadiamento tumoral. Quanto maior o grau histológico, pior a sobrevida e a resposta ao tratamento (FITZGIBBONS, 2000).

O sistema de *Scarff-Bloom-Richardson*, amplamente aplicado na avaliação de tumores sólidos, considera três variáveis morfológicas: grau de diferenciação (medida da capacidade do tumor em gerar túbulos, glândulas e papilas), pleomorfismo celular e índice mitótico. Segundo Richardson (apud BARROS, 2007) cada variável é pontuada de 1 a 3 e a classificação é gerada a partir da somatória de pontos, conforme figura 8.

Quadro do grau nuclear segundo B.Richardson	
Bem diferenciado	De 3 a 5
Moderadamente diferenciado	De 6 e 7
Mau diferenciado	8 e 9

QUADRO 06: Grau nuclear segundo B. Richardson

De acordo com Hortobagyi, para pacientes com tumores menores que 1 cm e axila-negativa o grau histológico é o fator mais consistente na associação com o prognóstico (WISINTAINER, 2006).

Oncogene HER-2 (c-*erb* B-2):

Segundo o consenso do Colégio Americano de Patologistas (FITZGIBBONS, 2000) o c-*erb* B-2 é ranqueado como um fator prognóstico categoria 2.

O HER-2 ou c-*erb* B-2 é um proto-oncogene relacionado ao desenvolvimento do câncer de mama. Situado no cromossomo 17q21, pode ser ativado por amplificação quando passa a codificar a produção de uma glicoproteína, a p185, que atua no sistema de receptores para fatores de crescimento epiteliais por meio de sinais de transdução alterando processos de proliferação, sobrevivência, motilidade e aderência celular. Observa-se homologia com outros membros da família do EGFR, como o *erb*-3 e *erb*-4 por isso os testes clínicos devem ser suficientemente específicos para *erb*-2 e suas amplificações.

O método mais empregado para a avaliação do HER-2 é a reação de imunohistoquímica que pode detectar a superexpressão da proteína HER-2 na superfície de células de tumorais incluídas em parafina.

Sua expressão ocorre em até um terço dos casos e seu valor preditivo no prognóstico e acima disto, sua capacidade de estabelecer a resposta terapêutica ao trastuzumab advertem para a necessidade de incluir na rotina patológica dos tumores de mama a avaliação HER-2.

No momento da análise, segundo o Colégio Americano de Patologia, apenas a reação de membrana deve ser considerada e apenas o componente invasor da tumoração deve ser analisado. Os resultados são expressos de forma semi-quantitativa em escores negativo (0) e positivo (+, ++ e +++) (FITZGIBBONS, 2000).

O método FISH (*fluorescent in situ hybridization*) é mais preciso já que utiliza sondas de DNA marcadas com fluoresceína e permite uma avaliação quantitativa. Contudo é mais dispendioso. A imuno-histoquímica (IMH) e o FISH apresentam resultados concordantes em 90%, se a IMH detectar reação forte (+++). Nos casos de expressão gênica menor (++) , é necessária a realização do FISH para quantificar a expressão do HER-2 e para estimar devidamente a resposta do caso em questão à terapia com anticorpo monoclonal anti-HER-2. Casos que apresentem baixa expressão (+) são aceitos como de baixa resposta ao uso de Trastuzumab (Herceptin) e inelegíveis a este tratamento. O teste de FISH será positivo se existirem mais de 6 cópias de HER-2 por núcleo ou uma relação de sinais de HER-2 sobre sinais de cromossomo 17 superior a 2,2. A superexpressão de HER-2 ocorre em aproximadamente 25% dos casos de carcinoma de mama e quando verificada representa prognóstico adverso. Estes casos devem receber esquemas terapêuticos especiais que incluam a terapia anti-HER-2 e o uso de antracílicos (BARROS,2007).

Genes supressores TP53 / p53:

A proteína p53 é codificada pelo gene TP53 localizado no cromossomo 17p13. Tem função importante no controle da divisão celular, da apoptose, do reparo do DNA lesado da diferenciação celular e da angiogênese, com a função final de preservar a integridade do genoma. Suas funções resultam em um papel-chave de regulação do ciclo celular suprimindo o desenvolvimento de neoplasias em condições normais (SILVA-RIBEIRO, 2003).

Mutações esporádicas desse gene ocorrem ao longo da vida ou podem advir de um defeito hereditário, como na Síndrome de Li-Fraumeni cujos portadores apresentam elevado risco de desenvolver o câncer de mama. Cerca de um terço dos tumores de mama exibem a mutação do gene supressor p53 que se associa ao alto grau nuclear e agressividade clínica. Na ocorrência de mutações genéticas, a proteína p53 pode ser detectada por reação de IMH, o que se observa de 14 a 26% dos cânceres de mama (WISINTAINER, 2006).

O p53 é considerado um fator negativo de prognóstico inclusive nos casos de axila negativa, apesar de resultados contraditórios em alguns estudos que diminuem

a importância clínica do teste, se aceita a hipótese de maior refratariedade à terapia sistêmica particularmente nos casos que se associam a expressão de HER-2, contudo os dados são ainda controversos. O p53 parece ser um bom marcador prognóstico particularmente entre pacientes com axila-livre de comprometimento, nestes casos sua expressão permite inferir uma resposta terapêutica pior à quimioterapia e radioterapia. Evidência recente sugere que uma correlação entre o p53 e o BRCA-1 no câncer de mama hereditário em que o p53 atua como co-fator na gênese do câncer nestes pacientes (SOBOL, 1997 *apud* FITZGIBBONS, 2000).

BRCA 1 e 2:

A mutação germinativa dos genes BRCA 1 e 2, localizados, respectivamente, nos cromossomos 13 e 17 induz grande suscetibilidade ao câncer de mama.

As portadoras apresentam chances elevadas de desenvolverem a neoplasia da ordem de 60 a 80 % (VERONESI, 2002).

Esta ocorrência diz respeito apenas aos casos hereditários (1 a 3 %) da população, os demais casos que cursam sem a mutação específica são chamados esporádicos e perfazem a quase totalidade da amostra. A maioria dos tumores induzidos pelo BRCA1 não apresenta RE e é insensível à manipulação hormonal. Já os tumores formados pelo BRCA 2, ao contrário, se assemelham aos demais. Ambos os genes quando mutados impõem uma grande tendência à bilateralidade, que chega a 40% em 10 anos.(FORD 1998, *apud in* BARROS 2007)

Receptores de Estrogênio (RE) :

A determinação de receptores hormonais é procedimento obrigatório na avaliação de casos de câncer de mama. Seu poder preditivo foi amplamente investigado e comprovado em ensaios realizados nas últimas duas décadas. O Colégio Americano de Patologia sugere que os tumores sejam classificados como positivo e negativo apenas evitando-se a gradação em *score* de intensidade (FITZGIBBONS, 2000).

Os estrogênios são potentes estimuladores da proliferação celular no epitélio mamário, interagem com receptores intranucleares e passam a influenciar a atividade genômica, transcrição e produção de fatores de crescimento subsequentemente com estímulo a divisão celular (OSBORNE, 2005).

Os RE são de dois tipos RE α e RE β que são produtos protéicos de diferentes genes localizados respectivamente nos cromossomos 6 e 14.

O RE α é uma proteína com 595 aminoácidos com um domínio central para ligação com o DNA e outro para ligação hormonal. O RE β é um pouco menor possuindo 530 aminoácidos, sua área de ligação central possui grande homologia em relação ao RE α e nas demais regiões muitas diferenças. As funções do RE β estão pouco esclarecidas sendo aventado inclusive um efeito inibidor do crescimento tumoral.

No modelo clássico de atuação do estradiol ocorre inicialmente a ligação do hormônio no domínio do receptor, e este conjunto dimeriza-se com outro receptor. O dímero liga-se a seqüências específicas do DNA, chamadas de elementos de resposta estrogênica, nos genes responsivos. Aos dímeros acoplam-se proteínas co-reguladoras (co-ativadoras ou co-repressoras) que modulam a transcrição desses genes. As co-ativadoras (AIB,CBP/300,PCAF) têm sua ligação condicionada a ocupação do receptor pelo estradiol e, assim, transcrevem-se os genes TGF α ,VEGF,PDGF, IGF-1,e IRS. Proteínas co-repressoras (NcoR,SMRT) ocorrem se o tamoxifeno se ligar ao receptor estrogênico. No modelo não-clássico além dos elementos de resposta ao estrogênio, o hormônio pode se ligar a sítios alternativos de molécula de DNA como AP1, SP1, ou USF e em seqüência a fatores de transcrição como *c-jun* e *c-fos*. Aqui os RE funcionam basicamente como co-ativadores, estimulando genes importantes para o desenvolvimento tumoral como o IGF-1 ciclina D1, *myc*, *bcl-2* e catepsina-D.

O resultado da avaliação dos RE tem grande valor prognóstico. Casos com RE positivos têm evolução clínica mais favorável e maior sobrevida que os casos RE negativo. O maior papel dos RE é a previsão de resposta à terapia hormonal com tamoxifeno e inibidores de aromatase. A resposta é de 70% em RE-positivos e quase zero em RE-negativos (OSBORNE, 2005).

Receptores de Progesterona (RP):

O papel dos receptores de progesterona ainda é incerto, mas sua presença é indicadora de resposta ao estrogênio uma vez que RP é produzido por estimulação estrogênica. Alguns estudos consideram o *status* do RE um fator preditivo associado à sobrevida livre de doença enquanto o *status* de RP está mais associado à sobrevida global, talvez por ser ele um indicador mais fidedigno de resposta à terapia endócrina após a recorrência da doença (WISINTAINER, 2006).

Navarrete (2005) aponta uma ação maior na proliferação celular quando o estímulo estrogênico é simultâneo ao progesterônico, o que pode ser notado pelo volume nuclear das células do epitélio ductal na 2ª fase do ciclo menstrual. Duas formas de RP A e B são codificadas pelo mesmo gene, sua presença indica a presença de RE funcionante.

A combinação de ambos os receptores eleva as chances de resposta à hormonioterapia para 80%. Esta taxa decai se houver expressão de apenas um dos receptores hormonais for positivo. É possível que a ausência de RP não signifique simplesmente prejuízo na função dos RE mas uma alteração no processo de sinalização para os fatores de crescimento gerando resistência ao tamoxifeno.(NAVARRETE, 2005)

MIB-1 (ki-67):

O ki-67 é o anticorpo monoclonal capaz de identificar o antígeno nuclear MIB-1 presente apenas em células em fase de proliferação.

Trata-se de um antígeno expresso nas células em divisão nas fases G¹ tardia, S, M, e G² e que não é expresso por células em fase G⁰ (PIERGA, 2004).

Sua presença pode ser determinada por IMH em material de congelação, ou em blocos de parafina. Desta forma vem se mostrando útil como um marcador de proliferação celular. O anticorpo monoclonal Ki-67 reconhece o MIB-1, sinalizando proliferação celular com a vantagem de ser realizado a partir de material parafinado.

Este marcador vem sendo empregado para estratificar pacientes em bom ou mau prognóstico, segundo sua capacidade proliferativa (FITZGIBBONS, 2000).

Em estudo recente (HRUSHESKY, 2007), com mulheres menopausadas portadoras de câncer de mama, a proporção de células expressando Ki-67 depois de 2 semanas de terapia endócrina prevê a recorrência tumoral melhor que a proporção de Ki-67 antes da endocrinoterapia. A expressão de Ki-67 foi utilizada para avaliar a resposta ao tratamento e inferir seu impacto no tempo livre de doença.

Embora os estudos em demonstrar o Ki-67 como um fator prognóstico independente sejam conflitantes, ele continua sendo um índice confiável da proliferação celular substituindo satisfatoriamente a citometria de fluxo na avaliação da frequência proliferativa tumoral (HRUSHESKY, 2007).

Fração de células em fase S:

Pela técnica de citometria de fluxo é possível determinar qual a porcentagem de células de um tumor se encontram na fase S (fase S) do ciclo celular.

A avaliação da ploidia aplica-se a tecido tumoral recentemente congelado, a partir do qual os núcleos celulares podem ser extraídos. Para o câncer de mama considera-se que a ocorrência de mais de 10% das células em fase S oferece implicações negativas ao prognóstico quanto à recorrência e mortalidade, tanto em pacientes axila-negativas quanto naquelas com axila-positivas. A fração de células na fase S não pode prever a resposta à terapia, de acordo com análises recentes (MUSS, 1994 *apud in* FITZGIBBONS, 2000).

Trata-se de metodologia sensível, mas dispendiosa, que exige espécime cirúrgico não fixado, dificuldades que tornam rara a sua aplicação na prática clínica.

Micrometástases em medula óssea:

Várias publicações vêm oferecendo dados quanto à correlação prognóstica de micrometástases em medula óssea (MMO) e o câncer de mama.

Os espécimes de medula óssea são obtidos a partir da biópsia por agulha do esterno ou espinha ilíaca, geralmente no momento do tratamento cirúrgico e as

micrometástases são identificadas por imuno-histoquímica e por coloração com anticorpos monoclonais (WISINTAINER, 2006).

Hayes (2005) afirma que pacientes portadoras de micrometástases em medula óssea tem prognóstico pior que aquelas que não as têm. Em sua revisão menciona várias análises que observaram elevada significância estatística. O grupo norueguês sugeriu recentemente que a presença de micrometástases 3 a 4 anos após o tratamento primário estava associada a elevada taxa de recorrência em poucos anos. Apesar destas evidências ainda não está claro o papel deste achado na condução terapêutica dos casos. Por exemplo, em pacientes com axila-positiva, mas medula óssea negativa é possível prescindir da terapia sistêmica? Ou ainda, pacientes com bom prognóstico clínico patológico mereceriam a terapia sistêmica baseada apenas na positividade da medula óssea? Apesar de apresentar evidência de correlação com prognóstico, as metástases em medula óssea ainda não têm definido seu papel na prática clínica.

UPA/PAI-1:

As etapas iniciais do processo de metastatização envolvem a degradação da matriz extra-celular. Esta degradação se cumpre através da ativação de sistemas enzimáticos inclusive as metaloproteinases da matriz e o sistema ativador de plasminogênio tipo-uroquinase, o sistema uPA. Os genes upa/pai-1 estão envolvidos na expressão da protease tipo uroquinase ativadora de plasminogênio (uPA) e seu inibidor o ativador do inibidor do plasminogênio (PAI-1) no câncer de mama. Estes fatores desempenham papel importante na invasão tumoral e formação de metástases. A uPA converte plasminogênio em plasmina que degrada os componentes da matriz e ativa as metaloproteases e fatores de crescimento latentes.

Seu impacto prognóstico e preditivo foi amplamente validado no câncer de mama em grande estudo colaborativo realizado pela EORTC RBG na análise de 8377 casos (WEIGELT, 2005).

Sua maior aplicação clínica recai sobre casos de câncer de mama com axila negativa, quando o teste evita o tratamento pela quimioterapia em pacientes com

doença menos agressiva. Nas pacientes de risco intermediário, conforme a definição pelo consenso de *St Galen*, sua aplicação permite definir quem deve receber a quimioterapia por possuir um tumor mais agressivo que o sugerido pelos fatores clássicos de prognóstico. O desafio atual é o de integrar as informações do Upa/Pai-1 com a assinatura gênica e a partir destes resultados definir com maior precisão que pacientes de uma população de portadoras de câncer de mama devem receber a quimioterapia (HAYES, 2005).

Quanto ao teste trata-se de um micro ensaio ELISA que requer tecido fresco ou congelado, o que pode não ser exeqüível para a maioria dos centros. Estas dificuldades iniciais e os custos envolvidos vêm dificultando a sua aplicação na prática clínica e por isso ainda requer validação a despeito dos dados favoráveis iniciais (HARBECK, 2007).

