

**ANA MARIA GONÇALVES REBÊLO**

**CARCINOMA DUCTAL INVASOR DE MAMA: RELAÇÃO DA EXPRESSÃO  
IMUNO-HISTOQUÍMICA DO FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO  
VASCULAR (VEGF) E DO ONCOGENE BCL-2 COM O TAMANHO TUMORAL E  
STATUS DOS LINFONODOS SENTINELAS NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO  
HISTOPATOLÓGICO DA NEOPLASIA.**

**BRASÍLIA, 2009**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA MARIA GONÇALVES REBÊLO**

**CARCINOMA DUCTAL INVASOR DE MAMA: RELAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) E DO ONCOGENE BCL-2 COM O TAMANHO TUMORAL E STATUS DOS LINFONODOS SENTINELAS NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DA NEOPLASIA.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães

**BRASÍLIA**

**2009**

*Dedico este trabalho aos meus pais e  
irmãos, que me permitiram conhecer o  
verdadeiro sentido da palavra família.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida.

Ao Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães por conduzir essa pesquisa e sempre estimular a formação acadêmica.

Ao Dr. Mário Moraes, exemplo de doação à patologia.

À Dra. Fátima Vogt, pela disponibilidade.

Ao Dr. Pedro Tauil pela enorme contribuição, principalmente na análise estatística dos dados.

A todos os preceptores da residência médica em Anatomia Patológica do HUB, por me ensinarem a amar a patologia.

À Juliana e demais colegas de residência, pelo incansável incentivo e apoio.

A todos os funcionários do CAP-HUB, em especial à Priscila, que jamais se negaram a prestar qualquer auxílio para o bom desenvolvimento desse trabalho.

Às pacientes, sem as quais seria impossível a realização desse estudo.

## RESUMO

O câncer de mama é o mais comum entre mulheres em todo o mundo e o que mais causa mortes entre brasileiras. O diagnóstico precoce é imprescindível para o sucesso terapêutico dessa neoplasia e dentre seus principais fatores prognósticos pode-se citar o tamanho tumoral e o status dos linfonodos sentinelas. O presente trabalho é um estudo transversal realizado com uma amostra de 44 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama e submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008, tendo como principal objetivo avaliar a associação entre a expressão imuno-histoquímica do VEGF e do Bcl-2 nessa neoplasia com o tamanho tumoral e status dos linfonodos sentinelas no momento do diagnóstico histopatológico da doença. Não se verificou associação entre expressão imuno-histoquímica do VEGF e tumores maiores do que 2,0 cm, mas observou-se associação estatisticamente significativa entre expressão tumoral do Bcl-2 e tamanho tumoral menor ou igual a 2,0cm. Embora tenha existido associação entre imunorreatividade tumoral do VEGF e presença de linfonodos axilares comprometidos, assim como entre expressão do Bcl-2 e linfonodos axilares livres de neoplasia, elas não foram estatisticamente significativas. Nossos resultados estão parcialmente de acordo com os dados da literatura, mostrando que no momento do diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasor de mama o VEGF tem potencial para ser utilizado como fator de mau prognóstico enquanto que o Bcl-2 pode ser utilizado como fator de bom prognóstico, no entanto são necessários estudos complementares, ampliando-se a amostra analisada e realizando-se estudos prognósticos de longo prazo.

Palavras chaves: Câncer de mama, angiogênese, linfonodo sentinela, VEGF, Bcl-2.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide and is the first cause of mortality in Brazilian women. Early diagnostic is essential for the success in treatment. The tumor's size and sentinel lymph node status are the main prognostic factors. This study used 44 patients with ductal invasive breast carcinoma submitted to a primary surgical treatment in HUB from 2007 to 2008. Our aim was evaluated the relation between VEGF and Bcl-2 expression in breast cancer by immunohistochemistry and the tumor's size, lymph node status at the moment of histopathological diagnostic. In this study high VEGF expression wasn't associated with tumor bigger than 2,0 cm and high Bcl-2 expression was strongly associated with the size of the tumor less than or equal to 2,0 cm. High VEGF expression was associated with neoplastic nodal involvement and high Bcl-2 expression was associated with axillary nodes negatives, but both weren't statistical significative. Our results agree partiality with the literature data, therefore at the moment of histopathological diagnostic of breast invasive carcinoma ductal the VEGF can serve as poor prognostic factor, meanwhile the Bcl-2 can serve as good prognostic factor. Although there are a necessity of complementary studies which could increase the sample assayed and long-term prognostics studies.

Key words: Breast cancer, angiogenesis, sentinel lymph node, VEGF, Bcl-2.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 Câncer de mama: Importância epidemiológica (Mundo, Brasil e DF).....	18
3.2 Angiogênese.....	20
3.2.1 Histórico.....	21
3.2.2 Angiogênese fisiológica.....	23
3.2.3 Angiogênese em patologias não neoplásicas.....	25
3.2.4 Angiogênese em neoplasias.....	27
3.2.5 Métodos de investigação da angiogênese.....	30
3.2.5.1 Densidade de microvasos.....	30
3.2.5.2 Métodos bioquímicos.....	32
3.3 VEGF.....	32
3.3.1 A família VEGF.....	33
3.3.1.1 VEGF-A.....	33
3.3.1.2 VEGF-B.....	35
3.3.1.3 VEGF-C.....	36
3.3.1.4 VEGF-D.....	37
3.3.1.5 VEGF-E.....	38

3.3.1.6 Fator de crescimento placentário.....	38
3.3.1.7 VEGF-F.....	38
3.3.1.8 VEGFR-1.....	39
3.3.1.9 VEGFR-2.....	39
3.3.1.10 VEGFR-3.....	40
3.3.1.11 Neuropilina 1 e 2.....	40
3.4 Tamanho do tumor.....	41
3.5 Linfonodo sentinela.....	43
3.6 Apoptose e Bcl-2.....	45
3.6.1 Apoptose.....	46
3.6.2 A família Bcl-2.....	46
4 MATERIAL E MÉTODO.....	50
4.1 Tipo de estudo.....	50
4.2 Amostra.....	50
4.3 Procedimentos.....	50
4.4 Critérios de inclusão e de exclusão.....	51
4.5 Procedimentos para estudo imuno-histoquímico.....	51
4.5.1 Preparação da lâmina histológica para estudo imuno-histoquímico.....	51
4.5.2 Procedimento para a análise imuno-histoquímica.....	53
4.6 Procedimentos estatísticos.....	55
4.7 Aspectos éticos.....	55
5 RESULTADOS.....	56
6 DISCUSSÃO.....	61



7 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO I.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imunorreação ausente para o Bcl-2, 200x, p. 54.

Figura 2 - Imunorreação fraca (1+) para o Bcl-2, 200x, p. 54.

Figura 3 - Imunorreação moderada (2+) para o VEGF, 400x, p. 54.

Figura 4 - Imunorreação forte (3+) para o VEGF, 400x, p. 54.

Figura 5 - Frequência de tumores, segundo o tamanho, no momento do diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasor de mama em pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008, p. 56.

Figura 6 - Imunorreação forte (3+) para o VEGF, 400x, p. 57.

Figura 7 - Frequência dos tumores, segundo o status dos linfonodos axilares, no momento do diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasor de mama em pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008, p. 58.

Figura 8 - Imunorreação forte (3+) para o Bcl-2, 400x, p. 60.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes primários (anticorpos) - Nome do clone e diluição, p. 52.

Tabela 2 - Critérios semiquantitativos de avaliação da intensidade da imunorreação para Bcl-2 e VEGF, p. 54.

Tabela 3 - Relação da imunorreatividade do VEGF em carcinomas ductais invasores de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008 com o tamanho tumoral, p. 57.

Tabela 4 - Relação da imunorreatividade do Bcl-2 em carcinomas ductais invasores de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008 com o tamanho do tumor, p. 58.

Tabela 5 - Relação da imunorreatividade do VEGF em carcinomas ductais invasores de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008 com o status dos linfonodos sentinelas axilares, p. 59.

Tabela 6 - Relação da imunorreatividade do Bcl-2 em carcinomas ductais invasores de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008 com o status dos linfonodos sentinelas axilares, p.60.

## LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF -	Fator de crescimento fibroblástico ácido
AJCC -	American Joint Committee on Cancer
bFGF -	Fator de crescimento fibroblástico básico
BH -	Bcl-2 homólogo
bp -	Pares de base
CACON -	Centro de Alta Complexidade em Oncologia
CAP -	Centro de Anatomia Patológica
cDNA -	DNA complementar
cm -	Centímetro(s)
CPNPC -	Câncer de pulmão não pequenas células
DAEP -	Diretoria Adjunta de Ensino e Pesquisa
DMV -	Densidade de microvasos intratumoral
DF -	Distrito Federal
EUA -	Estados Unidos da América
FGF -	Fator de crescimento fibroblástico
Flk-1 -	Fetal liver kinase-1
Flt-1 -	fms-like tyrosine kinase-1
HIF-1 -	Fator 1 hipóxia induzido
hMAM -	Mamaglobulina humana
hMAM mRNA -	Ácido ribonucléico mensageiro da mamaglobulina humana
HUB -	Hospital Universitário de Brasília

IC -	Intervalo de confiança
Ig -	Imunoglobulina
MEC -	Matriz extracelular
mm <sup>3</sup> -	Milímetro(s) cúbico(s)
NP-1 -	Neuropilina - 1
NP-2 -	Neuropilina - 2
OMS -	Organização Mundial da Saúde
OR -	Odds ratio
p -	Página
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIGF -	Fator de crescimento placentário
RE -	Receptor de estrógeno
RP -	Receptor de progesterona
SUS -	Sistema Único de Saúde
TAF -	Fator de angiogênese tumoral
TBS -	Tris Buffer Solution
UICC -	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF -	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR-1 -	Receptor de VEGF-1
VEGFR-2 -	Receptor de VEGF-2
VEGFR-3 -	Receptor de VEGF-3
VPF -	Fator de permeabilidade vascular
$\chi^2$ -	Qui-quadrado

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a doença maligna não-cutânea mais comum em mulheres e certamente é o câncer mais temido por elas, devido à sua alta frequência e aos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente, ocorrendo principalmente após os 50 anos de idade. A menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) aumenta em 20% o risco de câncer de mama em relação a mulheres com menarca após os 14 anos. Mulheres com a primeira gestação completa a termo antes dos 20 anos de idade têm metade do risco de desenvolver câncer de mama que aquelas nulíparas ou com primeira gestação após os 35 anos. Sabe-se também que mulheres com história de: parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) afetadas por esta neoplasia; terapia de reposição hormonal (estrogênio/progesterona) pós-menopausa; exposição à radiação e carcinoma em mama contra lateral ou no endométrio têm risco aumentado de desenvolver câncer de mama. (KUMAR, 2005).

O câncer de mama representa, nos países ocidentais, uma das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas apontam aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes. (INCA, 2007).

No Brasil o número de casos novos de câncer de mama esperados para o ano de 2008 (válidos também para o ano de 2009) é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Desconsiderando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente nas regiões Sudeste, cujo risco estimado é de 68 casos novos por 100 mil mulheres; 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), perdendo apenas para o câncer de colo uterino, cujo risco estimado é de 22 casos para cada 100.000 mulheres. Já no Distrito Federal (DF), estima-se para 2008, aproximadamente, a descoberta de 660 casos novos de câncer de mama em mulheres. (INCA, 2007).

Está bem estabelecido que fatores tais como tamanho do tumor; tipo e grau histológico do tumor; presença ou não de invasão vascular sanguínea e linfática; status e número de linfonodos axilares avaliados; multicentricidade e multifocalidade tumoral influenciam o prognóstico do câncer de mama e são rotineiramente utilizados para o seu estadiamento e definição da terapêutica. Assim sendo, sabe-se que pacientes com tumores menores que 2,0 cm (centímetros) e de baixo grau histológico, sem comprometimento metastático para linfonodos axilares ou sítios distantes, sem multicentricidade ou multifocalidade tumoral, sem invasão vascular sanguínea ou linfática pela neoplasia têm melhor prognóstico. (ROSAI, 2004). No entanto o perfil imuno-histoquímico do carcinoma mamário é também um importante indicador prognóstico desta neoplasia.

O câncer de mama representa a única doença oncológica em que marcadores específicos são rotineiramente usados para guiar a conduta terapêutica. Marcadores como os receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) são largamente aplicados e têm sido usados para determinar a adequabilidade do paciente à terapia endócrina. Caso o tumor seja positivo para tais marcadores é indicada a terapia hormonal, em geral obtendo-se bons resultados. Também é de grande importância o HER-2, incluído constantemente no acompanhamento de pacientes com câncer de mama. Sua expressão frequentemente é associada à boa resposta ao tratamento sistêmico com o *trastuzumab*, apesar de alguns estudos também mostrarem que ele se relaciona com alto grau tumoral, envolvimento linfonodal, maior índice de recorrência e mortalidade. (PAYNE, 2008).

O antígeno nuclear Ki-67 constitui-se em um complexo bimolecular localizado no núcleo celular e presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G<sub>0</sub>. Ele tem relação direta com a fração de crescimento de uma população celular, constituindo-se no melhor marcador imuno-histoquímico de proliferação celular. (ALVES, 1999).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é outro marcador cujo valor prognóstico no câncer de mama tem sido objeto de muitos estudos. Entende-se por angiogênese a formação de novos vasos sanguíneos, que é essencial para o desenvolvimento, progressão e metástases de tumores malignos. Na ausência de angiogênese o tumor não pode crescer além de 1,0 a 2,0 mm<sup>3</sup> (milímetros cúbicos).

Relatos recentes têm mostrado que o VEGF está elevado em pacientes com falha na resposta ao tratamento hormonal ou naquelas que têm recorrência precoce da doença, sugerindo que o VEGF pode estar diretamente envolvido não apenas na formação de novos vasos sanguíneos, mas também induzindo a proliferação e manutenção de células tumorais. (LIANG, 2006).

Nos últimos anos muitas modalidades terapêuticas têm se tornado disponíveis para o tratamento do câncer de mama. Em decorrência disso surgiu um forte interesse em torno da pesquisa de novos marcadores prognósticos, identificando-se pacientes mais capazes de beneficiar-se de terapias adjuvantes sistêmicas. Muitas drogas anticancerígenas atuam induzindo a apoptose, tornando-se importante o estudo desse mecanismo. Entre os genes reguladores do processo apoptótico pode-se citar o gene p53 supressor tumoral e o oncogene Bcl-2. São observadas mutações no p53 em mais da metade dos cânceres humanos, constituindo-se no alvo mais comum de alterações genéticas de tumores humanos. As principais funções da proteína p53 são regular a progressão do ciclo celular, reparar alterações do DNA (ácido desoxirribonucléico) e induzir a apoptose quando há falha no reparo do DNA lesado. Dessa forma mutações no p53 e sua superexpressão em câncer de mama estão associadas a pior prognóstico. Já o Bcl-2, apesar de ter função antiapoptótica, quando expresso no câncer de mama relaciona-se a bom prognóstico. Provavelmente isso ocorre porque a expressão do Bcl-2 está associada a outros fatores prognósticos favoráveis tais como positividade dos receptores de estrógeno, baixo grau tumoral e baixa atividade proliferativa. (CORADINI, 2004).

Dentre as opções terapêuticas para as neoplasias malignas mamárias pode-se citar o tratamento cirúrgico, as alternativas quimioterapêutica e radioterapêutica, o tratamento hormonal e o uso de drogas como o *trastuzumab*, para o qual é indispensável o estudo imuno-histoquímico do tumor. Anticorpos como receptores de estrógeno e progesterona, assim como o HER-2 são imprescindíveis na atualidade para direcionar o tratamento do câncer de mama. Além disso outros anticorpos, tais como o VEGF e o Bcl-2 têm sido alvos de inúmeros estudos e podem gerar novas perspectivas para o tratamento do câncer de mama. Neste contexto, torna-se relevante avaliar a associação do VEGF e do Bcl-2 com fatores prognósticos para o câncer de mama já bem estabelecidos na literatura, destacando-se dentre eles o tamanho e o grau histológico do tumor; a presença ou não de invasão vascular



sanguínea e linfática; o status e o número de linfonodos axilares avaliados; a existência ou não de multicentricidade e de multifocalidade tumoral.

Percebe-se assim que o câncer de mama é uma patologia frequente entre mulheres e que seu comportamento biológico é influenciado por numerosos fatores, no entanto o presente trabalho pretende estudar apenas a associação da imunorreatividade do VEGF e do Bcl-2 em carcinomas ductais invasores de mama com o tamanho tumoral e o status dos linfonodos axilares no momento do diagnóstico histopatológico dessa neoplasia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação de marcadores imuno-histoquímicos com o tamanho do tumor e o status dos linfonodos sentinelas no momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar se no momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama a expressão do VEGF nessas neoplasias está ou não associada ao tamanho do tumor e ao comprometimento ou não do linfonodo sentinela pela neoplasia.

2. Verificar se no momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama a expressão do Bcl-2 nessas neoplasias está ou não associada ao tamanho do tumor e ao comprometimento ou não do linfonodo sentinela pela neoplasia.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 CÂNCER DE MAMA: IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (MUNDO/BRASIL/DF)

Segundo estimativas da OMS devem ocorrer 9 milhões de mortes por câncer em 2015 e 11,4 milhões em 2030. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes registradas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, correspondendo a 13% de todas as mortes. Mais de 70% destes óbitos ocorreram em países de média ou baixa renda. O câncer de mama foi responsável por 502 mil mortes, ficando em quinto lugar dentre os tipos de câncer com maiores índices de mortalidade e perdendo apenas para os cânceres de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1 milhão); de fígado (662 mil) e de cólon (655 mil). (OMS, 2009). No Brasil o número de casos novos de câncer de mama esperados para o ano de 2008 é de 49.400, sendo aproximadamente 660 deles no Distrito Federal. (INCA, 2007).

Em 2020, estima-se que o número de casos novos anuais de câncer seja de aproximadamente 15 milhões e cerca de 60% deles ocorrerão em países em desenvolvimento. Sabe-se também que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos. Dessa forma o câncer constitui-se num problema desafiador para as políticas de saúde pública. (INCA, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde o aumento da sobrevivência de pacientes com câncer de mama está diretamente relacionado à adoção de políticas que favoreçam o diagnóstico precoce e o tratamento adequado em tempo hábil. A elevada frequência de câncer e os altos custos em sua assistência levaram o governo brasileiro a traçar estratégias que favoreçam o controle de tal patologia. Dessa forma em novembro de 1998, alterações significativas foram instituídas na lógica de tratamento das neoplasias no Sistema Único de Saúde (SUS), introduzindo-se um programa de atendimento integral ao câncer. Assim sendo, o Ministério da Saúde estabeleceu que somente hospitais que dispusessem de todos os recursos para o tratamento das neoplasias mais frequentes no país seriam

credenciados para a assistência oncológica no SUS. A esses hospitais, deu-se o nome de Centros de Alta Complexidade em Oncologia - CACON. (BRITO, 2005).

O câncer de mama é o mais frequente (se excluído o câncer de pele não-melanoma) e o que mais causa mortes entre as mulheres no Brasil. Apesar dos investimentos realizados nos últimos anos, em nosso país a assistência oncológica ainda é insuficiente, inadequada e mal distribuída. Cerca de 60% dos casos de câncer de mama no Brasil são diagnosticados em estágios avançados, pois não se dispõe de uma estrutura que garanta a mamografia sistemática a todas as mulheres nas faixas etárias de maior risco. Por outro lado, em países desenvolvidos, como Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, a incidência da doença é alta e vem aumentando a cada ano, mas a mortalidade vem diminuindo graças à detecção precoce pela mamografia e ao tratamento adequado dos casos. (PINHO, 2007). Em Portugal, desde o início da década de 90 vem ocorrendo uma redução de 2% ao ano na taxa de mortalidade por câncer de mama, explicada por um aumento da frequência na detecção precoce e acesso a tratamentos eficazes. (BASTOS, 2007).

A pesquisa de variáveis associadas ao câncer de mama pode estar relacionada aos programas de controle da doença. Estudos bem desenhados têm demonstrado que a idade elevada, geralmente após os 50 anos, é o fator mais importante e, na maioria dos casos, o único fortemente associado ao desenvolvimento do câncer de mama. Contudo, outros fatores estão bem estabelecidos na causalidade da doença, tais como antecedente pessoal de hiperplasia atípica ou câncer de mama contra lateral; menarca precoce; menopausa tardia; nuliparidade; primeira gestação completa após os 30 anos; terapia de reposição hormonal por longo tempo; uso prolongado de contraceptivos orais de dosagens elevadas em estrogênio; exposição a altas doses de radiação ionizante e história familiar de câncer de mama, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) foram acometidos antes dos 50 anos de idade. Entretanto apenas cerca de 10% do total de casos de cânceres de mama são considerados de caráter familiar. (PINHO, 2007).

O câncer de mama chama a atenção pela grande frequência em que ocorre e por sua alta taxa de mortalidade. É uma doença extremamente heterogênea, cujo

comportamento biológico e evolução clínica variam bastante de acordo com o paciente. Dessa forma estudos e pesquisas em busca de entender melhor esta neoplasia, estabelecendo-se manejos adequados e terapias mais eficazes são de fundamental importância para mudar as estatísticas grandiosas e negativas que giram em torno desse câncer.

### 3.2 ANGIOGÊNESE

O termo angiogênese foi inicialmente usado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares pré-existentes. No entanto mais recentemente esse termo tem sido usado para designar o processo de crescimento e remodelamento de uma rede vascular primitiva em uma rede vascular complexa. Assim novos vasos sanguíneos no adulto surgem principalmente através da angiogênese, embora também possam originar-se por vasculogênese. (CARMELIET, 2000).

A angiogênese, o processo de desenvolvimento e crescimento de novos vasos sanguíneos, é essencial para a adequada vascularização tecidual. Em resposta à hipóxia, o fator 1 hipóxia induzível (HIF-1) ativa centenas de genes, inclusive o fator de crescimento endotelial vascular, estimulando a quimiotaxia e a proliferação de células endoteliais durante o surgimento de novos capilares. (QUTUB, 2009).

Sabe-se que a angiogênese ocorre tanto em situações fisiológicas (exercícios físicos ou durante o ciclo reprodutivo feminino) como em patologias exemplificadas por doenças vasculares, neoplasias malignas, diabetes, inflamação, asma, obesidade, artrite e doenças neurodegenerativas. Entender por que e quando a angiogênese é prevalente, assim como quais processos controlam-na são essenciais para a compreensão e tratamento de diversas doenças. Há mais de um século pesquisadores já veem atentando para isso, mas foi principalmente nas últimas décadas que os estudos nessa área ganharam grande impulso, criando fortes expectativas para o tratamento de graves doenças que acometem a humanidade tais como cânceres e coronariopatias. (QUTUB, 2009).

### 3.2.1 HISTÓRICO

Publicações alemãs mostram que há mais de um século pesquisadores, como o grande patologista Rudolf Virchow, observaram que o crescimento tumoral pode ser acompanhado por aumento de vascularização, sugerindo que novos vasos sanguíneos têm importante papel na patogênese do câncer. Em 1927, Warren Lewis da Universidade *John Hopkins*, descreveu em detalhes a vascularização de diversos tumores que surgem espontaneamente em camundongos e observou que a arquitetura vascular de cada tipo de tumor exibe particularidades, concluindo que o ambiente tumoral tem uma importante influência sobre o crescimento e as características morfológicas dos vasos sanguíneos. (FERRARA, 2002).

Em 1928, J.C.Sandison descreveu uma câmara transparente que pode ser introduzida através da orelha de coelhos, permitindo a observação in vivo do crescimento de vasos sanguíneos. Em 1939, Gordon Ide e colaboradores da Universidade de Rochester, utilizando-se da técnica descrita por Sandison investigaram a correlação entre o crescimento de um carcinoma transplantado em coelho e seu suprimento vascular. Tais pesquisadores observaram que o crescimento tumoral foi acompanhado por uma rápida e extensa formação de novos vasos sanguíneos, sugerindo que células tumorais possam liberar fator de crescimento vascular. (FERRARA, 2002).

Em 1945, um grupo de pesquisadores do National Cancer Institute liderados por Glenn Algire, adaptaram a câmara transparente para camundongos e acompanharam diariamente o crescimento de vasos sanguíneos em tumores, avaliando a contagem de vasos em relação ao tamanho do tumor. Dessa forma tais cientistas perceberam que o crescimento de novos vasos sanguíneos precedia a fase rápida de crescimento tumoral em todos os tipos de tumores avaliados, propondo que a aquisição, pelas células tumorais, da habilidade de promover o crescimento de novos vasos é um dos passos mais cruciais da tumorigênese. Assim formularam a hipótese de que a mudança nas células tumorais que permite evocar a proliferação capilar também é capaz de iniciar o crescimento autônomo de tais células. (FERRARA, 2002).

Em 1948, Isaac Michaelson propôs a possibilidade da existência de um “fator X” estimulante da proliferação vascular retiniana associada à diabetes e outras retinopatias, mas durante alguns anos esses estudos não despertaram grandes interesses. Porém ao final da década de 60 tais trabalhos ganharam grande atenção, quando Melvin Greenblatt e Phillippe Shubick da Escola Médica de Chicago e Robert Ehrmann e Mogens Knoth da Escola Médica de Harvard publicaram, separadamente, dois grandes estudos demonstrando que as células tumorais liberam um fator angiogênico, estimulando a formação de novos vasos sanguíneos. (FERRARA, 2002).

Em 1971, Judah Folkman, propôs a utilização de inibidores da angiogênese para tratamento do câncer em humanos e nesse mesmo ano, com o auxílio de colaboradores, isolou um fator de angiogênese tumoral (TAF). Em 1979, este mesmo grupo de pesquisadores, relatou uma bem sucedida cultura de células endoteliais de microvasos, que representa a chave para investigar o processo de mitogênese em células endoteliais e de angiogênese. (FERRARA, 2002).

Em 1983, Donald Senger e colaboradores, relataram a identificação e purificação parcial de uma proteína que induzia o aumento da permeabilidade vascular, sendo nomeada de fator de permeabilidade vascular (VPF). Dessa forma esses cientistas propuseram que o VPF poderia ser um mediador específico da hiperpermeabilidade de vasos sanguíneos. (FERRARA, 2002).

Em 1985, dois potentes fatores angiogênicos foram identificados, sendo o fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF) isolado e sequenciado por um grupo de pesquisadores liderados por Kenneth Thomas, enquanto que o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) teve sua estrutura primária descrita por Fred Esch e colaboradores. No ano seguinte clones cDNA (DNA complementar) do aFGF e do bFGF foram isolados, respectivamente, por Michael Jaye e Judith Abraham. (FERRARA, 2002).

Em 1989, estudos moleculares e bioquímicos liderados por Napoleone Ferrara demonstraram a existência de uma proteína promotora do crescimento de células endoteliais vasculares, sendo nomeada fator de crescimento endotelial vascular. Enquanto isso, Daniel Connolly e colaboradores, em um estudo independente relataram o isolamento e sequenciamento de um VPF humano. Os

dois grupos, no final desse mesmo ano, relataram simultaneamente a purificação, o sequenciamento e clones cDNA do VEGF e VPF. O grupo de Ferrara identificou clones de VEGF codificados por 121-, 165- e 189- aminoácidos, já o de Connolly descreveu um peptídeo idêntico ao VEGF-189. Dessa forma esses achados mostraram que o VEGF e o VPF representam a mesma molécula, estimulando a mitogênese de células endoteliais e induzindo a permeabilidade vascular. Vale ressaltar ainda que o termo VEGF tornou-se mais popular pelo uso, sendo adotado pela literatura mundial. (FERRARA, 2002).

Em 1993, Jin Kim, Ferrara e colaboradores relataram que a utilização de anticorpos monoclonais contra o VEGF resulta em supressão do crescimento tumoral *in vivo*, provando que o crescimento tumoral é dependente da angiogênese. Em 1996, o grupo de Ferrara com o auxílio de Peter Carmeliet, Werner Risau e colaboradores demonstraram que o VEGF também é requerido para a vasculogênese e angiogênese embriônica normal. (FERRARA, 2002).

Assim sendo no início da década de 90 o papel da angiogênese em diversas patologias e no desenvolvimento normal do indivíduo já estava bem definido. No entanto apesar da molécula de VEGF já estar isolada, com a estrutura sequenciada e algumas funções estabelecidas, ainda hoje representa um grande desafio para a medicina a aplicação desses conhecimentos no manejo das mais diversas enfermidades. (FERRARA, 2002).

### 3.2.2 ANGIOGÊNESE FISIOLÓGICA

A grande maioria das pesquisas sobre angiogênese dá ênfase ao desenvolvimento desse processo em situações patológicas, tais como neoplasias e doenças isquêmicas. No entanto se sabe que a angiogênese também ocorre em circunstâncias fisiológicas, tais como ciclo reprodutivo feminino e embriogênese.

No ciclo reprodutivo feminino mensalmente ocorre desenvolvimento de folículo ovariano e alterações proliferativas endometriais que requerem grande demanda de nutrientes e oxigênio, necessitando da formação de novos vasos



sanguíneos. Assim durante esse ciclo há proliferação de novos capilares, que promove o crescimento folicular, a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo, mas logo em seguida observa-se regressão dos vasos sanguíneos, sugerindo que as atividades de indução e inibição da angiogênese são coordenadas. Alguns estudos têm demonstrado que a superexpressão do VEGF relaciona-se com a proliferação de vasos sanguíneos nos ovários e que a administração de inibidores do VEGF suprime a angiogênese luteal e atrasa o desenvolvimento folicular em roedores e primatas. (STOUFFER, 2001).

Durante a gravidez, a glândula mamária feminina modifica-se substancialmente resultando em expansão da árvore ductal e dos ácinos glandulares. Para isso torna-se necessário extenso aporte de nutrientes, exigindo importante remodelamento dos vasos sanguíneos. A angiogênese ocorre principalmente durante a maturação dos ácinos glandulares, permitindo um bom funcionamento dessas estruturas, particularmente no que diz respeito à produção de leite. Experimentos têm revelado que isoformas do VEGF são necessárias para a produção de leite, bem como têm demonstrado que o VEGF é altamente expresso durante o desenvolvimento de glândulas mamárias e está presente em altas concentrações no leite humano. (QIU, 2008).

O desenvolvimento vascular embriônico ocorre através de dois processos consecutivos: vasculogênese, que é a formação de um plexo vascular primitivo e angiogênese, que é o remodelamento e maturação da estrutura vascular inicial. A migração, proliferação e polarização das células endoteliais desempenha papel fundamental em estabelecer uma rede vascular funcional. O desenvolvimento dessa rede é rigorosamente controlado por fatores de crescimento e seus ligantes, bem como integrinas e ligantes da matriz extracelular. O VEGF é o maior regulador do desenvolvimento vascular embriônico e exerce sua função ligando-se a dois receptores de alta afinidade tirosina-quinase, receptor de VEGF 1 e 2 (VEGFR-1 e VEGFR-2), bem como aos correceptores neuropilina 1 e 2 (NP-1 e NP-2). (AASE, 2007).

Vê-se assim que a angiogênese tem um papel inquestionável na formação, desenvolvimento e sobrevivência do indivíduo, no entanto, como será discutido a

seguir, é em situações patológicas que ela tem sido exaustivamente estudada, desempenhando funções de destaque.