Expressão Gênica:

Modernamente as análises da expressão de arranjo genético têm se mostrado um critério prognóstico interessante. A partir de técnicas baseadas em segmentos de DNA representando diferentes arranjos gênicos em lâminas de vidro com RNA de um dado espécime hibridizado, van de Vijver (2002) estabeleceu um perfil de 70 genes que compõe uma assinatura gênica prognóstica. Foram acompanhadas 295 mulheres, entre elas 180 de assinatura de mau prognóstico e 115 de bom prognóstico.

Após 10 anos a probabilidade de permanecer livre de metástases no grupo de mau prognóstico foi de $50.6 \pm 4,5\%$, enquanto que no grupo de bom prognóstico gênico esta probabilidade foi de $85.2 \pm 4.3\%$. A acuidade deste teste representou uma perspectiva fascinante na abordagem médica do câncer de mama. Este ensaio pode ser aplicado sobre tecidos formalizados e embebidos em parafina exigindo desta forma menor quantidade amostral, diferentemente das técnicas sobre tecidos congelados utilizadas anteriormente, que na era dos tumores impalpáveis representaram uma opção muitas vezes ineqüível por exigirem um volume maior de tecido para o experimento (VAN DE VIJVER, 2002).

Os tumores de mama podem ser agrupados de acordo com a co-expressão gênica conforme o exposto na análise de Morris e cols. (2007).

Em um cenário de 456 genes mais propensos a variabilidade entre diferentes tumores as amostras foram pareadas. A partir disso surge uma nova classificação, partindo do pré-suposto que tumores receptores de estrogênio negativos e tumores receptores de estrogênio negativos são doenças diferentes biologicamente. Entre os tumores receptores de estrogênio (RE) positivos surgem os subtipos Luminal A e Luminal B. Entre os tumores RE negativos os subtipos HER2+/ER-, e subtipo basal caracterizado pela superexpressão de genes HER2 com alta expressão de genes característicos do epitélio basal normal da mama. Morris considera ainda um quinto subtipo, do tipo células normais do epitélio mamário. Este subtipo pode não representar um tipo tumoral propriamente, mas sim uma amostra de tumor em que células de tecido normal da mama estão predominantemente representadas. Esta subclassificação do câncer de mama nos tipos luminal e basal vem da comparação do padrão de expressão gênica do tumor com o padrão normalmente encontrado em tecido mamário humano não tumoral. As células luminais coram com anticorpos anticercatina 8 e 18 enquanto as células basais coram com anticercatina 5 e 17 com ausência ou baixos níveis de receptores para estrogênio.

A partir destas conclusões supõe-se que nos subtipos basal e luminal a célula progenitora tumoral proveio de um subtipo celular específico no epitélio mamário e na perda de diferenciação guarda relação com o padrão genético da célula original.

A heterogeneidade de comportamento clínico do câncer de mama e seus resultados terapêuticos refletem a variabilidade genética e biológica dos tumores, e das populações de pacientes que sofrem da doença (MORRIS, 2007).

Os indicadores prognósticos de base genética começam a ser empregados na prática clínica recentemente, o *Mammaprint*, bateria de 70 genes concebida pelo grupo de pesquisadores de Amsterdã foi capaz de classificar os tumores mamários em grupos de bom e mau prognóstico, conforme citado anteriormente, em 295 pacientes. Outro ensaio o *oncotype DX* foi desenvolvido nos EUA pela *Genomic Health* e inclui a análise de 21 genes se mostrou igualmente útil para prever resposta clínica em geral e à hormonioterapia.

Os subtipos moleculares, basal, luminal B, e HER2+/ER- são tomados como de prognóstico ruim pelo ensaio de 70 genes-Amsterdã (*Mammaprint*), e a

observação mais interessante é que uma pequena sobreposição de genes, ou seja uma combinação comum entre os subtipos é pouco freqüente, o que leva a crer que existam outros padrões combinatórios de genes capazes de promover o processo de progressão tumoral. A análise gênica é uma ferramenta que permite individualizar mais detalhadamente o tratamento e prever a resposta entre as opções existentes, com isso pode ampliar as chances de cura no tratamento da patologia em estudo (VAN DE VIJVER, 2002).

2.5 VEGF COMO FATOR PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA.

Gasparini (2001) realizou revisão de 44 artigos que estudaram a correlação entre a angiogênese e o câncer de mama. O Autor em sua meta-análise compilou resultados de 7.202 tumores e concluiu que entre os fatores angiogênicos testados o VEGF parece ser o único que apresenta informação prognóstica relevante. Além disso, pacientes com elevada expressão de VEGF apresentaram pior prognóstico e menor probabilidade de se beneficiar do tratamento adjuvante convencional. Com base nestes dados o autor lança a hipótese de que estas pacientes podem ser selecionadas para tratamentos anti-angiogênicos baseados na neutralização específica do antígeno VEGF com boa chance de resposta (GASPARINI, 2001).

Toi (1995) analisou, retrospectivamente, 328 carcinomas de mama segundo a imunomarcagem de VEGF e a densidade de microvasos, observou associação significativa entre a MVD e expressão de VEGF que foi positiva em 50% dos tumores. Este Autor encontrou significância de resultados com a sobrevida livre de doença, na análise de ambas as variáveis. Não houve correlação significativa com o status menopausal, o tamanho do tumor, status axilar, receptor de estrogênio, tão pouco com outros marcadores de angiogênese testados como o fator de crescimento de hepatócitos, e fator básico de crescimento de fibroblastos.

Nakamura (2003) descreveu o significado prognóstico do VEGF-C em câncer de mama em um seguimento de longo prazo, e a correlação desta proteína com a ocorrência de metástases nos linfonodos e com a expressão de *c-erb B-2*. Não ocorreu significância com *c-erb B-2*, p53 e receptores de progesterona. Houve

significância, com valor de p de 0,001, no grupo axila-positiva. Oitenta e três por cento dos tumores foram sensíveis à imunomarcagem para VEGF e a correlação com a sobrevida livre de doença em 5 anos teve valor altamente significativo de 0,0165.

Nicolini (2004) apresentou estudo caso-controle com 129 pacientes onde 74 eram portadoras de câncer de mama recorrente e grupo controle com 55 mulheres tratadas para esta causa, livres de doença, em 10 anos de acompanhamento. Foi determinada, retrospectivamente, em tecido do tumor fixado a expressão imunohistoquímica de VEGF, receptor de estrogênio, MIB-1, p53, *c-erb* B-2 entre os dois grupos de pacientes. O VEGF se expressou igualmente nos tumores *in situ* e invasores menores que 2 cm e nos tumores maiores, como T2, T3 e T4.

A expressão VEGF foi muito sensível, mas, pouco específica. VEGF expressou-se sem diferença significativa entre o grupo de metástases e o grupo livre de doença. Entre os grupos a expressão de MIB-1 e receptores para estrogênio apresentaram correlação significativa com p -valor de 0,031. A análise multivariada em relação ao tempo livre de doença, o envolvimento linfonodal e receptores de progesterona negativos foram os únicos a mostrar correlação desfavorável significativa e independente. Em análise univariada VEGF mostrou diferença significativa quanto ao status linfonodal, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, *c-erb* B-2, MIB-1, ciclina D1 e p53; comparativamente VEGF mostrou-se significativa embora fosse o mais fraco preditor de recorrência. Os autores concluem que VEGF não substitui, convenientemente, os demais marcadores prognósticos do câncer de mama.

Nieto e cols. (2007) analisaram uma amostra de 223 biópsias de pacientes tratadas para câncer de mama com extenso envolvimento axilar, que receberam além do tratamento cirúrgico, quimioterapia de alta dose. Os blocos de parafina do tumor primário foram coletados retrospectivamente.

Os autores avaliaram a densidade de microvasos, expressão imunohistoquímica de VEGF, Her-2, p53, e EFGR (receptor para o fator de crescimento epidermal). A expressão de VEGF intratumoral foi detectada em 51% dos pacientes, e não foi observada associação entre expressão de VEGF e densidade de microvasos. A superexpressão de VEGF foi observada em 56% dos

pacientes Her-2 positivo e em 39% no grupo Her-2 negativo. VEGF não esteve associado com acometimento axilar, com o número de linfonodos acometidos, com o diâmetro tumoral, status de receptores hormonais, status de p53, ou seu grau histológico. No estudo a angiogênese foi avaliada quanto à densidade de microvasos e não quanto a expressão de VEGF para predizer o resultado oncológico (p-valor = 0,8). O antígeno mostrou-se como um importante fator independente de prognóstico, apenas em pacientes de câncer de mama com extenso acometimento axilar. Os autores finalizam sugerindo que a imunomarcação por VEGF é importante para selecionar pacientes para tratamento com drogas antiangiogênicas.

A figura 7, na próxima página, sumariza os trabalhos revisados, envolvendo a capacidade prognóstica de VEGF e suas correlações com outros marcadores prognósticos.

Autor/data	N	Método/ reagente	Variáveis analisadas		Sensibilidade (VEGF +)	Sobrevida livre de doença p-valor
Toi, 1995 Japão	328	MVD(CD 31) Anti-VEGF A 121 (MV 303)	Ñ sig	tu, status axilar, ER, HGF, bFGF status menop.,	50%	Grupo Ax+ p<0.05 Grupo Ax – p<0,05
			Sig	EC , status axilar		
Nakamura, 2003, Japão	123	Anti-VEGF-C (R e D System.Inc.)	Ñ sig	idade, tu, RE, RPg, c-erb B-2, p53, grau nuclear	83%	p-valor 0,0165
Linderholm, 2003, Suécia	1307	Anti-VEGF-A 165 em citosol Biópsia de congelação.	Ñ sig	Status axilar	Não descreveu	p-valor=0,002
			Sig	ER, PgR, grauhistol, P53, fase S		
Howard,2004 U.S.A.	77	Anti- VEGFpoliclonal (Biogenex)	Sig	E.Clínico, E-caderina	75%	Não avaliada
			Ñ sig	c-erbb2, p53,		
Nicolini,2004 Itália (Caso controle)	74	anti-VEGF-A (clone a-20 Santa Cruz)	Não buscou correlações entre VEGF e outros marcadores prognósticos		86%	p-valor=0.516
Nieto,J 2007 USA	234	MVD(CD31) Anti-VEGF-C (SantaCruz)	Ñ sig	MVDc- erbB2, p53, EGFR	83%	VEGF p-valor=0,8
			Ñ sig	Status axilar,Tu, , RE, RPg, P53,grau histológico		MVD p-valor<0,001

QUADRO 07: Estudos revisados sobre a capacidade prognóstica de VEGF

2.5.1 Terapia Antiangiogênica

Judah Folkman (1971), da Universidade de Harvard, há 30 anos, sugeriu ser possível deter o crescimento de tumores impedindo a formação de vasos sanguíneos que o tumor induz para sustentar a multiplicação descontrolada das células que o caracterizam surgindo, então, o conceito de 'anti-angiogênese'.

A terapia antiangiogênica é também chamada quimioterapia metronômica, termo que busca enfatizar a possibilidade de reduzir as doses de quimioterápicos e aumentar-lhes a assiduidade, visto que o alvo não é a célula neoplásica apta a desenvolver quimiorresistência, mas as células endoteliais normais e geneticamente estáveis em volta do tumor. Com este recurso tumores resistentes ao tratamento quimioterápico podem transformar-se em tumores responsivos num regime terapêutico com doses mais baixas e freqüentes além de ser mais tolerável (FOLKMAN,2006).

Em 1993, Ferrara anunciou que, nos testes pré-clínicos, um anticorpo geneticamente modificado bloqueava a ação do VEGF, suprimindo assim a capacidade do tumor de estimular o aumento da quantidade de vasos e, portanto, também o seu crescimento. Em 1997, começaram os ensaios clínicos em seres humanos com este anticorpo.

Em 2003 o pesquisador divulgou resultados da fase III de Bevacizumab (Avastin®) (aplicado em combinação com quimioterapia) avaliados como melhores resultados do que o esperado no tratamento das metástases de pacientes com câncer de cólon. Os resultados preliminares de amplo estudo randomizado com pacientes portadoras de câncer de mama metastático sem tratamento prévio mostraram que estes pacientes quando tratados com Bevacizumab (Avastin®) em associação à quimioterapia padrão tiveram um intervalo mais longo de sobrevida que as pacientes tratadas exclusivamente com quimioterapia sem Bevacizumab. Um total de 722 mulheres com recorrência metastática de câncer de mama foi recrutado (RUGO, 2004).

Os inibidores de angiogênese vêm se mostrando uma alternativa de controle do câncer de mama avançado, as drogas inibidoras da angiogênese são

substâncias que podem evitar a neoformação de vasos sanguíneos no tecido circundante e no próprio tumor assim limitando gravemente o desenvolvimento tumoral pela redução no aporte de oxigênio (CINIERI, 2006).

Recentes estudos apontaram Bevacizumab (Avastin®) como nova alternativa de tratamento cuja aprovação aconteceu dia 26 de fevereiro de 2004 nos USA, para o tratamento do câncer de cólon e reto. Trata-se de um anticorpo monoclonal humanizado Bevacizumab desenvolvido para inibir VEGF. Desempenha ação crítica de inibição da angiogênese ligando-se ao receptor do VEGF e evitando a interação de VEGF ao receptor. Foi aprovado também para tratamento, como droga de primeira linha no carcinoma de mama metastático e no câncer colorretal metastático, combinado ao esquema quimioterápico padrão (SHIH, 2006).

Bevacizumab neutraliza a habilidade do VEGF de ligar-se ao receptor flt-1 e KDR/flk-1 localizados à superfície das células endoteliais. Bevacizumab inibe a atividade mitogênica, a alteração de permeabilidade e outras funções biológicas das células endoteliais. Na biologia de tumores sua ação previne a formação da neovasculatura e limita o fluxo sanguíneo com a redução de vasos imaturos e anormais, estes efeitos levam à apoptose no epitélio tumoral e a diminuição da pressão de fluido intersticial o que permite acesso mais fácil das drogas quimioterápicas ao seu alvo (SHIH, 2006)..

Shih (2006) compilou estudos demonstrando que em pacientes com tumores recorrentes de mama tratadas em primeira linha com antracíclicos ou taxane a combinação da quimioterapia padrão ao bevacizumab esteve associada a vantagens significantes na sobrevida global, tempo livre de progressão de doença, ($p < 0,05$) em comparação com pacientes tratadas apenas com quimioterapia convencional.

Estas pacientes foram randomizadas em dois grupos um deles tratado exclusivamente com Paclitaxel e o outro com a associação de Paclitaxel e Bevacizumab. Pacientes com superexpressão de HER-2 foram excluídas a menos que já tivessem usado Trastuzumab (Herceptin®) ou apresentassem contra-indicação para o seu uso como antecedentes de supressão medular e tromboembolismo. As pacientes que receberam o Bevacizumab manifestaram ligeiro aumento de neuropatia de nervos periféricos, hipertensão e proteinúria; todos os

outros efeitos colaterais se manifestaram igualmente nos dois grupos. A ocorrência de efeitos adversos foi 2% maior no grupo do Bevacizumab, mas mesmo as ocorrências graves mostraram-se tratáveis e bastante infreqüentes (SCOTT, 2007).