### 3.2.3 ANGIOGÊNESE EM PATOLOGIAS NÃO NEOPLÁSICAS

Existem diversas formas pelas quais os vasos sanguíneos originam-se e desenvolvem-se. Chama-se vasculogênese à formação de vasos sanguíneos a partir de células endoteliais progenitoras, ocorrendo principalmente no embrião. Já os termos angiogênese e arteriogênese referem-se à formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente, requerendo o brotamento e estabilização de pequenos vasos, frequentemente formando pontes entre redes vasculares e criando uma eficiente circulação colateral. Quando o crescimento de vasos sanguíneos é desregulado há um grande impacto sobre a saúde, contribuindo para a patogênese de diversas doenças, algumas inteiramente inesperadas. Inúmeras doenças são caracterizadas por angiogênese excessiva, destacando-se neoplasias malignas, psoríase, artrite, retinopatias, asma, obesidade, aterosclerose e doenças infecciosas. Por outro lado o crescimento insuficiente de vasos e a regressão vascular anormal não apenas causam isquemia cardíaca e cerebral, mas também podem levar a desordens neurodegenerativas, pré-eclâmpsia, angústia respiratória e osteoporose. (CARMELIET, 2003).

A neovascularização intraocular em geral está associada a condições de isquemia retiniana, podendo ocorrer em pacientes com diabetes mellitus, com oclusão da veia central da retina ou em recém-nascidos prematuros. A formação de novos vasos sanguíneos pode levar a hemorragia vítrea, descolamento de retina, glaucoma neovascular e eventual cegueira. Em 1948, Isaac Michaelson propôs que o evento chave na patogênese dessas condições é a liberação, induzida pela hipóxia, de uma substância angiogênica, altamente difusível, que foi chamada "Fator X". Estudos subsequentes mostraram que tal fator corresponde ao VEGF. Em 1994, alguns grupos de pesquisadores relataram o aumento dos níveis do VEGF no fluido ocular de pacientes com retinopatia diabética, sendo estabelecida estreita correlação entre os níveis de VEGF e a retinopatia proliferativa em situações de diabetes, de

oclusão da veia central da retina ou de prematuridade. Evidências adicionais de que a neovascularização intraocular é mediada pelo VEGF foi gerada em modelos animais de doença retiniana isquêmica usando inibidores do VEGF. Evidências recentes indicam que o VEGF pode também estar implicado na neovascularização do plexo coróide, a qual é associada à degeneração macular relacionada com a idade, podendo inclusive levar à cegueira. (FERRARA, 2002).

Quanto ao procedimento cirúrgico, sabe-se que ele promove uma cascata local e sistêmica de reações, levando à reparação de estruturas lesionadas. Independente do tipo de tecido afetado, o processo de cicatrização envolve pelo menos três fases: inflamação, proliferação e maturação. A primeira etapa compreende a indução do processo inflamatório consequente à lesão inicial, promovendo a remoção de tecido danificado ou morto. A segunda fase é marcada pela proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares, formando o tecido de granulação, que é edemaciado e rico em pequenos novos vasos sanguíneos. Durante esse período ocorre ainda a síntese de proteínas da matriz extracelular e deposição de colágeno. É nessa etapa que a angiogênese manifesta-se mais expressivamente. Na fase de maturação ocorre a substituição do tecido de granulação por uma cicatriz, envolvendo alterações na composição da matriz extracelular (MEC). Alguns fatores de crescimento que estimulam a síntese do colágeno e outras moléculas de tecido conjuntivo também modulam a síntese e ativação de enzimas que degradam esses componentes da MEC. O equilíbrio entre a síntese e degradação da MEC resulta na remodelação da estrutura do tecido conjuntivo. Em analogia com a reparação de ferimentos, a regeneração hepática consequente a grandes ressecções é acompanhada por um pico local da produção de fatores indutores do crescimento, resultando em aumento regenerativo do fígado remanescente até a recuperação do seu peso total original. (VAN DER BILT, 2004).

No indivíduo adulto normalmente a maior parte da rede vascular encontra-se quiescente, com apenas 0,01% das células endoteliais submetendo-se a divisão. O crescimento excessivo ou insuficiente dos vasos sanguíneos, assim como distúrbios no remodelamento vascular contribuem para o desenvolvimento de numerosas doenças. Sabe-se que tanto a hipóxia como mediadores da resposta inflamatória são potentes fatores indutores da formação de novos vasos sanguíneos, assim quaisquer condições que reduza o suprimento de oxigênio para os tecidos ou

provoque a liberação de fatores inflamatórios são acompanhadas por angiogênese. Dessa forma depósitos anormais de matriz extracelular ou congestão vascular que dificultem a liberação de oxigênio, causando hipóxia em diabetes, doença de Alzheimer e asma são acompanhados por angiogênese. (CARMELIET, 2000).

A neovascularização é uma importante consequência da resposta inflamatória no leito vascular. As células endoteliais desempenham um relevante papel na fase proliferativa, contribuindo para a angiogênese. A formação de tecido de granulação em cicatrização secundária, em oposição à cicatrização primária resultante de suturas, envolve a migração de fibroblastos e formação de novos vasos sanguíneos para reparar a lesão. Dos múltiplos fatores inflamatórios e de crescimento induzidos pela injúria, muitos são conhecidos por ter efeitos angiogênicos e, como relatado a seguir, são considerados pré-requisitos também para células tumorais progredirem, resultando em crescimento tumoral ou em recorrência local da neoplasia.

### 3.2.4 ANGIOGÊNESE EM NEOPLASIAS

A angiogênese é essencial para o crescimento e desenvolvimento de diversas neoplasias, assim como para a formação de metástases. Tumores sólidos dependem da neovascularização para crescerem além de 1,0 a 2,0 mm<sup>3</sup>. Os mecanismos moleculares que levam a alterações angiogênicas nas células tumorais não estão completamente elucidados, no entanto modificações que provocam um balanço positivo entre fatores pró- e antiangiogênicos a favor dos primeiros parecem ser responsáveis por desencadear a atividade angiogênica tumoral. Alguns fatores pró-angiogênicos, tais como o VEGF e o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e outros antiangiogênicos (trombospondina, angiostatina) já foram identificados, sendo a produção dos mesmos influenciada por condições que incluem stress metabólico (hipóxia, baixo pH e hipoglicemia), stress mecânico (pressão originada por proliferação celular), resposta inflamatória (células inflamatórias que permeiam os tecidos) e mutações genéticas (ativação de oncogenes ou deleção de genes supressores tumorais). Como a interação entre o ambiente e os mecanismos

genéticos influencia a angiogênese tumoral e o desenvolvimento de neoplasias ainda é assunto polêmico e não totalmente explicado. (GASPARINI, 2000).

Sabe-se ainda que as células normais dos mamíferos necessitam de oxigênio e nutrientes para a sobrevivência e conseqüentemente estão localizadas dentro de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de distância dos vasos sanguíneos, que é o limite de difusão do oxigênio. Para os organismos multicelulares crescerem além desse tamanho é necessária a formação de novos vasos sanguíneos. Tal processo é controlado pelo balanço entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos, que é desregulado em diversas doenças, especialmente em neoplasias. Sem os vasos sanguíneos o tumor não pode originar metástases para outros órgãos ou crescer além de um tamanho crítico de 2,0  $\text{mm}^3$ . Dessa forma a inibição da angiogênese relacionada ao tumor tem se tornado um alvo atraente para a terapia anticâncer. (CARMELIET, 2000).

O câncer de pulmão é a principal causa de morte relacionada a câncer nos EUA e segundo dados da American Cancer Society estimam-se para o ano de 2009, cerca de 159.390 mortes por essa patologia nos EUA. (JEMAL, 2009). O câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC) corresponde a aproximadamente 80% de todos os casos dessa neoplasia, com cerca de 70% dos pacientes apresentando-se com doença avançada. A angiogênese é fundamental para o crescimento desse câncer, assim a secreção excessiva de fatores pró-angiogênicos resulta em migração, proliferação celular e formação de tubos capilares, permitindo o desenvolvimento do tumor. Diversas pesquisas têm buscado desenvolver terapias anticâncer a partir da inibição da angiogênese tumoral. O bevacizumab, um anticorpo monoclonal que exerce sua função ligando-se ao VEGF circulante e impedindo que ele se ligue aos seus receptores, foi utilizado em diversos estudos randomizados, mostrando que sua combinação com a quimioterapia convencional para o tratamento de CPNPC resultou em melhoria da sobrevida total e sobrevida livre de doença dos pacientes. Outros estudos têm utilizado pequenas moléculas inibidoras de receptores de VEGF (Vandetanib) e de receptores de tirosina quinase (Sorafenib) associadas ao tratamento quimioterápico tradicional de CPNPC, principalmente em pacientes com metástase cerebral ou quando as células tumorais mostram diferenciação escamosa, no entanto o papel de tais moléculas no tratamento do CPNPC ainda não está bem definido. (HORN, 2009).

Resultados de diversos estudos experimentais têm sugerido que a progressão tumoral e a produção de metástases em câncer de mama também são dependentes da angiogênese. O câncer de mama expressa muitos fatores angiogênicos, incluindo o VEGF, o FGF, o fator de crescimento placentário e a timidina fosforilase. No entanto tais fatores são predominantemente expressos em diferentes fases de desenvolvimento do tumor. A timidina fosforilase, por exemplo, é expressa principalmente em tumores iniciais, enquanto que o VEGF é expresso em todos os estágios do tumor. Assim sendo, provavelmente o câncer de mama expressa diferentes perfis angiogênicos, necessitando da utilização de agentes antiangiogênicos diversos. Vale ressaltar que o bevacizumab associado a outras drogas já foi utilizado em alguns estudos para o tratamento do câncer de mama, resultando em um aumento da sobrevida total e da sobrevida livre de doença, melhorando as perspectivas em relação ao tratamento dessa neoplasia. (FOX, 2007).

Durante a angiogênese fisiológica novos vasos sanguíneos rapidamente amadurecem e tornam-se estáveis, no entanto na angiogênese tumoral o processo ocorre descontroladamente, provocando um constante crescimento de novos vasos sanguíneos. Em decorrência disso a vasculatura tumoral desenvolve características arquiteturais próprias, que a tornam completamente diferente do sistema vascular sanguíneo normal. Assim os vasos sanguíneos tumorais mostram-se irregulares, tortuosos, dilatados, podendo inclusive terminar em fundo cego. Eles não estão organizados em um padrão bem definido de vênulas, arteríolas e capilares, podendo exibir características aleatórias de qualquer um desses tipos de vasos. A rede vascular tumoral frequentemente é heterogênea, apresentando um fluxo sanguíneo lento, irregular e inadequado. Dessa forma, enquanto que em tecidos normais a densidade de vasos é dinamicamente regulada pelas necessidades metabólicas de nutrientes e oxigênio, a rede vascular tumoral tende a possuir excesso de vasos. Assim as anormalidades funcionais e estruturais dos vasos tumorais reflete a natureza patológica do processo de indução de formação de tais vasos. (BERGERS, 2003).

O tumor cresce e desenvolve-se por um processo complexo que requer a transformação de uma célula normal em célula maligna. Tumores pequenos (menores do que  $2,0 \text{ mm}^3$ ) são quiescentes e extraem nutrientes e oxigênio por

difusão. O crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes é um passo fundamental na transição de tumores “dormentes” para um estágio de malignidade. Assim a descoberta de drogas efetivas no controle da angiogênese tumoral e biologicamente viáveis, lança novas perspectivas em torno do tratamento de neoplasias malignas.

### 3.2.5 MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO DA ANGIOGÊNESE

A angiogênese além de desempenhar relevante papel em diversas doenças não neoplásicas, constitui-se em importante passo para o crescimento e progressão de tumores sólidos, assim como para o desenvolvimento de metástases. Dessa forma mensurando-se a angiogênese de tumores primários pode-se prever a evolução dos mesmos. Métodos para quantificar a angiogênese principalmente no câncer de mama têm sido objetos constantes de numerosas pesquisas nas últimas décadas, já tendo sido bem estabelecido que a densidade de microvasos em tumores mamários funciona como um importante fator prognóstico no câncer de mama. (UZZAN, 2004).

#### 3.2.5.1 DENSIDADE DE MICROVASOS

Um dos métodos mais comuns para quantificar a angiogênese em tumores humanos sólidos é a técnica da contagem intratumoral de microvasos, também conhecida como densidade de microvasos intratumoral (DMV). Ela foi primeiramente descrita por Weidner em 1991, sendo utilizada para quantificar a angiogênese tumoral no câncer de mama e deve ser realizada da seguinte forma:

- 1º. Examinar todos os cortes histológicos do tumor, selecionando-se aquele que melhor represente a neoplasia em estudo;

2º. Resgatar o bloco de parafina correspondente ao corte histológico escolhido e realizar novo corte histológico de 5µm de espessura para proceder à reação imuno-histoquímica;

3º. Realizar exame imuno-histoquímico nas secções histológicas com anticorpo para células endoteliais (anti-F8RA, anti-CD31, anti-CD34, por exemplo) a fim de destacar os microvasos;

4º. Examinar, com um aumento de 40x ou 100x, minuciosamente toda a secção histológica em que foi realizada a reação imuno-histoquímica, selecionando-se aquelas áreas de carcinoma invasor com maior número de microvasos em destaque (também chamada de "hot spot");

5º. Contar individualmente todos os vasos existentes em uma área correspondente a um campo de 200x (objetiva de 20x e ocular de 10x) ou 0,74mm<sup>2</sup>, localizada dentro de uma região de "hot spot". (WEIDNER, 1995).

Vê-se assim que a quantificação da angiogênese através da densidade de microvasos é relativamente simples, podendo ser reproduzida em laboratórios comuns de anatomia patológica. Devido a isso, tornou-se um método bastante divulgado e estudado. Assim sua importância já foi demonstrada em diversas neoplasias. No câncer de mama foi verificado que a alta DMV correlaciona-se com a presença de metástases tumorais e com a sobrevida total e sobrevida livre de doença mais curtas. No câncer de pulmão observou-se que a alta densidade de microvasos associa-se com a presença de metástases tumorais. Além disso no câncer de próstata notou-se que a elevada densidade de microvasos é mais comum em tumores pouco diferenciados e/ou com metástases. (WEIDNER, 1995). Vale ressaltar que o método tradicional de quantificação da DMV é rápido, prático e de baixo custo, no entanto apresenta dificuldades principalmente no que diz respeito à identificação das áreas de "hot spot". Esse método pode ser melhorado através da utilização de um sistema computadorizado de análise de imagens, o qual tem surgido como ferramenta capaz de melhorar a acurácia, facilitar a execução e aumentar a reprodutibilidade da mensuração da DMV entre patologistas. (BARBARESCHI, 1995).



### 3.2.5.2 Métodos bioquímicos

As perspectivas para a quantificação da angiogênese tumoral através de métodos bioquímicos surgiram a partir da identificação de altos níveis séricos de bFGF em pacientes com carcinoma renal. As descobertas subsequentes de que a presença de bFGF na urina é mais sensível, embora menos específica, do que a citologia urinária para a identificação do câncer de bexiga, assim como que os níveis de bFGF relacionam-se com o status tumoral, vieram reforçar a possibilidade de mensurar a angiogênese através de métodos bioquímicos. Vale ressaltar ainda que estudos complementares posteriores utilizando diversos tumores sólidos, inclusive câncer de mama, mostraram que altos níveis de bFGF estão associados a pacientes com pior prognóstico e menor sobrevida. A possibilidade da determinação do nível de vascularização de um tumor primário através da quantificação da concentração sérica ou urinária de um ou mais peptídeos angiogênicos pode tornar-se método simples, prático e de melhor reprodutibilidade na avaliação da atividade angiogênica tumoral de cada indivíduo, dessa forma se identificando os pacientes que possam se beneficiar mais de terapias com inibidores da angiogênese. (BARBARESCHI, 1995).

### 3.3 VEGF

Entende-se por angiogênese a formação de novos vasos sanguíneos, que é essencial para o desenvolvimento, progressão e metástases de tumores malignos. Na ausência de angiogênese o tumor não pode crescer além de 1,0 a 2,0 mm<sup>3</sup>. Em 1991 Weidner *et al* apresentaram o primeiro estudo demonstrando a influência da angiogênese em câncer de mama feminina e desde então muitos outros foram desenvolvidos nessa área. Atualmente conhece-se o VEGF, um marcador imunohistoquímico de angiogênese, cujo valor prognóstico no câncer de mama ainda não está bem elucidado, mas a maioria das pesquisas realizadas apontam-no como fator de mau prognóstico. Relatos recentes têm mostrado que o VEGF está elevado em pacientes com falha na resposta ao tratamento hormonal ou naquelas que têm

recorrência precoce da doença, sugerindo que o VEGF pode estar diretamente envolvido não apenas na formação de novos vasos sanguíneos, mas também induzindo a proliferação e manutenção de células tumorais. (LIANG, 2006). Além disso, a avaliação da angiogênese peritumoral pode traduzir uma relação direta entre esse parâmetro e a possibilidade de metástases à distância por via hematogênica, selecionando pacientes com câncer inicial de mama que necessitariam de tratamento mais agressivo. (ABREU, 2002).

### 3.3.1 A FAMÍLIA VEGF

A família VEGF compreende 7 glicoproteínas que são designadas por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e fator de crescimento placentário (PlGF). Os membros dessa família exercem seus efeitos biológicos através da interação com seus receptores, que são denominados VEGFR-1, VEGFR-2, receptor de VEGF 3 (VEGFR-3), NP-1 e NP-2. Tais receptores são do tipo tirosina quinase transmembrana. Assim o VEGF liga-se ao domínio extracelular do receptor, ativando uma cascata de proteínas que resulta na dimerização e autofosforilação da porção intracelular do receptor. Conseqüentemente as células endoteliais são ativadas, permitindo um aumento da permeabilidade vascular, migração e proliferação de células endoteliais, assim como formação de novos vasos sanguíneos. (OTROCK, 2007).

#### 3.3.1.1 VEGF-A

O VEGF-A (também referido como VEGF) é o membro da família mais estudado e melhor caracterizado. Trata-se de uma citocina secretada por tumores com importância crítica tanto na angiogênese normal quanto na tumoral. (OTROCK, 2007).

O gene do VEGF está localizado no braço curto do cromossomo 6, sendo composto por 7 íntrons e 8 éxons, que se arranjam de diferentes maneiras, originando 4 isoformas maduras de VEGF (VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206). A designação numérica das isoformas do VEGF correspondem ao número de aminoácidos da molécula. Existem ainda isoformas menos comumente expressas que são identificadas como VEGF145 e VEGF183. (OTROCK, 2007). As isoformas 121 e 165 são secretadas como proteínas solúveis, sendo as mais abundantes. (REEVES, 2009). O VEGF165 é a isoforma predominante e superexpressa em uma grande variedade de tumores sólidos. (OTROCK, 2007).

O VEGF-A exerce seus efeitos através da interação com receptores de superfície celular, que são receptores do tipo transmembrana tirosina quinase e incluem o VEGFR-1 ou Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1) e o VEGFR-2 ou Flk-1 (fetal liver kinase-1), expressos seletivamente em células endoteliais. No entanto o VEGF-A também pode exercer seus efeitos através dos receptores NP-1 e NP-2, expressos principalmente em células do endotélio vascular e neurônios. O VEGFR-2 constitui-se no principal receptor responsável pelos efeitos pró-angiogênicos do VEGF-A. (OTROCK, 2007).

Sabe-se ainda que o VEGF-A é o mais potente fator angiogênico, induzindo a proliferação das células endoteliais, brotamento e formação de tubos vasculares. Além disso ele tem importante papel na manutenção da viabilidade das células endoteliais, induzindo a expressão de proteínas antiapoptóticas. Vale ressaltar ainda que o VEGF-A tem importante efeito vasodilatador por estimular a síntese de óxido nítrico. (OTROCK, 2007).

Diversos experimentos in vivo têm demonstrado que o VEGF-A está associado à vasculogênese fisiológica, assim como à angiogênese. No homem o VEGF-A é expresso em praticamente todos os tumores sólidos estudados bem como em neoplasias malignas hematológicas. De fato correlações têm sido feitas entre os níveis de expressão do VEGF-A e o desenvolvimento, progressão e manutenção de diferentes tipos de cânceres. (OTROCK, 2007).

A expressão do VEGF-A relaciona-se intimamente com a elevada DMV e com altos níveis de hMAM mRNA (ácido ribonucléico mensageiro da mamaglobulina humana). O hMAM (mamaglobulina humana) é uma proteína recentemente descrita,

sendo específica do câncer de mama, mas também encontrada no tecido mamário normal em menores proporções. Tais autores mostraram que altos níveis de hMAM mRNA no sangue periférico foram encontrados em pacientes com metástases linfáticas e estadiamento clínico avançado. Também foi demonstrado que no câncer de mama a expressão do VEGF-A relaciona-se com a presença de metástases linfáticas, grande densidade de microvasos no tumor, estadiamento clínico avançado e grande tamanho tumoral, mostrando assim que o VEGF-A desempenha importante papel na ocorrência e desenvolvimento do câncer de mama. Dessa forma, em pacientes com câncer de mama, a detecção combinada da DMV com a expressão do VEGF-A e do hMAM mRNA sugere uma correlação entre angiogênese no tumor primário e presença de células tumorais no sangue periférico, podendo desempenhar importante papel na previsão do prognóstico de tal neoplasia. (XIE, 2009).

### 3.3.1.2 VEGF-B

O gene humano do VEGF-B compreende aproximadamente 4000 bp (pares de bases), contém 8 (oito) éxons, 6 (seis) íntrons e está localizado na banda 13 do braço longo do cromossomo 11. O VEGF-B produz 2 formas de polipeptídios, o VEGF-B167 e VEGF-B186. A região promotora do VEGF-B exibe importantes diferenças em relação ao VEGF-A. O promotor do VEGF-B contém sítios Egr-1, no entanto não apresenta o HIF-1e o AP-1, que são característicos do promotor VEGF-A. Dessa forma a hipóxia ou o frio, que podem induzir a expressão do VEGF-A não parecem regular os níveis de VEGF-B. Vale ressaltar que os mecanismos moleculares que regulam os níveis de VEGF-B ainda são pouco compreendidos. (OTROCK, 2007).

O VEGF-B liga-se ao VEGFR-1, mas não ao VEGFR-2 ou ao VEGFR-3. A ação do VEGF-B sobre o VEGFR-1 induz uma pequena atividade mitogênica para as células endoteliais, sugerindo que o VEGF-B é um ineficiente mitogênico para as células endoteliais. (OTROCK, 2007).

O VEGF-B167 e o VEGF-B186 diferem quanto à sequência de aminoácidos e quanto ao comprimento da porção C-terminal da molécula. Ambos apresentam uma sequência idêntica de 116 aminoácidos na porção N-terminal da proteína madura. Essa região N-terminal possui o domínio para a ligação do receptor do VEGF-B, sendo homólogo para as regiões correspondentes no VEGF-A e PlGF. A porção C-terminal confere propriedades distintas ao VEGF-B167 e ao VEGF-B186, que afetam a distribuição do VEGF no corpo. Assim o VEGF-B167 tem um C-terminal com domínio de ligação à heparina, estando associado com glicosaminoglicanas que auxiliam na adesão dessa isoforma à matriz extracelular. Já a porção C-terminal do VEGF-B186 não se liga à heparina e provavelmente permanece livremente circulante. (OTROCK, 2007).

O papel do VEGF-B ainda não está totalmente elucidado, no entanto como ele é significativamente expresso no tecido muscular estriado esquelético, no miocárdio e no tecido adiposo marrom, sua função pode estar relacionada a células de alto metabolismo energético, modulando a proliferação de células endoteliais e o crescimento vascular principalmente nesses tecidos. Algumas pesquisas têm demonstrado ainda que o VEGF-B desempenha um papel na angiogênese inflamatória. (OTROCK, 2007).

### 3.3.1.3 VEGF-C

O gene do VEGF-C está localizado na banda 34 do braço longo do cromossomo 4. O VEGF-C pertence a um grupo de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e exerce suas funções ligando-se ao VEGFR-2 e ao VEGFR-3. A forma madura do VEGF-C induz a mitogênese, a migração e a sobrevivência das células endoteliais. Durante o desenvolvimento, o VEGF-C é expresso junto com o VEGFR-3 principalmente nas regiões em que os vasos linfáticos desenvolvem-se. Diversos estudos têm demonstrado que o VEGF-C induz linfangiogênese, principalmente em territórios inflamatórios e tumorais. Assim o VEGF-C regula a função dos vasos linfáticos durante a inflamação e em neoplasias

malignas, correlacionando-se com invasão linfática, metástases linfáticas e sobrevida do paciente.(OTROCK, 2007).

A disseminação metastática de células cancerígenas é um dos maiores fatores de risco relacionados ao prognóstico clínico de neoplasias. O câncer de mama é uma das neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo e sua progressão metastática em geral está associada a um prognóstico reservado. A invasão linfática constitui-se em fator de risco independente e relaciona-se com a sobrevida livre de doença. Kurebayashi (1999), relatou um estudo demonstrando a associação entre expressão tumoral ao VEGF-C e presença de metástases linfonodais. Já Kinoshita (2001) publicou um estudo mostrando forte associação entre a expressão tumoral do VEGF-C no câncer de mama e a invasão vascular linfática nessa neoplasia, concordando com diversas pesquisas que mostram a estreita relação entre a expressão do VEGF-C e a difusão linfática de outras neoplasias. Vale ressaltar que esse estudo mostrou a relação entre a expressão do VEGF-C e a invasão vascular linfática, mas não com a presença de metástases linfonodais, deduzindo-se que a expressão do VEGF-C está mais associada a eventos precoces de disseminação metastática linfática. Observa-se assim que o VEGF-C está associado à invasão linfática, podendo atuar como marcador capaz de estimar a recorrência do câncer de mama. Além disso Zhang (2008) demonstrou que tumores mamários cuja expressão ao VEGF-C é significativa em geral exibem metástases linfonodais, alto grau histológico e expressão à COX-2. Assim tem-se formulado a hipótese de que inibidores da COX-2 possam auxiliar na prevenção de metástases linfonodais do câncer de mama.

#### 3.3.1.4 VEGF-D

O gene do VEGF-D localiza-se no braço curto do cromossomo "X". A forma madura do VEGF-D exerce sua função ligando-se ao VEGFR-2 e ao VEGFR-3, estimulando o crescimento de células endoteliais tanto em vasos sanguíneos como linfáticos. O papel do VEGF-D ainda não está totalmente elucidado, no entanto alguns estudos já demonstraram que ele é requerido para a angiogênese induzida

pela hipóxia assim como para a angiogênese e a linfangiogênese tumorais. Até o presente momento o que há realmente de concreto é que o VEGF-D é um dos principais fatores indutores da linfangiogênese já identificados.(OTROCK, 2007).

#### 3.3.1.5 VEGF-E

O VEGF-E é o membro menos estudado e compreendido da família VEGF. Ele é um potente agente angiogênico e alguns estudos têm indicado que a ativação do VEGFR-2 isoladamente pelo VEGF-E pode estimular eficientemente a angiogênese. Devido ao fato do VEGF-E induzir significativamente a angiogênese com poucos efeitos colaterais in vivo, ele deve ser cuidadosamente estudado como forte candidato para o uso clínico em terapias pró-angiogênicas. (OTROCK, 2007).

#### 3.3.1.6 FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO

Como o próprio nome indica o PIGF foi originalmente descoberto na placenta, mas também é expresso nos pulmões e no coração. Já foram descritas quatro isoformas humanas do PIGF (PIGF-1,-2,-3 e -4), que diferem quanto ao tamanho e à afinidade por ligantes. A deficiência do PIGF prejudica a angiogênese durante processos isquêmicos, cicatriciais, inflamação e câncer, assim como diminui e abrevia a resposta inflamatória, reduzindo a angiogênese inflamatória e a formação de edema. (OTROCK, 2007).

#### 3.3.1.7 VEGF-F

O VEGF-F tem uma estrutura 50% homóloga ao VEGF-A165, liga-se seletivamente ao VEGFR-1 e tem atividade biológica mais potente do que ele. (OTROCK, 2007).

### 3.3.1.8 VEGFR-1

O VEGFR-1 (Flt-1) é composto por sete imunoglobulinas (Ig) extracelulares de domínio homólogo, uma região transmembrana isolada e um domínio intracelular tirosina quinase. Ele liga-se ao VEGF-A, VEGF-B e PlGF com alta afinidade. Durante o desenvolvimento o VEGFR-1 é o primeiro receptor a ser expresso em angioblastos e no endotélio, embora menos fortemente do que o VEGFR-2. O VEGFR-1 é expresso em células endoteliais, osteoblastos, monócitos, macrófagos, trofoblastos da placenta, células mesangiais renais e células tronco. A expressão do VEGFR-1 é regulada pela hipóxia via um mecanismo dependente do HIF-1. Estudos recentes têm demonstrado a importância do VEGFR-1 na promoção da hematopoiese e recrutamento de progenitores endoteliais. Assim o VEGFR-1 pode atuar estimulando o crescimento de vasos colaterais e a atividade arteriogênica em processos isquêmicos dos membros ou do miocárdio através do recrutamento de células da medula óssea. Vale ressaltar ainda que o VEGFR-1 é expresso em diversas neoplasias, incluindo o câncer de mama e tumores astrocíticos, no entanto o seu papel nesses tumores ainda deve ser investigado. (OTROCK, 2007).

### 3.3.1.9 VEGFR-2

À semelhança do VEGFR-1, o VEGFR-2 exibe uma região extracelular com sete imunoglobulinas, um domínio transmembrana e um domínio intracelular tirosina quinase com aproximadamente 70 aminoácidos. O VEGFR-2 liga-se ao VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, promovendo principalmente mitogênese de células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular. O VEGFR-2 é importante para o efeito antiapoptótico do VEGF em células endoteliais da veia do cordão umbilical. Em decorrência do VEGFR-2 estar envolvido na proliferação e migração de células endoteliais, ele tem se tornado alvo central para a intervenção antiangiogênica. Alguns estudos têm demonstrado que a inibição molecular do VEGFR-2 pode melhorar a resposta tumoral, estando sendo testados alguns de seus inibidores. (OTROCK, 2007).



### 3.3.1.10 VEGFR-3

O VEGFR-3 (Flt4), um membro de receptores das células endoteliais do tipo tirosina quinase, tem apenas seis domínios Ig homólogos. O VEGFR-3 liga-se preferencialmente ao VEGF-C e ao VEGF-D, estando aumentado em tumores vasculares e na periferia de tumores sólidos. Esse receptor é largamente distribuído em tumores vasculares e pode ser considerado como marcador de diferenciação de células endoteliais em neoplasias vasculares. A ativação do VEGFR-3 é observada em linfangiogênese de processos cicatriciais assim como em células endoteliais de vasos sanguíneos de resposta inflamatória crônica. Além disso o aumento de seus ligantes foi observado em certas condições neoplásicas, que incluem melanoma e câncer de mama. O bloqueio do VEGFR-3 com inibidores específicos reprime o crescimento de vasos linfáticos, desfavorecendo a proliferação de metástases para linfonodos. (OTROCK, 2007).