Este estudo foi conduzido pelo NCI (*National Câncer Institute-USA*) com a colaboração de uma rede de pesquisadores coordenados pelo *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) e contabilizou um total de 715 casos. Os resultados preliminares foram apresentados em maio 2005 no Encontro Anual da Sociedade Americana de Oncologia. Este e outros ensaios clínicos em andamento vêm demonstrando a eficácia do Bevacizumab no tratamento oncológico do câncer de mama, cólon e pulmão e delineando uma nova esperança para o controle destes tumores em situação de recorrência à distância. Os resultados sugerem que o emprego do Bevacizumab combinado mono-quimioterapia com Paclitaxel oferece aos pacientes uma desaceleração no progresso do câncer de aproximadamente 5 meses, em média, quando comparados com os resultados do grupo tratado exclusivamente com Paclitaxel. A diferença entre os grupos é estatisticamente significativa. A pesquisa em questão foi a primeira a demonstrar benefício na terapia antiangiogênica em pacientes com câncer de mama metastático e representa grande avanço no tratamento de mulheres com doença metastática de mama. (*European Medicines Evaluation Agency, 2007*)

3 MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se estudo retrospectivo analítico de amostra de 54 mulheres portadoras de câncer de mama diagnosticadas, tratadas e acompanhadas nos ambulatórios de Mastologia do Hospital Regional de Sobradinho (HRS), da Secretaria de Estado de Saúde do Governo do Distrito Federal, e no Laboratório de Anatomia Patológica no período de novembro de 1998 a dezembro 2005.

3.2 AMOSTRA

A amostra foi constituída por pacientes portadoras de câncer de mama, submetidas a tratamento cirúrgico (radical ou conservador) com linfadenectomia axilar ou à biópsia incisional no período de novembro de 1988 a dezembro de 2005.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

a) inclusão:

- Pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama.

b) exclusão:

- Casos tratados primariamente com quimioterapia ou hormonioterapia;
- Casos cujos blocos em parafina estavam esgotados no estoque em razão de exames anteriores à pesquisa.
- Casos de carcinoma *in situ*; sarcomas e tumores filóides.
- Recorrências tumorais.
- Blocos com problemas de fixação e inclusão
- Casos em que o prontuário médico não foi localizado

3.3.1 PROCEDIMENTO

A partir do levantamento de 119 prontuários iniciado em julho de 2006, realizou-se a coleta das informações clínicas da primeira consulta e acompanhamento oncológico pertinentes a cada caso.

Todos os blocos de biópsia foram resgatados do arquivo da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital Regional de Sobradinho. Foi realizado o exame histopatológico das secções coradas pelo método de hematoxilina-eosina, para confirmar a presença do tumor no fragmento.

Em seguida os blocos e lâminas foram transportados para Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de Brasília onde foram recortados e selecionados segundo a condição técnica de conservação. Os cinquenta e quatro casos selecionados foram então submetidos ao protocolo para estudo imuno-histoquímico. Os sessenta e cinco blocos restantes foram abandonados por apresentarem problemas técnicos que inviabilizavam a realização do experimento.

Após a informação sobre os objetivos do estudo e a garantia do caráter voluntário da participação, obteve-se o Termo de Consentimento Livre e Informado (TCLE), conforme os critérios estabelecidos no CNEP. A pesquisa foi aprovada junto ao comitê de ética em pesquisa – CEP – FS/UnB.(Anexo II). Nos casos em que a paciente faleceu, o Termo de Compromisso para o uso de Dados em Arquivo foi assinado pela autora em consonância com as normas do CNEP.

3.4 PROCEDIMENTOS PARA ESTADIAMENTO CLÍNICO

A União Internacional Contra o Câncer (UICC) propõe classificação para o estadiamento do câncer de mama baseada no sistema TNM e adotada desde 1958.

Tomando como base a classificação descrita, utilizamos as informações contidas no laudo anátomopatológico. Os detalhes da referida classificação constam do Anexo I.

3.5 PROCEDIMENTO PARA ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

O estudo imuno-histoquímico foi realizado em secções de tecido, a partir de 54 blocos incluídos em parafina com a finalidade de pesquisar a expressão das proteínas p53, *c-erb B-2*, MIB-1, receptores para estrogênio e de progesterona e VEGF, utilizando o protocolo de Estreptovidina Peroxidase. As amostras selecionadas foram submetidas à microtomia sendo obtido secções de tecido na espessura de 3 micrômetros que foram colocados em lâminas de vidro, previamente limpas, desengorduradas e sialinizadas em solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical CO., StLouis, MO/USA) durante 1 minuto.

3.5.1 Procedimento Imuno-Histoquímico

Os procedimentos imuno-histoquímicos utilizados, são detalhados a seguir.

3.5.1.1 Hidratação das lâminas

A desparafinização das secções de tecido foi realizada em três banhos de substituto vegetal de xilol [Eco-k ®], na estufa a 37°C, durante 15 minutos cada um. As secções foram hidratadas em quatro banhos de álcool (álcool absoluto, álcool a 95%, 90% e 80%) e, sem passar em água, as secções foram levadas diretamente para a solução de Bloqueio de Peroxidase Endógena.

3.5.1.2 Bloqueio da peroxidase endógena

Água oxigenada a 3%, três banhos de 10 minutos cada.

Obs: Em cuba da bateria, preparar solução de água oxigenada a 3% (equivalente à água oxigenada de 10 vols).

3.5.1.3 - Pré-tratamento das lâminas

As lâminas foram distribuídas em suportes plásticos e colocadas no Vaporizador (*Steammer*), [marca T-Fal ®] imersas em solução de Tampão Citrato pH 6 ou tampão EDTA pH8 ou pH9, a 97°C, durante 30 minutos, de acordo com as exigência requerida pelo tipo de anticorpo primário utilizado. Fora do vaporizador, as secções ainda dentro da solução utilizada foram deixadas esfriar por, aproximadamente, 15 minutos.

3.5.1.4 Reagentes primários

As lâminas foram distribuídas sobre espumas de borracha, umedecidas com água, que foram acondicionadas em cubas plásticas dotadas de tampas. Cada lâmina foi lavada com TBS e secada, cuidadosamente com lenço de papel, para retirada do excesso de Tampão TBS que estava sobre as secções. A seguir foram gotejadas sobre elas os **Reagentes Primários**, previamente diluídos, seguindo o mapa. As lâminas foram deixadas por toda a noite (*over night*), na geladeira.

3.5.1.5-Reagente Secundário (Kit Dako K-0690-LSAB+®)

Cada lâmina foi lavada com TBS e secada cuidadosamente com lenço de papel, para retirada do excesso de Tampão TBS que estava sobre as secções. A seguir foram gotejadas sobre elas o **Reagente Secundário**, (Frasco amarelo do Kit LSAB+) o suficiente para cobrir toda a secção. As lâminas foram, então, incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente.

3.5.1.6 Reagente Streptoavidina peroxidase (Kit Dako K-0690-LSAB+®)

Cada lâmina foi lavada com TBS e secada cuidadosamente com lenço de papel, para retirada do excesso de Tampão TBS que estava sobre as secções. A seguir foram gotejadas sobre elas o **Reagente Streptoavidina peroxidase** (Frasco vermelho do Kit LSAB+) o suficiente para cobrir toda a secção. As lâminas foram, então, incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente.

3.5.1.7 Preparo da solução de DAB líquido (Kit K-3466 Dako ®)

Todas as lâminas foram lavadas com TBS, O excesso de tampão TBS foi retirado cuidadosamente com lenço de papel e a seguir foi gotejada a Solução DAB o suficiente para cobrir toda a secção, conforme fórmula da figura 10. As lâminas foram, então, incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente.

REAGENTES	QUANTIDADE
3,3'- Diaminobenzidine (DAB)	1 gota
Tampão que acompanha Kit do DAB líquido	1ml
Homogenizar	

QUADRO 08: Solução DAB

3.5.1.8 - Hematoxilina

As lâminas foram retiradas das bandejas e colocadas em cuba de coloração para serem lavadas em água corrente. A seguir foram coradas pelo método de **Hematoxilina de Harris**, durante 20 segundos. Em seguida as lâminas foram lavadas, rapidamente, em água amoniacal e, depois, em água corrente.

3.5.1.9 - Montagem das lâminas

Para finalizar, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e as secções de tecido foram recobertas com lamínulas de vidro, utilizando-se para isso resina sintética – Entellan®

Anticorpo	Clone	Diluição
VEGF	VG-1	1:50
P53	DO-7	1:50
Ki-67	MIB-1	1:50
Anti c-erb B-2	-	1:400

QUADRO 09: Diluição dos anticorpos

3.5.2 Procedimento para a Análise Imuno-histoquímica

Semiquantificação da pesquisa da Proteína p53 (clone DO-7) - Intensidade de coloração: moderada (escore 1), forte (escore 2); porcentagem de células coradas: ocasionais, até 1/3 (escore 1), até 2/3 (escore 2) e mais de 2/3 (escore 3). O caso é classificado como negativo quando não se observam células coradas; positivo + indicando a presença de células ocasionais positivas; positivo ++ indicando casos com até 1/3 de células coradas de moderada intensidade (escore 1 = 1x1); positivo +++ indicando casos com até 2/3 de células coradas de moderada ou forte intensidade ou até 1/3 de células coradas de forte intensidade ou, ainda, casos de moderada intensidade em mais de 2/3 de células (escores 2 a 4 = 2x1 ou 2x2 ou 3x1); positivo ++++ indicando coloração de forte intensidade em mais de 2/3 das células (escore 6 = 3x2), (SCHMITT E COLS., 1998).

Semiquantificação da pesquisa de receptores de estrogênio e progesterona segundo SANNINO E SHOUSA (1994): Intensidade de coloração: moderada (escore 1), forte (escore 2); porcentagem de células coradas: ocasionais, até 1/3 (escore 1), até 2/3 (escore 2) e mais de 2/3 (escore 3). O caso é classificado como negativo quando não se observam células coradas; positivo + indicando a presença de células ocasionais positivas; positivo ++ indicando casos com até 1/3 de células coradas de moderada intensidade (escore 1=1x1); positivo +++ indicando casos com até 2/3 de células coradas de moderada ou forte intensidade ou até 1/3 de células coradas de forte intensidade ou, ainda, casos de moderada intensidade em mais de 2/3 de células (escores 2 a 4=2x1 ou 2x2 ou 3x1);positivo ++++ indicando coloração de forte intensidade em mais de 2/3 das células (escore 6=3x2):

Semiquantificação da pesquisa da proteína do oncogene c-erb B-2 : 0 – ausência de imunorreatividade em padrão membrana em mais de 90% das células tumorais; + - imunorreatividade discreta, em padrão membrana – quase imperceptível –, em mais de 10% das células tumorais; ++ - imunorreatividade discreta a moderada, em padrão membrana, em mais de 10% das células tumorais; +++ - imunorreatividade intensa e completa, em padrão membrana, em mais de 10% das células tumorais (JACOBS E COLS., 2000).

Semiquantificação da detecção do antígeno Ki-67(MIB-1): **0** – ausência de imunorreatividade dos núcleos das células tumorais; **+** - imunorreatividade dos núcleos e/ou nucléolos em menos de 10% das células tumorais; **++** - imunorreatividade dos núcleos e/ou nucléolos entre 10 a 25% das células tumorais; **+++** imunorreatividade dos núcleos e/ou nucléolos entre 25 a 50% das células tumorais; **++++** imunorreatividade dos núcleos e/ou nucléolos em mais de 50% das células tumorais. Usualmente quando o tumor tem menos de 10% dos núcleos marcados para o Ki-67, é considerado como tendo um baixo índice de proliferação e mais de 25%, um alto índice. Valores entre 10 a 25% podem ser considerados moderados (MELLO E ALVES 1999).

Semiquantificação da detecção do antígeno VEGF: Avaliação semi-quantitativa do resultado da imunorreação foi baseada em TURLEY E COLS. (1998) levando em consideração a intensidade de coloração, e está descrita No quadro 12.

Graduação da Reação	Significado
Negativo	Imunorreação ausente
Positivo +	Imunorreação fraca
Positivo ++	Imunorreação moderada
Positivo +++	Imunorreação acentuada

QUADRO 10: Critérios semi-quantitativos de avaliação da intensidade de imunorreação para VEGF com o anticorpo VG1.

Considerou-se padrão de positividade para o VEGF a coloração acastanhada do citoplasma na maioria das células neoplásicas.

3.5.3 Análise Estatística

Foram realizadas análises descritivas dos fatores prognósticos relevantes para o estudo. Para verificar as relações entre o VEGF e os demais fatores foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para ambos os procedimentos utilizou-se o programa SPSS para Windows 15.0.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS

4.1.1 Idade

A média etária encontrada é de $52,53 \pm 13,29$ anos com mediana em 49,5 anos. A paciente mais idosa possui idade de 86 anos e a mais jovem 28 anos.

A amostra foi dividida em categorias levando em consideração os pontos de corte mais referidos na literatura, sendo: (1) \leq a 35 anos – Pacientes jovens, (2) ≥ 51 anos menopausa, (3) ≥ 75 anos idosas.

Utilizou-se como média etária para a ocorrência da menopausa os dados obtidos no levantamento de base populacional realizado por Pedro (2003) . O valor de 51 anos adveio da amostra de 456 mulheres brasileiras residentes no Município de Campinas, Estado de São Paulo.

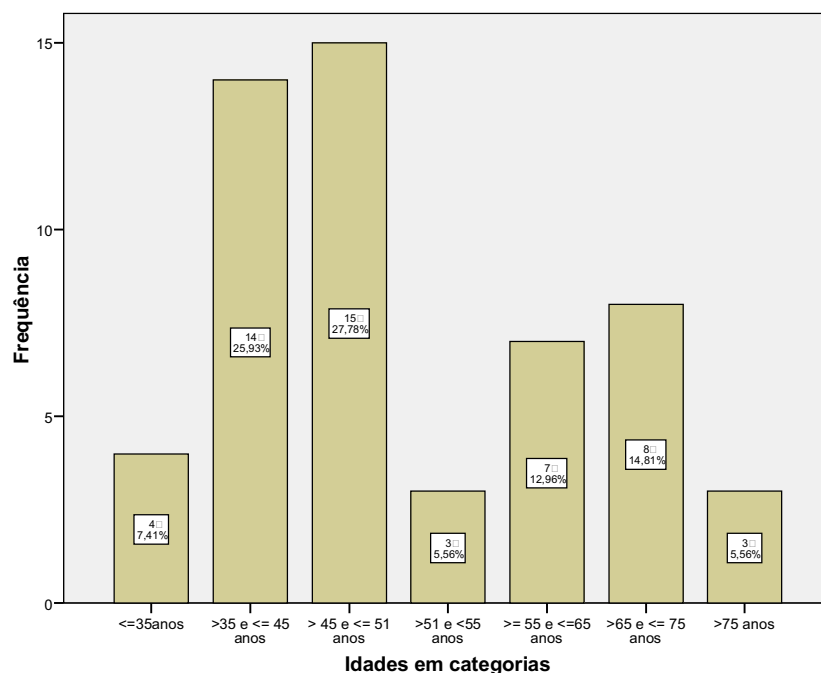


FIGURA 01: Distribuição de Idades Categorizadas

A observação do gráfico de barras demonstra uma diminuição da incidência após os 51 anos, uma discreta elevação entre 55 e 75 anos e além de 75 anos uma nova queda na incidência.

4.1.2 Estadiamento

A amostra está caracterizada por casos primariamente operáveis, em estadiamento igual ou inferior ao II B. Dentre eles se destaca o subgrupo II B com 38,89% (n= 21) e o subgrupo II A com 33,33% (n= 18). Entre os casos operáveis o estadiamento I representa 24,07% da amostra (n=13).