### 3.3.1.11 Neuropilina 1 e 2

NP-1 liga-se preferencialmente ao VEGF-A, VEGF-B e PlGF, enquanto que NP-2 conecta-se ao VEGF-A, VEGF-C e PlGF. Durante o desenvolvimento embriogênico o NP-1 é expresso nos nervos, no sistema cardiovascular e esquelético, enquanto que em adultos ele é expresso em células endoteliais, células tumorais, pulmão, coração, fígado, rim, pâncreas, osteoblastos e células estromais da medula óssea. O NP-2 tem um padrão de expressão similar ao do NP-1. (OTROCK, 2007).

NP-1 atua como co-receptor aumentando a interação VEGF-A/VEGFR-2, formando complexos com o VEGFR-1 e aumentando a angiogênese tumoral. Em embriões o NP-1 é expresso principalmente em artérias, enquanto que o NP-2 é prevalente em veias e células endoteliais linfáticas, estando fortemente associado ao desenvolvimento de vasos linfáticos. (OTROCK, 2007).

### 3.4 TAMANHO DO TUMOR

O câncer de mama é uma doença heterogênea, que compreende um número de entidades biológicas distintas com morfologia, padrão imuno-histoquímico e comportamento clínico específicos. (REIS-FILHO, 2008). A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida variam de acordo com o paciente. Essa variação é determinada por uma série complexa de fatores, tais como diferença na velocidade de metastatização do tumor e outros mecanismos relacionados com a condição imunológica, hormonal e nutricional do paciente. Define-se fator prognóstico como parâmetro possível de ser mensurado no momento do diagnóstico e que serve como preditor da sobrevida ou do tempo livre de doença. Apesar de certos aspectos anatômicos, como o tamanho do tumor primário e as condições dos linfonodos axilares, constituírem fatores importantes na avaliação prognóstica, uma série de características histológicas como tipo e grau histológico do tumor, presença ou não de invasão vascular sanguínea e linfática, multicentricidade e multifocalidade tumoral são fundamentais para avaliar o prognóstico da evolução da doença e auxiliam na determinação dos programas terapêuticos. (ABREU, 2002). O sistema de estadiamento para o câncer de mama mais conhecido e utilizado é o TNM, que usa como critérios o tamanho do tumor (T), a extensão da neoplasia para linfonodos axilares (N) e a propagação da neoplasia para órgãos ou locais mais distantes (M). Critérios pré-definidos são utilizados para descrever as três características independentemente e quando associadas determinam o grau final do estadiamento TNM. Segundo o College of American Pathologists - 2009, este estadiamento é assim definido:

- Estadiamento 0: Carcinoma in situ;
- Estadiamento I: Carcinoma invasivo, com 2,0cm ou menor em diâmetro; sem envolvimento linfonodal;
- Estadiamento II: Carcinoma invasivo com 5,0cm ou menor em diâmetro, com até três nódulos axilares envolvidos ou carcinoma invasivo maior que 5,0cm sem envolvimento linfonodal;

- Estadiamento III: Carcinoma invasivo com 5,0cm ou menor de diâmetro, com quatro ou mais linfonodos axilares envolvidos; carcinoma invasivo maior que 5,0cm de diâmetro, com envolvimento linfonodal; carcinoma invasivo, com envolvimento dos linfonodos mamários internos ipsilaterais; ou carcinoma invasivo, com envolvimento cutâneo (edema, ulceração ou nódulos cutâneos satélites), fixação na parede torácica, ou carcinoma inflamatório clínico;

- Estadiamento IV: Qualquer câncer de mama com metástases distantes.

Carter (1989) utilizando uma amostragem de 24.740 mulheres com diagnóstico primário de câncer de mama publicou um estudo mostrando que o tamanho tumoral, o status dos linfonodos axilares e o número de linfonodos axilares comprometidos pela neoplasia constituem-se em importantes fatores prognósticos para o câncer de mama. Assim tal estudo demonstrou que pacientes com tumores menores do que 2,0 cm exibiram uma sobrevida em 5 anos de 99% quando os linfonodos axilares não estavam comprometidos pela neoplasia; de 77% quando 1 a 3 linfonodos encontravam-se comprometidos e uma sobrevida máxima de 64% quando 4 ou mais linfonodos mostravam-se comprometidos pela neoplasia. Esse estudo demonstrou ainda que tanto em pacientes com linfonodos axilares livres de neoplasia como naqueles com linfonodos comprometidos, o tamanho tumoral tem importância gradual para a taxa de mortalidade das pacientes. Assim independente do status linfonodal quanto maior o diâmetro do tumor pior o prognóstico da paciente. Além disso tal estudo revelou que o tamanho tumoral e o status dos linfonodos axilares são fatores prognósticos independentes, pois se observou um declínio na sobrevida quando o tamanho tumoral aumentava e o status linfonodal era mantido inalterado, assim como se detectou um declínio da sobrevida quando o status linfonodal era gradativamente agravado e o tamanho tumoral mantido constante. Tal estudo, baseado em uma amostragem de 24.740 pacientes confirma que o sistema de estadiamento TNM para o câncer de mama além de simples e facilmente reproduzível, é capaz de estimar o prognóstico de tal neoplasia.

Vê-se assim que apesar da existência de diversos fatores prognósticos para o câncer de mama, o tamanho tumoral e o status dos linfonodos axilares, base do sistema TNM, são parâmetros práticos e extremamente úteis para estimar o prognóstico dessa neoplasia.

### 3.5 LINFONODO SENTINELA

A dissecação seletiva de linfonodos tem sido um dos mais controversos e importantes assuntos discutidos no manejo de pacientes com neoplasias malignas. O status dos linfonodos regionais é o fator prognóstico mais importante e um componente crítico no estadiamento de pacientes com câncer além de influenciar na indicação de terapias adjuvantes. Para pacientes com câncer de mama é imprescindível a avaliação dos linfonodos locais e regionais para definir o prognóstico, estadiamento e conduta terapêutica. (KIRICUTA, 2000).

O conceito de linfonodo sentinela é baseado na progressão ordenada de células tumorais dentro do sistema linfático. Metástases para linfonodos não é um evento aleatório, sendo determinado pelo fluxo linfático através da drenagem linfonodal de um tumor primário. Define-se linfonodo sentinela como o primeiro a receber a drenagem linfática de determinado tumor primário, correspondendo ao primeiro linfonodo acometido por metástases. A biópsia aprimorada de tal linfonodo é capaz de definir o status linfonodal regional. O mapeamento da rede linfática local e regional pode ser realizado através de linfocintilografia, usando princípios anatômicos e fisiológicos para identificar o linfonodo sentinela e os subsequentes. Assim torna-se possível a realização de linfadenectomia seletiva para estudo histopatológico e imuno-histoquímico, evitando-se uma ampla dissecação de linfonodos, tornando a cirurgia mais simples, de menores custos e com melhores resultados estéticos. (KIRICUTA, 2000).

O conceito de linfonodo sentinela revolucionou o tratamento de neoplasias malignas iniciais, especialmente do câncer de mama. A introdução do estudo de linfonodos sentinelas em pacientes com essa neoplasia rendeu sucesso em praticamente 100% dos casos. O trabalho do patologista é investigar a presença de metástases em linfonodos sentinelas, seja através do exame histopatológico convencional ou do exame imuno-histoquímico. Vale ressaltar que apesar de quase sempre o linfonodo sentinela estar localizado no nível 1 da rede linfática loco-regional, ocasionalmente ele pode ser identificado nos níveis 2 ou 3, assim como, mais raramente, em localizações imprevisíveis como outras redes linfáticas. (KIRICUTA, 2000).

A biópsia do linfonodo sentinela tem elevada acurácia e é um método minimamente invasivo para o estadiamento dos pacientes, podendo substancialmente reduzir a morbidade e custos no tratamento do câncer de mama, impedindo uma agressiva e dispensável dissecação linfonodal axilar completa assim como tratamentos adjuvantes desnecessários. (KIRICUTA, 2000).

O tamanho do tumor e a presença de metástases em linfonodos axilares são fatores prognósticos bem estabelecidos para o câncer de mama. No entanto outros fatores tais como a idade da paciente, tipo do tumor, grau histológico, condições das margens cirúrgicas e presença de invasão vascular linfática têm sido investigados quanto ao seu valor prognóstico no câncer de mama. Tais fatores poderiam ser importantes especialmente em pacientes com linfonodos axilares negativos, nos quais a decisão de realizar terapia sistêmica adjuvante é baseada no tamanho tumoral. Budrukkar (2008) publicou um trabalho em que a invasão vascular linfática foi o único fator significativo em cânceres de mama iniciais para o controle local da doença e a sobrevida livre de doença em análises univariadas e multivariadas. O estudo demonstrou que a invasão vascular linfática pode ser um dos principais parâmetros histológicos para decidir sobre terapia sistêmica adjuvante em mulheres com câncer de mama inicial e linfonodos axilares negativos (T1N0).

No câncer de mama a biópsia de linfonodo sentinela tem se tornado uma rotina largamente aceita como alternativa para a extensa dissecação de linfonodos axilares, ajudando a identificar pacientes com linfonodos negativos de infiltração neoplásica e prevenindo uma ampla dissecação axilar, que não representaria qualquer benefício para as pacientes, mas estaria relacionada à maior morbidade, alto risco de infecção e linfedema. A biópsia de linfonodo sentinela é utilizada rotineiramente no manejo de pacientes com câncer de mama em estadio inicial (T1 ou T2), no entanto existem algumas situações em que ainda não está bem estabelecido o valor desse parâmetro. Dentre essas situações pode-se citar multicentricidade e/ou multifocalidade tumoral, cirurgia mamárias e/ou axilares prévias, assim como câncer de mama grande ou localmente avançado (estadio T3 ou T4). Hanker (2008) publicou um trabalho relatando que em câncer de mama a biópsia de linfonodo sentinela não deve ser utilizada para definir a conduta em pacientes com doença multicêntrica, no entanto pode ser utilizada naqueles com doença multifocal. Esse estudo descreveu também que pacientes submetidas a

extensas cirurgias mamárias ou axilares prévias, distorcendo a drenagem linfática mamária não devem utilizar o método de biópsia de linfonodos sentinelas, no entanto pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos prévios simples (como biópsias diagnósticas) podem usufruir do método de avaliação do linfonodo sentinela sem qualquer restrição. Além disso esse estudo descreveu que a biópsia de linfonodo sentinela é um método que pode ser aplicado em casos de tumores grandes, em estadios avançados (T3 e T4) e submetidos à quimioterapia prévia ao procedimento cirúrgico sem qualquer prejuízo para os pacientes.

### 3.6 APOPTOSE E BCL-2

A compreensão da etiopatogenia das doenças neoplásicas obteve importantes avanços através do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, as quais possibilitam a identificação de mecanismos de controle do ciclo celular e o consequente comportamento biológico dos tumores, que estão relacionados à expressão e atuação de um grande número de moléculas, em sua maior parte composta por proteínas. A utilização crescente de técnicas como o sequenciamento genético e a imuno-histoquímica expandiu substancialmente os conhecimentos a respeito do grande número de genes e funções de suas respectivas proteínas. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e avaliação de tais proteínas, porém a imuno-histoquímica permanece como o método mais disponível para a análise em bases clínicas, devido ao seu custo reduzido e à possibilidade de sua realização em laboratórios convencionais de anatomia patológica.

Assim sabe-se que o Bcl-2 pertence a uma família de membros que podem atuar como reguladores nas vias envolvidas na apoptose, tanto inibindo como promovendo a morte celular programada. Dentre as proteínas antiapoptóticas estão o Bcl-2 e o Bcl-xL, enquanto que as pró-apoptóticas incluem o Bax, Bcl-Xs e Bad. Por ser um marcador antiapoptótico o Bcl-2 deveria relacionar-se a pior prognóstico no câncer de mama. No entanto o que a maioria dos estudos demonstra é que ele está associado a tumores de melhor prognóstico. Não se sabe se isso ocorre pelo fato de ele acompanhar outros fatores prognósticos favoráveis tais como pequeno

tamanho tumoral, baixo grau nuclear e tumores positivos para receptores de estrógeno ou pelo fato do balanço intracelular entre os membros antiapoptóticos e pró-apoptóticos, favorecer estes últimos, neutralizando a ação antiapoptótica do Bcl-2.

### 3.6.1 APOPTOSE

A apoptose é um mecanismo ativo e coordenado de autodestruição celular que pode ocorrer tanto em situações fisiológicas como em patológicas. Morfologicamente caracteriza-se por desidratação celular, que leva à condensação citoplasmática, compactação da cromatina nuclear e fragmentação nuclear. A membrana plasmática, que preserva a estrutura morfológica e a integridade funcional da célula rompe-se apenas em fases tardias da apoptose, envolvendo fragmentos nucleares e citoplasmáticos, formando os “corpos apoptóticos”, os quais são rapidamente removidos por fagocitose antes mesmo de desencadear qualquer resposta inflamatória pelo hospedeiro. (PAPATHANASSOGLU, 2000).

A manutenção de um número constante de células em determinado organismo reflete um rigoroso equilíbrio entre as vias que regulam a morte e a proliferação celular. Assim o aumento do número de células em tecidos neoplásicos, seja por aumento da proliferação ou por redução da morte celular, pode ser visto como uma violação da homeostase normal. Durante muito tempo as pesquisas sobre oncogênese concentraram-se apenas nos mecanismo de aumento do crescimento e proliferação celular, no entanto nas últimas décadas muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar os mecanismo de controle da apoptose, a fim de melhor entender o processo de morte celular. Assim surgiu uma nova categoria de oncogenes, cuja principal função é controlar a morte celular programada, conhecida como família Bcl-2. (HANKER, 2008).

### 3.6.2 A FAMÍLIA Bcl-2

Em 1985 o Bcl-2 foi descoberto como oncogene relacionado à translocação 14;18 - t (14;18)(q32;q21), patognomônica do linfoma folicular de células B. Assim o Bcl-2 foi definido em vários aspectos, tornando-se o primeiro gene a ser identificado como regulador da apoptose. (SUSNOW, 2009).

A definição de que a proteína Bcl-2 localiza-se em mitocôndrias e o fato da glicólise aeróbica ser um traço característico do câncer levantou fortes suspeitas da importância dessa organela na apoptose e no desenvolvimento tumoral. Assim surgiram questões interessantes como quais mudanças metabólicas nas células cancerígenas estariam ligadas a outras alterações essenciais ao câncer, exemplificadas pela promoção exarcebada da angiogênese e sinais de crescimento celular desordenado. A apoptose é induzida por múltiplos diferentes sinais e envolve perda da homeostase mitocondrial, em particular da integridade da membrana mitocondrial externa, liberando citocromo *c* e outras proteínas para o espaço intermembrana. A integração desses processos é controlada por proteínas da família Bcl-2 e também influenciada pelo status metabólico da célula. Previamente ao Bcl-2 outros oncogenes foram identificados como promotores da proliferação e transformação celular, induzindo o crescimento e desenvolvimento tumoral na ausência dos efeitos do Bcl-2. (SUSNOW, 2009).

A família de proteínas Bcl-2 inclui fatores anti e pró-apoptóticos, atuando nas membranas mitocondrial e microssomal, sendo encontrados em mitocôndrias ou no retículo endoplasmático, como proteínas solúveis em frações citosólicas ou ligadas a elementos do citoesqueleto. O Bax, o Bak e o Bok são membros que promovem a apoptose, enquanto que o Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, MCL1 e A1 funcionam como antiapoptóticos. Todos eles possuem uma estrutura aproximadamente tridimensional com 4 domínios homólogos, que são conhecidos como Bcl-2 homólogo 1 (BH1), BH2, BH3 e BH4, além de um segmento transmembrana C-terminal. A sequência de aminoácidos determina a função pró ou antiapoptótica da proteína. Além disso existem elementos pró-apoptóticos conhecidos como fatores BH-3 exclusivos, nos quais os domínios BH1, BH2 e BH4 estão ausentes. Nas células humanas são conhecidas oito proteínas pertencentes a esse grupo: BIM, BID, PUMA, NOXA, BAD, BMF, HRK e BIK. (LESSENE, 2008).