Em estádios mais avançados III A e IV estiveram representados por 1 caso cada. Trata-se de casos abordados com biópsias incisionais preliminares ao tratamento quimioterápico. Não ocorreram casos em estadiamento III B.

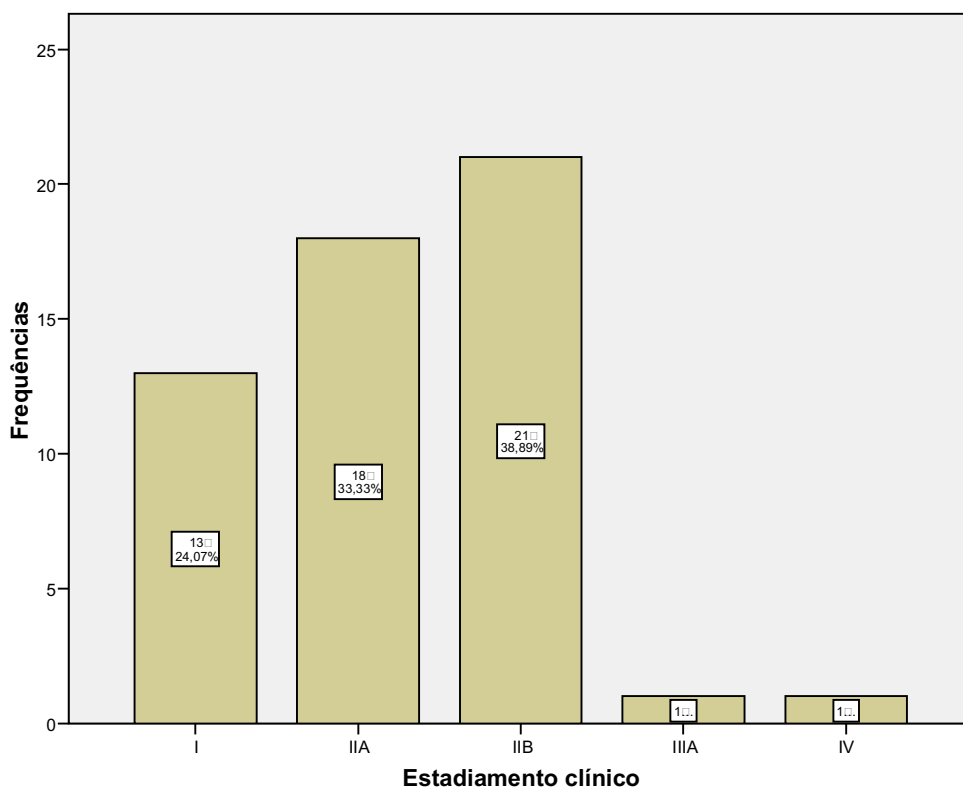


FIGURA 02: Distribuição de Frequências Segundo o Estadiamento Clínico

4.1.3 Tamanho do tumor

Mais da metade das pacientes possuem tumores de tamanho superior a 2 cm, com 53.71%.

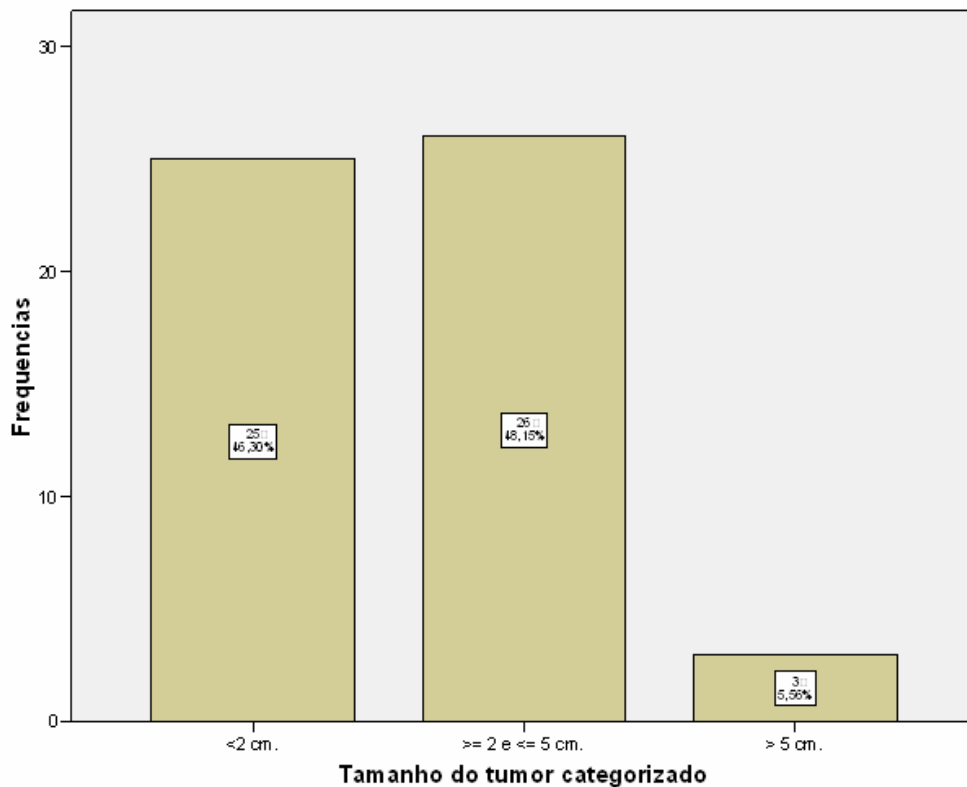


FIGURA 03: Distribuição de Frequências por Categoria de Tamanho Tumoral.

4.1.4 Comprometimento axilar

A distribuição de casos segundo o comprometimento axilar foi praticamente simétrica nos dois subgrupos com 28 sujeitos no grupo axila-negativa, e 26 no grupo axila-positiva. Esta variável se correlacionou positivamente com tamanho do tumor de acordo com a tabela 01.

A associação entre diâmetro tumoral e comprometimento axilar mostrou-se muito significativa, o χ^2 assumiu o p valor de 0,034. Não foi observada associação destas variáveis com a expressão de VEGF.

Tabela 01: Comprometimento axilar versus tamanho do tumor categorizado

Comprometimento axilar	Tamanho do tumor categorizado			Total
	<= 2 cm.	> 2 e <= 5 cm.	> 5 cm.	
positivo	8	15	3	26
negativo	17	11	0	28
Total	25	26	3	54

4.1.5 Grau Histológico:

Os carcinomas analisados apresentavam em sua maioria grau de diferenciação moderado 53,70% (n=29). Na categoria de grau histológico pouco diferenciado ocorre um percentual de 25,93% de casos (n=14)

Somente 11,1% (n=6) dos casos encontravam-se em categoria bem diferenciada.

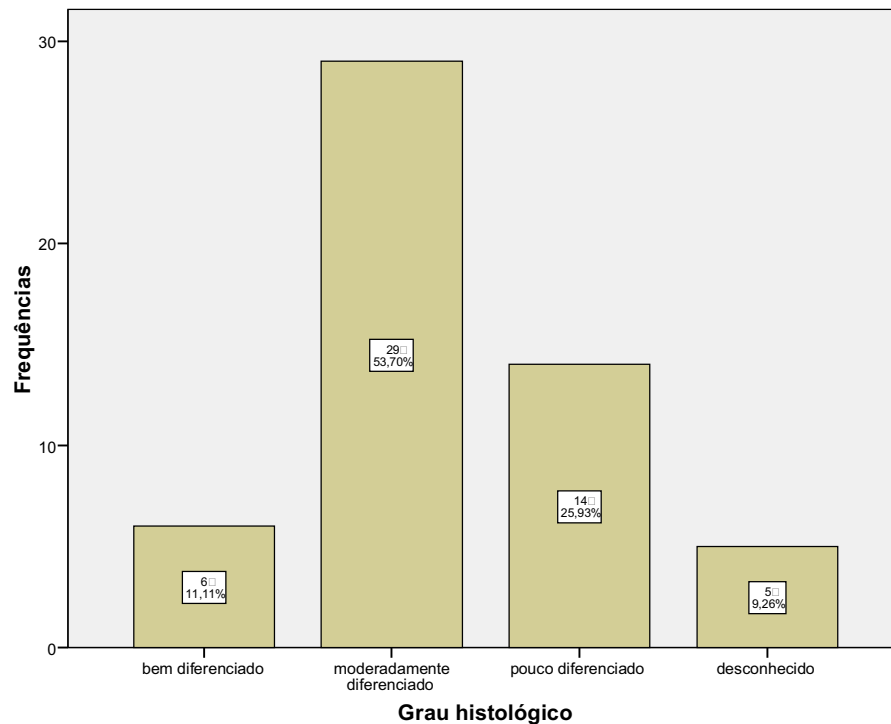


FIGURA 04: Distribuição de freqüências segundo o grau histológico

Não foi encontrada associação significativa do grau nuclear com as seguintes variáveis: Comprometimento axilar, tamanho do tumor e idade.

4.1.6 – Sobrevida:

Dentre as pacientes apenas vinte e duas já haviam sido acompanhadas por 5 anos ao encerramento da coleta de dados clínicos. Entre elas 5 casos apresentavam ao encerramento da coleta de dados recorrência tumoral ou óbito. As demais 17 pacientes encontravam-se livres de doença.

O gráfico ilustra o subgrupo de 32 pacientes que não possuindo cinco anos completos de seguimento foram excluídas da análise de sobrevida.

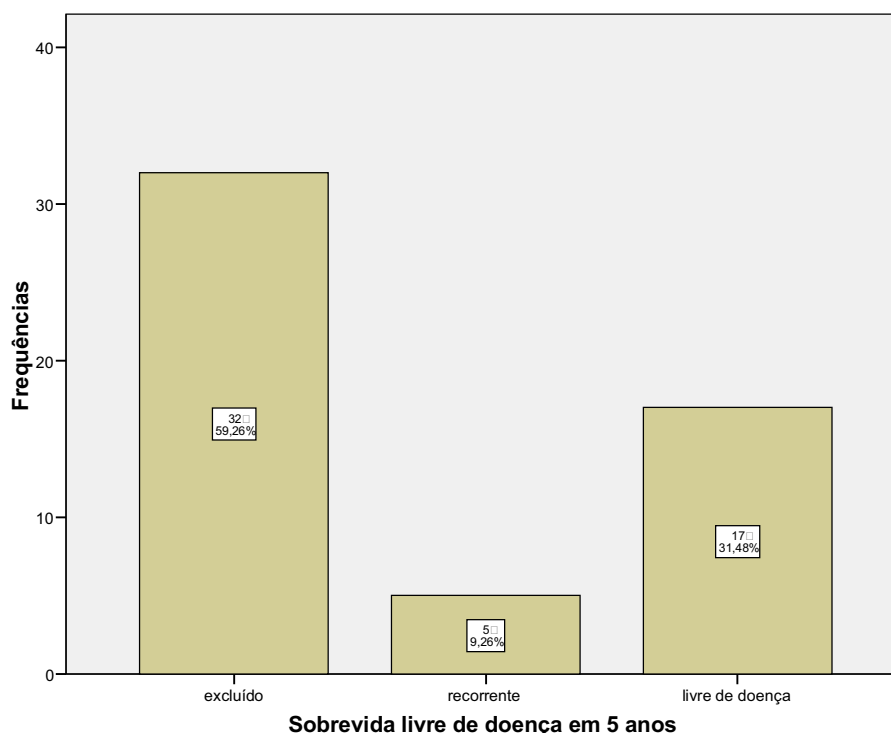


FIGURA 05: Distribuição de frequências de pacientes com sobrevida em 5 anos

O subgrupo recorrente inclui tanto pacientes portadoras de metástases tratáveis, como casos de recorrência tumoral no sítio cirúrgico e óbito por câncer mama. O subgrupo livre de doença está definido como pacientes assintomáticas com mamografia, raio X de tórax, e exames laboratoriais normais.

4.2 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS LABORATORIAIS

4.2.1 Receptores Hormonais

4.2.1.1 Estrogênio

A expressão de receptores de estrogênio, foi negativa em 51,85% dos casos (n= 28), não foi observada significância nas associações desta variável com o grau histológico, tamanho do tumor, Idade e comprometimento axilar.

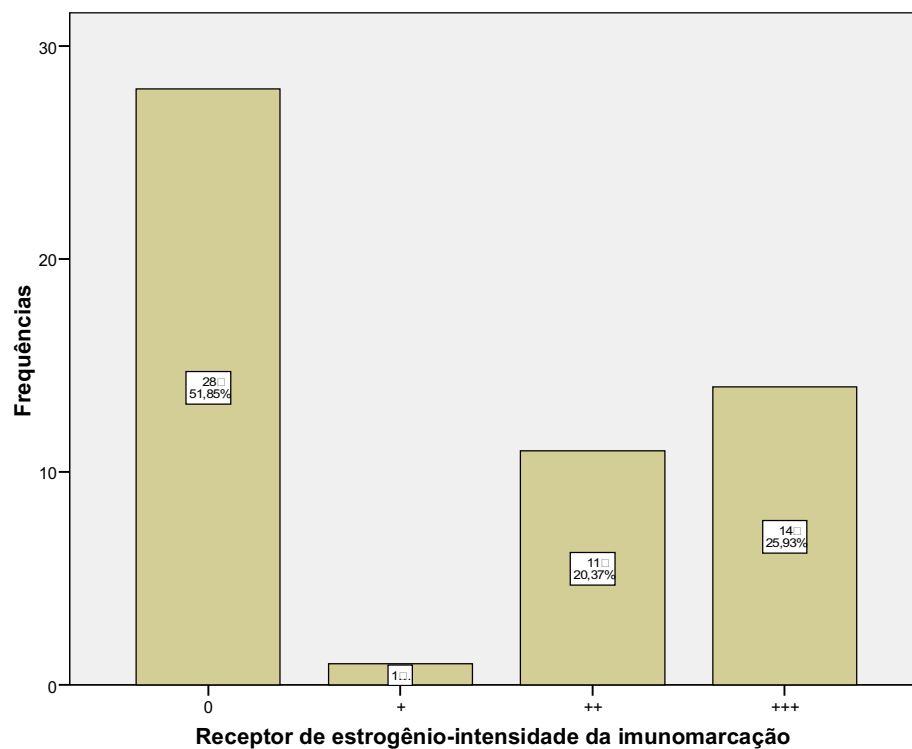


FIGURA 06: Distribuição de Frequências da Expressão de Receptores para Estrogênio.

4.2.1.2 Progesterona

A expressão de receptores de progesterona distribuída em 28 casos de expressão negativa e 26 casos de expressão positiva.

O qui-quadrado para a associação desta variável com o estadiamento clínico, comprometimento axilar, grau histológico, ou idade não foi significativo.

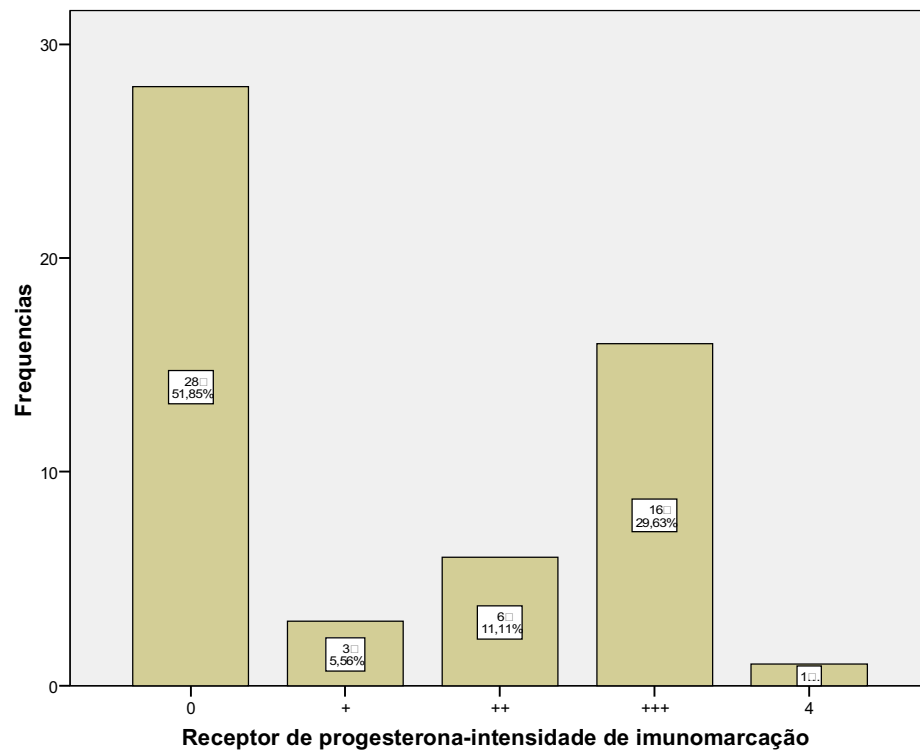


FIGURA 07: Distribuição de frequências de expressão de receptores para progesterona

4.2.1.2.1 Correlação entre a expressão de receptores de estrogênio e de progesterona

A associação entre os receptores de progesterona e estrogênio foi altamente significativa com p-valor menor que 0,0001.(Tabela 02)

Quando o receptor de estrogênio não se expressou, o receptor de progesterona também esteve ausente.

Tabela 02: Associações entre a expressão do Receptor de estrogênio versus Receptor de progesterona

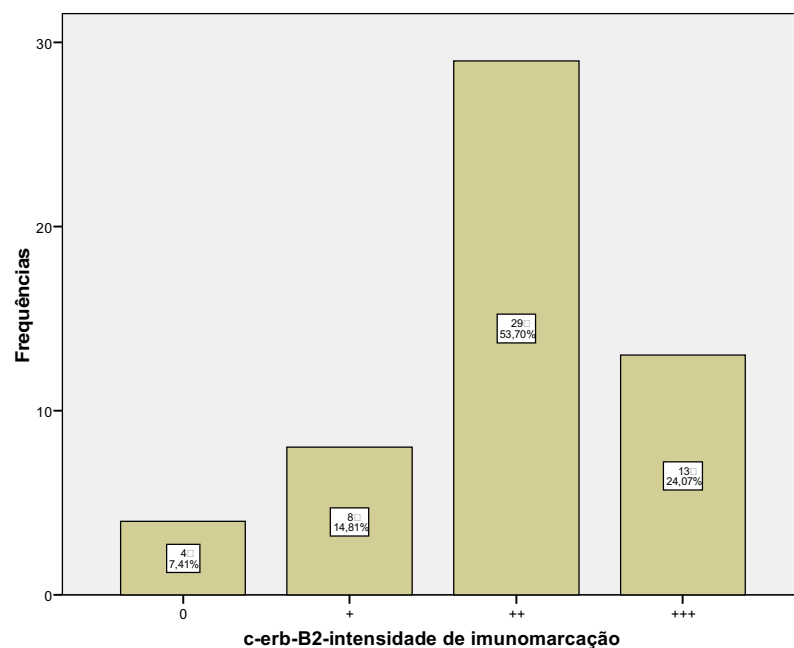
		Receptor de progesterona					Total
		0	+	++	+++	++++	0
Receptor de estrogênio	0	26	0	0	2	0	28
	+	0	1	0	0	0	1
	++	0	2	3	6	0	11
	+++	2	0	3	8	1	14
Total		28	3	6	16	1	54

4.2.2 c-erb B-2

O antígeno c-erb B-2 apresentou ausência de expressão em apenas 4 casos. A expressão desta variável aconteceu em 92,6% dos casos (n=50). A gradação mais freqüente foi a moderada, representada no gráfico como ++.

c-erbB2 foi intensamente expressado em 24% dos casos. Fitzgibbons estima esta ocorrência em 25% dos casos.

As variáveis: tamanho do tumor, comprometimento axilar, idade, e receptores hormonais tiveram os valores de qui-quadrado não significantes na associação com c-erb B-2.

**FIGURA 08: Distribuição da expressão de c-erb B-2**

4.2.3 MIB-1 (ki67)

O MIB-1 expressou-se positivamente em 96.3% da amostra, sendo que em 77.8% dos casos estão entre as categorias 2+ e 4+.

Este achado permite qualificar a amostra como de predomínio de casos com elevada proliferação celular. Apesar disso a variável MIB-1 não mostrou associação significativa com o estadiamento clínico, tamanho do tumor, grau histológico, receptor de estrogênio.

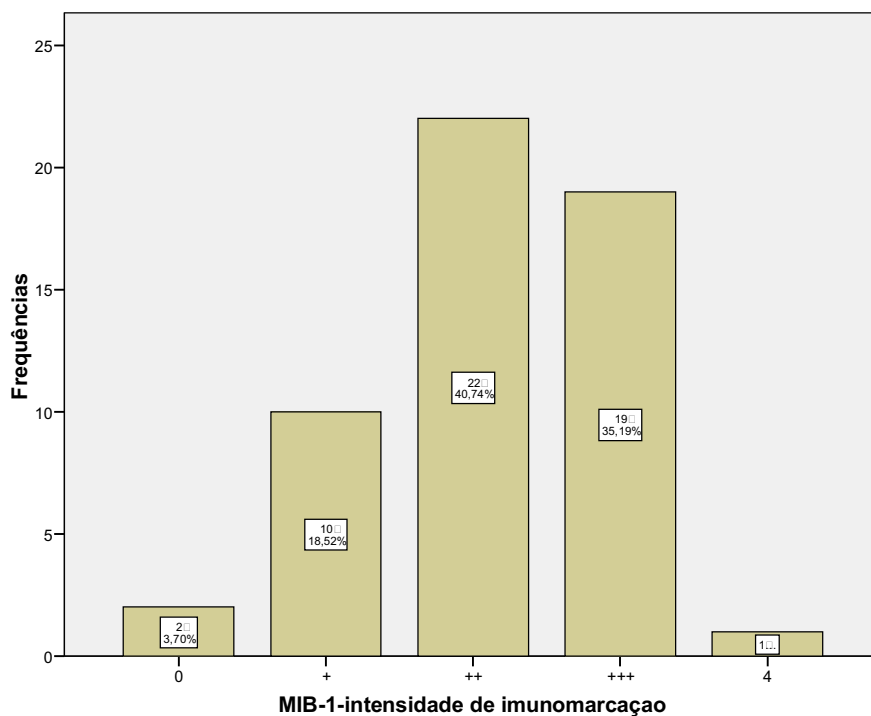


FIGURA 09: Distribuição de Frequências da Expressão de MIB.

A associação de MIB com *c-erb* B-2 foi altamente significativa com qui-quadrado de 33,297 e p valor 0,001

4.2.4 p53

A proteína p53, quando detectada pela imuno-histoquímica indica mutação do gene TP53. A literatura refere sua ocorrência em aproximadamente 30% dos casos de carcinoma de mama.

A amostra exhibe expressão positiva de p53 em 70.4% da amostra. Essa expressão ocorre predominantemente em grau de moderado (2+) a intenso (3+ e 4+). Este achado encontra-se acima do esperado para a população geral, e permite inferir agravo na taxa de sobrevivência desta população.

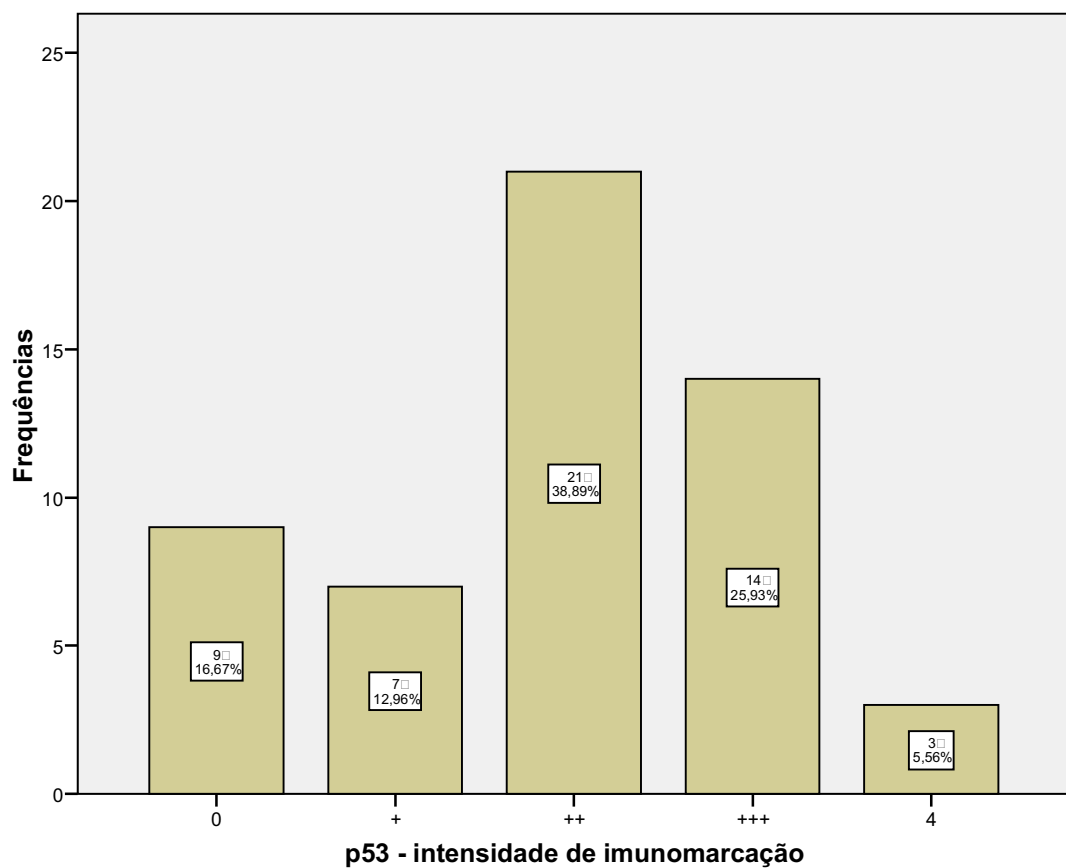


FIGURA 10: Distribuição de freqüências de expressão de p53

As variáveis: tamanho do tumor, comprometimento axilar, idade, e receptores hormonais tiveram os valores de qui-quadrado não significantes na associação com p53.

4.2.5 VEGF

A maior parte dos casos (53,7%) expressou moderadamente o VEGF (n=29). Apenas 1,9% dos carcinomas mostrou-se negativo para expressão deste antígeno (n=1).

A expressão em 96,3 % dos casos está acima da encontrada por outros autores (Nicolini-86%, Nieto-83%, Nakamura-83%). Convém salientar, entretanto, que os anticorpos empregados nos referidos experimentos foram diferentes do utilizado no presente trabalho.

Nas figuras 19,20 e 21 apresenta-se fotos da imuno-histoquímica para o VEGF que exemplificam a análise semi-quantitativa da expressão do VEGF

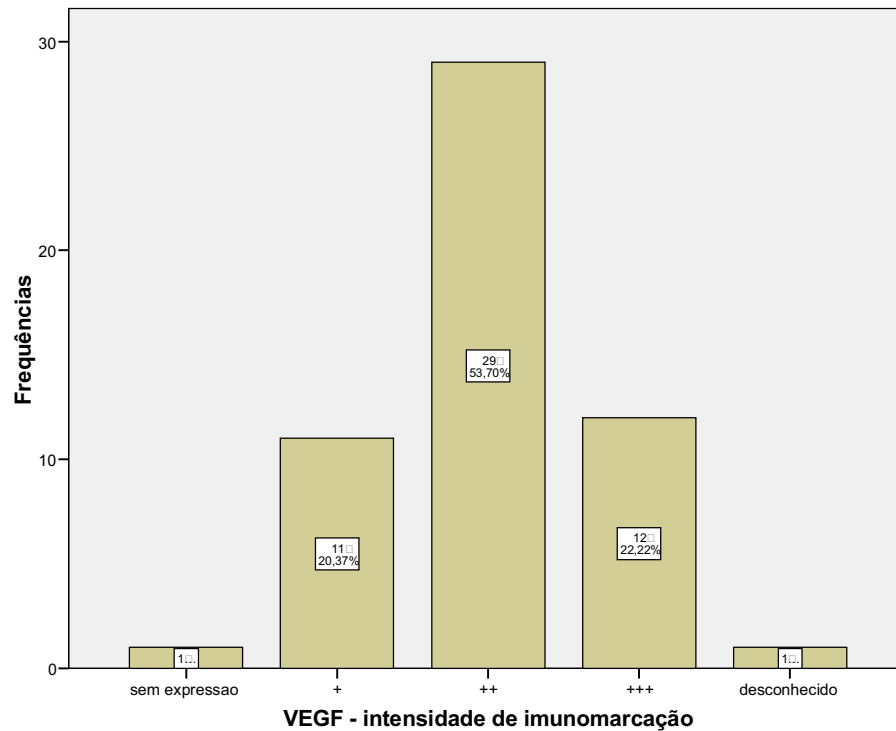


FIGURA 11: Distribuição de Frequências da Expressão de VEGF.

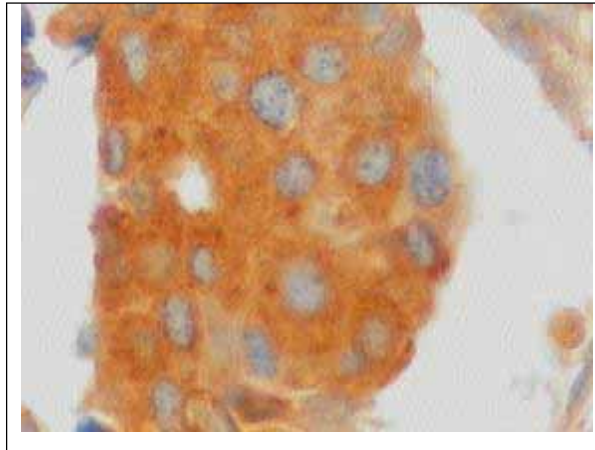


FIGURA 12 : Fotomicrografia: Caso no.18-M.C.C,Carcinoma ductal infiltrante,IHQ VEGF3+,(400x)

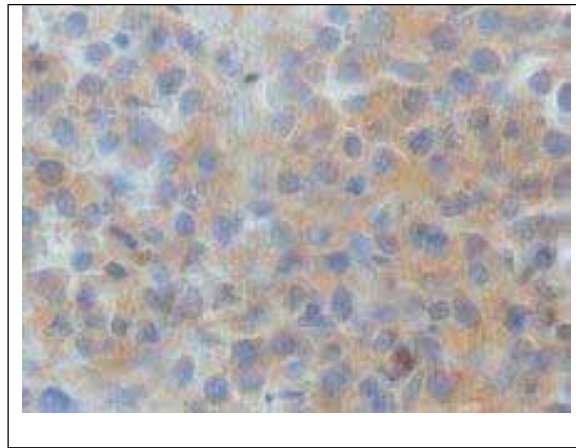


FIGURA 13: Fotomicrografia CASO no.1-J.D.M. Carcinoma ductal infiltrante, IHQ VEGF 2+(400x)

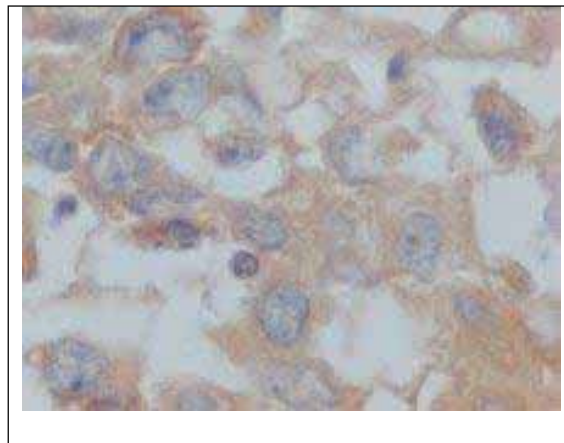


FIGURA 14: Fotomicrografia CASO no.36- E.T.L Carcinoma ductal infiltrante, IHQ VEGF 1+, 400x

4.3.1 Estudo Correlacional Todas as Variáveis versus a expressão de VEGF.

TABELA 03- Estudo correlacional todas as variáveis versus a expressão de VEGF.