A indução da apoptose em diferentes tecidos em resposta ao stress é um processo complexo controlado por diferentes membros da família Bcl-2. O Bcl-xL, por exemplo, é essencial para a sobrevivência de plaquetas e na embriogênese contribui para a manutenção de progenitores eritróides e células neurais, enquanto que o Bcl-2 é essencial para a viabilidade de linfócitos B e T maduros. Além disso o MCL1 é importante para a sobrevivência de células tronco hematopoiéticas e progenitores de linfócitos B e T. Assim o bloqueio funcional de proteínas antiapoptóticas específicas gera consequências próprias, esperando-se que antagonistas do Bcl-2 causem linfopenia enquanto que antagonistas do Bcl-xL provoque trombocitopenia. (LESSENE, 2008).

A atividade do Bax e do Bak está localizada na membrana mitocondrial externa, a qual se torna permeável em resposta a sinais de morte celular. Como resultado o citocromo c é liberado no citosol, induzindo a ativação da cascata caspase e promovendo a morte celular apoptótica. (LESSENE, 2008).

A descoberta de que o Bcl-2, uma proteína superexpressa em muitos tipos de células cancerígenas, promove a sobrevivência, mas não a proliferação celular tem levado à hipótese de que o prejuízo da apoptose é um passo crítico para o desenvolvimento de tumores. A remoção programada de células com danos ou defeitos através da apoptose é essencial durante a embriogênese e para a manutenção da homeostase. A apoptose também é importante para combater microorganismos infecciosos assim como no processamento de agentes citotóxicos usados em quimioterapia. Células tumorais insensíveis para quimioterapia e radioterapia podem frequentemente ser investigadas para defeitos na maquinaria apoptótica ou em vias sinalizadoras que ativariam as células normais. A elucidação dessas vias tem salientado a possibilidade do desenvolvimento de terapias que induzam diretamente a apoptose e portanto não dependam de sinais que são frequentemente inviáveis em células danificadas. Assim se bem direcionada a maquinaria apoptótica poderia ser útil tanto na remoção de células indesejáveis como na terapia para o câncer ou doenças inflamatórias. (LESSENE, 2008).

Callagy (2008) publicou um estudo de metanálise confirmando que a expressão da proteína Bcl-2 em câncer de mama funciona como fator de bom prognóstico independente do status linfonodal, do tamanho tumoral e do grau

histológico tumoral.No entanto o mecanismo pelo qual o Bcl-2 pode exercer seu efeito protetor em pacientes com câncer de mama permanece desconhecido.Se é consequência do seu papel na apoptose ou de funções não apoptóticas não está esclarecido.

O papel antiapoptótico do Bcl-2 está bem caracterizado, no entanto sua função no controle do ciclo celular tem recebido menos atenção. Sabe-se que o Bcl-2 atrasa a progressão da fase G1 e a transição G1-S por prolongar a fase G0, sendo capaz de aumentar os efeitos inibitórios do crescimento celular analogamente ao p53. É possível que o predomínio de uma dessas funções em relação à outra dependa do tipo e fisiologia celular e que efeitos antiproliferativos sejam traduzidos pela supressão tumoral em neoplasias sólidas, incluindo o câncer de mama.Além disso existe um consenso emergente de que o Bcl-2 desempenha um papel chave na determinação da resposta à terapia endócrina e quimioterápica, assim tumores que expressam o Bcl-2 têm melhor resposta à terapia endócrina. (CALLAGY, 2008).

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal no qual foram analisadas as variáveis: presença ou ausência de expressão do Bcl-2 e do VEGF; tamanho máximo do tumor até 2,0cm ou maior do que 2,0cm; linfonodo sentinela livre ou comprometido pela neoplasia.

### 4.2 AMOSTRA

Para esse estudo foram selecionados do arquivo do Centro de Anatomia Patológica (CAP) do Hospital Universitário de Brasília (HUB) todos os blocos de parafina, contendo fragmentos de mama com carcinoma ductal invasor de pacientes submetidas a procedimento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008. Vale ressaltar que apenas os blocos disponíveis no CAP e em bom estado de conservação foram utilizados nessa pesquisa, totalizando um número de 44 blocos.

### 4.3 PROCEDIMENTOS

Foi realizada uma revisão nos arquivos digitais da secretaria do CAP-HUB, selecionando-se todos os casos de carcinoma ductal invasor de mama diagnosticados através de exame histopatológico em peças cirúrgicas de mastectomia ou setorectomia nos anos de 2007 e 2008.

Coletaram-se os dados disponíveis sobre os casos previamente submetidos a estudo histopatológico e imuno-histoquímico, principalmente no que diz respeito ao tamanho tumoral, ao status dos linfonodos axilares e à expressão tumoral do Bcl-2 e

do VEGF. Selecionaram-se no arquivo do CAP-HUB os blocos de parafina dos casos que necessitavam de estudo imuno-histoquímico complementar, procedendo-se a tal exame no próprio HUB.

#### 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram selecionados para a pesquisa 51 casos de carcinoma ductal invasor, cujas pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico (mastectomia radical ou setorectomia) no HUB nos anos de 2007 e 2008. No entanto apenas 44 casos foram incluídos no estudo, pois foram excluídos quatro casos de pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante, dois cujos blocos de parafina não se encontravam arquivados no CAP-HUB e um cujo material não se encontrava em bom estado de conservação para a realização do exame imuno-histoquímico por problemas de fixação do tecido mamário.

#### 4.5 PROCEDIMENTOS PARA ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

##### 4.5.1 Preparação da lâmina histológica para estudo imuno-histoquímico

Nos casos em que o estudo imuno-histoquímico já havia sido previamente realizado, procedeu-se apenas à coleta dos dados, enquanto que nos demais o estudo imuno-histoquímico foi realizado nas secções de tecido obtidas a partir de blocos incluídos em parafina com a finalidade de pesquisar a expressão do Bcl-2 e do VEGF utilizando o protocolo de Estreptovidina Peroxidase. As amostras selecionadas foram submetidas à microtomia, obtendo-se secções de tecido na espessura de 3,0 micrômetros que foram colocadas em lâminas de vidro, previamente limpas, desengorduradas e sialinizadas em solução de 3-aminopropiltriétoxi-silano (Sigma Chemical CO, StLouis, MO/USA). A seguir são descritas as etapas do procedimento imuno-histoquímico.

1º - Desparafinização e hidratação: A desparafinização das secções de tecido foi realizada em três banhos de substituto vegetal de xilol, na estufa a 37°C, durante 15 minutos cada um. Em seguida as secções foram hidratadas em quatro banhos de álcool (álcool absoluto, álcool a 95%, 90% e 80%) e, sem passar em água, foram levadas para a solução de bloqueio de peroxidase endógena.

2º - Bloqueio da peroxidase endógena: Água oxigenada a 3%, três banhos de 10 minutos cada.

3º - Pré-tratamento das lâminas: As lâminas foram distribuídas em suportes plásticos e colocadas na panela de pressão elétrica (modelo DL) imersas em solução de Tampão Citrato pH 6 ou tampão EDTA pH8 ou pH9, a 97°C, durante 30 minutos, de acordo com as exigências requeridas pelo tipo de anticorpo primário utilizado. Em seguida as secções, ainda dentro da solução utilizada, foram deixadas esfriar por, aproximadamente, 15 minutos.

4º - Incubação com anticorpo primário: 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 (Tris Buffer Solution) e secada, cuidadosamente com lenço de papel, para retirada do excesso de tampão TBS que estivesse sobre as secções. A seguir foram gotejadas sobre elas os reagentes primários [DakoCytomation Denmark A/S, Denmark], previamente diluídos, de acordo com o especificado na Tabela 01. As lâminas foram deixadas por toda a noite (*over night*) na geladeira.

Tabela 1: Reagentes primários (anticorpos) - Nome do clone e diluição

ANTICORPO	CLONE	DILUIÇÃO
<b>Bcl-2</b>	124	1:100
<b>VEGF</b>	VG-1	1:50

5º - Incubação com anticorpo secundário (Kit Dako K-0690-LSAB) [DakoCytomation Denmark A/S, Denmark]: Cada lâmina foi lavada com TBS e secada cuidadosamente com lenço de papel para retirada do excesso de Tampão TBS que estivesse sobre as secções. A seguir foram gotejadas sobre elas os reagentes secundários (Frasco amarelo do Kit LSAB) o suficiente para cobrir toda a

secção. As lâminas foram, então, incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente.

6º - Reagente Estreptovidina Peroxidase (Kit Dako K-0690-LSAB) [DakoCytomation Denmark A/S, Denmark]: Cada lâmina foi lavada com TBS e secada cuidadosamente com lenço de papel para retirada do excesso de tampão TBS que estivesse sobre as secções. A seguir foram gotejadas sobre elas o reagente streptovidina peroxidase (Frasco vermelho do Kit LSAB) o suficiente para cobrir toda a secção. As lâminas foram, então, incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente.

7º - Revelação com substrato cromogênico: 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 (Kit K-3468 Dako) [DakoCytomation Denmark A/S, Denmark] o suficiente para cobrir toda a secção. As lâminas foram, então, incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente.

8º - Contracoloração com hematoxilina: As lâminas foram retiradas das bandejas e colocadas em cuba de coloração para serem lavadas em água corrente. Logo depois foram coradas pelo método de hematoxilina de Harris, durante 20 segundos. Em seguida foram lavadas, rapidamente, em água amoniacal e, depois, em água corrente.

9º - Montagem das lâminas: As secções de tecidos contidas nas lâminas foram recobertas com lamínulas de vidro, utilizando-se para isso resina sintética – Entellan.

10º - Identificação das lâminas: As lâminas foram especificadas com um número próprio, identificando-as com exclusividade.

#### 4.5.2 Procedimento para a análise imuno-histoquímica

A avaliação semiquantitativa do resultado da imunorreacção para Bcl-2 e VEGF foi baseada em Turley (1998), levando em consideração a intensidade de coloração, conforme a Tabela 02. Assim quanto mais intensas as colorações das

imunorreações, mais fortes e positivas elas foram consideradas (Figuras 01, 02, 03 e 04). Para fins estatísticos as imunorreações fracas ou ausentes foram avaliadas como negativas, enquanto que as moderadas ou acentuadas foram julgadas positivas.

Tabela 2: Critérios semiquantitativos de avaliação da intensidade da imunorreação para Bcl-2 e VEGF

GRADUAÇÃO DA REAÇÃO	SIGNIFICADO
<b>Negativo</b>	Imunorreação ausente
<b>Positivo +</b>	Imunorreação fraca
<b>Positivo ++</b>	Imunorreação moderada
<b>Positivo +++</b>	Imunorreação acentuada

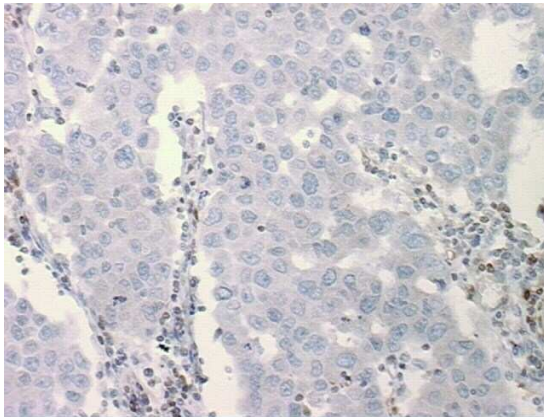


Figura 1: Imunorreação ausente para o Bcl-2, 200x.

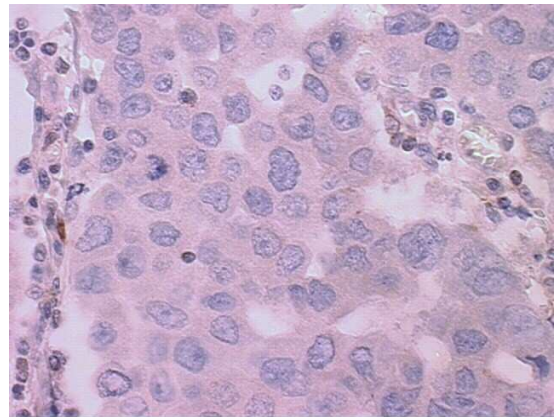


Figura 2: Imunorreação fraca(1+) para o Bcl-2, 200x.

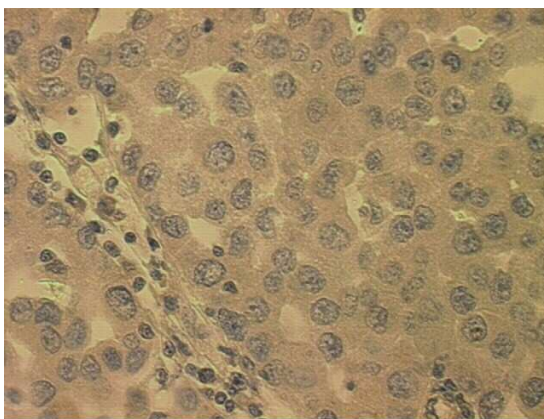


Figura 3: Imunorreação moderada (2+) para o VEGF, 400x.

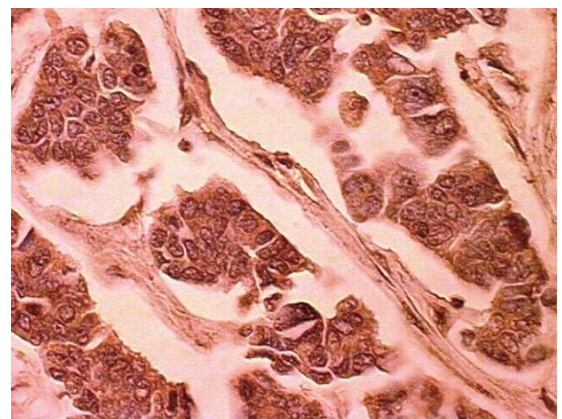


Figura 4: Imunorreação forte (3+) para o VEGF, 400x.

#### 4.6 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

A análise estatística foi realizada para verificar a associação ou não das expressões imuno-histoquímicas de Bcl-2 e de VEGF com o tamanho do tumor e com o comprometimento do linfonodo sentinela. Foi utilizado o programa de computador Epi Info versão 3.5.1 e para verificar a significância estatística das associações encontradas foram usados o teste não paramétrico Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o exato de Fischer, quando os valores esperados estavam abaixo de 5. Foram analisadas as medidas de associação (odds ratio -OR), os valores de p (considerado como significativo  $p < 0,05$ ) e do intervalo de confiança (IC), para um grau de confiança de 95%.

#### 4.7 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado em junho de 2008 e apresentado ao diretor do HUB, à diretora da DAEP (Diretoria Adjunta de Ensino e Pesquisa) e ao chefe do CAP-HUB, que permitiram a realização do estudo no HUB. Em seguida o projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UnB, que aprovou a pesquisa em outubro de 2008. (ANEXO I)



## 5 RESULTADOS

Dos 44 tumores estudados, 23 (52,27%) eram maiores de 2,0 cm e 21(47,73%) apresentavam dimensão máxima de até 2,0cm no momento do diagnóstico histopatológico da neoplasia (Figura 05), mostrando que em nosso meio o diagnóstico de câncer de mama geralmente é feito em estágios avançados.