		VEGF 0	VEGF+	VEGF++	VEGF+++	Desconhecido	Qui- quadrado
Estadiamento Clínico	I	0	0	9	4	0	12,945 (p=0,67)
	II A	1	7	7	3	0	
	II B	0	4	11	5	1	
	IIIA	0	0	1	0	0	
	IV	0	0	1	0	0	
Diâmetro Tumoral	<=2cm	0	4	14	7	0	6,192 (p=0,62)
	>2 e <5 cm	1	7	12	5	1	
	>5cm	0	0	3	0	0	
RE +		0	4	6	8	1	3,116 (p=0,539)
RE -		1	7	13	4	0	
Pré- menopausa		1	6	20	5	-	4,134 (p=0,388)
Pós- menopausa		0	5	9	7	-	
Axila +		1	4	13	7	1	3,392 (p=0,494)
Axila -		0	7	16	5	0	
c-erb B-2	0	1	0	2	1	0	19,930 (p=0,068)
	+	0	2	6	0	0	
	++	0	7	14	8	0	
	+++	0	2	7	3	1	
p53	0	0	1	4	4	0	14,911 (p=0,53)
	+	0	1	4	2	0	
	++	0	7	8	5	0	
	+++	1	2	10	1	0	
	++++	0	0	3	0	0	
MIB	0	1	0	1	0	0	40,782 p=0,001
	+	0	1	3	6	0	
	++	0	7	12	2	1	
	+++	0	3	12	4	0	
	++++	0	0	1	0	0	

4.3.2 – Estudo correlacional de p53 versus *status* menopausal.

Tabela 04: Associação do p53 segundo *status* menopausal.

	Status Menopausal		Total
	<51anos	> ou = a 51 anos	
0	7	2	9
+	1	6	7
++	13	8	21
+++	10	4	14
4	2	1	3
Total	33	21	54

Proteína p53 mostrou tendência à significância na associação com o *status* menopausal. O subgrupo de mulheres na pré menopausa (< 51 anos) mostrou qui-quadrado = 8,182 e p valor de 0,085 limítrofe a significância.

Oncoproteína *c-erb* B-2, VEGF e MIB não mostraram significância frente o *status* menopausal.

4.3.3 Estudo correlacional da expressão de VEGF versus *c-erb* B-2 segundo o comprometimento axilar

O VEGF associou-se significativamente ao *c-erb* B-2 no subgrupo de mulheres com comprometimento axilar, o qui-quadrado foi de 0,046. No subgrupo axila-negativa não se observou associação.

Tabela 05: Associação entre VEGF e *c-erb* B-2 segundo o comprometimento axilar

Comprometimento axilar		<i>c-erb</i> B-2				Total
		0	+	++	+++	0
positivo	Sem expressão	1	0	0	0	1
	+	0	0	3	1	4
	++	1	3	8	1	13
	+++	0	0	5	2	7
	desconhecido	0	0	0	1	1
	Total	2	3	16	5	26
negativo	+	0	2	4	1	7
	++	1	3	6	6	16
	+++	1	0	3	1	5
	Total	2	5	13	8	28

4.3.4 Estudo correlacional do comprometimento axilar versus sobrevida livre de doença em 5 anos

Quando se considera as 22 pacientes acompanhadas no período de cinco anos, foi observado apenas um caso de recorrência no subgrupo de axila-livre. O qui-quadrado de 0,078 não é significativo, mas expressa uma tendência à significância.

Tabela 06: Comprometimento axilar versus sobrevida livre de doença em 5 anos

		Comprometimento axilar		Total
		Positivo	Negativo	Positivo
SOBREVIDA em 5 anos	Recorrente	4	1	5
	Livre de doença	6	11	17
Total		10	12	22

Qui-quadrado 0,078 mostra tendência à significância.

4.3.5 – Estudo correlacional da expressão de VEGF versus a sobrevida livre de doença em 5 anos.

Tabela 07 : VEGF versus sobrevida livre de doença em 5 anos

		VEGF				Total
		+	++	+++	desconhecido	
SOBREVIDA 5 anos	Recorrente	1	3	1	0	5
	Livre de doença	4	9	3	1	17
Total		5	12	4	1	22

Não foi observada associação entre as variáveis, Qui-quadrado de 0,98 com 3 graus de liberdade.

DISCUSSÃO:

Os principais achados deste trabalho demonstraram que os casos de câncer de mama atendidos no Hospital Regional de Sobradinho possuem, em sua maioria, características clínicas de prognóstico desfavorável. Embora sejam casos primariamente operáveis predominam pacientes em pré-menopausa, estadiamento II B, com tumores de diâmetro superior a 2 cm. Quase a metade das pacientes já possui comprometimento axilar no momento do diagnóstico.

A análise dos parâmetros clínicos da amostra expressa gravidade na epidemiologia do câncer de mama na comunidade de Sobradinho: tumores grandes, axilas comprometidas, grau histopatológico elevado. A análise da distribuição de frequência destas variáveis pode evidenciar retardo no diagnóstico e a necessidade de implantação de um programa de rastreamento mamográfico nessa localidade.

O grau histopatológico mostrou-se moderado ou pobremente diferenciado em aproximadamente 79% dos casos. A sobrevida livre de doença após 5 anos foi de 77%. Dados da *American Cancer Society* exibem 80% de sobrevida, e o INCA em seu último relatório (INCA, 2008) informa a taxa de sobrevida média após 5 anos de 61% para as brasileiras portadoras de câncer de mama. É necessário observar que neste levantamento apenas 22 pacientes já contavam com cinco anos completos de seguimento sendo uma amostra muito pequena, consideramos discutível o valor desta informação.

Esse conjunto de dados delinea um cenário de diagnósticos tardios com tumores já palpáveis, volumosos e invasivos em mulheres pré-menopausicas, ainda jovens e produtivas. Dados que denunciam a ausência de um programa de rastreamento mamográfico que permita a detecção em fase pré-clínica dos carcinomas de mama na comunidade de Sobradinho. Além disso, estas observações caracterizam esta amostra como de risco para recorrência tumoral com taxas menores de sobrevida livre de doença em cinco anos.

A implantação de um programa de rastreamento mamográfico resultaria em detecção mais precoce dos casos de câncer de mama na comunidade e poderia, a

médio prazo, resultar na diminuição dos custos envolvidos no tratamento destas mulheres com declínio das taxas de mortalidade pelo câncer de mama.

Segundo Tábar (1999), o carcinoma de mama é marcado pela heterogeneidade de clones celulares que o compõe. Os clones mais agressivos se multiplicam mais rapidamente que o componente bem diferenciado do tumor. Assim o grau de diferenciação tende a se agravar na medida em que o nódulo cresce.

Se o grau histológico tende a progredir na medida em que há retardo no diagnóstico, é mais provável que em uma amostra de tumores volumosos e indiferenciados, o câncer de mama possa manifestar modificações genéticas que incorrem em gravidade expressando antígenos relacionados a maus resultados de sobrevida como são *c-erb B-2*, *p53* e *MIB-1*. Pela mesma razão estes tumores deixam de expressar os marcadores que conferem melhor prognóstico por exemplo os receptores hormonais.

O carcinoma de mama é uma doença progressiva, mas sua progressão pode ser interrompida pelo diagnóstico precoce. O benefício do diagnóstico mamográfico vai além da detecção de lesões menores e localizadas. Oportuniza a detecção do tumor em grau de diferenciação histológica mais favorável ao tratamento e a sobrevida. O diagnóstico precoce implica em cirurgias menos extensas, podendo prescindir do tratamento adjuvante tão necessário entre os casos mais avançados. As pacientes beneficiadas pelo diagnóstico precoce através da mamografia têm chance sobrevida livre de doença mais longa, sem os estigmas mutilantes da cirurgia radical. Embora este estudo não contemple uma avaliação da cobertura mamográfica na comunidade de Sobradinho, o diâmetro dos nódulos no momento do diagnóstico, descreve o predomínio (53,71%) de tumores facilmente palpáveis com mais de 2cm de diâmetro. No momento da admissão 26 pacientes desta amostra já possuíam comprometimento axilar outro critério que indica diagnóstico tardio.

Entre os marcadores prognósticos investigados observou-se predomínio de casos com ausência de expressão de receptores hormonais para o estrogênio, esta evidência caracteriza casos de evolução desfavorável e insensíveis à terapia com tamoxifeno ou bloqueadores de aromatase.

Esta observação está ligada ao fato de 61% da amostra estar representada por mulheres em fase pré-menopausica, o que coincide com os achados de Bentzon (2008). Bentzon afirma que antes dos 51 anos as chances de observar ausência de receptores para estrogênio são maiores e demonstra que a proporção de receptores para estrogênio aumenta com a idade de 51 para 82%.

Quanto à superexpressão de *c-erb B-2* os achados foram condizentes com a literatura. A oncoproteína *c-erb B-2* confere gravidade prognóstica aos casos de câncer de mama e quimio-resistência ao Metotrexate. Fitzgibbons (2000), em sua revisão, menciona a ocorrência da superexpressão de *c-erb B-2* em um terço dos casos. Os achados neste trabalho apontaram para 24% dos casos (n=13) nos quais ocorreu expressão intensa deste marcador.

A expressão de MIB vem oferecer informação adicional sobre a taxa de proliferação celular dos tumores investigados. Foi encontrada superexpressão desse marcador em 37% das nossas pacientes. A partir deste achado infere-se mau prognóstico, em decorrência de proliferação celular acelerada.

Observou-se significância muito alta entre a expressão de MIB e de VEGF, o valor do qui-quadrado encontrado foi de 0,001. Considerando que VEGF é tomado como o principal mediador da angiogênese tumoral e sendo o câncer, de acordo com a hipótese de Folkman (1990), uma patologia angiogênese-dependente é possível que a proliferação celular revelada pelo MIB-1 decorra da capacidade de expressar abundantemente o VEGF e garantir o aporte de O^2 e nutrientes necessários ao desenvolvimento tumoral. A superexpressão de MIB-1 pode ser uma consequência da atividade do VEGF, visto que de acordo com Folkman(1971), a ação do VEGF aumenta a densidade de microvasos, amplia a superfície vascular em torno do tumor e oferece adequada nutrição às suas células. O mesmo autor considera que o crescimento de tumores sólidos depende diretamente da instalação da rede vascular neoformada. Como suposição pessoal considera-se que garantidas as condições ideais de nutrição e oxigenação uma fração maior de células neoplásicas deixam a fase G^0 para entrar em duplicação liberando o MIB-1. Outras pesquisas são necessárias para confirmar esta hipótese. A mesma correlação foi percebida por Nicolini (2004), sem ter sido justificada por este Autor.

A proteína p53 quando detectada pela imuno-histoquímica indica mutação do gene TP53 que desempenha função reguladora do ciclo celular. Está presente, segundo Fitzgibbons (2000), em um terço dos casos de câncer de mama e confere a estes tumores alto grau nuclear, agressividade clínica e refratariedade aos esquemas quimioterápicos convencionais. Os casos analisados neste trabalho, nos quais a expressão de p53 foi positiva, perfazem 70,4% das pacientes com superexpressão em 31% dos casos.

A expressão de p53 mostrou tendência à significância na associação com o status menopausal. A expressão de p53 foi mais freqüente no subgrupo de mulheres com idade inferior a 51 anos em fase pré-menopausica. Esta associação confere maior gravidade aos carcinomas ocorridos em 61% da amostra. O qui-quadrado encontrado foi de 0,085, valor próximo aos valores de significância.

VEGF foi identificado pelo anticorpo VG1 capaz de marcar as isoformas 121, 165 e 189 do fator de crescimento do endotélio vascular. As pacientes expressaram amplamente VEGF em 96% dos casos. Achado que condiz com os estudos revisados anteriormente nesta monografia ao demonstrar que a angiogênese é essencial ao crescimento tumoral e sendo VEGF um marcador da atividade angiogênica é natural que esteja amplamente expresso em uma amostra de carcinomas.

A superexpressão deste marcador coincidiu com expressão de *c-erb B-2*, (qui-quadrado =0,068). Esta correlação foi mais forte no subgrupo de pacientes com comprometimento axilar, o qui-quadrado encontrado foi de 0,046. A densidade de microvasos tomada como medida da angiogênese pode predizer a ocorrência de metástases, visto que quanto maior a superfície de troca vascular maiores as oportunidades de acesso à circulação sanguínea e linfática. No grupo de pacientes que exibiam comprometimento axilar os tumores mostraram maior expressão de VEGF, cuja ação viabilizou acesso a circulação sanguínea e linfática e permitiu a ocorrência de metástases a distancia e/ou para a cadeia linfonodal.

É importante prosseguir esta pesquisa comparando a densidade de microvasos (MVD) e a expressão de VEGF pelo VG1 para testar a associação da expressão de VEGF com este imuno-marcador e a MVD. Outros estudos

investigaram as mesmas variáveis contudo com reagentes diferentes (ver figura 07). Havendo uma associação forte entre a MVD e a expressão do VEGF marcada pelo VG1 estaríamos diante de uma excelente alternativa para a mensuração de angiogênese tumoral.

Segundo Howard (2004), a superexpressão de *c-erb B-2* está ligada a aumento de produção de VEGF pelo tumor. O que é atribuído à ação da subunidade α do HIF-1 (fator regulador da angiogênese induzido pela hipóxia). A subunidade α pode ser a mediadora da influência do *c-erb B-2* sobre a expressão de VEGF. Assim os tumores com taxa de crescimento mais elevada por influência de *c-erb B-2* sobrecarregam a microcirculação gerando déficit de oxigênio, seguido de liberação do HIF-1 α que atua estimulando a síntese de VEGF. A correlação entre o VEGF e o *c-erb B-2* resulta em incremento da angiogênese tumoral e a partir da neoformação vascular ocorre via de disseminação linfática e sanguínea para as células tumorais, agravando o prognóstico da portadora.

Yang (2002) conclui em uma análise das correlações entre *c-erb B-2* e VEGF-A, B, C e D em 107 casos de carcinoma de mama, que a ativação de *c-erb B-2* pode potencializar a adesão entre as células tumorais e endoteliais e aumentar a expressão de VEGF por ação do HIF-1 α .

Nesta pesquisa não foi alcançada associação significativa entre a expressão de VEGF pela imuno-histoquímica e a sobrevida livre de doença em 5 anos. Assim, não se pode qualificar o VEGF como um marcador prognóstico para o câncer de mama a partir desses dados. Mas é importante observar que o número de pacientes que atendiam a condição de 5 anos completos de seguimento era pequeno (n=22). O seguimento das demais pacientes estudadas, que possuem atualmente tempo de seguimento clínico inferior a 5 anos (n=32), ainda poderá oferecer em um futuro próximo conclusões positivas sobre a capacidade prognóstica da expressão tecidual do VEGF em carcinomas mamários.