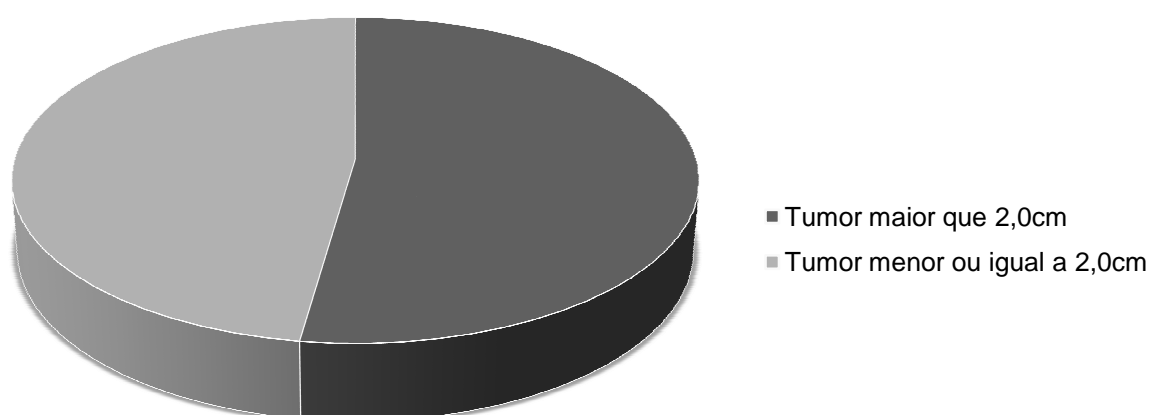


Figura 5: Frequência de tumores, segundo o tamanho, no momento do diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasor de mama em pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008.

Dos 23 tumores maiores do que 2,0cm apenas 3(13,04%) expressaram imuno-histoquimicamente o VEGF no momento do diagnóstico histopatológico (Figura 06), enquanto que 20(86,96%) não demonstraram imunorreatividade importante para esse marcador (Tabela 03). Já dos 21 tumores com tamanho menor ou igual a 2,0 cm no momento do diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasor de mama, 5 (23,81%) exibiram imunorreatividade ao VEGF, enquanto que 16 (76,19%) não mostraram imunorreatividade expressiva para esse marcador, obtendo-se  $OR=0,48$  (IC95% 0,08-2,85,  $p>0,05$ ). Portanto, nesse estudo não foi encontrada associação entre expressão imuno-histoquímica ao VEGF e tamanho

tumoral maior do que 2,0cm em carcinomas ductais invasores de mama no momento do diagnóstico histopatológico.

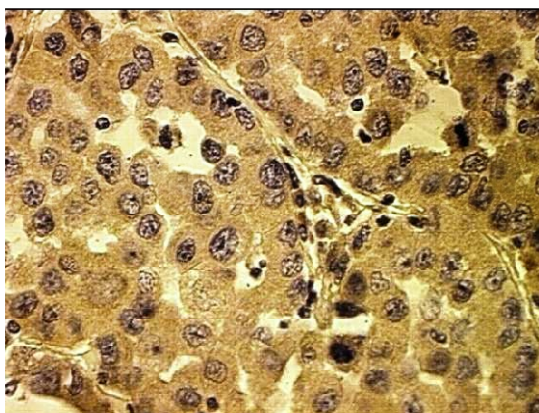


Figura 6: Imunorreação forte (3+) para o VEGF, 400x.

Tabela 3: Relação da imunorreatividade do VEGF em carcinomas ductais invasores de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008 com o tamanho tumoral

Imunorreatividade do VEGF	Tumores > 2,0cm	Tumores ≤ 2,0cm
<b>Positivo<sup>1</sup></b>	3	5
<b>Negativo<sup>2</sup></b>	20	16

1-Imunorreação moderada ou forte (2+ ou 3+).

2- Imunorreação fraca (1+) ou ausente.

Além disso, dos 23 tumores maiores do que 2,0cm, 6 (26,09%) tiveram imunorreatividade para o Bcl-2, enquanto que 17 (73,91%) não tiveram expressão imuno-histoquímica significativa para tal marcador. Já dos 21 tumores com tamanho menor ou igual a 2,0cm no momento do diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasor de mama, 14 (66,67%) exibiram imunorreatividade ao Bcl-2 e 7 (33,33%) não expressaram significativamente tal marcador (Tabela 04). Assim pelo teste  $\chi^2$  obteve-se  $p=0,02$  ( $p<0,05$ ) com  $OR=5,67$  ( $IC95\%1,31 - 26,23$ ), revelando uma associação estatisticamente significante entre expressão do Bcl-2 em carcinomas ductais invasores de mama e tamanho tumoral máximo de até 2,0cm no momento do diagnóstico histopatológico dessas neoplasias.

Tabela 4: Relação da imunorreatividade do Bcl-2 em carcinomas ductais invasores de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008 com o tamanho do tumor

Imunorreatividade do Bcl-2	Tumor>2,0cm	Tumor≤2,0cm
<b>Positivo<sup>1</sup></b>	6	14
<b>Negativo<sup>2</sup></b>	17	7

1-Imunorreação moderada ou forte (2+ ou 3+).

2- Imunorreação fraca (1+) ou ausente.

Dos 44 casos estudados, 23(52,27%) pacientes exibiam linfonodos sentinelas axilares comprometidos pela neoplasia e 21(47,73%) mostravam tais linfonodos livres de neoplasia (Figura 07). Esses dados mostram que o diagnóstico de câncer de mama feminino em pacientes do HUB frequentemente é realizado em estágio avançado, quando já se tem inclusive metástases, piorando o prognóstico dessas mulheres.

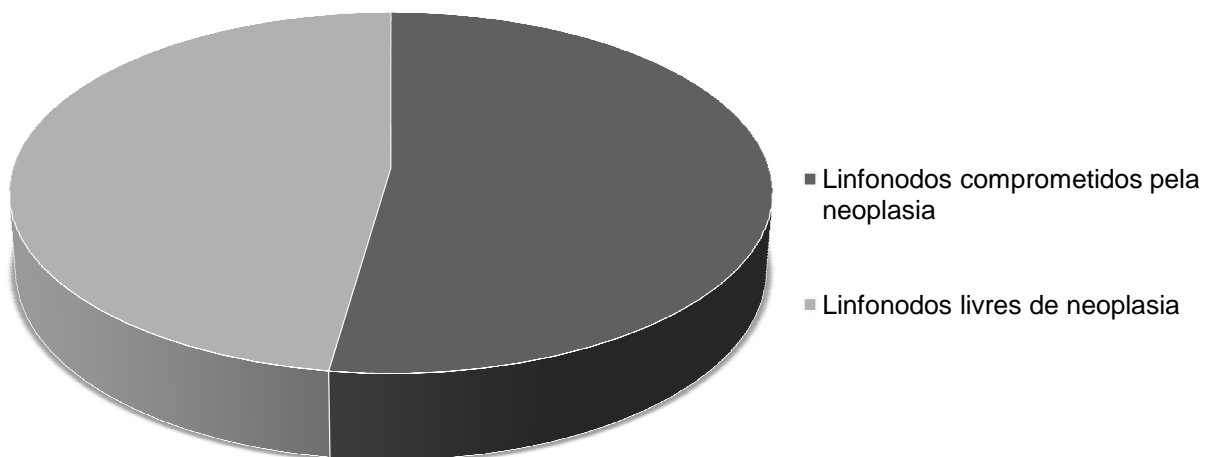


Figura 7: Frequência dos tumores, segundo o status dos linfonodos axilares, no momento do diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasor de mama em

pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008.

Dos 23 tumores que estavam associados a linfonodos sentinelas infiltrados pela neoplasia, apenas 7(30,43%) expressaram imuno-histoquimicamente o VEGF, enquanto 16 (69,57%) não mostraram imunorreatividade significativa ao VEGF. Já em relação aos 21 tumores associados a linfonodos livres de invasão neoplásica os resultados são os seguintes: somente 1(4,76%) mostrou imunorreatividade ao VEGF, enquanto que 20 (95,24%) não expressaram significativamente esse marcador (Tabela 05). Dessa forma, pelo teste exato de Fischer obteve-se  $p=0,03$  ( $p<0,05$ ), podendo-se afirmar que houve associação entre expressão imuno-histoquímica do VEGF e linfonodos sentinelas comprometidos pela neoplasia no momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama, no entanto essa associação não foi estatisticamente significante (OR = 8,75 IC 95% -0,89-209,65).

Tabela 5: Relação da imunorreatividade do VEGF em carcinomas ductais invasores de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008 com o status dos linfonodos sentinelas axilares

Imunorreatividade do VEGF	Linfonodo sentinela positivo <sup>3</sup>	Linfonodo sentinela negativo <sup>4</sup>
Positivo <sup>1</sup>	7	1
Negativo <sup>2</sup>	16	20

1-Imunorreação moderada ou forte (2+ ou 3+).

2- Imunorreação fraca (1+) ou ausente.

3-Linfonodo comprometido pela neoplasia.

4-Linfonodo livre de neoplasia.

Ainda em relação ao grupo de tumores, cujos linfonodos sentinelas mostravam-se comprometidos pela neoplasia, 8 (34,78%) exibiram imunorreatividade importante ao Bcl-2 (Figura 08), enquanto que 15 (65,22%) não expressaram significativamente esse marcador. Já em relação aos 21 tumores associados a linfonodos livres de invasão neoplásica os resultados são os seguintes:

12 (57,14%) exibiram reação imuno-histoquímica ao Bcl-2, mas 9(42,86%) não mostraram imunorreatividade expressiva a tal marcador (Tabela 06). Assim pelo teste  $\chi^2$  obteve-se  $p=0,23$  ( $p>0,05$ ) com  $OR=2,5$   $IC95\%$  0,63-10,22, não sendo detectada associação estatisticamente significativa entre expressão do Bcl-2 em carcinomas ductais invasores de mama e linfonodos sentinelas livres de infiltração neoplásica no momento do diagnóstico histopatológico desse câncer.

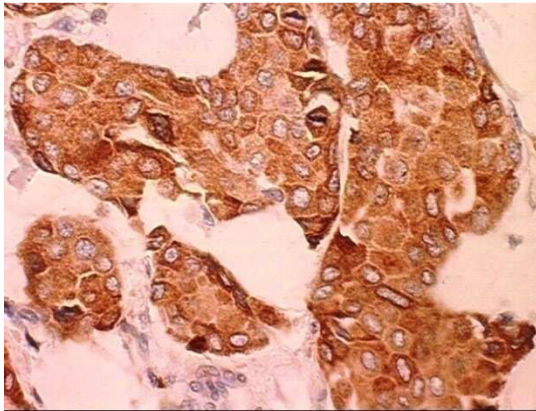


Figura 8: Imunorreação forte (3+) para o Bcl-2, 400x.

Tabela 6: Relação da imunorreatividade do Bcl-2 em carcinomas ductais invasores de mama de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário no HUB nos anos de 2007 e 2008 com o status dos linfonodos sentinelas axilares

Imunorreatividade do Bcl-2	Linfonodo sentinela positivo <sup>3</sup>	Linfonodo sentinela negativo <sup>4</sup>
Positivo <sup>1</sup>	8	12
Negativo <sup>2</sup>	15	9

1-Imunorreação moderada ou forte (2+ ou 3+).

2- Imunorreação fraca (1+) ou ausente.

3-Linfonodo comprometido pela neoplasia.

4-Linfonodo livre de neoplasia.

## 6 DISCUSSÃO

O tamanho do tumor e o status dos linfonodos sentinelas axilares são fatores prognósticos bem estabelecidos para o câncer de mama. Esses dois parâmetros são a base do sistema de estadiamento mais conhecido e utilizado no mundo, o TNM, que foi estabelecido e promulgado pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) e pela Union Internationale Contre le Cancer (UICC). (CARTER, 1989; SINGLETARY, 2002).

No presente trabalho a maioria (52,27%) dos tumores estudados apresentava, no momento do diagnóstico histopatológico, tamanho máximo superior a 2,0 cm ou linfonodos sentinelas axilares comprometidos pela neoplasia. Isso mostra que em nosso meio o diagnóstico de câncer de mama feminina frequentemente é realizado em estágio avançado, quando já se tem inclusive metástases linfonodais, piorando substancialmente o prognóstico dessas mulheres. Tais dados estão de acordo com a literatura, a qual mostra que cerca de 60% dos casos de câncer de mama no Brasil são diagnosticados em estágios avançados, pois não se dispõe de uma estrutura que garanta a mamografia sistemática a todas as mulheres nas faixas etárias de maior risco. Por outro lado, em países desenvolvidos, como EUA, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, a incidência da doença é alta e vem aumentando a cada ano, mas a mortalidade vem diminuindo graças à detecção precoce pela mamografia e ao tratamento adequado dos casos. (PINHO, 2007). Nos EUA, por exemplo, estimam-se 192.370 casos novos de câncer de mama para o ano de 2009. (JEMAL, 2009). Enquanto que no Brasil esse número não deve ultrapassar 49.400 casos. (INCA, 2007).

O tamanho do tumor no momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama está diretamente relacionado ao risco de recidiva, constituindo-se no melhor preditor de recidivas tumorais em pacientes com ausência de comprometimento metastático linfonodal. (CARTER, 1989).

O crescimento e desenvolvimento de tumores sólidos, incluindo o câncer de mama, é totalmente dependente da angiogênese, sem a qual é impossível um tumor expandir-se além de 1,0 a 2,0 mm<sup>3</sup>. Diversos estudos têm descrito a importância da

DMV como fator prognóstico do câncer de mama, de tal forma que quanto maior DMV pior o prognóstico. (UZZAN, 2004). Sabe-se que o VEGF constitui-se em um marcador imuno-histoquímico bastante útil, sendo mais fortemente expresso em tumores cuja proliferação vascular apresenta-se acentuada. (GASPARINI, 2000). Dessa forma a imunorreatividade do VEGF em tumores mamários correlaciona-se com DMV e conseqüentemente com o prognóstico da neoplasia.

Há anos estão sendo desenvolvidas pesquisas, investigando a relação entre o VEGF e o comportamento biológico do câncer de mama. Assim Toi (1994) demonstrou que a sobrevida livre de doença em pacientes acometidos por tal neoplasia é significativamente menor naqueles, cujos tumores expressam fortemente o VEGF. Kinoshita (2001) publicou um estudo mostrando que no câncer de mama tumores que expressam fortemente o VEGF-C apresentam maiores índices de invasão vascular linfática e de recaídas precoces da doença. Já Linderholm (2008) publicou um trabalho revelando que tumores de mama os quais exibem altos níveis de VEGF apresentam pior prognóstico, mais frequentemente se associando a recorrência precoce. Além disso, Ghosh (2008) também mostrou que tumores mamários cujos linfonodos sentinelas não se encontram envolvidos pela neoplasia, mas que apresentam elevados níveis de VEGF exibem prognóstico ruim. Vê-se assim, que diversos artigos disponíveis na literatura relatam que altas taxas de VEGF em carcinomas ductais invasores de mama estão relacionadas a tumores mais agressivos, volumosos e com maiores chances de originar metástases. Para atingirem grandes dimensões os tumores necessitam de uma importante rede vascular, assim tumores maiores do que 2,0cm em geral exibem alta DMV e acentuada imunoexpressão do VEGF. Em nosso estudo no momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama não houve associação entre imunorreatividade tumoral ao VEGF e tamanho tumoral superior a 2,0cm. Observa-se assim que nossos achados são discordantes daqueles da literatura, o que pode ser explicado pela pequena amostra analisada.