A interpretação da intensidade da coloração no ensaio imuno-histoquímico pode sofrer críticas de subjetividade pelo caráter de mensuração semi-quantitativa. Acredita-se que estudos futuros correlacionando imuno-histoquímica com a hibridização *in situ* para o VEGF-A permitiriam correlacionar estes achados com um

parâmetro quantitativo mais confiável. Contudo os custos deste experimento podem ser elevadíssimos e são por ora inalcançáveis.

O método de análise empregado representa uma grande simplificação metodológica comparado aos métodos de aferição da densidade de microvasos propostos desde 1992 por Weidner que em sua complexidade de execução dificilmente teriam espaço na rotina de investigação prognóstica de tumores de mama.

O exame imuno-histoquímico vem acrescentando muitas informações sobre a biologia tumoral do câncer de mama. Seus resultados estão incorporados à prática clínica e sua realização é recomendada rotineiramente pelo Colégio Americano de Patologistas desde 2000. Os marcadores são úteis principalmente na decisão terapêutica e permitem definir adequadamente, em pacientes axila-negativa, quais deverão receber a quimioterapia adjuvante em razão de seus riscos individuais de recidiva definidos pelos marcadores prognósticos. Acredita-se que a inclusão de VEGF na rotina do estudo imuno-histoquímico usando-se o VG1 pode contribuir na identificação de casos com maior probabilidade de metastatização, novas pesquisas com este reagente e maior número de pacientes poderão assegurar esta hipótese.

A relevância do papel de VEGF na história natural do carcinoma de mama e a recente perspectiva de selecionar pacientes para terapia antiangiogênica com Bevacizumab, servem de incentivo a novos estudos usando o VG1. Métodos quantitativos de aferição do VEGF (por exemplo, a hibridização *in situ*) poderão definir se há valor prognóstico no VEGF entre os marcadores do painel imuno-histoquímico para câncer de mama ou se VEGF deverá ser acrescentado a pesquisa apenas como preditor de resposta terapêutica em esquemas quimioterápicos com Bevacizumab.

CONCLUSÃO

O estudo verificou ampla expressão de VEGF com positividade em 96,3% dos casos este achado ratifica a máxima postulada por Folkman em 1971, amplamente comprovada na revisão de literatura de que a angiogênese é essencial ao crescimento de tumores sólidos.

VEGF não mostrou correlação com a sobrevida livre de doença em 5 anos neste trabalho, mas correlacionou-se positivamente com dois marcadores prognósticos o *c-erb* B-2 e MIB-1, o que pode indicar um sinergismo entre fatores de mau prognóstico.

A perspectiva de uma terapia específica para inibir VEGF, qualifica este antígeno como um fator preditivo de resposta. Sua pesquisa pode auxiliar na seleção das pacientes que por expressarem intensamente o VEGF são mais sensíveis a uma terapia antiangiogênica, com resposta mais favorável a este esquema terapêutico que aos esquemas convencionais.

REFERÊNCIAS

1. ADAMS, J. e cols.. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. **Cancer Res.**, v. 60, n. 11, p. 2898-2905, 2000.
2. AMERICAN CANCER SOCIETY, Cancer facts & Figures 2007 disponível on-line www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2007PWSecured.pdf.-ultimo acesso 12/12/2007.
3. AXELSSON, K. e cols.. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. **J Natl.Cancer Inst.**, v. 87, n. 13, p. 997-1008, 1995.
4. BARROS AC; BUZAID AC. **Cancer de mama - Tratamento multidisciplinar** Dendrix edição, 2007. ISBN 978-85-99453-11-7.
5. BATES, D. O. ; HARPER, S. J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascul.Pharmacol.**, v. 39, n. 4-5, p. 225-237, 2002.
6. BAUMGARTNER, K. B. e cols.. Association of body composition and weight history with breast cancer prognostic markers: divergent pattern for Hispanic and non-Hispanic White women. **Am J Epidemiol.**, v. 160, n. 11, p. 1087-1097, 2004.
7. BENTZON, N e cols.. Prognostic effect of estrogen receptor status across age in primary breast cancer. **Int. J.Cancer**, v.122,n5,p1089-1094, 2008- Resumo on line www.periodicos.capes.gov.br
8. BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat.Rev.Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-410, 2003.
9. BORGSTROM, P. e cols.. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. **Anticancer Res.**, v. 19, n. 5B, p. 4203-4214, 1999.
10. BOUCHARDY, C. e MORABIA, A. (22-3-2006). **Remarkable change in age-specific breast cancer incidence in the swiss canton of Genova and its possible relation with the use of hormone replacement therapy**. **B.M.C.Cancer**, 2006,6:78 disponível online <http://www.biomedical.com/> acesso em 03/12/2006
11. BROWN, L. F. e cols.. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. **Clin.Cancer Res.**, v. 5, n. 5, p. 1041-1056, 1999.
12. CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat.Med.**, v. 6, n. 4, p. 389-395, 2000.
13. CARMICHAEL, A. R. Obesity and prognosis of breast cancer. **Obes.Rev.**, v. 7, n. 4, p. 333-340, 2006.
14. CHOI, W. W. e cols.. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. **Mod.Pathol.**, v. 18, n. 1, p. 143-152, 2005.
15. CINIEMI, S.; ORLANDO, L.; COLLEONI, M. Primary systemic therapy on local advance breast cancer, where are we going? **Ann.Oncol.**, v. 17 Suppl 7, p. vii18-vii21, 2006.
16. COSTA M F e GUERRA H. (2000). **Diagnóstico da Situação de Saúde da População Idosa Brasileira: um Estudo da Mortalidade e das Internações Hospitalares Públicas**. Informe Epidemiológico do SUS 9[3], 23-41. 24-12-2007.
17. DAHLBERG, S. ; LIU, P. Y. Prognostic factors in clinical trials. **Breast Cancer Res.Treat.**, v. 22, n. 3, p. 193-196, 1992.

18. DAIDONE, M. G. e cols.. Primary breast cancer in elderly women: biological profile and relation with clinical outcome. **Crit Rev.Oncol.Hematol.**, v. 45, n. 3, p. 313-325, 2003.
19. DE CASTRO, J. G. e cols.. Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). **Crit Rev.Oncol.Hematol.**, v. 59, n. 1, p. 40-50, 2006.
20. DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU,I.A e cols Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. **J.Pathol.vol197(5):677-83.2002.**
21. EISENBERG, A. e KOIFMAN, S. (2004). **Fatores prognósticos do cancer de mama sem comprometimento de linfonodos axilares: revisao da literatura.** Rev.Bras.Mastologia 14[4], 149-160. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease.
22. EUROPEAN MEDICINES EVALUATION AGENCY.(2007). **Extension of the indication to include Avastin in combination with paclitaxel for first-line treatment of patients with metastatic breast cancer.** EMEA group, disponível em www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/avastin/Avasrin-AR-H-582-II-08.pdf. Acesso em 15-12-0007.
23. FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nat.Rev.Cancer**, v. 2, n. 10, p. 795-803, 2002.
24. FERRARA, N.. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr.Rev.**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.
25. FERRARA, N.. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **J Mol.Med.**, v. 77, n. 7, p. 527-543, 1999.
26. FERRARA, N. ; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. **Nat.Med.**, v. 5, n. 12, p. 1359-1364, 1999.
27. FERRARA, N. e cols.. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. **Am J Pathol.**, v. 162, n. 6, p. 1881-1893, 2003a.
28. FERRARA, N.; GERBER, H. P.;LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat.Med.**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003b.
29. FERRARA, N. e cols.. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr.Rev.**, v. 13, n. 1, p. 18-32, 1992.
30. FERRARA, N. ; KEYT, B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. **EXS**, v. 79, p. 209-232, 1997.
31. FERRARA, N. e cols.. Targeting VEGF-A to Treat Cancer and Age-Related Macular Degeneration. **Annu.Rev.Med.**, 2006.
32. FERRARA, N. ; VIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr.Rev.**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.
33. FITZGIBBONS, P. L. e cols.. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch.Pathol.Lab Med.**, v. 124, n. 7, p. 966-978, 2000.
34. FOLKMAN, J. Angiogenesis and apoptosis. **Semin.Cancer Biol.**, v. 13, n. 2, p. 159-167, 2003.
35. FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annu.Rev.Med.**, v. 57, p. 1-18, 2006.
36. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N.Engl.J Med.**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.
37. FOLKMAN, J. ; KALLURI, R. Cancer without disease. **Nature**, v. 427, n. 6977, p. 787, 2004.

38. FOLKMAN, J. e cols.. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **J Exp.Med.**, v. 133, n. 2, p. 275-288, 1971.
39. GASPARINI, G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. **Crit Rev.Oncol.Hematol.**, v. 37, n. 2, p. 97-114, 2001.
40. GASPARINI, G Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. **Oncologist.**, v. 5 Suppl 1, p. 37-44, 2000.
41. GASPARINI, G. ; HARRIS, A. L. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. **J Clin.Oncol.**, v. 13, n. 3, p. 765-782, 1995.
42. GASPARINI, G. e cols.. Thrombospondin-1 and -2 in node-negative breast cancer: correlation with angiogenic factors, p53, cathepsin D, hormone receptors and prognosis. **Oncology**, v. 60, n. 1, p. 72-80, 2001.
43. GASPARINI, G. e cols.. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. **J Natl.Cancer Inst.**, v. 89, n. 2, p. 139-147, 1997a.
44. GIATROMANOLAKI,A e cols. The angiogenic "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR) receptor" pathway in patients with endometrial carcinoma: prognostic and therapeutic implications. **Cancer**. Vol92,n 10 p2569-2577. 2001.
45. GRACA, B. e cols.. [Angiogenesis and cancer: from biopathology to therapy]. **Acta Med.Port.**, v. 17, n. 1, p. 76-93, 2004.
46. HARBECK, N. e cols.. Tumor-associated proteolytic factors uPA and PAI-1: critical appraisal of their clinical relevance in breast cancer and their integration into decision-support algorithms. **Crit Rev.Clin.Lab Sci.**, v. 44, n. 2, p. 179-201, 2007.
47. HARMEY, J. **VEGF and cancer- Medical Intelligence Unit 1a**. edição.New York,New York,U.S.A. 2003. ISBN 0-306-47988-5.
48. HAYES, D. F. Prognostic and predictive factors revisited. **Breast**, v. 14, n. 6, p. 493-499, 2005.
49. HICKLIN, D. J. ; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin.Oncol.**, v. 23, n. 5, p. 1011-1027, 2005.
50. HLATKY,I e cols Clinical application of antiangiogenic Therapy:Microvessel density,What it does and doesn't tell us.**J.Natl.cancer Inst**. Vol 94,no.12,2002
51. HOWARD, E. M. e cols.. Correlation and expression of p53, HER-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), and e-cadherin in a high-risk breast-cancer population. **Int.J Clin.Oncol.**, v. 9, n. 3, p. 154-160, 2004.
52. HRUSHESKY, W. J. e cols.. Re: Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. **J Natl.Cancer Inst.**, v. 99, n. 13, p. 1053-1054, 2007.
53. IDE, A. G. e BAKER, N. H. W. S. L. (1939). **Vascularization of the Brown Pierce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber**. Am J Roentgnol 42, 891-899.
54. INCA.**Incidência de Câncer no Brasil-Estimativas 2008** disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008.pdf>, acesso em 7/12/2007.
55. INCA.**Ocorrência e sobrevida segundo estadiamento 2004**.disponível em http://www.inca.gov.br/situação/arquivos/ocorrência_sobrevida.pdf, acesso em 12 de agosto de 2007.
56. JACOBS TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. - HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. **Am J Clin Pathol**. 113(2): 251-258, 2000.

57. KATO, T. e cols.. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. **Br.J Cancer**, v. 88, n. 12, p. 1900-1908, 2003.
58. KATO, T. e cols.. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for 377 Japanese patients with breast cancer. **Breast Cancer Res.Treat.**, v. 70, n. 1, p. 65-74, 2001.
59. KIM, K. J. e cols.. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 841-844, 1993.
60. LINDERHOLM, B. e cols.. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. **J.Clin.Oncol.**, v. 16, n. 9, p. 3121-3128, 1998.
61. LOCOPO, N.; FANELLI, M.;GASPARINI, G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. **Breast Cancer Res.Treat.**, v. 52, n. 1-3, p. 159-173, 1998.
62. MELLO, ES; ALVES, VAF, Determinação da fração de proliferação celular no carcinoma de mama pela marcação imunohistoquímica do antígeno nuclear Ki-67 comparação dos métodos quantitativo e semi-quantitativo. **J Bras Patol.**, 35 (4): 200-205, 1999:.
63. MORRIS, S. R. ; CAREY, L. A. Molecular profiling in breast cancer. **Rev.Endocr.Metab Disord.**, 2007.
64. NAKAMURA, Y. e cols.. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. **Clin.Cancer Res.**, v. 9, n. 2, p. 716-721, 2003.
65. NAVARRETE, M. A. e cols.. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Res.**, v. 7, n. 3, p. R306-R313, 2005.
66. NEWMAN, L. A. ; MARTIN, I. K. Disparities in breast cancer. **Curr.Probl.Cancer**, v. 31, n. 3, p. 134-156, 2007.
67. NICOLINI, A. e cols.. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and other common tissue prognostic indicators in breast cancer: a case-control study. **Int.J Biol.Markers**, v. 19, n. 4, p. 275-281, 2004.
68. NIETO, Y. e cols.. Prognostic analysis of tumour angiogenesis, determined by microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. **Br.J Cancer**, v. 97, n. 3, p. 391-397, 2007.
69. OSBORNE, C. K. ; SCHIFF, R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. **J Clin.Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1616-1622, 2005.
70. PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.;DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur.J Cancer**, v. 37 Suppl 8, p. S4-66, 2001.
71. PEDRO,A; NETO,A; PAIVA,L. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar.**Cadernos de Saúde Pública** V,19,n1,p17-25.
72. PIERGA, J. Y. e cols.. Prognostic value of cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) and cytokeratin-positive cells in bone marrow samples of breast cancer patients. **Int.J Biol.Markers**, v. 19, n. 1, p. 23-31, 2004.
73. PUGH, C. W. ; RATCLIFFE, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. **Nat.Med.**, v. 9, n. 6, p. 677-684, 2003.
74. RAKHA, E. ; ELLIS, I. O. Non Operative Breast Pathology: An overview of assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer needle core biopsy specimens. **J Clin.Pathol.**, 2007.
75. ROBERTS, W. G. ; PALADE, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. **J Cell Sci.**, v. 108 (Pt 6), p. 2369-2379, 1995.

75. SANNINO P ; SHOUSHA S – Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. *J. Clin. Pathol.* 47:90-92, 1994.
76. SCHMITT FS, SOARES R, CIRNES L & SERUCA R – P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. **Path.Res.Pract.** 194:815-819,1998.
77. SCOTT, L. J. Bevacizumab: in first-line treatment of metastatic breast cancer. **Drugs**, v. 67, n. 12, p. 1793-1799, 2007.
78. SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL (2005). *Dados e Indicadores Epidemiológicos do Distrito Federal-2003*.
79. SHIH, T. ; LINDLEY, C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. **Clin.Ther.**, v. 28, n. 11, p. 1779-1802, 2006.
80. SIDONI, A. e cols.. Breast cancer in young women: clinicopathological features and biological specificity. **Breast**, v. 12, n. 4, p. 247-250, 2003.
81. SILVA-RIBEIRO, A. e ZUCULOTP, S. (2003). **A família do p53: aspectos estruturais e funcionais do p73 e do p63**. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* , 179-184.
82. TAYLOR, A. ; CHENG, K. K. Social deprivation and breast cancer. **J Public Health Med.**, v. 25, n. 3, p. 228-233, 2003.
83. TOI, M. e cols.. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. **Breast Cancer Res.Treat.**, v. 36, n. 2, p. 193-204, 1995.
84. TOI, M. e cols.. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. **Cancer**, v. 77, n. 6, p. 1101-1106, 1996.
85. TURLEY, H. e cols.. Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal antibody VG1. **J Pathol.**, v. 186, n. 3, p. 313-318, 1998.
86. VAN, VJIVER e cols.. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530-536, 2002.
87. VERMEULEN, P. B. e cols.. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. **Eur.J Cancer**, v. 32A, n. 14, p. 2474-2484, 1996.
88. VERONESI, U.e cols..Rethinking TNM: breast cancer classification for treatment decision-making and research. **Breast,v.15,n.1,p 3-8,2006**
89. VERONESI, U. e cols. **Mastologia Oncológica** Veronesi,U e cols.1ª. edição rio de Janeiro –RJ: MEDSI Editora Médica Científica Ltda,2002
90. WALKER, R. A. e cols.. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. **Br.J Cancer**, v. 74, n. 11, p. 1796-1800, 1996.
91. WEIDNER, N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. **Breast Cancer Res.Treat.**, v. 36, n. 2, p. 169-180, 1995.
92. WEIDNER, N. e cols.. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. **J Natl.Cancer Inst.**, v. 84, n. 24, p. 1875-1887, 1992.
93. WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.;VAN, V. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nat.Rev.Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005.
94. WISINTAINER, F.; BOFF, R. **Mastologia Moderna**. Ed.Mesa Redonda, 2006. 468 p. ISBN 85-99407-02-3.

95. YANCOPOULOS, G. D. e cols.. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 242-248, 2000.
96. YANG,W. e cols.. ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A. **Cancer** v. 94 n.11 p.2855-2861 2002
97. ZAVAGNO, G. e cols.. Influence of age and menopausal status on pathologic and biologic features of breast cancer. **Breast**, v. 9, n. 6, p. 320-328, 2000.

ANEXO I

ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA:

Estadiamento do Câncer de Mama pela União Internacional Contra Câncer UICC e Comitê da Junta Americana do Câncer-AJCC- 6ª edição (2002) :

T=tamanho do tumor	
T X	Tumor primário não pode ser encontrado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
TIs	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
T1	Tumor ≤ 2 cm na maior extensão
T1mic	Microinvasão $\leq 0,1$ cm na maior extensão
T1a	Tumor $> 0,1$ cm e $\leq 0,5$ cm
T1b	Tumor $> 0,5$ cm e $\leq 1,0$ cm
T1c	Tumor $> 1,0$ cm e $\leq 2,0$ cm
T2	Tumor $> 2,0$ cm e $\leq 5,0$ cm
T3	Tumor $> 5,0$ cm
T4	Tumor de qualquer tamanho comprometendo tecidos fora da mama
T4a	Extensão para parede torácica
T4b	Extensão para pele (edema, peau d'orange, ulceração e nódulo satélite)
T4c	Ambos T4a e T4b
T4d	Carcinoma inflamatório

Regras para classificar o tamanho do tumor (T)

- ❖ Selecionar o procedimento clínico mais acurado (exame físico, mamografia, ultrassom, ou ressonância magnética)
- ❖ O tamanho patológico do tumor é medido somente pelo componente invasivo. O componente *in situ* não entra na classificação.
- ❖ A medida do tamanho se realiza antes de qualquer remoção de tecido.
- ❖ Quando houver múltiplos focos de microinvasão o tamanho do maior foco será usado para a classificação.
- ❖ Tumores múltiplos ipsilaterais, o de maior tamanho será usado para estadiamento.
- ❖ Tumores simultâneos bilaterais cada tumor é estadiado separadamente.

N- Linfonodos Regionais	
Nx	Sem diagnóstico ou removidos previamente
N0	Sem evidência de metástases
N1	Metástases axilares ipsilaterais móveis
N2	Metástases com linfonodos fixos
N2a	Metástases para linfonodos axilares ipsilaterais fixos entre si ou outras extensões
N2b	Metástases somente para mama ipsilateral sem comprometimento axilar
N3	Metástases para linfonodos infraclaviculares , ou mama interna, ou supraclaviculares com ou sem axila
N3a	Metástase infraclavicular
N3b	Metástases ipsilateral mama interna e axilares
N3c	Metástases ipsilateral supraclavicular

Regras para a Classificação dos Linfonodos:

- ❖ Caso onde a classificação se baseia apenas no linfonodo sentinela é adicionada a designação (sn)
- ❖ Células tumorais isoladas são distinguidas de micrometástases pelo tamanho e são definidas como grupamento inferior a 0,2mm na maior dimensão
- ❖ As lesões metastáticas menores que 0,2 mm detectadas por HE ou IMH são identificadas pela letra “i”
- ❖ Micrometástases são definidas quando maiores que 0,2mm e menores que 2,0 mm, classificadas como pN1 mi
- ❖ Linfonodo intramamário positivo com axilares livres são classificados como pN1
- ❖ Nódulos positivos no músculo peitoral recebem a mesma classificação pN1 desde que não haja continuidade para o tecido mamário adjacente
- ❖ Carcinomas lobulares, mesmo focos < que 0,2 mm quando múltiplos são considerados pN1a, considera-se a somatória dos focos.

M - Metástases	
M0	Metástases ausentes
M1	Metástase à distância
Mx	Metástases não investigadas, mas suspeitadas.

Agrupamento dos achados e classificação em estádios.

Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II A	T0 N1 M0 T1 N0 M0 T2 N0 M0
Estádio II B	T2 N1 M0 T3 N0 M0
Estádio III A	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1,N2 M0
Estádio III B	T4 N0, N1, N2 M0 qqT N3 M0
Estádio IV	qqT qqN M1

Fonte : (Veronesi,U e Viale,G, 2006)

ANEXO II

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

**DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA EM PESQUISA DE FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO
VASCULAR(VEGF) EM TUMORES DE MAMA
INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS: HRS E FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNB (PÓS-GRADUAÇÃO)
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. GILDA REPUBLICANO ADORNO
ORIENTADOR : PROF. ALBINO VERÇOSA MAGALHÃES**

1. Identificação da paciente (representante legal)

NOME:..... IDADE:.....
ENDEREÇO..... CEP.....
TELEFONE:..... REGISTRO HOSPITALAR:.....
RG:.....

2. Declaro que:

A DOUTORA:
.....

Convidou-me a participar como voluntário de pesquisa conduzida neste Ambulatório de Mastologia e explicou-me e entendi que:

JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS da PESQUISA:

- 1) Este estudo vai verificar a presença de uma substância no material de biópsia de tumores de mama estocados no LABORATORIO DE ANATOMIA PATOLOGICA DO HRS .
- 2) A substância pesquisada é uma proteína chamada VEGF, o método laboratorial se chama IMUNO-HISTOQUIMICA .
- 3) Os exames vão verificar a presença ou ausência da proteína VEGF, e relacionar o resultado com a capacidade de desenvolvimento do tumor em um conjunto de casos de câncer de mama tratados no Hospital de Sobradinho.
- 4) A pesquisa ajuda a descobrir quais os casos mais graves, no grupo de pacientes tratados no HRS para que seja oferecido a elas um acompanhamento especial.

OBJETIVO DA PESQUISA:

Avaliar a importância do VEGF na análise de casos de câncer de mama.

VOLUNTARIEDADE , SIGILO E INFORMAÇÕES GERAIS

- 1) O material a ser utilizado encontra-se depositado no arquivo da Patologia e faz parte dos seus registros hospitalares.
- 2) O uso deste material não implica em risco, despesas ou desconforto pessoal, o seu manuseio e transporte serão realizados pelo pesquisador Dra. Gilda Republicano Adorno, que se responsabiliza pela sua integridade e preservação desde que seja autorizada pela paciente.
- 3) Na pesquisa o material de biópsia poderá ser fotografado, e os resultados utilizados para o estudo, em publicações e apresentações científicas no Brasil e no exterior desde que respeitadas as normas e a legislação vigente em relação a este assunto.
- 4) Estas informações serão tratadas como confidenciais e que a identidade dos pacientes será protegida .
- 5) Não existe nenhuma remuneração, lucro ou patrocínio envolvidos nesta pesquisa.
- 6) A participação não é obrigatória e, a qualquer momento, poderei desistir de participar e retirar meu consentimento. A recusa não trará nenhum prejuízo na relação com a pesquisadora ou com a instituição. **A Dra. Gilda coloca-se a disposição para esclarecimentos a cerca do trabalho e/ou para notificação de possível desistência no telefone 34879224 ou 33464834.**

Assinatura do Médico.....

Assinatura da Paciente ou Representante ou Responsável.....

TESTEMUNHA.....

Em caso de desistência da paciente em continuar participando da pesquisa:

Revogo o consentimento prestado no dia..... e afirmo que não desejo prosseguir na pesquisa que me foi proposta, que dou como finalizada nesta data.

Brasília DATA:..... Assinatura

TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS EM ARQUIVO

Título do projeto: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) em tumores de mama e seu papel como fator prognóstico. Análise retrospectiva de 72 casos de carcinoma de mama.

Pesquisadores: Gilda de Assis Republicano Adorno

Orientador: Prof. Albino Verçosa Magalhães

O(s) pesquisador(es) do projeto acima identificado(s) assume(m) o compromisso de:

Decorrido o óbito da paciente Sra _____

No. de biópsia _____ e na impossibilidade de consultar seus representantes legais.

1. preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados;
2. que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
3. que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

Brasília, _____ de _____ de _____.

Nome e Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome(s) e Assinatura(s) de todos pesquisador(es) participante(s)



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa –CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto: 045/2006

Título do Projeto: “Fator de crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) em tumores de mama e seu papel como fator prognóstico. Análise retrospectiva de 72 casos de carcinoma de mama”.

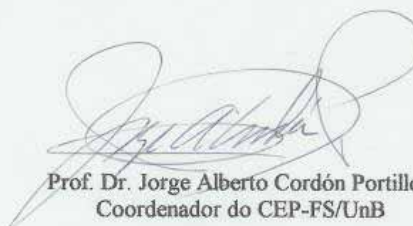
Pesquisadora Responsável: Gilda Ladeira da Assis Republicano Adorno

Data de Entrada: 28/04/2006.

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 045/2006 com o título: “Fator de crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) em tumores de mama e seu papel como fator prognóstico. Análise retrospectiva de 72 casos de carcinoma de mama”. Analisado na 4ª reunião, realizada no dia 09 de maio de 2006.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 09 de maio de 2006.



Prof. Dr. Jorge Alberto Cordón Portillo
Coordenador do CEP-FS/UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro
Faculdade de Ciências da Saúde
Cep: 70.910-900



ANEXO III
PLANILHA DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

PLANILHA DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

caso	idade	E.Clinico	T	LL	Grau Hist	RE	RP	c-erB2	MIB	p53	VEGF	Sobrevida
1	49	2B	T 1	Comp	2	0	0	2	3	4	2	9 anos bem
2	45	2B	T 2	Comp	2	0	0	1	3	4	2	Sem dados
3	49	2B	T3	livre	3	2	3	3	2	2	2	Óbito met hepatic
4	47	2B	T2	Comp	1	0	3	2	3	3	2	Metástases ósseas
5	42	2B	T2	Comp	2	3	3	2	2	3	2	9 anos be
6	46	2B	T2	Comp	2	2	3	2	2	2	2	9 anos ber
7	32	2B	T2	Comp	2	1	1	3	2	2	9	8 anos ber
8	38	2 B	T2	Comp	3	3	3	2	2	1	1	Óbito met. pulmã
9	45	2 A	T2	Comp	3	3	2	2	3	3	2	7 anos ber
10	45	1	T1	livre	2	2	3	2	3	0	3	7 anos ber
11	44	2B	T2	Comp	2	0	0	2	1	0	3	6 anos be
12	51	2B	T2	Comp	2	0	0	3	1	2	3	6anos ber
13	51	2 A	T1	Comp	2	0	0	2	2	2	1	6anos ber
14	49	3 A	T 3	Comp	n.c	0	0	2	3	3	2	6 anos be

15	51	4	T2	Comp	n.c	0	0	2	1	2	2	Metástase hepática
16	49	2B	T3	livre	3	0	0	0	3	3	2	6 anos b
17	49	2 A	T1	Comp	2	0	0	0	0	3	0	6 anos b
18	51	2 A	T1	Comp	1	2	2	2	3	3	2	6anos b
19	76	2B	T2	Comp	2	3	3	3	3	3	3	Sem da
20	62	2B	T2	Comp	2	0	0	1	3	3	2	Sem da
21	76	2B	T2	Comp	3	0	0	2	2	2	1	6 anos b
22	57	2B	T2	Comp	2	0	0	3	2	3	1	Óbito r cerebral
23	72	2B	T2	Comp	1	0	0	1	3	3	2	6anos b
24	73	2B	T2	Comp	2	2	2	2	1	0	3	6anos b
25	71	2 A	T1	Comp	2	3	2	2	3	2	3	Sem da
26	60	2B	T2	Comp	2	3	3	2	3	2	3	5anos b
27	43	2 A	T2	livre	2	0	0	3	1	2	2	Sem da
28	50	2 A	T2	livre	3	0	0	1	2	0	1	4 anos b
29	50	2B	T2	Comp	2	2	1	1	2	0	2	Sem da
30	36	1	T1	livre	3	0	3	2	1	2	3	Sem da
31	41	2 A	T1	livre	2	0	0	3	2	2	2	4 anos b
32	44	2B	T3	livre	3	0	0	1	3	3	1	4 anos b
33	33	1	T1	livre	3	2	3	2	2	2	2	4anos b
34	46	1	T1	livre	2	3	3	3	2	3	2	4anos b
35	45	2A	T2	livre	2	3	3	2	3	2	2	3 anos b
36	46	2B	T2	comp	3	0	0	3	2	2	1	4 anos b
37	42	1	T1	livre	2	0	0	2	2	0	2	4 anos b

38	38	1	T1	livre	n.c	0	0	0	0	0	2	3 anos b
39	28	1	T1	livre	2	2	3	2	4	3	2	3 anos b
40	40	2 A	T1	comp	1	3	3	2	3	2	1	Met, mamaria interna
41	32	2 A	T 2	livre	2	0	0	3	1	0	3	Metast.ósse
42	73	2 A	T2	livre	1	0	0	3	2	1	2	Sem dad
43	54	2 A	T2	livre	2	0	0	3	1	0	2	3anos be
44	74	2 A	T2	livre	2	3	0	2	2	2	1	Sem dad
45	56	1	T1	livre	3	0	0	2	3	4	2	Sem dad
46	58	1	T 1	livre	n.c	3	2	2	2	2	2	2 anos t
47	62	1	T1	livre	2	3	0	2	2	1	3	2 anos t
48	86	1	T 1	livre	1	3	3	3	3	1	2	2 anos t
49	53	1	T1	livre	3	2	2	2	2	2	3	2 anos t
50	64	1	T1	livre	2	2	1	1	2	1	2	2 anos t
51	52	2 A	T2	livre	3	0	0	2	1	2	1	2 anos t
52	72	2 A	T2	livre	2	3	4	2	3	2	1	2 anos t
53	71	2 A	T2	livre	3	0	0	0	1	1	3	2anos t
54	68	2 A	T2	livre	n.c	2	3	1	2	1	2	Sem da