Durante décadas as cirurgias propostas para o carcinoma mamário vem sofrendo grandes aperfeiçoamentos, sempre se buscando intervenções de menores portes, com melhores resultados estéticos e de menores custos, mas que mantenham ou melhorem índices como a sobrevida total e a sobrevida livre de doença. A introdução do conceito de linfonodo sentinela e sua aplicação no manejo

de pacientes com câncer de mama foi essencial para um aprimoramento das técnicas cirúrgicas e condutas clínicas usadas em pacientes acometidas por essa neoplasia. O advento da imuno-histoquímica e o emprego de técnicas de biologia molecular permitiram a descoberta de diversos parâmetros (RE, RP, HER-2) empregados para avaliar o prognóstico do câncer de mama, no entanto o status do linfonodo sentinela axilar permanece como o mais importante indicador prognóstico independente em pacientes com neoplasia maligna mamária, sendo utilizado também para definir o tratamento adjuvante quimioterápico ou radioterápico. Pacientes portadores de linfonodos comprometidos pela neoplasia exibem pior prognóstico do que aquelas com linfonodos livres e, independente de qualquer benefício na sobrevivência das pacientes, a remoção dos linfonodos envolvidos pela neoplasia fornece um excelente controle regional da doença. (QUAN, 2009).

A angiogênese desempenha importante papel não só no crescimento, mas também na disseminação do câncer. Assim tumores com uma elevada proliferação vascular tendem a manifestar mais precocemente metástases linfonodais ou para órgão distantes. Dentre um grande número de fatores angiogênicos descritos, o VEGF é um dos mais potentes. Ele desempenha funções-chaves na regulação do crescimento de células endoteliais e na permeabilidade vascular. Assim no câncer de mama numerosos estudos têm investigado a significância prognóstica do VEGF, que vem sendo apontado como indicador de mau prognóstico. (GHOSH, 2008). Tumores com comprometimento de linfonodos sentinelas pela neoplasia também apresentam prognóstico reservado. Nosso estudo investigou a associação entre a expressão tumoral do VEGF e a presença de linfonodos sentinelas comprometidos pela neoplasia no momento do diagnóstico histopatológico de câncer de mama, confirmando uma associação entre essas duas variáveis. Embora o valor de tal associação tenha sido muito próximo de um estatisticamente significativo, ele não o foi, o que pode ser explicado pela pequena amostra estudada, tornando-se necessária a repetição desse estudo com um maior número de casos.

O crescimento tumoral, além de ser dependente da angiogênese, resulta de um balanço entre proliferação e morte celular. Denomina-se apoptose o mecanismo geneticamente controlado de morte celular, que é fundamental para a eliminação de células danificadas. Assim a apoptose desempenha importante papel na carcinogênese e no crescimento tumoral. No câncer de mama o número de células



apoptóticas é maior em tumores de dimensões aumentadas, com elevada atividade mitótica e com pior grau histológico (tumores menos diferenciados), observando-se portanto uma associação direta entre o número de células apoptóticas e o comportamento biológico mais agressivo do câncer de mama. (FARIAS, 2005).

O Bcl-2 é uma proteína antiapoptótica bastante útil em imuno-histoquímica. No entanto o papel prognóstico de membros da família Bcl-2 e do próprio Bcl-2 em neoplasias malignas humanas ainda não está bem definido. Numerosos experimentos têm demonstrado que células com perda da capacidade de submeter-se à apoptose estão relacionadas à progressão do câncer para tipos mais agressivos e resistentes à terapia. Não há nenhuma dúvida de que o Bcl-2 bloqueia a apoptose, no entanto seu papel prognóstico em diversas neoplasias humanas malignas é paradoxal. A expressão acentuada do Bcl-2 é classicamente relacionada a linfomas foliculares, que geralmente são neoplasias de baixo grau e de crescimento lento, mas que apresentam resistência à quimioterapia e podem evoluir para tumores de alto grau, progredindo rapidamente. Por outro lado no câncer de mama a expressão de tal proteína está associada a tumores de baixo grau histológico, com receptores hormonais positivos e ausência de metástases, resultando em melhor sobrevida dos pacientes.(HAMILTON, 2000).Sabe-se ainda que a expressão do Bcl-2 no câncer de mama está associada à supressão da apoptose, resultando em uma baixa taxa de progressão tumoral e bom prognóstico.(GUROVA, 2003). Estudos recentes têm demonstrado que a expressão do Bcl-2 no câncer de mama está associada a tumores de melhor evolução e com positividade para RE e RP.(NADLER, 2008).

No câncer de mama o tamanho tumoral e o status dos linfonodos sentinelas são os principais indicadores prognósticos. (CARTER, 1989; ABREU, 2002; BUDRUKKAR, 2008).Assim tumores com dimensões máximas de até 2,0 cm e com linfonodos sentinelas livres de neoplasia apresentam um bom prognóstico. Diversos estudos têm revelado que uma forte expressão do Bcl-2 no câncer de mama está relacionada a baixo risco de metástases distantes e a um bom prognóstico dessa neoplasia. (HAMILTON, 2000; BLAGOSKLONNY, 2001; GUROVA, 2003).Nosso trabalho mostrou que no momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama, a expressão imuno-histoquímica do Bcl-2 apresentou associação estatisticamente significativa com tumores de tamanho máximo até

2,0cm, que são exatamente aqueles que frequentemente exibem melhor evolução, assim nossos achados estão de acordo com os dados descritos e prevalentes na literatura.

Tumores mamários com linfonodos sentinelas axilares negativos para infiltração neoplásica exibem melhor prognóstico, o que se reflete inclusive no estadiamento TNM, N0 (SINGLETARY, 2002). Além disso diversos trabalhos têm demonstrado que em câncer de mama uma forte expressão imuno-histoquímica do Bcl-2 associa-se a melhor evolução tumoral. (HAMILTON, 2000; BLAGOSKLONNY, 2001; GUROVA, 2003). O nosso estudo revelou uma associação entre imunorreatividade tumoral ao Bcl-2 e linfonodos sentinelas axilares livres de infiltração neoplásica no momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama. No entanto tal associação não foi estatisticamente significativa, o que pode ser explicado pela pequena amostragem investigada. Dessa forma são necessários estudos complementares, ampliando-se a amostra analisada e realizando-se o seguimento de pacientes para melhor avaliar o prognóstico.

## 7 CONCLUSÃO

No momento do diagnóstico histopatológico de carcinomas ductais invasores de mama não se evidencia associação entre expressão do VEGF e tamanho tumoral maior do que 2,0 cm, mas se observa associação entre imunorreatividade ao VEGF e presença de linfonodos sentinelas comprometidos pela neoplasia. Assim o VEGF tem potencial para funcionar como fator de mau prognóstico no câncer de mama.

No momento do diagnóstico de carcinomas ductais invasores de mama observam-se uma importante relação entre expressão imuno-histoquímica do Bcl-2 e tumores menores do que 2,0 cm, assim como também se nota uma associação entre imunorreatividade ao Bcl-2 e linfonodos livres de neoplasia. Tumores de tamanhos menores ou igual a 2,0cm e com linfonodo sentinela livre de neoplasia estão associados a melhor prognóstico. Assim o Bcl-2 pode ser utilizado como um marcador de bom prognóstico tumoral no momento do diagnóstico histopatológico dessa neoplasia.

Em ambos os casos são necessários estudos complementares, ampliando-se a amostra analisada e realizando-se estudos de seguimento das pacientes para melhor avaliar o prognóstico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AASE, K. et al. Angiomotin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis. **Genes & Development**, v. 21, n. 16, p. 2055-2068, Aug. 2007.
2. ABREU, E; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113-131, 2002.
3. ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 270p.
4. BARBARESCHI, M. et al. Novel methods for the determination of the angiogenic activity of human tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 36, n. 2, p. 181-192, 1995.
5. BASTOS, J.; BARROS, H.; LUNET, N. Evolução da Mortalidade por Cancro da Mama em Portugal (1955-2002). **Acta Médica Portuguesa**, v. 20, p. 139-144, 2007.
6. BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-410, Jun. 2003.
7. BLAGOSKLONNY, M.V. Paradox of Bcl-2 (and p53): why may apoptosis-regulating proteins be irrelevant to cell death? **BioEssays**, v. 23, n. 10, p. 947-953, Oct. 2001
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007. 94p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>>. Acesso em: 11 julho 2009.
9. BRITO, C.; PORTELA, M.C.; VASCONCELLOS, M.T.L. Assistência oncológica pelo SUS a mulheres com câncer de mama no Estado do Rio de Janeiro. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 6 , p. 874-881, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v39n6/26980.pdf>>. Acesso em: 10 julho 2009.

10. BUDRUKKAR, A.N. et al. Prognostic factors in node negative premenopausal women treated with breast conserving therapy without adjuvant systemic therapy. **The Breast**, v. 17, n. 3, p. 263-269, Jun. 2008.
11. CALLAGY, G.M. et al. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 8, n. 153, May 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/153>>. Acesso em: 11 julho 2009.
12. CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 653-660, Jun. 2003.
13. CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, vol. 407, p. 249-257, Sept. 2000.
14. CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, v. 6, n. 3, p. 389-395, Mar. 2000.
15. CARTER, C.L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E. Relation of Tumor Size, Lymph Node Status, and Survival in 24,740 Breast Cancer Cases. **Cancer**, v. 63, n. 1, p. 181-187, Jan. 1989.
16. COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS. **Cancer Protocols and Checklists**: Breast - Protocol applies to all invasive carcinomas of the breast. Disponível em: <[http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer\\_protocols/2005/breast\\_05\\_ckw.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2005/breast_05_ckw.pdf)>. Acesso em: 11 julho 2009.
17. CORADINI, D.; DAIDONE, M.G. Biomolecular prognostic factors in breast cancer. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 16, n. 1, p. 49-55, Feb. 2004.
18. FARIAS, R.E.; SOUZA, A.R.; AARESTRUP, F.M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 209-218, 2005.

19. FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 10, p. 795-803, Oct. 2002.
20. FOX, S.B.; GENERALI, D.G.; HARRIS, A.L. Breast tumour angiogenesis. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 6, Dec. 2007.
21. GASPARINI, G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. **The Oncologist**, v. 5, suppl 1, p. 37-44, 2000.
22. GHOSH, S. et al. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. **Human Pathology**, v. 39, n. 12, p. 1835–1843, Dec. 2008.
23. GUROVA, K.V.; GUDKOV, A.V. Paradoxical Role of Apoptosis in Tumor Progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.88, n. 1, p. 128-137, Jan 2003.
24. HAMILTON, A.; PICCART, M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on HER-2,p53 and BCL-2. **Annals of Oncology**, v. 11, n. 6, p. 647-663, 2000.
25. HANKER, L.C. et al. Indications for the sentinel node: multicentric, size of tumor, prior surgery. **Breast Cancer Online**, v. 11, n. 2, Feb. 2008. . Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayIssue?jid=BCO&volumeld=11&issueld=02&iid=1788576>>. Acesso em: 11 julho 2009.
26. HORN, L.; SANDLER, A.B. Angiogenesis in the treatment of non–small cell lung cancer. **Society Proceedings Of The American Thoracic**, v. 6, n. 2, p. 206-217, Apr. 2009.
27. JEMAL, A. et al. Cancer Statistics, 2009. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 4, p. 225-249, Jul./Aug. 2009.
28. KINOSHITA, J. et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 66, n. 2, p. 159-164, Mar. 2001

29. KIRICUTA, I.C. Sentinel Node Concept in Breast Cancer. **Strahlenther Onkol**, v. 176, n. 7, p. 307-314, Jul. 2000.
30. KORSRNEYER, S.J. Bcl-2 Initiates a New Category of Oncogenes: Regulators of Cell Death. **Blood**, v. 80, n. 4, p. 879-886, Aug. 1992.
31. KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.1592 p.
32. KUREBAYASHI, J. et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Family Members in Breast Cancer. **Jpn J Cancer Res**, v. 90, n. 9, p. 977–981, Sept. 1999.
33. LESSENE, G; CZABOTAR, P.E.; COLMAN, P.M. BCL-2 family antagonists for cancer Therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 12, p. 989-1000, Dec. 2008.
34. LIANG, Y.; BREKKEN, R.A.; HYDER, S.M. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. **Endocrine-Related Cancer**, v. 13, n. 3, p. 905-919, Sept. 2006.
35. LINDERHOLM, B.K. et al. Vascular endothelial growth factor is a strong predictor of early distant recurrences in a prospective study of premenopausal women with lymph-node negative breast cancer. **The Breast**, v. 17, n. 5, p. 484-491, Oct. 2008.
36. NADLER, Y. et al. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. **Breast Cancer Research**,v. 10, n. 2, Apr. 2008. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/10/2/R35>>. Acesso em: 11 julho 2009.
37. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>. Acesso em: 11 julho 2009.
38. OTROCK, Z.K.; MAKAREM, J. A.; SHAMSEDDINE, A.I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 38, n. 3, p. 258–268, May/Jun. 2007.

39. PAPATHANASSOGLU, E.D.; MOYNIHAN, J.A.; PhD; ACKERMAN, M.H. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 2, p. 537-549, Feb. 2000.
40. PAYNE, S. J. et al. Predictive markers in breast cancer – the present. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 82-90, Jan. 2008.
41. PINHO, V.F.S.; COUTINHO, E.S.F. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1061-1069, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v23n5/08.pdf>. Acesso em: 10 julho 2009.
42. QIU, Y. et al. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 4, p. 1104-1112, Apr. 2008.
43. QUAN, M.L.; McCREADY, D. The Evolution of Lymph Node Assessment in Breast Cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 99, n. 4, p. 194-198, Mar. 2009.
44. QUTUB, A.A. Multiscale Models of Angiogenesis. **IEEE Eng Med Biol Mag**, v. 28, n. 2, p. 14-31, Mar./Apr. 2009.
45. REEVES, K.W. et al. Vascular endothelial growth factor and breast cancer risk. **Cancer Causes Control**, v. 20, n. 3, p. 375-386, Apr. 2009.
46. REIS-FILHO, J.R.S.; TUTT, A.N.J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 108-118, Jan. 2008.
47. ROSAI, J.; ACKERMAN'S. **Surgical Pathology**. 9ed. London: Mosby, 2004. 2v.
48. SINGLETARY, S.E. et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 17, p. 3628-3636, Sep. 2002.



49. STOUFFER, R.L. et al. Regulation and Action of Angiogenic Factors in the Primate Ovary. **Archives of Medical Research**, v. 32, n. 6, p. 567-575, Nov./Dec. 2001.
50. SUSNOW, N. et al. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 1, p. 42–49, Feb. 2009.
51. TOI, M. et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. **Jpn J Cancer Res**, v. 85, n. 10, p. 1045-1049, Oct. 1994.
52. TURLEY, H. et al. Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal antibody VG1. **The Journal of Pathology**, v. 186, n. 3, p. 313-318, Nov. 1998.
53. UZZAN, B. et al. Microvessel Density as a Prognostic Factor in Women with Breast Cancer A Systematic: Review of the Literature and Meta-Analysis. **Cancer Research**, v. 64, n. 9, p. 2941-2955, May 2004.
54. VAN DER BILT, J.D.W.; BOREL RINKES, I.H.M. Surgery and angiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1654, n. 1, p. 95-104, Mar. 2004.
55. WEIDNER, N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 36, n. 2, p. 169-180, 1995.
56. XIE, X.D. et al. Study on relationship between angiogenesis and micrometastases of peripheral blood in breast cancer. **Cancer Res Clin Oncol**, v. 135, n. 3, p. 413-419, Mar. 2009.
57. ZHANG, X.H. et al. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. **BMC Cancer**, v. 8, n. 4, Jan. 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/4>>. Acesso em: 10 julho 2009.

## ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



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: 129/2008

Título do Projeto: Carcinomas Ductais Invasores de Mama. Associação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e do Oncogene Bcl-2 com os Principais Fatores Prognósticos dessa Neoplasia

Pesquisadora Responsável: Ana Maria Gonçalves Rebêlo

Data de Entrada: 08/09/2008

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 129/2008 com o título: “Carcinomas Ductais Invasores de Mama. Associação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e do Oncogene Bcl-2 com os Principais Fatores Prognósticos dessa Neoplasia”, analisado na 9ª Reunião Ordinária realizada no dia 14 de Outubro de 2008.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um 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, 15 de Outubro de 2008.

Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB