

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:**

**CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Flavio Cabreira Jobim**

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, PATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS  
DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OPERÁVEL: A EXPERIÊNCIA DO  
SERVIÇO DE MASTOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO  
ALEGRE (1999-2004)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas,  
UFRGS, como requisito para obtenção do título de Doutor**

**Orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann**

**Porto Alegre**

**2013**

## CIP - Catalogação na Publicação

Jobim, Flavio Cabreira

Características clínicas, patológicas e imuno-histoquímicas de pacientes com câncer de mama operável: A experiência do Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (1999 - 2004) / Flavio Cabreira Jobim. -- 2013.

199 f.

Orientador: Gilberto Schwartzmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Câncer de mama. 2. Angiogênese. 3. Fatores prognósticos. 4. Imuno-histoquímica. 5. Sobrevida. I. Schwartzmann, Gilberto, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **Dedicatória**

Dedico esta tese as pacientes portadoras de câncer de mama que lutam bravamente contra a doença, e apesar de tudo prestam sua contribuição nas pesquisas, com esperança que a ciência um dia encontrará a cura tão sonhada.

## **Agradecimentos**

Ao meu querido Professor Dr. Nilton Leite Xavier meu sincero e emocionado agradecimento: por seus ensinamentos na Mastologia, desde os tempos da Residência Médica no Hospital Presidente Vargas, por sua amizade fraterna durante todos esses anos, por seu incentivo para que eu retornasse aos bancos desta Universidade em busca do conhecimento e da qualificação, por sua orientação durante o mestrado, e finalmente por ter me conduzido ao Prof. Gilberto.

Meu reconhecimento ao Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann, que apesar da sua vida sempre cheia de atividades e compromissos me acolheu como mestrando e depois como doutorando. Agradeço pelo estímulo na realização desta pesquisa, pelos ensinamentos e orientações, e pela ajuda fundamental durante os trabalhos e na conclusão desta tese.

Ao Dr. Diego de Mendonça Uchoa, pelo desprendimento e indispensável colaboração no desenvolvimento da técnica laboratorial e interpretação das lâminas de imuno-histoquímica, sem a qual não seria possível realizar esta pesquisa.

Ao Dr. Dennis Baroni Cruz pela colaboração na interpretação das lâminas de imuno-histoquímica.

À colega Natalia Chemello, pelo incansável trabalho na pesquisa dos casos e na seleção dos blocos de parafina e lâminas de HE.

À Sra. Neiva Copetti, técnica do Laboratório de Pesquisa em Patologia do HCPA, pelo valoroso trabalho no aperfeiçoamento da técnica de imuno-histoquímica e confecção das lâminas.

À Dr.<sup>a</sup> Anaelena Bragança de Moraes, Prof.<sup>a</sup> do Departamento de Estatística da UFSM, pelos ensinamentos de estatística e análise dos dados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS , meu profundo reconhecimento pela acolhida como aluno, e pela oportunidade de formação e convivência com um seleto grupo dedicado a ciência.

Aos Professores do PPGCM/UFRGS, pelos relevantes ensinamentos, sem os quais este curso seria apenas o cumprimento de tarefas e não uma formação prática para o resto da vida.

Aos Serviços de Mastologia e Patologia do HCPA/UFRGS pela acolhida na realização desta pesquisa.

À minha secretária Luciana, que administra o consultório há vários anos, e principalmente porque neste período soube resolver e conciliar todos os conflitos na minha atribulada agenda.

Aos meus pais, Adão Gonçalves Jobim (*in memoriam*) e Maria Erotildes Cabreira Jobim, minha admiração e reconhecimento pelos ensinamentos e pelos estímulos para que sempre seguisse em frente na busca do conhecimento e concretização de meus sonhos.

E finalmente a minha família: Neicy Mara Ritterbusch de Oliveira Jobim, esposa, médica dermatologista, minhas filhas Fabiana, advogada, e Giovana Alice, que segue nossos passos e cursa o ensino médio, se preparando para um futuro brilhante. A vocês que me apoiaram nesta caminhada, que suportaram minha ausência neste período, no trabalho, em aulas ou mesmo em casa absorvido por minhas tarefas de pesquisa, dedico todo o esforço que realizei na conclusão desta tese. Sem a compreensão e o carinho de vocês não seria possível concluir minhas tarefas e atingir meus objetivos. Amo vocês!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

## Resumo

**Introdução:** A Organização Mundial da Saúde estimou para o ano de 2008 aproximadamente 1.38 milhões de casos novos de câncer de mama no mundo e 458 mil mortes. A maioria dos casos (56%) e das mortes (64%), ocorrendo em países economicamente desenvolvidos. Apesar dos avanços e do diagnóstico precoce, um número significativo de mulheres com tumores da mama operáveis apresentando evolução desfavorável vêm à sucumbir devido ao surgimento de doença metastática. Uma melhor compreensão da heterogeneidade do tumor e das características microambientais subjacentes, bem como dos mecanismos e as consequências das suas interações é essencial para melhorar o direcionamento das terapias existentes e desenvolver novos agentes terapêuticos para o câncer. **Objetivos:** Descrever as características clínicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas de um grupo de pacientes com câncer de mama operável, e estudar o impacto destas características no estadiamento da doença, sobrevivência livre de recorrência e sobrevivência global. Além disto, analisar as potenciais correlações existentes entre estas características. **Métodos:** Estudo de coorte retrospectiva de base hospitalar envolvendo 86 mulheres com câncer primário de mama, submetidas a tratamento entre julho de 1999 e dezembro de 2004, no Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Dados clinicopatológicos e imuno-histoquímicos (RE, RP, HER2, Ki67 e p53) foram coletados dos registros hospitalares. Expressão do VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 foram analisadas através de imuno-histoquímica. Variáveis contínuas foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Spearman, ou pelo teste não paramétrico U de Mann-Whitney e H de Kruskal-Wallis, quando comparadas com variáveis categóricas. Variáveis categóricas foram analisadas pelo teste  $\chi^2$  de Pearson. Estimativas da probabilidade de sobrevivência foram obtidas pelo estimador não paramétrico de Kaplan-Meier e pelo semiparamétrico modelo de regressão de Cox. Comparação entre as curvas de sobrevivência foi realizada pelo teste estatístico de log-rank. O IC foi calculado em 95% e valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. **Resultados:** A sobrevivência livre de recorrência em 5 e 10 anos foi de 82,2% e 68%, e a global foi de 90,2% e 82,9%, respectivamente. Número de linfonodos positivos ( $p = 0,00$ ;  $p = 0,03$ ),

diâmetro tumoral ( $p= 0,01$ ;  $p= 0,01$ ) e estágio ( $p= 0,00$ ;  $p= 0,02$ ) são fatores de risco isolado para recorrência e óbito, respectivamente. Superexpressão de HER2 é um fator de risco isolado para recorrência ( $p= 0,04$ ). Existe uma correlação positiva significativa entre: VEGF e MMP-9 ( $r_s: 0,246$ ;  $p= 0,023$ ); TIMP-2 e MMP-2 ( $r_s: 0,358$ ;  $p= 0,001$ ). Também foram encontradas associações significativas entre as variáveis: a) VEGF e receptor de progesterona positivo ( $p= 0,045$ ); b) TIMP-2 e idade  $\geq 50$  anos ( $p= 0,002$ ), e diâmetro  $\leq 2,0$  cm ( $p= 0,016$ ); c) TIMP-1 e menarca  $\leq 12$  anos ( $p= 0,038$ ); d) Maior diâmetro e alto grau histológico ( $\chi^2: 19,3$ ;  $p= 0,004$ ), invasão vascular ( $\chi^2: 12,6$ ;  $p= 0,006$ ), status do linfonodo axilar ( $\chi^2: 8,6$ ;  $p= 0,035$ ), número de linfonodos metastáticos ( $\chi^2: 7,2$ ;  $p= 0,028$ ), e recidiva a distancia ( $\chi^2: 4,0$ ;  $p= 0,046$ ); e) Invasão vascular e status do linfonodo axilar, e número de linfonodos metastáticos, ambos com  $\chi^2: 24,7$ ;  $p= 0,000$ . **Conclusões:** O número de linfonodos positivos, diâmetro tumoral, e estágio foram identificados como fatores de risco isolado para a ocorrência de recidiva e óbito. A superexpressão de HER2 é fator de risco isolado para a ocorrência de recidiva da doença. Novas pesquisas devem ser realizadas, com padronização de procedimento e um maior número de casos para melhor caracterização da doença.

**Palavras-Chave:** câncer de mama, angiogênese, metaloproteinase da matriz, inibidor tecidual da metaloproteinases, fator de crescimento endotelial vascular, imuno-histoquímica, sobrevida.



## Abstract

**Background:** The World Health Organization estimated approximately 1.38 million new breast cancer cases and 458,000 deaths worldwide for 2008. Most of these (56% of new cases and 64% of deaths) occur in economically developed countries. In Brazil, approximately 52,000 new cases are predicted for 2013. Better understand the heterogeneity of the tumor and microenvironmental characteristics around you, as well as the mechanisms and consequences of their interactions is essential to improve the targeting of existing therapies and develop new therapeutic agents for cancer. **Objectives:** The aim of this study was to describe the clinical, anatomopathological and immunohistochemical characteristics of a group of patients with operable breast cancer, and investigate the impact of these characteristics on disease staging, disease-free survival and overall survival. In addition, the potential correlations between these characteristics were analyzed. **Methods:** This is a hospital-based retrospective cohort study of 86 women with primary breast cancer, subjected to surgical and adjuvant treatment between July 1999 and December 2004. Clinicopathological and immunohistochemical (ER, PR, HER2, Ki67 e p53) data were collected from hospital records. The expression of VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 was analyzed using the immunohistochemical technique. Continuous variables were assessed with Spearman's rank correlation coefficient, or the non-parametric Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis H tests. Pearson's  $\chi^2$  test was employed to assess categorical variables. The possibility of survival was estimated using the non-parametric Kaplan-Meier estimator and the semiparametric Cox regression model. Survival curves were compared using the statistical log-rank test. CI was calculated at 95% and p values <0.05 were considered statistically significant. **Results:** Disease-free survival at 5 and 10 years was 82.2% and 68%, and overall survival 90.2% and 82.9%, respectively. Number of positive lymph nodes (p= 0.00; p= 0.03), tumor diameter (p= 0.01; p= 0.01) and stage (p= 0.00; p= 0.02) were isolated risk factors for relapse and death, respectively. HER2 overexpression was an isolated risk factor for relapse (p= 0.04). There was a significant positive correlation between: VEGF and MMP-9 ( $r_s$ : 0.246; p= 0.023) and TIMP-2 and MMP-2 ( $r_s$ : 0.358; p= 0.001). Significant associations were also recorded between the following variables: a) VEGF and

progesterone receptor-positive status ( $p= 0.045$ ); TIMP-2 and age  $\geq 50$  years ( $p= 0.002$ ) and diameter  $\leq 2.0$  cm ( $p= 0.016$ ); c) TIMP-1 and menarche  $\leq 12$  years ( $p= 0.038$ ); d) greater diameter and high histologic grade ( $\chi^2: 19.3$ ;  $p= 0.004$ ), vascular invasion ( $\chi^2: 12.6$ ;  $p= 0.006$ ), axillary lymph node status ( $\chi^2: 8.6$ ;  $p= 0.035$ ), number of metastatic lymph nodes ( $\chi^2: 7.2$ ;  $p= 0.028$ ) and distant relapse ( $\chi^2: 4.0$ ;  $p= 0.046$ ); e) vascular invasion and axillary lymph node status and number of metastatic lymph nodes, both with  $\chi^2: 24.7$  and  $p= 0.000$ .

**Conclusion:** Number of positive lymph nodes, tumor diameter, and stage were identified as isolated risk factors for relapse and death. HER2 overexpression is an isolated risk factor for the occurrence of relapse. Further studies are needed, with standardization of the procedure and a larger number of cases, for better characterization of the disease.

**Keywords:** breast cancer, angiogenesis, metalloproteases, tissue inhibitor of metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, immunohistochemistry, survival.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Características clinicopatológicas das 86 pacientes com câncer de mama.....	156
<b>Tabela 2.</b> Distribuição das pacientes com câncer de mama segundo as variáveis e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado para recidiva.....	157
<b>Tabela 3.</b> Distribuição das pacientes com câncer de mama segundo as variáveis e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado para óbito.....	159
<b>Tabela 4.</b> Características imuno-histoquímicas dos tumores estudados em 86 pacientes.....	161
<b>Tabela 5.</b> Resumo das correlações estatisticamente significativas entre os níveis de VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP2, identificados pelo método da correlação de Spearman.....	161
<b>Tabela 6.</b> Associação dos fatores angiogênicos VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 com os demais parâmetros clinicopatológicos.....	162
<b>Tabela 7.</b> Associação dos fatores angiogênicos VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 com os marcadores biológicos e os subtipos moleculares de câncer de mama.....	164
<b>Tabela 8.</b> Distribuição das pacientes segundo o tratamento recebido.....	165
<b>Tabela 9.</b> Distribuição da recorrência da doença em 86 pacientes segundo o local das metástases.....	165
<b>Tabela 10.</b> Distribuição das 86 pacientes segundo o estado de saúde atual.....	165
<b>Tabela 11.</b> Modelo de riscos proporcionais de Cox múltiplo, para tempo livre de recorrência da doença.....	166
<b>Tabela 12.</b> Análise das variáveis contínuas (MMPs, TIMPs e VEGF) e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado, para tempo livre de recorrência da doença.....	166
<b>Tabela 13.</b> Análise das variáveis contínuas (MMPs, TIMPs, e VEGF), e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado para o risco de óbito.....	167
<b>Tabela 14.</b> Modelo de riscos proporcionais de Cox múltiplo, para o risco de	

óbito.....	167
<b>Tabela 15.</b> Expressão das MMPs 2 e 9, seus inibidores TIMPs 1 e 2, e VEGF e tempo de sobrevida livre de recorrência.....	168
<b>Tabela 16.</b> Expressão das MMPs 2 e 9, TIMPs 1 e 2, e VEGF comparados com tempo de sobrevida global.....	169

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Expressão imuno-histoquímica das metaloproteinases MMP-2, MMP-9, e inibidores teciduais das metaloproteinases TIMP-1 e TIMP2, nas células neoplásicas de tumor de mama.....	170
<b>Figura 2-</b> Associação entre o diâmetro patológico do tumor (pT) e o grau histológico de Richardson Scarff Bloom.....	171
<b>Figura 3.</b> Associação entre o diâmetro patológico do tumor (pT) do tumor e a presença de invasão vascular.....	172
<b>Figura 4.</b> Associação entre a classificação pTNM e a presença de invasão vascular.....	173
<b>Figura 5.</b> Associação entre o diâmetro patológico do tumor (pT) e o status do linfonodo axilar.....	174
<b>Figura 6.</b> Associação entre o diâmetro patológico do tumor (pT) e o número de linfonodos axilares comprometidos (pN).....	175
<b>Figura 7.</b> Associação entre a presença de invasão vascular no tumor e o status do linfonodo axilar.....	176
<b>Figura 8.</b> Associação entre a presença de invasão vascular no tumor e o número de linfonodos axilares positivos.....	177
<b>Figura 9-</b> Correlação entre a imunorreatividade do VEGF e da MMP-9.....	178
<b>Figura 10-</b> Correlação entre a imunorreatividade da MMP-2 e do TIMP-2.....	179
<b>Figura 11-</b> Comparação entre expressão de TIMP-2 e idade das pacientes.....	180
<b>Figura 12.</b> Comparação entre expressão de TIMP-2 e o diâmetro patológico do tumor.....	181
<b>Figura 13.</b> Comparação entre expressão de TIMP-1 e a idade da menarca.....	182
<b>Figura 14.</b> Comparação entre expressão de VEGF e o receptor de progesterona.....	183
<b>Figura 15.</b> Associação entre o diâmetro do tumor e o local de recidiva.....	184
<b>Figura 16.</b> Associação entre a recorrência e o estado de saúde atual das pacientes.....	185
<b>Figura 17a.</b> Curva de Kaplan-Meier para recidiva da doença, de acordo com o diâmetro tumoral.....	186
<b>Figura 17b.</b> Curva de Kaplan-Meier para recidiva da doença, de acordo com o número de linfonodos metastáticos.....	187

<b>Figura 17c.</b> Curva de Kaplan-Meier para recidiva da doença, de acordo com o estágio patológico.....	188
<b>Figura 17d.</b> Curva de Kaplan-Meier para recidiva da doença, de acordo com a expressão do HER2.....	189
<b>Figura 17e.</b> Curva de Kaplan-Meier para recidiva da doença, de acordo com o tratamento local.....	190
<b>Figura 18a.</b> Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global, de acordo com o diâmetro patológico do tumor.....	191
<b>Figura 18b.</b> Curva de Kaplan-Meier para óbito, de acordo com o estágio patológico da doença.....	192
<b>Figura 18c.</b> Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global, de acordo com o número de linfonodos metastáticos.....	193
<b>Figura 19a.</b> Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de recorrência.....	194
<b>Figura 19b.</b> Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência global.....	195

WHO	- World Health Organization
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
DATASUS	- Banco de dados do Sistema Único de Saúde
UICC	- Union for International Cancer Control
IARC	- International Agency for Research on Cancer
SEER	- Surveillance Epidemiology and End Results
MS	- Ministério da Saúde
EUA	- Estados Unidos da América
UFRGS	- Universidade Federal do Rio grande do Sul
HCPA	- Hospital de Clínicas de Porto Alegre
PPGCM	- Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
GPPG	- Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
FIPE	- Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
DOI	- Digital object identifier
CMF	- Ciclofosfamida, Metrotexato, Fluoracila
VEGF	- Vascular Endothelial Growth Factor; Fator de Crescimento Endotelial Vascular
MMP	- Matrix Metalloproteinase; Metaloproteinase da Matriz
TIMP	- Tissue Inhibitor of Metalloproteinase; Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
LNS	- Linfonodo Sentinela
HE	- Coloração tipo Hematoxilina e Eosina
IHQ	- Coloração tipo Imuno-histoquímica
MB	- Membrana Basal

MEC	- Matriz Extracelular
EMT	- Epithelial-Mesenchymal Transition; Transição Epitélio-Mesenquimal
TAM	- Tumor Associated Macrophage; Macrófago Associado ao Tumor
CAF	- Cancer associated fibroblasts; Fibroblasto Ativado associado com carcinoma
CTC	- Cell tumor current; Célula Tumoral Circulante
rbc	- Red blood cells, eritrócitos
bFGF	- Basic Fibroblast Growth Factor; Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
PIGF	- Placental Growth Factor; Fator de crescimento Placentário
SDF-1	- Stromal Cell-derived Factor-1; Fator-1 de células derivadas do estroma
BMC	- Células angiogênicas derivadas da medula ossea
IL-8	- Interleukin-8; Interleucina-8
TNF $\alpha$	- Tumor Necrosis Factor Alpha; Fator Alfa de Necrose Tumoral
K-ras	- Proto-oncogene K-ras
HER2	- Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; Receptor-2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
p53	- Gene supressor da carcinogênese mamária
Ca	- Íon cálcio
pH	- Potencial Hidrogenioiônico
VEGFR	- Vascular Endothelial Growth Factor Receptor; Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Ki-67	- Anticorpo monoclonal que identifica antígenos em núcleos das células em fase proliferativa



HIF-1 $\alpha$	- Hypoxia Inducible Factor 1, alpha subunit; Fator de Indução da Hipóxia, subunidade alfa
PDGF	- Platelet Derived Growth Factor; Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
EGF	- Epidermal Growth Factor; Fator de Crescimento Epidérmico
TGF $\beta$	- Transforming Growth Factor beta; Fator beta de Transformação do Crescimento
MT1-MMP	- Membrane type-1 Matrix Metalloproteinase ; Metaloproteinase da Matriz de Membrana Tipo 1; Metaloproteinase Transmembrana
kDa	- kilodaltons (medida de peso molecular)
GL-A	- Gelatinase A
GL-B	- Gelatinase B
TNM	- Classificação de Tumores Malignos: Tumor, Nódulo, Metástase
pT1	- Diâmetro patológico do tumor $\leq 2$ cm
pT2	- Diâmetro patológico do tumor $> 2$ cm e $\leq 5$ cm
pN0	- Ausência de metástases em linfonodos axilares
pN1	- Número de linfonodos axilares metastáticos de 1 a 3
pN2	- Número de linfonodos axilares metastáticos de 4 a 9
M1	- Metástases à distância
G	- Grau
E	- Estadio
ELISA	- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
mRNA	- Messenger Ribonucleic Acid - Acido Ribonucleico Mensageiro
RT-PCR	- Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction
RH	- Receptores Hormonais
RE	- Receptor de estrogênio

RP	- Receptor de progesterona
SPSS	- Statistical Package for the Social Sciences – Software Estatístico
™	- Marca comercial
Kg	- Quilograma
cm	- Centímetro
mm	- Milímetro
$\Sigma$	- Somatório; Soma
[ ]	- Colchetes
( )	- Parênteses
=	- Igual a; Igual
+	- Mais; Positivo
-	- Menos; Negativo; Ausente; Hífen
$\pm$	- Mais ou menos
x	Multiplicado por; Vezes
%	- Por cento; Percentual
I	- Intensidade da coloração
PC	- Percentual de Coloração
$\chi^2$	- Chi-squared; Qui-quadrado
r	- Correlação de Pearson
$r_s$	- Correlação de Spearman
>	- Maior que
<	- Menor que
$\geq$	- Maior ou igual
$\leq$	- Menor ou igual
$\alpha$	- Alfa

- $\beta$  - Beta
- $\gamma$  - Gama
- $\emptyset$  - Diâmetro tumoral

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	21
<b>2. Revisão da literatura</b> .....	24
2.1 Epidemiologia, Incidência e Mortalidade.....	24
2.2 Iniciação e Desenvolvimento do Câncer de Mama.....	35
2.3 Fatores Prognósticos em Câncer de Mama.....	40
2.3.1 Biomarcadores.....	42
2.3.1.1 Receptores Hormonais.....	42
2.3.1.2 HER2.....	44
2.3.1.3 Ki-67.....	46
2.3.1.4 p53.....	47
2.4 Classificação Molecular do câncer de mama.....	49
2.5 Angiogênese Tumoral e Metástases.....	55
2.6 Fator de Crescimento Endotelial Vascular.....	58
2.6.1 Expressão do Fator de Crescimento Endotelial no Câncer de mama.....	60
2.7 Metaloproteinasas da Matriz e Inibidores Teciduais de Metaloproteinasas....	63
2.7.1 Expressão das Metaloproteinasas da Matriz e dos Inibidores Teciduais de Metaloproteinasas no Câncer de Mama.....	66
<b>3. Justificativa</b> .....	70
<b>4. Objetivos</b> .....	71
4.1 Objetivo principal.....	71
4.2 Objetivos secundários.....	71
<b>5. Referências bibliográficas da revisão</b> .....	72
<b>6. ARTIGO EM INGLÊS</b> .....	87
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	128
<b>8. APÊNDICES</b> .....	130
8.1 Artigo publicado em ingles.....	130
8.2 Artigo publicado em português.....	139
8.3 Apresentação oral em Congresso Mundial.....	153
8.4 Apresentação oral em Congresso Brasileiro.....	154
8.5 Apresentação oral em Congresso Brasileiro.....	155
8.6 Tabelas.....	156
8.7 Figuras.....	170
8.8 Protocolos de coleta de dados.....	196
8.9 Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa/HCPA.....	199

## 1 Introdução

Nos últimos anos o câncer ganhou uma grande dimensão, tornando-se um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou para o ano de 2008, aproximadamente 12.7 milhões de casos novos de câncer, e 7.6 milhões de mortes, no mundo. A maioria dos casos (56%) e das mortes (64%) ocorre em países economicamente desenvolvidos. Entretanto, as projeções da OMS para as próximas décadas indicam que o câncer será a principal causa de morte, tanto nos países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Além disto, dois terços dos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (1).

O câncer de mama ocupa a segunda posição geral, correspondendo a 10,9% (1.4 milhões) dos casos novos. Nas mulheres, é a principal causa de morte no mundo, correspondendo a 23% de todos os cânceres incidentes, e 14% das mortes por câncer. Antes considerado uma doença de países desenvolvidos, o câncer passou a preocupar também os países em desenvolvimento, com poucos e médios recursos (1, 2).

As taxas de incidência e mortalidade, que cresciam há quase um século, mostraram algum declínio nas últimas décadas, principalmente em países mais desenvolvidos (3, 4). Nos EUA, Coleman et al. (5) analisaram dados de 1990 a 2007, concluindo que houve um declínio na taxa de mortalidade anual por câncer de mama em 2%. Entretanto as taxas de incidência e mortalidade ainda têm aumentado entre as mulheres em muitos países da Europa, Ásia, América Latina e alguns países Africanos (1, 2, 6).

Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) (7), para o ano de 2012, confirmam a relevância do problema do câncer no Brasil. Para o sexo feminino são esperados 260.640 casos novos de cânceres, sendo que destes, 21% (52.680) terão a mama como sítio primário, representando a neoplasia maligna de maior incidência entre as mulheres, sendo responsável por 15% do total de mortes por câncer. Segundo dados do INCA e do Ministério da Saúde/DATASUS (7, 8), a taxa de mortalidade padronizada é estimada em 12,6/100 mil mulheres, e no ano de 2010 foi responsável por 12.705 óbitos. Estima-se que a

sobrevivência média geral cumulativa após cinco anos, para mulheres com câncer de mama, seja de 85% nos países desenvolvidos e 56% nos países em desenvolvimento (7-9).

Avanços tecnológicos têm sido direcionados para o diagnóstico precoce e identificação de marcadores tumorais que possam prever o prognóstico das neoplasias malignas mamárias, bem como auxiliar no sentido de proporcionar tratamento mais específico e uma melhor sobrevida às pacientes acometidas pela doença. Fatores como idade, diâmetro tumoral, tipo histológico, grau histológico, comprometimento de linfonodos axilares, receptores hormonais (RE e RP), Ki-67 e a expressão da proteína HER2 são usualmente usados para orientar a terapia adjuvante mais apropriada para mulheres com doença loco-regional (10-12).

Nos últimos anos pesquisas moleculares foram direcionadas para identificar pacientes de risco para recidiva. Elas trouxeram avanços no conhecimento da fisiopatologia do câncer de mama, bem como no desenvolvimento de novas terapias alvo, capazes de atacar eventos responsáveis pelo crescimento celular, sobrevida celular, angiogênese, migração, invasão e metástase. Novos agentes com alvos moleculares específicos, como o trastuzumab e lapatinib, dirigidos contra o *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) ou o bevacizumab, dirigido contra o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) foram incorporados à terapêutica (13-19).

Apesar destes avanços e do diagnóstico precoce, um número significativo de mulheres com tumores da mama operáveis, apresentando evolução desfavorável vêm a sucumbir devido ao surgimento de doença metastática. Uma melhor compreensão da heterogeneidade do tumor e das características microambientais subjacentes, bem como dos mecanismos e as consequências das suas interações é essencial para melhorar o direcionamento das terapias existentes e desenvolver novos agentes terapêuticos para o câncer (20).

Até o presente, as características do tumor primário (diâmetro, grau de diferenciação e presença de invasão vascular ou nervosa), o comprometimento dos linfonodos axilares homolaterais pelo tumor, expressão de receptores de estrógeno e de progesterona e a presença de amplificação de HER2 têm sido os principais parâmetros utilizados para aferir o

prognóstico do câncer de mama operável e orientar a utilização de terapias adjuvantes (10-12).

Além disto, novos marcadores biológicos que possam ajudar na avaliação do prognóstico e do potencial de disseminação do câncer de mama têm sido estudados. Estudos recentes têm sugerido que a avaliação da atividade proliferativa do tumor através da expressão da proteína ki-67 e as dosagens de VEGF, metaloproteinases da matriz (MMPs), especialmente a MMP-2 e 9, e os inibidores teciduais específicos das metaloproteinases da matriz (TIMPs), especialmente o TIMP-1 e 2, podem se correlacionar com uma pior sobrevivência no câncer de mama (21-31).

A utilização dos parâmetros clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos acima mencionados têm por objetivo oferecer ao médico informações que possam estimar de forma mais precisa a probabilidade de metástases ocultas nestes pacientes. Desta maneira, pacientes com mínima probabilidade de metástases podem ser poupados de tratamentos adjuvantes desnecessários, enquanto aqueles com maior risco de recidiva podem receber tratamento sistêmico complementar ao tratamento loco-regional (32-34).

Nesta tese, o autor descreve a casuística dos pacientes com câncer de mama operável (EI, IIa, IIb e IIIa) tratados no Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante os anos de 1999-2004. Foram analisadas as características clínicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas consideradas relevantes segundo dados da literatura, no sentido de estimar o risco de recidiva da doença e a sobrevivência nesta população de pacientes.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 Epidemiologia, Incidência e Mortalidade

Nos últimos anos, o câncer ganhou uma grande dimensão, tornando-se um evidente problema de saúde pública mundial. A OMS estimou para o mundo, no ano de 2008, 12.7 milhões de casos novos de câncer e 7.6 milhões de mortes, sendo que 56% dos novos casos e 64% das mortes ocorrerão em regiões mais desenvolvidas. Também estimou para o ano de 2030, aproximadamente 27 milhões de casos incidentes de câncer, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com a doença (1, 2, 9).

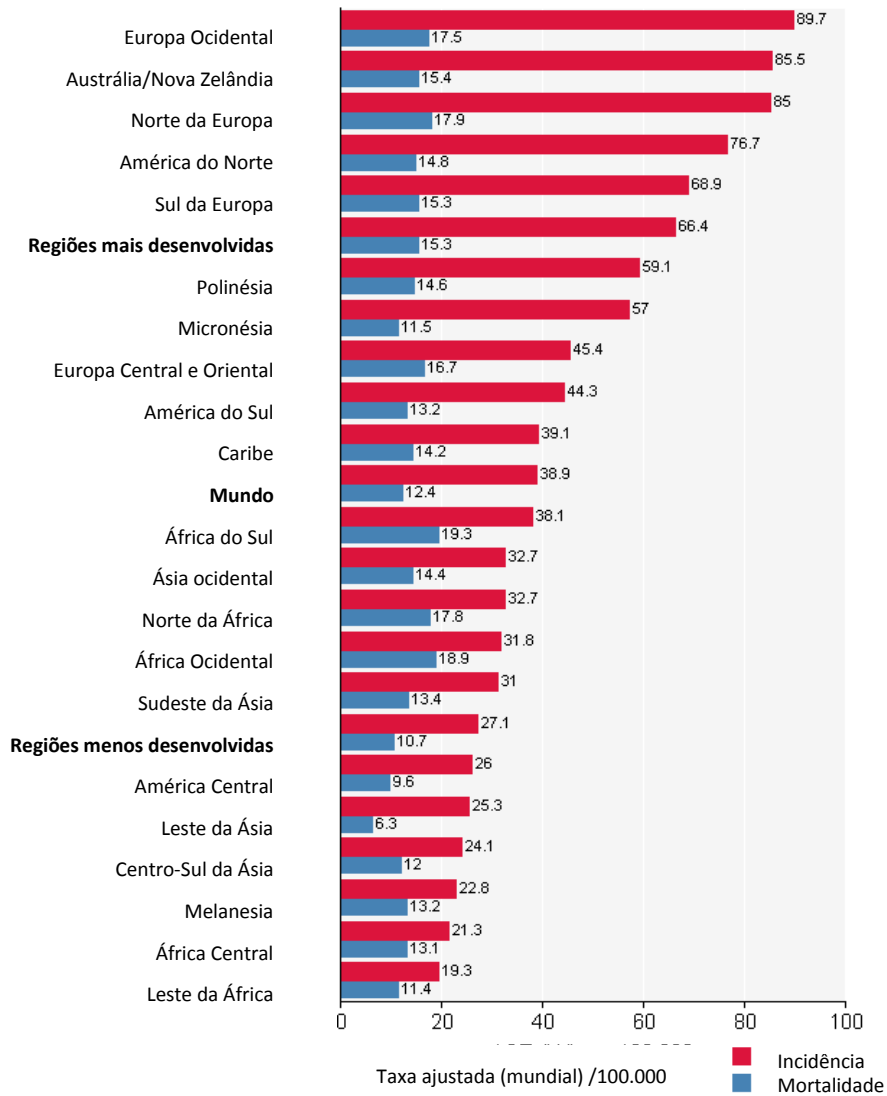
Progressos recentes na queda das taxas de mortalidade em alguns países de alta renda tem obscurecido o fato de que para a maioria das mulheres, em todo o mundo, que são recém-diagnosticadas, o câncer de mama é uma doença negligenciada no contexto de outros problemas de saúde numericamente mais frequentes. Além disto, este progresso no diagnóstico, e no desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer de mama, muitas vezes não pode ser suportado por países de baixa e média renda. As autoridades de saúde pública também não tratam a doença com a atenção necessária, visto que dados tão importantes para o planejamento das ações de controle da doença são negligenciados. Participação em pesquisas de grupos, mesmo envolvendo outros países também não são estimuladas nos países de baixa e média renda. Diante deste cenário, Ginsburg & Love (35), chamam o câncer de mama de “doença orfã”.

A mama é o sítio mais frequentemente afetado pelas neoplasias malignas que acometem as mulheres. A idade é considerada fator de risco importante para o câncer de mama. Sua incidência é relativamente baixa antes dos 35 anos, mas cresce rápida e progressivamente acima desta idade. Dados da literatura apontam que cerca de 80% dos casos ocorrem em



mulheres com idade superior a 50 anos, 48% em mulheres com mais de 65 anos e 30 % em mulheres com mais de 70 anos. Enquanto a maioria dos carcinomas de mama ocorre em mulheres com 50 anos ou mais, aproximadamente 3 a 5% dos tumores surgem em mulheres com menos de 35 anos (36, 37). A probabilidade de ocorrer um carcinoma invasor de mama em 10 anos é inferior a 1,5% aos 40 anos, 3% aos 50 anos e superior a 4% aos 70 anos. As estatísticas indicam o aumento de sua incidência em 30 a 40% entre os anos 70 e 90 na maioria dos países, principalmente entre as mulheres com mais de 50 anos (38-42).

O câncer de mama, que antes era considerado uma doença de países desenvolvidos, passou a preocupar também os países em desenvolvimento com poucos e médios recursos. Na figura 1 podemos observar dados de incidência e mortalidade no mundo, e em diferentes regiões, segundo o desenvolvimento sócio econômico. A OMS estimou para o ano de 2008 aproximadamente 1.4 milhões de novos casos de câncer de mama no mundo, representando 23% de todos os cânceres incidentes nas mulheres, ocupando o segundo lugar geral, com 10,9% dos casos. Dados da OMS, em 2010, mostram que esta neoplasia ocupa o primeiro lugar na taxa de mortalidade por câncer entre as mulheres (1, 9).



**Figura 1.** Taxa de Incidência e Mortalidade de câncer de mama, ajustada para idade, por 100.000 mulheres, no mundo, em regiões mais desenvolvidas e menos desenvolvidas.

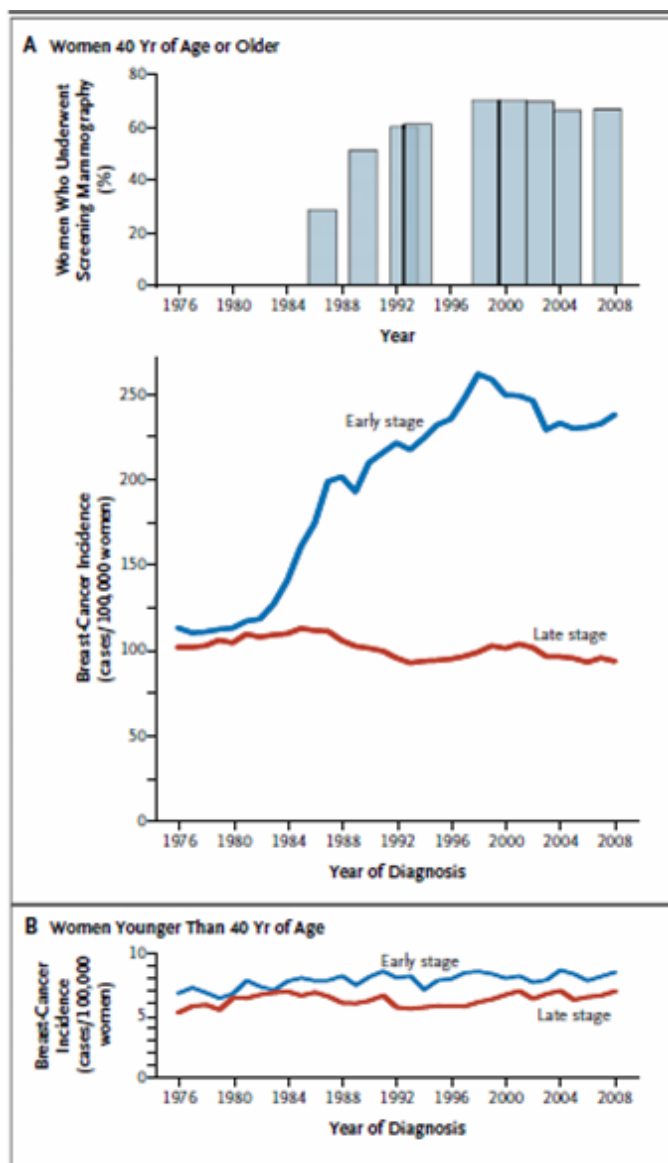
Fonte: GLOBOCAN 2008(IARC) (9).

Nos EUA estimou-se, para o ano de 2012, a ocorrência de 226.870 casos novos de câncer invasor de mama em mulheres. No mesmo período foi estimada uma mortalidade de 39.510 mulheres, que representa 14% das mortes por câncer entre as mulheres, ficando atrás apenas dos tumores de pulmão com 72.590 casos (43).

Um estudo americano publicado recentemente por Bleyer & Welch (44), analisou a incidência de câncer de mama em estágios iniciais (in situ e doença localizada) e estágios

tardios (doença regional e metástase à distância), no período de 1976 a 2008, em mulheres de 40 anos ou mais. Este estudo revela que a introdução do screening mamográfico nos EUA está associada com a duplicação do número de casos de câncer de mama em estágio inicial, detectados a cada ano, de 112 para 234 casos por 100.000 mulheres. Entretanto, não houve uma queda acentuada na taxa de incidência de casos avançados que caiu apenas 8%, passando de 102 para 94 casos por 100.000 mulheres. Este desequilíbrio pode indicar uma quantidade considerável de sobrediagnóstico, que no ano de 2008 representa mais de 70.000 mulheres diagnosticadas com câncer de mama, sem apresentar nenhum sintoma clínico. Este estudo ainda revela que, no mesmo período, a taxa de mortalidade caiu 28% entre as mulheres com 40 anos ou mais, passando de 71 para 51 mortes por 100.000 mulheres. Esta queda provavelmente é decorrente de uma combinação dos efeitos do rastreamento mamográfico e dos avanços no tratamento da doença.

Pode-se observar na figura 2, painel A, o substancial aumento do uso do screening mamográfico a partir do final da década de 1980 e início da década de 1990, entre as mulheres com 40 anos ou mais nos EUA. Este painel mostra também o concomitante aumento da incidência de câncer de mama em estágio inicial. Entretanto, fica evidente, apenas um pequeno decréscimo na incidência de doença em estágio mais tardio. O painel B, por sua vez, mostra que aquelas pacientes com menos de 40 anos de idade que não foram submetidas ao screening mamográfico apresentaram apenas uma pequena variação na incidência.



**Figura 2.** Uso da mamografia e incidência de estágios precoces e tardios do câncer de mama entre mulheres de 40 anos ou mais, nos EUA entre 1976 - 2008. O Painel A mostra a incidência com o uso de mamografia de rastreamento. O Painel B mostra a incidência entre as mulheres com menos de 40 anos, que não foram submetidas ao screening mamográfico.

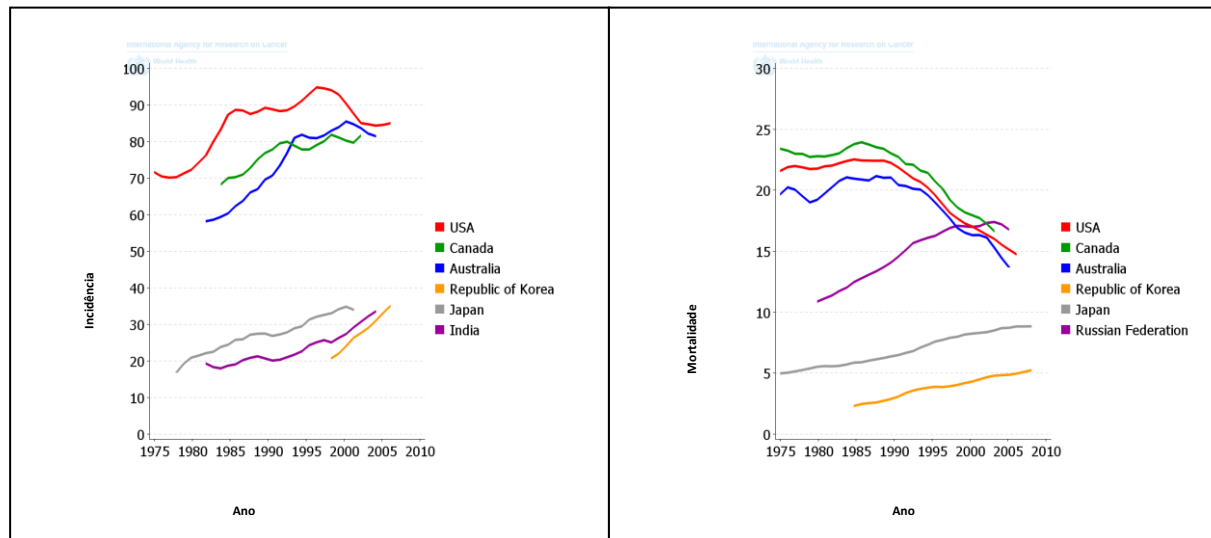
Fonte: Bleyer & Welch (44).

Na Europa, segundo Ferlay et al. (45), eram previstos para o ano de 2008, 3.2 milhões de casos novos de câncer e 1.7 milhões de mortes pela doença. O câncer de mama correspondia a 13,1% (421.000) de todos os casos novos e a 7,5% (129.000) das mortes.

Nos EUA houve um declínio na taxa de mortalidade anual por câncer de mama em 2% no período de 1990 a 2007. Isto refletiu em uma redução global de 25% das mortes por câncer no ano de 2007 comparado com 1990. Esta diminuição foi vista apenas nas mulheres com 50 anos ou mais, o que leva a crer que esteja relacionada à diminuição do uso de terapia de reposição hormonal após a divulgação de estudos no ano de 2002. Outros países também tiveram uma queda na mortalidade nos últimos 25 anos, como a Holanda (25%), Bélgica (20%), Suécia (18%), Noruega (24%), França (1,4%), Itália (1,6%) e Alemanha (1,5%). No Brasil, principalmente nos centros mais desenvolvidos, também nota-se uma tendência da queda na taxa de mortalidade. Estima-se que a sobrevivência média geral cumulativa após 5 anos, para mulheres com câncer de mama, oscile entre 85% (variando de 53% a 94%) nos países desenvolvidos e 56% (variando de 49% a 61%) nos países de baixa renda (1, 2, 5, 9, 46).

Atualmente, o câncer de mama, além de ser considerado um problema de saúde pública no Mundo e no Brasil, é o tumor mais temido pelas mulheres, devido à sua alta incidência, e, sobretudo, pelos seus efeitos psicológicos que incluem o afetamento da percepção da sexualidade e da própria imagem pessoal. O fato de ter sua incidência consideravelmente aumentada principalmente em regiões de melhor posição socioeconômica e naquelas com massivo desenvolvimento econômico nos últimos anos, como Japão, Singapura e algumas áreas urbanas da China, indica que ele pode estar relacionado à melhor qualidade de vida da população, adoção de novos hábitos alimentares, uso de bebida alcoólica, sedentarismo e ao aumento da expectativa de vida (7, 8).

Na figura 3, abaixo, podemos ver a tendência ao longo dos anos na incidência e na mortalidade de câncer de mama em países desenvolvidos, que apresentam altas taxas de incidência, com queda na mortalidade, e outros que estão adquirindo hábitos ocidentais, como a Coreia, Japão e Índia, que apresentam também altas taxas de incidência, mas permanecem com altas taxas de mortalidade (9).



**Figura 3.** Tendências na Incidência e Mortalidade por câncer de mama em países selecionados.

Fonte: GLOBOCAN 2008(IARC) (9).

Dados divulgados pelo INCA/DATASUS (7, 8) para o ano de 2012, para o sexo feminino, no Brasil, estimam em 260.640 os novos casos de câncer, excetuando o câncer de pele não melanoma. O câncer de mama será o mais incidente com 52.680 novos casos, como vemos na tabela 1, representando em torno de 21% das neoplasias malignas do sexo feminino e tornando-se o responsável por 15% do total de mortes por câncer, seguido pelo câncer de colo uterino com, 17.540 novos casos.

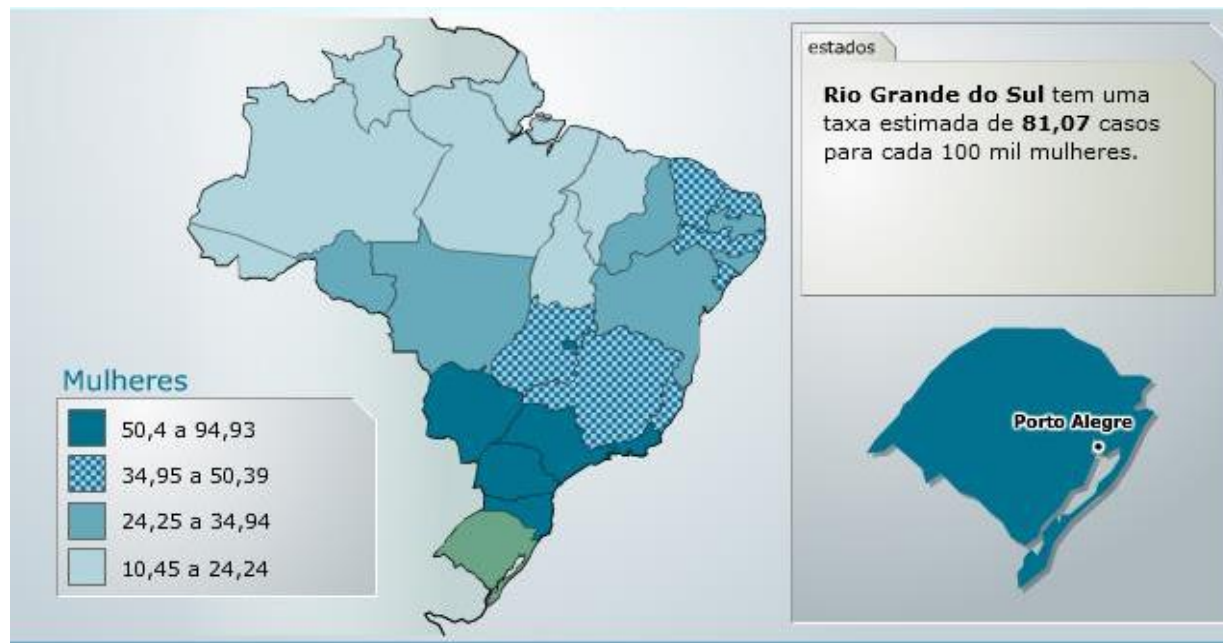
**Tabela 1.** Estimativa para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos por tipo de câncer, segundo sexo e localização primária, no Brasil.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tíreoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
<b>Subtotal</b>	<b>195.190</b>	<b>202,85</b>	<b>51.780</b>	<b>248,60</b>	<b>189.150</b>	<b>188,58</b>	<b>59.280</b>	<b>254,86</b>
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>257.870</b>	<b>267,99</b>	<b>66.400</b>	<b>318,79</b>	<b>260.640</b>	<b>259,86</b>	<b>75.180</b>	<b>323,22</b>

\* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: MS/ Instituto Nacional de câncer (7).

A taxa de incidência de câncer de mama esperada no Brasil é de 52,50/100 mil mulheres. Na Região Sul, esta estimativa é de 64,80/100 mil mulheres e, no Rio Grande do Sul, de 81,07/100 mil, com 4.610 casos novos, sendo que 980 (125,63/100mil) destes ocorrerão na capital do Estado, Porto Alegre. Este dado confirma a tendência de alta incidência da doença em grandes centros urbanos. A Figura 4 mostra a distribuição da incidência de câncer de mama no país, que é bastante heterogênea entre os estados. Sendo as regiões Sul e Sudeste aquelas que apresentam a maior incidência, enquanto as regiões Norte e Nordeste, às menores (7, 8).

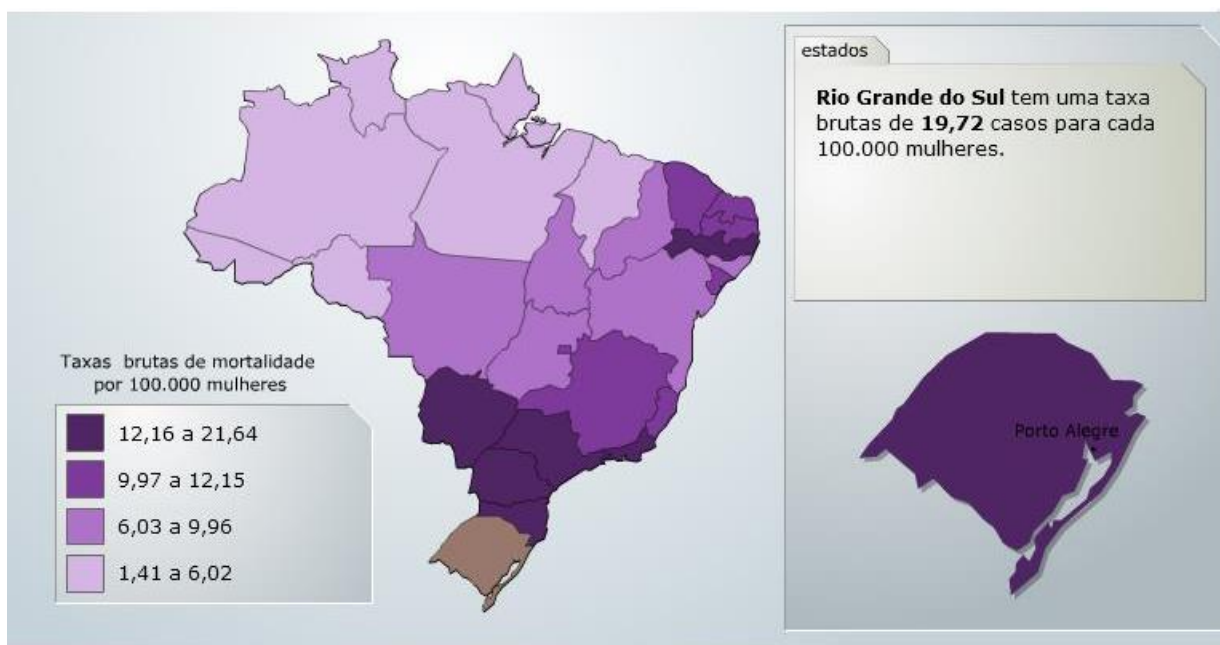


**Figura 4.** Representação espacial das taxas brutas de incidência da neoplasia maligna da mama feminina por 100.000 mulheres, estimadas para o ano 2012, segundo a Unidade da Federação.

Fonte: MS/ Instituto Nacional de câncer (7).

O câncer de mama no Brasil cresce em número de casos e também no número de mortes. Houve um aumento de 45% nas mortes em 10 anos, saltando de 8.104 em 1999, para 11.813 em 2008. A taxa de mortalidade padronizada é estimada em 12,6/100 mil mulheres e, no ano de 2010, a doença dizimou 12.705 vidas de mulheres brasileiras. Na Figura 5 observamos também a heterogeneidade das taxas de mortalidade, segundo as Unidades da Federação. As elevadas taxas de mortalidade provavelmente são devidas ao diagnóstico tardio e a demora das pacientes em receber atendimento em centros especializados (7, 8).





**Figura 5.** Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por câncer de mama, por 100.000 mulheres, nas Unidades da Federação, entre 2009 e 2010.

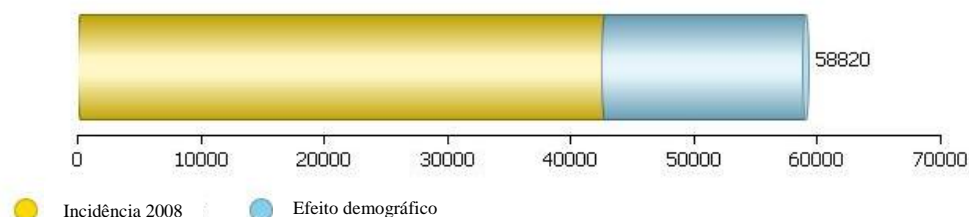
Fonte: MS/ Instituto Nacional de câncer (7).

Entretanto, um estudo publicado recentemente, conduzido por Freitas-Junior et al. (46), pesquisador da Universidade Federal de Goiás, avaliou os índices de mortalidade no Brasil no período de 1980 a 2009. A mortalidade por câncer de mama está caindo nos estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, o que mantém as taxas de mortalidade estáveis no país nos últimos anos, porque nos demais estados do país os índices permanecem estáveis ou indicam um aumento na mortalidade. O estudo mostra que, no Rio Grande do Sul, a redução percentual da mortalidade segue uma média de 0,8% / 100.000 mulheres por ano desde 1993. Em São Paulo, esta queda é de 1,9% / 100.000 mulheres ao ano e, no Rio de Janeiro a média é de 0,6%. Acredita que isto se deve a uma melhor infraestrutura no sistema de saúde. Os estados com maior aumento da mortalidade no período são: o Maranhão, com um crescimento de 12% no índice de mortalidade por 100.000 mulheres, seguido da Paraíba, com 11,9%, e do Piauí com 10,9% pontos percentuais. Avaliando a situação do câncer de mama no Brasil, Lee et al. (47) também encontraram disparidades nas taxas de mortalidade, atribuindo isto à falta de conscientização sobre a doença, ao uso da mamografia como ferramenta de prevenção, ao desconhecimento dos procedimentos cirúrgicos adequados, ao difícil acesso ao tratamento radioterápico e às técnicas mais modernas de tratamento sistêmico. Os autores ainda

ressaltam que 37% das pacientes atendidas nas instituições públicas foram diagnosticadas com estágio III-IV da doença em comparação com 16,2% daquelas atendidas em instituições privadas.

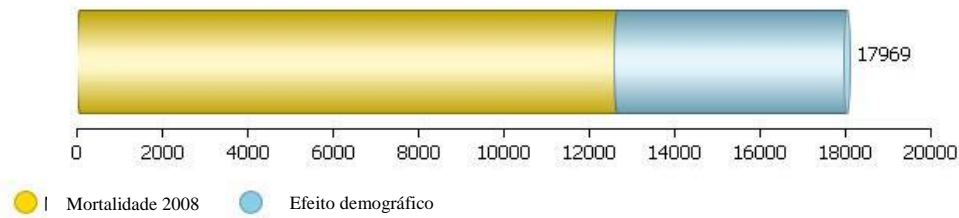
As autoridades brasileiras têm mostrado preocupação com os dados sobre o câncer de mama no país, e realizaram algumas ações no sentido de melhorar o diagnóstico e o acesso ao tratamento destas pacientes, bem como a disponibilização de medicamentos modernos para o tratamento de casos específicos. Sobre isto, podemos citar a Lei N° 11.664, de 29 de Abril de 2008, que garante a realização, pelo Sistema Único de Saúde (SUS), de exame mamográfico a todas as mulheres a partir dos 40 anos de idade; As Portarias N° 18 e 19, publicadas no Diário Oficial da União, de 25 de Julho de 2012, pelo Ministério da Saúde – Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, que incorporam o medicamento trastuzumabe no SUS para o tratamento de câncer de mama inicial e localmente avançado; Ainda, a Lei N° 12.732, de 22 de Novembro de 2012, dispõe sobre o primeiro tratamento de pacientes com neoplasia maligna e estabelece o prazo de 60 dias para seu início, a partir do dia em que for firmado o diagnóstico histopatológico (48-50).

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (9) estima para o Brasil no ano de 2020, uma incidência alarmante de novos casos de câncer de mama e de mortalidade pela doença, somente pelo efeito demográfico, como podemos ver nas Figuras 6 e 7.



**Figura 6.** Estimativa para o ano de 2020 do número de casos novos de câncer de mama no Brasil (todas as idades).

Fonte: GLOBOCAN 2008 (IARC) (9).



**Figura 7.** Estimativa para o ano de 2020 do número de mortes por câncer de mama em mulheres no Brasil (todas as idades).

Fonte: GLOBOCAN 2008 (IARC) (9).

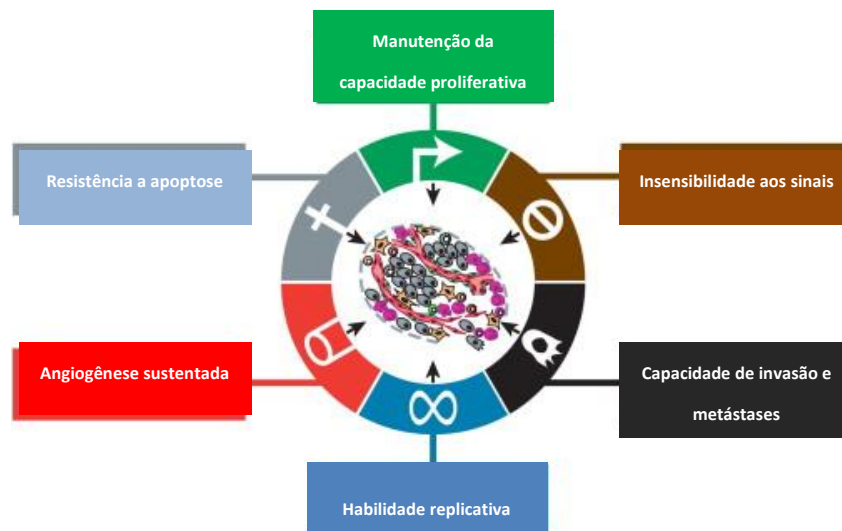
## 2.2 Iniciação e Desenvolvimento do Câncer de Mama

A mama normal é mantida por um conjunto complexo de interação entre células luminais, mioepiteliais, membrana basal e células do estroma. Cânceres são doenças genéticas, resultantes de mutações acumuladas no genoma. Acredita-se que este genoma das células transformadas é instável e resulta na aquisição acumulativa de mutações que podem converter uma célula normal em uma célula cancerosa, devido aos descontroles de programas essenciais como proliferação, diferenciação celular e morte (51).

Segundo Hanahan & Weinberg (52, 53), o fundamento da carcinogênese está na descoberta de mutações que produzem oncogenes com ganho de função dominante e genes supressivos do tumor com perda recessiva de função, originando defeitos em circuitos regulatórios que governam a proliferação celular normal e a homeostase. As células normais para evoluírem progressivamente até um estado neoplásico necessitam passar por uma série de etapas de capacitação, e este processo de passos múltiplos da patogênese do tumor humano é uma condição para que as células cancerígenas incipientes adquiram os traços que lhes permitam tornarem-se tumorigênicas, e finalmente malignas.

Os autores sugerem que o comportamento neoplásico decorre de, pelo menos, seis alterações essenciais na fisiologia celular, que caracterizam coletivamente o tumor maligno, como pode ser observado na figura 8. São elas: a) a manutenção da capacidade proliferativa, com autossuficiência em sinais de crescimento mitogênico; b) a insensibilidade

aos sinais antiproliferativos; c) a resistência a apoptose, permitindo o potencial replicativo ilimitado, formando grandes populações celulares, capazes de formar tumores macroscópicos; d) a angiogênese sustentada; e) Habilidade replicativa e; f) a capacidade de invasão e metástases, permitindo que células neoplásicas escapem do tumor e colonizem novos sítios. Como substrato destas alterações, há a instabilidade do genoma, que gera mutações aleatórias, e a inflamação, que promove múltiplas funções, tais como a liberação de produtos químicos ativamente mutagênicos para as células neoplásicas próximas. Estas alterações levam ao acúmulo progressivo de novas mutações, elevando o potencial de malignidade (52, 53).



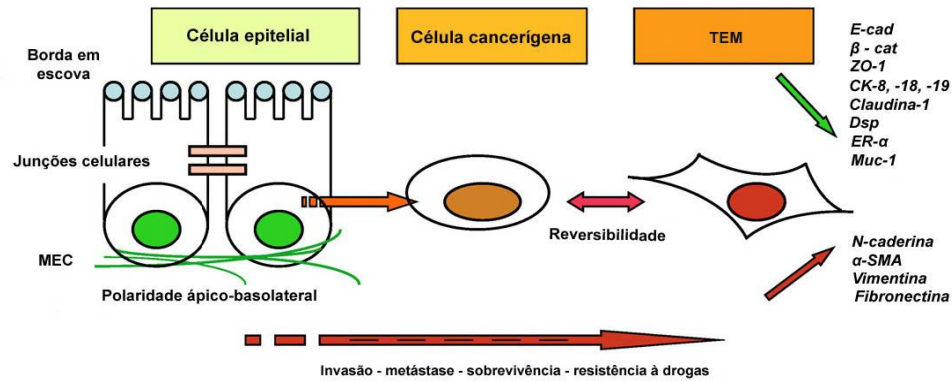
**Figura 8.** As seis capacidades funcionais marcantes, adquiridas durante o desenvolvimento do câncer, originalmente propostas por Hanahan & Weinberg, cuja teoria contribuiu muito na última década para um progresso notável na compreensão do mecanismo de cada característica.

Fonte: Hanahan & Weinberg (52).

Os tumores são tecidos complexos, constituídos por vários tipos de células diferentes que participam de interações heterotípicas entre si. Este conceito foi solidificado e estendido, revelando que a biologia dos tumores já não pode ser entendida simplesmente enumerando as características das células cancerosas, mas, em vez disso, devem abarcar as

contribuições do microambiente tumoral para a carcinogênese. Os carcinomas são formados por células epiteliais neoplásicas que constituem um compartimento (parênquima), que são claramente distintas das células mesenquimais que formam o estroma associado ao tumor. O processo de invasão e metástase é uma sequência de passos, que prevê uma sucessão de mudanças biológicas celulares, começando com a invasão do local, em seguida, intravasão por células cancerosas nas proximidades dos vasos sanguíneos e linfáticos, o trânsito de células cancerosas através destes vasos, seguido de fuga das células cancerosas da luz vascular para o parênquima de tecidos distantes (extravasamento), a formação de pequenos nódulos de células cancerosas (micrometástases) e, finalmente, o crescimento de lesões micrometastáticas em tumores macroscópicos, sendo este último passo denominado colonização (52).

Durante a progressão do câncer, alguns eventos são cruciais para iniciar o processo metastático. Estes eventos envolvem a desorganização dos contatos célula-célula, aumento da motilidade, resistência a apoptose, invasividade celular, os quais fazem parte de um programa morfogenético conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM) Figura 9. A adesão célula-célula é controlada por um sistema de proteínas de membrana, conhecido como complexo juncional apical. A glicoproteína transmembrana E-caderina é a principal proteína das junções aderentes e desempenha um importante papel na regulação da organização e manutenção da adesão célula-célula, e de sinais intracelulares que medeiam a proliferação e a motilidade celular. Neste evento, há síntese de proteases como a MMP-3, ativação de genes como a Vimentina e inibição de genes epiteliais como as citoqueratinas. Este programa, TEM multifacetado, pode ser ativado transitoriamente ou estavelmente, em graus diversos, por células neoplásicas durante o curso de invasão e metástase (52, 54).



**Figura 9.** Esquema mostrando alterações celulares ocorridas durante a transição epitélio-mesênquimal (TEM). Num enterócito, ocorre a perda das microvilosidades, desagregação da adesão intercelular e destacamento da matriz extracelular (MEC). Essas células adquirem um fenótipo maligno que pode progredir para um completo programa de TEM, onde marcadores epitélio são perdidos ou redistribuídos para lugares diferentes da sua localização (exemplo: E-caderina, b-catenina) e passam a expressar marcadores mesênquimais (exemplo: vimentina, fibronectina e N-caderina).  $\alpha$ -SMA: Alfa actina de músculo esquelético, Muc-1: Mucina-1, CK: Citoqueratina, Dsp: Desmoplaquina, ER- $\alpha$ : Receptor de estrogênio- $\alpha$ . Fonte: Adaptado de Sabbah *et al.* (54)

Segundo Burstein *et al.* (55), a história natural do câncer de mama envolve processos moleculares, celulares e patológicos bem definidos, na transformação de um tecido normal a uma lesão pré-invasiva, até um carcinoma in situ e invasor. A maioria das alterações que ocasionam a formação do câncer decorre de alterações genéticas cumulativas, da expressão do oncogene e da perda da regulação do ciclo celular normal.

Embora a iniciação do câncer seja por alterações genéticas, estudos atuais apontam alterações epigenéticas e um envolvimento com o microambiente. O curso da doença não depende exclusivamente das características intrínsecas do tumor, mas também do microambiente local, ou estroma, que pode influenciar fortemente no resultado. Variações específicas nos diferentes tipos de células do estroma e a capacidade de interação com as células tumorais determinam a complexidade da doença e a sua heterogeneidade. A angiogênese é um passo necessário para o crescimento do tumor, embora a microdensidade vascular tenha valor prognóstico fraco no câncer de mama. Além das características do estroma, específicos para o local do microambiente tumoral, fatores sistêmicos podem contribuir para a gama de comportamentos apresentados pelos tumores de mama. Eles incluem fatores como idade, estado menopausal, índice de massa corporal, bem como o estado imunitário geral (20, 25, 56, 57).

O estrogênio induz o crescimento de células mamárias, aumentando o potencial de alterações genéticas e, por consequência, a probabilidade de desenvolver câncer (58). Portanto, qualquer situação que aumente a exposição ao estrogênio, aumentará também o risco para câncer de mama. A menarca antes dos 12 anos também é considerada de risco para câncer de mama, provavelmente devido ao aumento da exposição ao hormônio. A taxa de recidiva da doença também é maior naquelas mulheres na pré-menopausa comparadas ao grupo na pós-menopausa (59-61).

Stingl & Caldas (62) afirmam que a compreensão da heterogeneidade celular e gênica do tumor de mama, que se relaciona com vários genes envolvidos no controle do crescimento, metabolismo e diferenciação celular são fundamentais para estabelecermos tratamentos específicos e eficazes, pois a expressão molecular de cada tipo de tumor propicia variações na resposta aos quimioterápicos, bem como norteiam o prognóstico destas pacientes.

Existe uma ampla variedade de padrões morfológicos de câncer de mama, e estes diferentes tipos fornecem importantes informações prognósticas. Quase todas as neoplasias malignas da mama são do tipo histológico adenocarcinoma, os outros tipos correspondem a menos de 5% (carcinoma de células escamosas, tumores filoides, sarcomas e linfomas). Convencionalmente, dividimos os tumores de mama em dois grandes grupos: carcinoma ductal, com aproximadamente 80 - 85% dos casos, e carcinoma lobular, que responde por 15% dos casos, e estes grupos ainda são subdivididos em carcinoma invasor e in situ (63, 64).

A expansão do câncer de mama ocorre por infiltração direta do parênquima mamário, pelos ductos, por invasão de tecidos adjacentes e pelo sistema vascular angiolinfático. Estes mecanismos de expansão justificam a probabilidade do câncer estar presente na mama e em outros sítios mais distantes. Os locais mais comuns de envolvimento regional são os linfonodos axilares, supraclaviculares e da mama interna. Metástases à distância são observadas mais comumente em ossos, pulmão e fígado (65).

O tamanho do tumor e o estado dos linfonodos axilares são os fatores prognósticos mais importantes para o câncer de mama e constituem a base para o estadiamento clínico

segundo o sistema TNM de classificação dos tumores malignos (T: tamanho do tumor; N: envolvimento dos gânglios axilares; M: presença ou ausência de metástases à distância) (66).

### **2.3 Fatores Prognósticos em câncer de mama**

Fatores prognósticos são quaisquer elementos disponíveis no momento do tratamento primário, mensuráveis, e estão associados aos aspectos patológicos e biológicos do tumor. Têm a capacidade de prever o comportamento clínico da doença (intervalo livre de doença) ou a sobrevivência global do doente no momento do diagnóstico. Os fatores preditivos são definidos como as características clínicas, patológicas e biológicas que são usadas para estimar a probabilidade de resposta a um determinado tipo de terapia adjuvante (67).

O prognóstico de pacientes com câncer de mama é extremamente variável, e muitos esforços são realizados no sentido de identificar fatores que, desde o diagnóstico, possam ser determinantes na tentativa de prever a evolução de cada doente, de modo que o risco de recidiva possa ser calculado. Também a identificação de fatores preditivos de resposta pode permitir uma individualização adequada da terapêutica, mais específica e eficaz, como o caso da avaliação dos RH e do HER2, que são fatores prognósticos e preditivos para a resposta à terapia endócrina e antireceptor HER2, respectivamente (68-71).

Os fatores prognósticos clássicos incluem a idade, tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos, grau histológico, invasão vascular e os receptores hormonais. A identificação destes fatores é fundamental, tanto para identificar pacientes de bom prognóstico, cuja terapia adjuvante sistêmica não ofereça vantagem significativa, quanto para selecionar aquelas pacientes com prognóstico ruim, que possam ser beneficiadas com a introdução de uma terapia específica, mais agressiva, ou até mesmo o uso de terapia alvo (12, 72).

Alguns estudos, como o de Nixon, Neuberg & Haynes (73) e Jayasinghe, Taylor & Boyages (74), têm associado a idade da paciente no momento do diagnóstico ao prognóstico. Nixon



et al. estudaram um grupo de 1.398 pacientes, das quais 107 tinham menos de 35 anos de idade no momento do diagnóstico. Este subgrupo apresentou um maior risco de recorrência da doença em relação às mais idosas. Também mostrou uma associação com fatores de pior prognóstico, como o alto grau histológico, invasão vascular e receptores hormonais negativos. Já o estudo de coorte conduzido por Jayasinghe et al., incluindo 393 pacientes, encontrou uma sobrevida de 49% em 10 anos para as mulheres com idade menor que 40 anos no momento do diagnóstico. Entretanto, a sobrevida no mesmo período foi de 73% para as pacientes com idade entre 40-69 anos. Analisando o subgrupo com axila negativa, a taxa de sobrevida foi de 68% para as mulheres com menos de 40 anos e de 90% para as de mais idade.

O tamanho do tumor é um fator prognóstico independente, estando diretamente relacionado a metástases axilares e ao aumento do risco de recorrência e morte (70, 75). As taxas de sobrevida em cinco anos variam de 45,5% para os tumores  $\geq 5,0$  cm com linfonodo axilar metastático, a 96,3% para tumores  $< 2,0$  cm com linfonodos negativos. Um estudo realizado por Verschraegen et al. (76) analisou o Banco de dados do Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program of the National Cancer Institute. O autor comparou o tamanho do tumor (T1-T2) em relação à mortalidade. Sendo que 58.070 casos tinham linfonodos axilares negativos e 25.616 tinham linfonodos positivos para metástases. O resultado foi um aumento da mortalidade de 10 a 25% nos casos com linfonodos negativos e de 20 a 40% naquelas que apresentavam linfonodos positivos, para cada milímetro de aumento entre tumores de três milímetros a cinco centímetros.

O grau histológico do tumor é categorizado em bem diferenciado (GI), moderadamente diferenciado (GII) e pouco diferenciado (GIII), segundo a classificação por grau histológico de Nottingham (63). O grau histológico GIII está associado ao menor intervalo livre de doença e menor sobrevida em relação ao GI e GII. A Sobrevivência em cinco anos para os graus GI, II e III é de 75, 53 e 31%, respectivamente (77, 78).

### **2.3.1 Biomarcadores**

Os marcadores biológicos ou biomarcadores são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos. Eles são produzidos primariamente pelo tumor, ou secundariamente pelo paciente em resposta a presença deste. Muitos marcadores tumorais podem ser identificados e quantificados por métodos simples, como a imuno-histoquímica, através de cortes em tecidos tumorais. Entre estes marcadores estão uma variedade de proteínas, algumas associadas a oncogenes e medidores da atividade proliferativa do tumor. O uso destes biomarcadores garante as pacientes com câncer de mama o planejamento de um tratamento mais próximo ao ideal. Por exemplo, o uso da dosagem de receptores hormonais em câncer de mama tem um papel decisivo na seleção de pacientes para receberem terapia endócrina, da mesma forma o HER2 é um forte preditor de resposta ao trastuzumab (24, 71, 79, 80).

#### **2.3.1.1 Receptores Hormonais**

Os receptores hormonais (RH) são proteínas, presentes no epitélio mamário, que se ligam aos hormônios circulantes mediando o processo de divisão celular. No câncer de mama, os receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP) são os mais estudados e trouxeram uma contribuição fundamental na abordagem terapêutica destes tumores. O RE é codificado pelo gene ESR1, localizado no cromossoma 6q25 e o RP é codificado pelo gene PGR localizado no cromossoma 11q22 (81, 82).

Tumores que expressam ambos os receptores se aproximam mais do tecido mamário normal, portanto a positividade dos RH está associada a um menor risco de recidiva e aumento da sobrevivência. Entretanto, tumores com receptores de estrogênio negativo aparecem associados significativamente com alta à densidade vascular (83-85).

Devido a simplicidade, a imuno-histoquímica tem sido o método de escolha para a medida de receptores hormonais. Cerca de 80% dos tumores de mama expressam os receptores hormonais. Sendo que 60-81% são positivos para RE e 44-61% são positivos para RP, o que autoriza a manipulação através de tamoxifeno, inibidor da aromatase ou ablação ovariana como terapia adjuvante. Cerca de 20% dos tumores são negativos para os dois receptores e menos de 10% expressam RP na ausência de RE (86-88). Na doença metastática, tumores positivos para receptores hormonais têm uma taxa de resposta ao tratamento hormonal em torno de 80%. Para os tumores com receptores negativos para estrogênio e positivos para progesterona a resposta é de 46%. Os tumores positivos para estrogênio e negativos para progesterona têm taxa de resposta de 27% e apenas 11% quando ambos são negativos (89-94).

O Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (95) realizou um estudo de meta-análise em 20 ensaios ( $n = 21.457$ ) de pacientes com câncer de mama inicial que usaram por cinco anos o tamoxifeno adjuvante versus o não uso do tamoxifeno, com cerca de 80% de adesão. Os autores concluíram que o uso de tamoxifeno adjuvante por cinco anos reduz com segurança, em torno de 1/3, os riscos de recorrência e morte por câncer de mama, em 15 anos, naquelas pacientes positivas para RE, independente do status do RP.

Considerando o status menstrual, 30% das mulheres na pré-menopausa são receptores hormonais positivos e na pós-menopausa este número sobe para 60%. A literatura é inequívoca ao mostrar que existe uma relação entre os RE e o prognóstico. Doentes com receptores hormonais positivos apresentam um maior intervalo de tempo livre de progressão e maior sobrevivência. Doentes com negatividade para ambos receptores tem pior prognóstico comparado com aqueles negativos para apenas um deles, trazendo benefício para aqueles que são positivos para os dois receptores (67, 94).

Um estudo sobre terapia endócrina adjuvante em mulheres com câncer de mama primário foi realizado em dois grandes bancos de dados de câncer de mama, mantidos pelo Breast Center at Baylor College of Medicine (Houston, TX). O primeiro denominado banco de dados PP (Program Project grant), e a segundo banco de dados SPORE (Specialized Program of Research Excellence grant). O banco de dados PP, continha informações de 3.739

mulheres que não receberam nenhuma terapia adjuvante sistêmica e de 1.688 que receberam terapia endócrina, mas não receberam quimioterapia. O segundo banco de dados, SPORE, continha informações de 10.444 pacientes que receberam terapia endócrina sem quimioterapia adjuvante. Analisando o risco de recorrência e morte nestes três grupos de pacientes, com um segmento médio de 67 meses, os autores encontram os seguintes dados: No grupo PP a redução do risco relativo para recorrência da doença foi de 25% naquelas pacientes que apresentavam RE positivo e Rp negativo e 53% naquelas com os dois receptores hormonais positivos, comparadas com aquelas mulheres que tinham ambos receptores negativos ( $p < 0,0001$ ). A redução do risco relativo para morte na presença de RE positivo e RP negativo foi de 30% no grupo SPORE e 38% no PP, comparado a ausência dos dois receptores ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, quando os dois receptores eram positivos a redução do risco de morte foi de 46% no grupo SPORE e 58% no PP ( $p < 0,0001$ ). A conclusão deste trabalho, é que a positividade do RP associado à positividade do RE melhora significativamente o prognóstico da doença em relação ao tratamento endócrino adjuvante, comparado com a positividade apenas do RE. Ainda as pacientes com receptores hormonais negativos poderiam ser beneficiadas com o uso de quimioterapia adjuvante (96).

### **2.3.1.2 HER2**

HER2 é a abreviatura do inglês de *Human Epidermal growth factor Receptor type 2*. É um proto-oncogene que está localizado na banda q21 do cromossoma 17 e codifica uma proteína receptora transmembrana de 185 kD, a proteína neu, HER2/neu, expressa em quase todas as células epiteliais, com papel importante no crescimento e desenvolvimento de uma vasta categoria de células (97). Possui uma sequência de aminoácidos com atividade tirosina quinase intracelular semelhante ao receptor de crescimento epidérmico e atua como um receptor de fator de crescimento. Mas em cerca de 20 a 30% dos cânceres de mama, o gene HER2 não funciona corretamente e faz muitas cópias de si mesmo

(conhecido como amplificação do gene HER2). Isso faz com que as células da mama sofram um crescimento e se dividam de forma descontrolada. Este proto-oncogene é membro da família HER, composta por quatro elementos: receptores de fator epidérmico EGFR/HER1, HER2, HER3 e HER4, sendo considerado um fator preditivo em câncer de mama (91, 98-100).

A superexpressão do HER2, que está presente em 20 a 30% dos carcinomas invasores de mama, se correlaciona com um pior prognóstico. Em muitos estudos aparece associado a vários fatores de mau prognóstico, como RE negativo, linfonodos axilares positivos, maior volume tumoral e alto grau histológico. Continua sendo o principal biomarcador preditivo de resposta para uso do trastuzumab e moléculas inibidoras da tirosina-quinase, como o lapatinib (93, 97, 101, 102).

O primeiro pesquisador que associou a superexpressão de HER2 com mau prognóstico em câncer de mama foi Slamon et al. (97). O autor mostrou que a amplificação do gene do HER2 em pacientes com câncer de mama axila positiva estava significativamente associado com a recorrência da doença e morte. Outros estudos têm associado à amplificação deste oncogene com o prognóstico mais agressivo e uma evolução desfavorável da doença, com uma menor sobrevida livre de doença e sobrevida global (101, 103-106). Há relatos que a proteína está associada a uma resistência ao tratamento hormonal antiestrogênico com tamoxifeno. Também é um preditor de benefício ao tratamento quimioterápico baseado em antraciclinas, associado ao tratamento com anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2 (trastuzumab) tanto na terapêutica adjuvante como metastática (91, 101, 107).

Sahlbreg et al. (108) afirmam que apesar do significativo progresso no tratamento das pacientes com superexpressão do oncogene HER2, através do uso de trastuzumab, mais de 50% destas pacientes respondem mal ao tratamento. Isto pode ser devido ao fragmento amplificado de HER2 em 17q12, que contém genes múltiplos. A identificação e o entendimento destes genes pode aumentar a eficácia das terapias anti-HER2 e possivelmente neutralizar a resistência ao trastuzumab.

### **2.3.1.3 Ki-67**

O gene Ki-67 é uma proteína nuclear localizada no braço longo do cromossomo 10 (10q25), expressa apenas em células na fase proliferativa do ciclo celular (G1, S, G2 e fase M). O antígeno Ki-67 também é conhecido como anticorpo monoclonal Ki-67 (MKI67), proteína nuclear humana, estritamente ligada com a proliferação celular, cuja medida tem por finalidade medir a fração de células em crescimento. A expressão do Ki-67 no tecido normal é muito baixa, menor de 3% das células (109-111).

Uma grande percentagem dos tumores positivos para Ki-67 está associada positivamente a tumores de pouca diferenciação histológica e inversamente a expressão dos receptores hormonais, indicando um prognóstico agressivo. Estudos revelam que câncer de mama com alta expressão do Ki-67 em 20-50% das células está associado à recorrência da doença e pior sobrevida (24). Tumores com baixa expressão de Ki-67, e receptor de estrogênio positivo apresentam melhor resposta a terapia hormonal, enquanto aqueles com alto índice de Ki-67 apresentam melhor resposta a quimioterapia. Tumores grandes, com linfonodo axilar negativo e baixo índice de Ki-67 apresentam bom prognóstico (97).

Estudos estabelecem o valor preditivo do Ki-67 no diagnóstico de câncer de mama. Clarke et al. (111) avaliaram a presença de dissociação entre os receptores de estrogênio, e células proliferativas no tecido mamário. Os autores mostraram que no tecido normal da mama as células positivas para receptor de estrogênio são em geral não proliferativas, e no tecido tumoral há uma dissociação entre as células proliferativas e as RE positivas. Outras publicações, como a de Luporsi et al. (112), Tawfik et al. (113) e Kruger et al. (85) mostraram uma associação entre a expressão do Ki-67 e o grau histológico, envolvimento de linfonodos axilares, alta densidade vascular, expressão negativa de RH, e com risco de recorrência da doença e sobrevida global. Jones et al. (114) mostraram também que a alta expressão do Ki-67 está associada com baixa resposta à quimioterapia neoadjuvante, sendo um fator prognóstico independente para sobrevida livre de doença.

Avaliando o volume do tumor e a expressão de Ki-67, Gottardi et al (115) encontraram uma expressão de ki-67  $\leq 10\%$  em 76,1% das pacientes com tumor pequeno (T1), comparadas

com 44% das pacientes com T2 ( $p < 0,001$ ). Em relação aos receptores hormonais, 68% das pacientes com RE positivo apresentavam níveis de Ki-67  $\leq 10\%$ , enquanto aquelas com RE negativo tinham níveis baixos de Ki-67 em apenas 46,4% dos casos ( $p < 0,01$ ).

Um grupo de 699 pacientes com câncer de mama linfonodo negativo (pN0), submetidas à mastectomia radical modificada ( $n = 508$ ), e mastectomia radical modificada mais radioterapia ( $n = 191$ ) foi avaliado por Selz et al (116), através de IHQ. As pacientes foram classificadas segundo o subtipo molecular em luminal A e B, HER2 e triplo negativo, usando RE, RP e HER2. Também foi medida a expressão do Ki-67, determinando um ponto de corte em  $> 20\%$  de expressão nas células para considerar positividade. Análise multivariada de Cox foi utilizada para avaliar o risco de recidiva loco-regional nos subtipos e na expressão de Ki-67. A radioterapia pós-operatória não estava associada ao melhor controle loco-regional em nenhum grupo, incluindo o proliferativo. Entretanto, a expressão de ki-67  $> 20\%$  foi o único fator prognóstico independente associado com o aumento de recidiva loco-regional em 5 anos (HR: 4,18; IC 95%, 1,11-15,77;  $p < 0,021$ ).

#### **2.3.1.4 P53**

O gene supressor de tumor TP53 (p53) localizado no cromossoma 17p13.1, codifica uma fosfoproteína que desempenha um papel importante no controle do ciclo celular. Ela bloqueia o processo de divisão celular nas células que sofrem lesão no seu DNA, permitindo que estas sejam reparadas, e previne o aparecimento do câncer, impedindo que o DNA danificado seja transmitido as células filhas. A expressão mantida da p53 ajuda a manter a apoptose. A privação da função deste gene pode estar relacionada à progressão tumoral. Quanto maior o número de mutações, pior o prognóstico da doença (117-119).

A presença de p53 mutante nos carcinomas de mama está entre 20% a 50% dos tumores estudados (91, 120, 121). Desta forma, a determinação imuno-histoquímica do p53 mutante é importante tanto como fator prognóstico como preditivo, pois está relacionada à pior

prognóstico em câncer de mama, com menor sobrevida livre de recorrência, menor sobrevida global, receptor de estrogênio negativo, alto grau nuclear, alta taxa de expressão do Ki-67, superexpressão de HER2 e estágios avançados da doença (85, 106, 120, 122, 123).

Tumores triplos negativos, que são assim definidos por falta de RE, RP e HER2, apresentam, na maioria, altas taxas de p53. Atualmente, para estes tumores a quimioterapia convencional é a única alternativa, portanto há uma necessidade de se buscar novas alternativas de tratamento para estes casos. Dumay et al. (124) investigaram a mutação da p53 em 572 tumores de mama. Os autores encontraram uma maior frequência de mutação em tumores basais (88%) em relação aos luminais (26%).

Morrisson et al. (125) analisando os biomarcadores em relação à idade, encontraram alta expressão de RE negativo ( $p=0,01$ ), alto índice de Ki-67 ( $p=0,01$ ) e p53 ( $p<0,001$ ) entre as mulheres jovens ( $\leq 40$  anos), comparados com  $\geq 50$  anos. O subtipo triplo negativo também foi mais frequente em mulheres jovens.

Uma meta-análise foi realizada por Chen et al. (126), para avaliar a existência de relação entre a p53 e a resposta à quimioterapia neoadjuvante. Foram analisados 26 estudos, incluindo 3.476 casos. A p53 foi associada à boa resposta em pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante, sugerindo que esta é um bom marcador preditivo de resposta em quimioterapia neoadjuvante.

## **2.4 Classificação Molecular do Câncer de Mama**



A classificação molecular do câncer de mama esta baseada nos perfis de expressão gênica por meio de microarranjos de DNA, que permitiu identificar cinco subgrupos de câncer de mama com diferentes perfis de expressão de genes, que refletem entidades da doença biologicamente distintas. Baseado na similaridade com algumas células do epitélio mamário os grupos foram denominados: luminal, quando a assinatura genética se assemelhava à célula luminal do ducto mamário; basal-like quando se assemelhava a célula basal, e HER2 quando os tumores apresentavam um perfil com alta expressão do gene HER2. Ainda um quinto grupo, normal-like, foi identificado com poucas alterações e de difícil interpretação, provavelmente tratando-se de artefatos técnicos. Além, de estes grupos mostrarem valor prognóstico diverso, eles também nos orientam quanto a melhor terapêutica para cada doente (127-129).

Recentemente Cuzick at al. (130) publicaram um trabalho, usando informações adquiridas através da técnica de imuno-histoquímica e concluíram que estas seriam superponíveis as informações da assinatura genética. Logo, baseado na expressão imuno-histoquímica destas proteínas, podemos reproduzir a expressão gênica usando marcadores tumorais para os receptores hormonais, HER2 e ki-67, classificando os tumores de acordo com a 12th St Gallen International Breast Cancer Conference -2011.

Na literatura o grupo luminal A representa cerca de 60% dos casos de cânceres de mama, e apresenta o melhor prognóstico em relação aos demais. São positivos para os receptores hormonais e estão associados a baixo grau histológico e baixa expressão de Ki-67. Mostram boa resposta à hormonioterapia com antiestrogênicos, inibidores da aromatase, e pouca resposta a quimioterapia (131, 132).

Subtipo	Fenótipo
Luminal A	RE e/ou RP positivos, HER2 negativo, Ki-67 < 14%
Luminal B	RE e/ou RP positivos, HER2 negativo, Ki-67 ≥ 14% ou RE e/ou RP positivos, HER2 positivo
Superexpressão de HER2	HER2 positivo, RE e RP negativos
Basal like ou Triplo negativo	HER2 negativo, RE e RP negativos

**Tabela 2.** Classificação molecular do câncer de mama, de acordo com a 12th St Gallen International Breast Cancer Conference -2011, (132).

Um estudo incluindo 10.159 mulheres com câncer de mama, a partir de dados de 12 registros de câncer de base hospitalar e populacional da América do Norte, Europa e Austrália, entre os anos de 1974 a 2005, mostrou o subtipo luminal A como o de maior frequência, com percentual de 71,3%, seguido do triplo negativo com 16%. Ressalta-se que neste estudo não foi medida a expressão do Ki-67 para a classificação dos subgrupos (33). Entretanto, uma frequência diferente foi encontrada no trabalho brasileiro realizado na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, publicado por Cintra et al. (133). Os autores analisaram, através de IHQ, tumores de 397 pacientes com câncer de mama, considerando a expressão do Ki-67 para a classificação dos subtipos, encontrando o subtipo luminal B-Her2 negativo como o de maior frequência (41,8%), seguido do triplo negativo (24,2%), luminal A (17,1%), luminal B-HER2 positivo (10,8%) e superexpressão de HER2 (6,0%). No subtipo luminal A, 72,1% das pacientes estavam na pós-menopausa. Por outro lado, a maioria das pacientes na pré-menopausa expressaram o subtipo luminal B-HER2 positivo (45,2%) e triplo negativo (44,2%). A maioria dos tumores maiores de 2,0 cm, com linfonodos positivos, apresentavam perfil triplo negativo e HER2 positivo.

O tipo luminal B apresenta receptores hormonais positivos, embora frequentemente sejam em níveis muito baixos, e às vezes apresentam alto índice proliferativo. São caracterizados por expressar genes associados ao HER2 em 30% dos casos, e genes de proliferação como o Ki-67, associado à resistência ao tamoxifeno. Também está associado a uma menor sobrevida livre de doença e sobrevida global, independente do tratamento adjuvante

recebido. Este grupo pode ser beneficiado com terapia adicional em relação a outros grupos de melhor prognóstico (131).

O grupo HER2 positivo, que também é classificado como de pior prognóstico, apresenta uma boa resposta ao anticorpo monoclonal humanizado (trastuzumab), com isto apresenta uma sobrevida livre de doença similar aos tumores de melhor prognóstico. Por outro lado o basal-like apresenta o pior prognóstico e carece de uma abordagem mais específica (71, 132, 134).

O HER2 é um tumor responsivo a quimioterapia, no entanto a sobrevivência deste tumor ainda é pobre e requer uma maior atenção na seleção terapêutica. Os tumores HER2 negativos apresentam um menor tempo de sobrevida livre de recorrência e pior taxa de sobrevida quando comparados aos HER2 positivos (129).

O tipo basal, caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais, demonstra um padrão prognóstico reservado. Os tumores com este perfil apresentam associação com mutação da p53 em 65% dos casos, grau histológico elevado, alto número de mitoses, áreas de necrose central, infiltrado linfocitário e conseqüentemente um menor intervalo livre de doença e sobrevida global. Tumores com este perfil não apresentam benefício com a instituição de terapia com inibidores da aromatase, bloqueadores de receptores de estrogênio ou trastuzumab (128, 129, 135).

Um estudo coordenado por Dawood et al. (136), analisou os resultados de imuno-histoquímica realizados em carcinomas de mama de 1.945 pacientes, e definiu a sobrevida associada à fenótipos moleculares. No caso, os autores utilizaram o grau histológico para diferenciar os luminais HER2 negativos, sendo que os GIII foram considerados como luminal B, e os GI e GII como luminal A. Este estudo encontrou 1279 (65,8%) tumores classificados como luminal A; 279 (14,3%) como luminal B; 95 (4,9%) HER2; 203 (10,4%) basal-like e 89 (4,6%) não foram classificados. Em geral, as mulheres com subtipo luminal A, tinham tumores de menor diâmetro, baixo grau histológico e menor envolvimento dos linfonodos axilares, comparados com os demais subtipos moleculares. A sobrevida global em 5 anos estimada para luminal A, luminal B, HER2, basal-like e tumores não classificados foi de

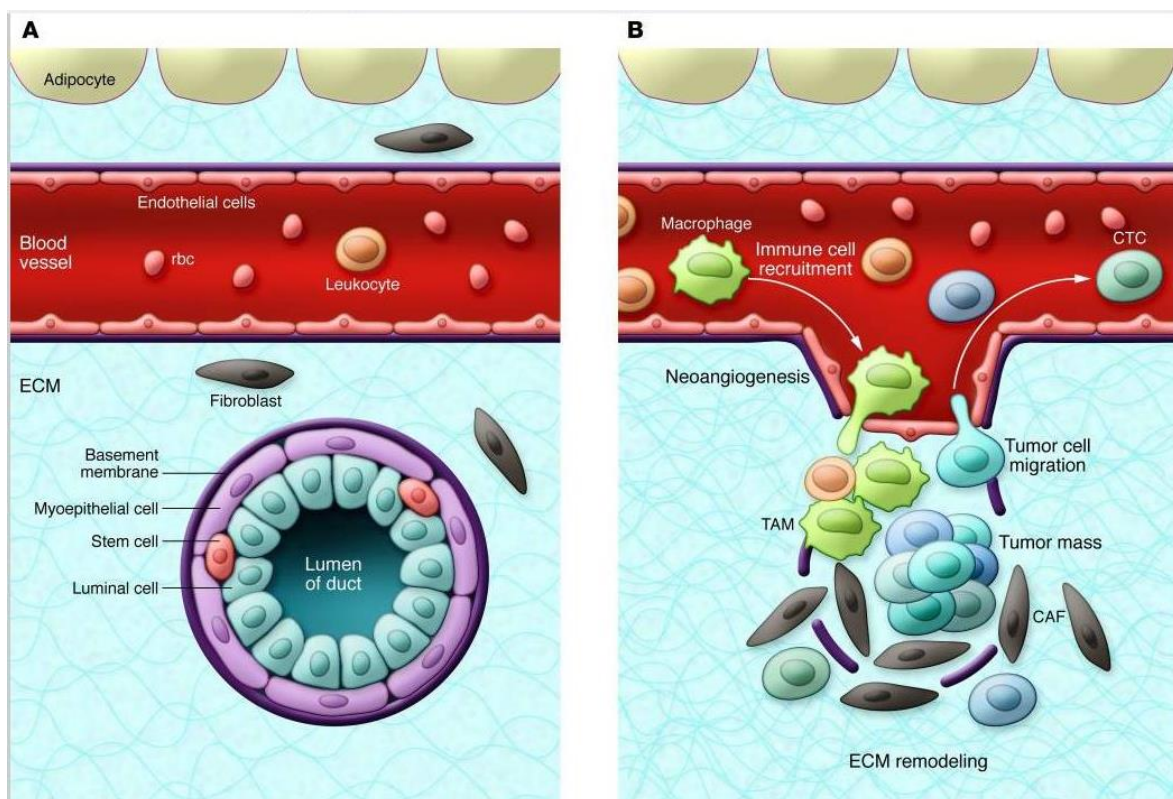
96%, 88%, 81%, 89%, e 85% respectivamente ( $p < 0,0001$ ). Na análise multivariada, comparando entre si, os tumores que apresentaram o pior prognóstico foram o basal-like (HR: 1,37; CI95% 0,91-2,06) e os não classificados (HR: 1,51; CI 95% 0,97-2,35).

Por muitos anos, o tratamento para o câncer de mama dependia unicamente da cirurgia e da quimioterapia, esta muitas vezes de alta toxicidade. Entretanto nos últimos anos temos visto uma grande evolução tecnológica neste tratamento, permitindo uma abordagem mais individualizada. O desenvolvimento da biologia molecular, com a identificação e validação de vários marcadores prognósticos e preditivos, como os receptores hormonais, HER2, Ki-67, p53 e outros que são continuamente pesquisados, bem como o desenvolvimento de novas drogas alvo nos trazem um alento, tanto no sentido de proporcionar um tratamento mais adequado e eficaz para as mulheres acometidas pela doença, como também prolongar a vida e perseguir o objetivo maior que é a cura da doença.

Entretanto isto não é suficiente para predizer o risco de recorrência, haja vista que muitas pacientes que são tratadas no estágio I da doença, sem evidência de comprometimento de linfonodos regionais, desenvolvem recorrência. Alguns autores afirmam que entre 20 a 30 % das pacientes com câncer de mama irão apresentar recidiva, mesmo que tenham inicialmente linfonodos axilares negativos, e seriam candidatas a receber terapia adjuvante. Outros ainda referem que 70% das pacientes poderiam ser curadas apenas com tratamento cirúrgico, sem necessidade de terapia mais agressiva (79, 137-139).

O câncer de mama não é uma entidade monolítica, compreende tumores com características heterogeneas, com possibilidade de diferentes respostas ao tratamento. A evolução do tumor depende de suas características intrínsecas, incluindo o tipo histológico, características imuno-histoquímicas e moleculares, bem como das características do microambiente. A figura 10, abaixo, mostra a arquitetura normal do ambiente da mama. Cada lobo surge de vários lóbulos, que conectam a um ducto terminal comum interlobular, que se estende até o mamilo. Histologicamente os ductos e lóbulos são revestidos por uma camada única de células epiteliais luminiais, rodeadas por células mioepiteliais que estão dispostas transversalmente. Estas estruturas são separadas do tecido circundante, ou estroma, por uma membrana basal (MB), cuja violação caracteriza o carcinoma invasor. O

estroma circundante compreende a matriz extracelular (MEC), as células discretas como fibroblastos, células do sistema imunológico e adipócitos, e estruturas organizadas, como os vasos sanguíneos, sendo que cada um contribui para configuração geral do microambiente. Uma melhor compreensão da heterogeneidade do tumor e das características subjacentes, bem como sobre os mecanismos e as consequências das suas interações é essencial para melhorar o direcionamento das terapias existentes e desenvolver novos agentes de tratamento (20, 140).



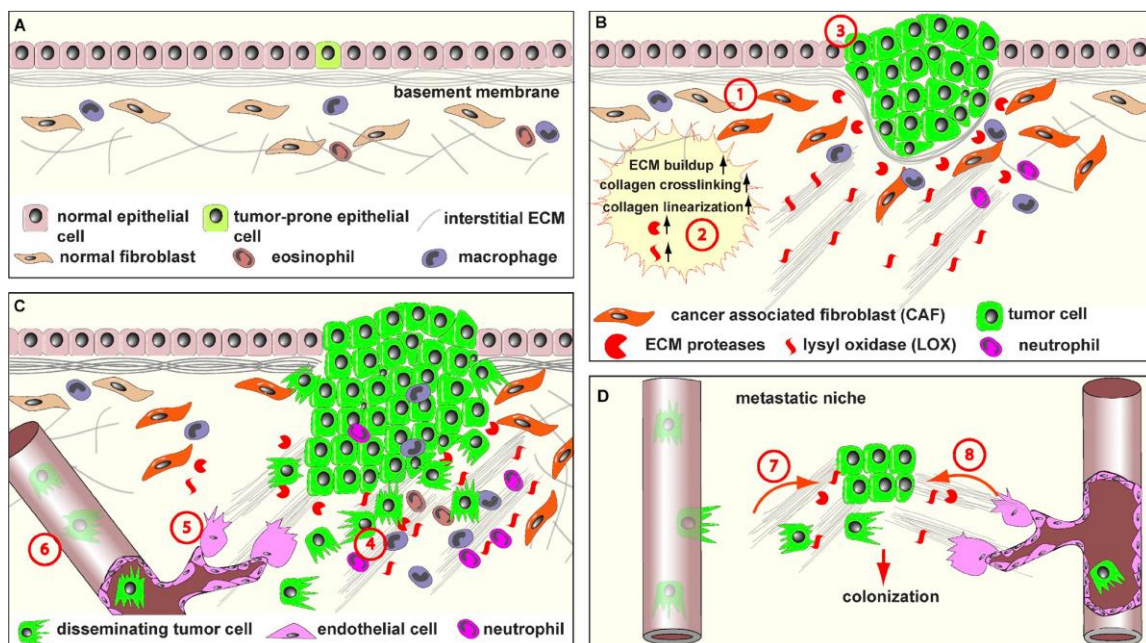
**Figura 10.** Representação esquemática da arquitetura normal da mama e do estroma circundante, que ilustra algumas variáveis intrínsecas do tumor e do microambiente.

Fonte: Bertos & Park (20).

O microambiente local de uma célula neoplásica desempenha papel importante no desenvolvimento do câncer. A MEC tem um importante papel na regulação dos mecanismos deste nicho. Ela é formada por uma complexa rede de macromoléculas composta por proteínas e polissacarídeos com distintas propriedades física, bioquímicas e biomecânicas. Ela tem como função a sustentação dos tecidos, reserva de fatores de crescimento e citocinas e sinalizações intracelulares, controlando assim a célula e o meio externo. Entre as

proteínas presentes na MEC encontram-se as MMPs. Embora rigidamente controlada durante o desenvolvimento embrionário e homeostase do órgão, a MEC é comumente desregulada e torna-se desorganizada em doenças como o câncer. Quando alterada, a MEC afeta a progressão do câncer por promoção direta da transformação celular e metástase. No entanto, as anomalias da MEC também desregulam o comportamento das células do estroma, facilitando a angiogênese tumoral, associada à inflamação, determinando a geração de um microambiente carcinogênico. Compreender como a composição da MEC e sua topografia são mantidas, e como a sua desregulação influencia na progressão do câncer pode ajudar a desenvolver novas intervenções terapêuticas, visando o nicho do tumor (25, 28, 140).

Na figura 11 podemos ver a MEC mantendo a sua homeostase e a integridade dos tecidos, com isto tornando o microambiente protegido, e em situação anormal quando ocorre uma série de eventos carcinogênicos que facilitam a proliferação celular, crescimento e disseminação metastática da doença.



**Figura 11.** A MEC anormal promove a progressão do câncer. (A) A remodelação de MEC é rigorosamente controlada para assegurar a homeostase de órgãos e suas funções. A dinâmica da MEC normal é essencial para a manutenção da integridade dos tecidos e manter raras células propensas a tumor, em conjunto com os fibroblastos, eosinófilos, macrófagos, e outras células do estroma, mantendo um microambiente global saudável. (B) Com a idade ou em condições patológicas, tecidos podem gerar uma série de eventos

carcinogênicos. Um destes eventos é a geração de fibroblastos ativados ou FAC (fase 1), o que contribui para a formação de MEC anormal, desregulando a expressão das enzimas de remodelação da MEC (fase 2). A MEC anormal tem impactos profundos sobre as células circundantes, incluindo células epitelial, endoteliais, imunológicas e outros tipos de células do estroma. A MEC desregulada promove a transformação celular epitelial e hiperplasia (fase 3). (C) Na fase final do tumor, as células imunes são frequentemente recrutadas para o local do tumor, para promover a progressão do câncer (fase 4). Além disso, a MEC desregulada afeta vários aspectos da biologia vascular e promove a angiogênese tumoral (fase 5). A criação de uma vascularização tumoral permeável por sua vez facilita a invasão da célula tumoral e metástase para sítios distantes (fase 6). (D) Em sítios distantes, as células cancerosas deixam a circulação e tomam posse do tecido local. Junto com células locais do estroma, as células neoplásicas expressam enzimas de remodelação da MEC e criam um nicho local metastático. Este nicho anormal na MEC promove a extravasão, sobrevivência e proliferação de células neoplásicas (fase 7). Em fases mais tardias, quando as células neoplásicas despertam da dormência, a MEC anormal liga o interruptor angiogênico (fase 8), presumivelmente através de um mecanismo semelhante ao utilizado no sítio primário (fase 5), e promove o rápido crescimento de células neoplásicas e uma expansão de micrometástases para macrometástases.

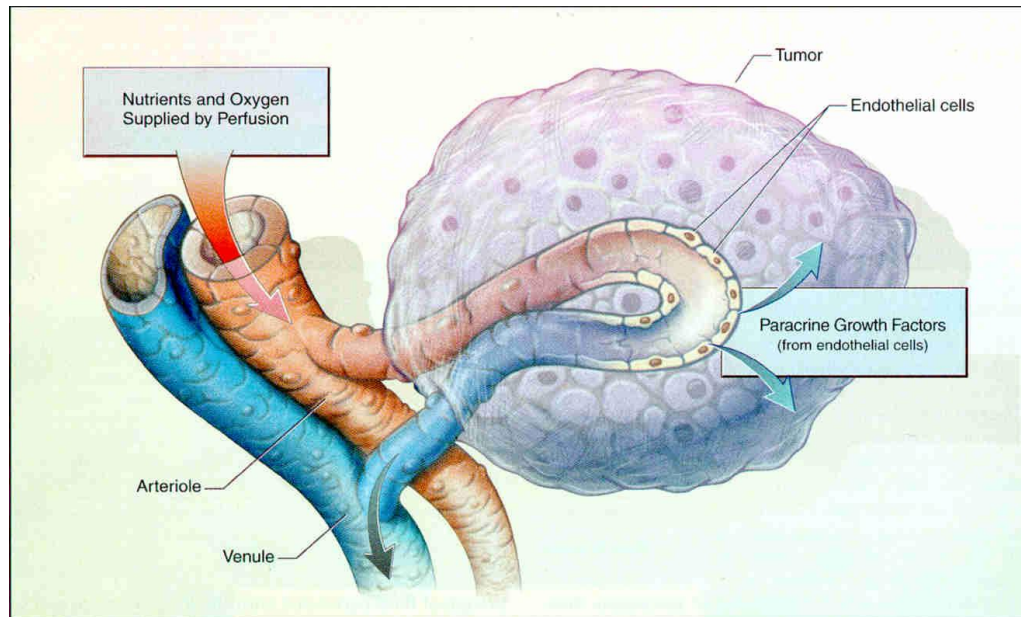
Fonte: Lu, Weaver & Werb (141).

## **2.5 Angiogênese Tumoral e Metástases**

O câncer de mama inclui um grupo heterogêneo de tumores com prognóstico variável. São tumores de alto potencial de malignidade devido a sua capacidade de invasão local e metástases à distância. Caracteriza-se por uma série progressiva de eventos genéticos que ocorrem em um único clone de células, devido a alterações em um número limitado de genes: os oncogenes e genes supressores tumorais. Uma célula transformada sofre sucessivas divisões celulares e mutações até se organizar em um cluster de células tumorais. A organização em forma de tumor exige oxigênio e nutrientes para continuar o crescimento (142, 143).

Segundo Folkman (144), os tumores conseguem permanecer em estado dormente até 1-2 mm, onde o número de células que se proliferam seria igual ao das que morrem. Para um posterior desenvolvimento, os tumores precisam induzir um processo neoangiogênico, iniciado por fatores pró-angiogênicos. Estes fatores induzem as células endoteliais nas vizinhanças dos vasos sanguíneos a degradar sua lâmina basal e migrar em direção ao tumor, que se expande rapidamente para 1,0 a 2,0 cm após a vascularização. A proliferação

endotelial e a formação de novos vasos estabelecem tanto a nutrição para o tumor quanto a rota para que as células neoplásicas entrem na circulação e atinjam outros órgãos à distância (Figura 12) (21, 22).

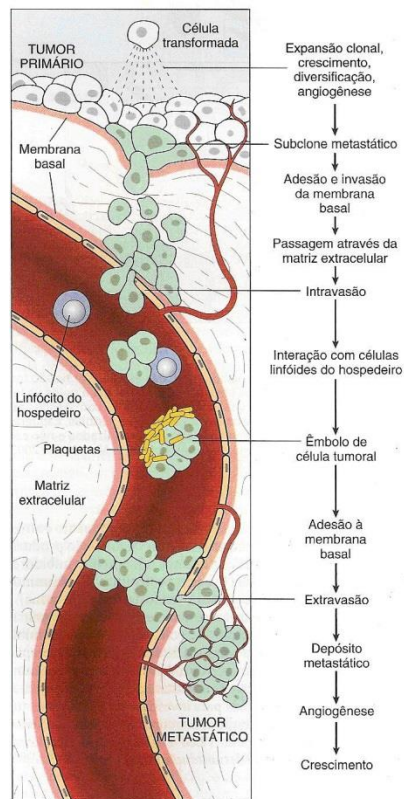


**Figura 12.** A Neovascularização, provocada pelos fatores angiogênicos, aumenta o aporte de oxigênio e nutrientes para o tumor, favorecendo o seu crescimento. Além disso, as células tumorais também são estimuladas pelos fatores de crescimento parácrinos, produzidos pelas células endoteliais capilares: fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento epitelial ligado a heparina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos, fator de crescimento insulin-like I.  
 Fonte: Folkman: N Engl J Med, Volume 333 (26).Dec 28, 1995.1757-1763 (145).

Esta capacidade adquirida de crescimento, invasão e metástase é o que realmente caracteriza o câncer. A metástase é o processo mais preocupante e estudado, pois é a causa da maioria das mortes por câncer e depende de processos intrínsecos à célula ou são iniciados por sinais do ambiente tissular, envolvendo varias etapas. Estas iniciam pela perda da adesão célula-célula; desprendimento de células tumorais do tumor primário; adesão e invasão da membrana basal adjacente, que funciona como barreira para a migração das células tumorais; invasão do tecido conjuntivo adjacente; migração destas células através da matriz extracelular; passagem através da MB e do endotélio vascular, penetrando na corrente circulatória sanguínea ou linfática (intravasão); interação com as células linfóides do hospedeiro; formação de clones celulares na corrente circulatória; adesão ao endotélio e MB; saída das células da corrente circulatória (extravasão); formação de um novo cluster de



células tumorais em outro sítio a distância, dependente da angiogênese para crescer (Figura 13) (142, 146).



**Figura 13.** Ilustração esquemática da cascata metastática, mostrando as etapas sequenciais envolvidas na disseminação hematogênica de um tumor.

Fonte: Robbins & Cotran, Patologia – Bases Patológicas das Doenças 7ª Edição pág. 324 (51).

A chave para o fenótipo angiogênico envolve uma troca local no equilíbrio entre agentes reguladores positivos e negativos do crescimento de microvasos. Tumores podem hiperexpressar um ou mais dos reguladores positivos da angiogênese, mobilizar proteínas angiogênicas para a MEC, recrutar multidões de células como os macrófagos que possuem sua própria proteína angiogênica ou combinar estes processos. As células tumorais secretam as próprias enzimas proteolíticas ou enviam sinais a outras células normais da matriz extracelular e/ou endotélio, estimulando a produção das proteases. A liberação das proteases facilita a perda de adesão célula-célula e a degradação enzimática ativa dos componentes da MB e da MEC. Na borda invasiva do tumor o equilíbrio entre as proteases e seus inibidores tende a favor das proteases, favorecendo a proteólise e a invasão tumoral (147-150).

Algumas proteínas angiogênicas são bem conhecidas, como o VEGF, fator de crescimento básico do fibroblasto (bFGF), fator alfa de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina 8 (IL-8) e as MMPs. Oncogenes como o K-ras e o Her-2 atuam indiretamente na angiogênese por estimular a expressão do VEGF. O gene p53 é conhecido como modulador da neovascularização por regular a expressão do VEGF (27, 28, 147, 148, 151-154).

O VEGF e as MMPs foram alvo de inúmeros estudos, sendo relacionados com vários tumores, como colo-retal, aparelho respiratório, cabeça, pescoço e câncer de mama. Existem evidências do envolvimento do VEGF e das proteases na degradação de elementos da MEC, incluindo a MB, facilitando a invasão tumoral e a progressão do tumor, com implante das células neoplásicas em outros sítios distantes. Para muitos tumores a densidade vascular pode estabelecer um indicador de potencial metastático e pobre sobrevida (21-23, 149).

## **2.6 Fator de Crescimento Endotelial Vascular**

O VEGF é um potente e seletivo fator mitogênico para o endotélio, que pode induzir uma rápida e completa resposta angiogênica. Ele aumenta a permeabilidade vascular e promove a formação de novos vasos, facilitando o crescimento e a metastização tumoral. Pertence a uma família das glicoproteínas (VEGF-A, -B, -C e -D). O mais estudado e conhecido é o VEGF-A, que está relacionado com a indução da angiogênese tumoral. O VEGF-C e o -D ligam-se ao VEGFR-3, atuando nas células endoteliais linfáticas, para induzir a produção de vasos linfáticos (linfogênese) (155-157).

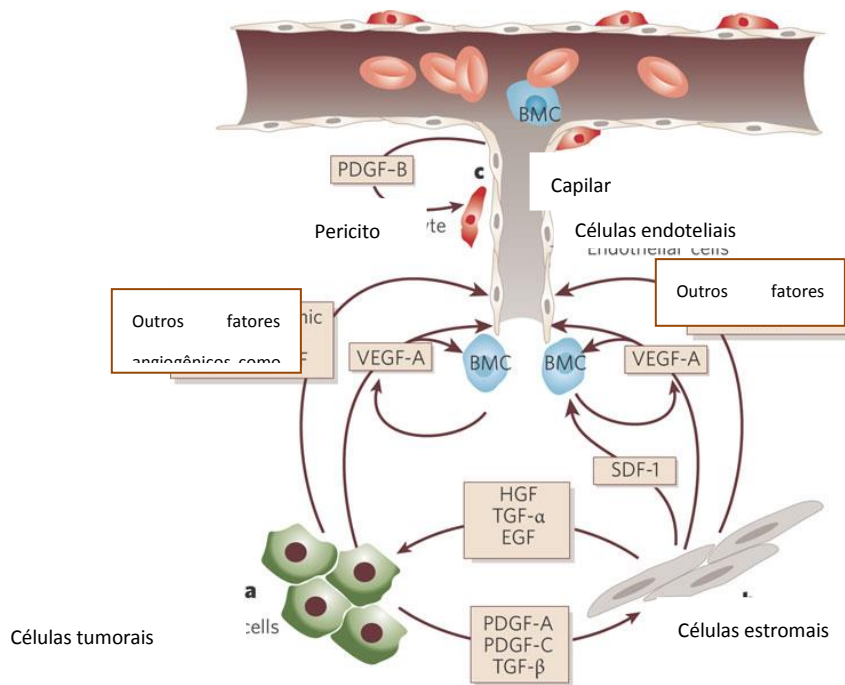
O VEGF é um potente indutor da formação de vasos sanguíneos no desenvolvimento inicial, e tem um papel central no crescimento de novos vasos sanguíneos em adultos (angiogênese). A sua ação é quase exclusivamente no endotélio, onde se encontra o seu maior receptor o VEGFR-2. Além de sua ação mitogênica ele também age induzindo a vasodilatação e aumentando a permeabilidade capilar. O aumento da expressão do VEGF

está relacionado a fatores como hipóxia, HIF-1 $\alpha$  e oncogenes como o K-ras e o Her-2. O gene p53 é conhecido como modulador da neovascularização por regular a expressão do VEGF (148, 155, 156, 158). Estas informações estão resumidamente apresentadas na tabela 3 e na figura 14.

**Tabela 3.** Fator de Crescimento Endotelial Vascular

<b>Proteínas</b>	Membros da família: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D Glicoproteína dimérica com isoformas múltiplas Mutações no VEGF resultam em vasculogênese e angiogênese defeituosa
<b>Produção</b>	Expressa em baixos níveis numa variedade de tecidos adultos e em níveis maiores em alguns locais como nos podócitos do glomérulo e miócitos cardíacos
<b>Agentes indutores</b>	HIF-1 $\alpha$ K-ras TGF- $\beta$ PDGF
<b>Receptores</b>	VGFER-1 VGEFR-2 (células endoteliais) VGEFR-3 (células endoteliais linfáticas) Mutações nos receptores resultam na falta de vasculogênese
<b>Funções</b>	Promove a angiogênese e vasculogênese Aumenta a permeabilidade vascular Estimula a proliferação celular endotelial Estimula a migração celular endotelial

**Abreviaturas:** Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF); Fator de Indução da Hipóxia, subunidade alfa (HIF-1 $\alpha$ ); Proto-oncogene K-ras (K-ras); Fator beta de Transformação do Crescimento (TGF- $\beta$ ); Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF); Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VGFER).  
Fonte: Adaptado de Robbins & Cotran, Patologia – Bases Patológicas das Doenças 7ª Edição pág. 114 (51).



**Figura 14.** Alguns dos fatores moleculares e celulares que estão relacionados com o tumor e o ambiente microvascular: **a.** As células tumorais produzem o VEGF-A e outros fatores angiogênicos como o Fator de Crescimento do Fibroblasto básico (bFGF), angiopietins, interleukin-8, Fator de Crescimento Placentário (PlGF) and VEGF-C. Estes estimulam as células endoteliais locais para proliferar e migrar. **b.** Uma fonte adicional de fatores angiogênicos é o estroma. Este compartimento heterogêneo contém fibroblastos, células inflamatórias e da imunidade. Estas produzem quimiocinas, como o Fator-1 de Células Derivadas do Estroma (SDF-1), que pode recrutar Células angiogênicas derivadas da Medula Óssea (BMC). VEGF-A ou PlGF podem também recrutar BMC. As células tumorais também podem liberar células estromais de recrutamento como subunidade A do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF-A), subunidade C do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF-C) ou Fatores de Transformação do Crescimento (TGF- $\beta$ ). **c.** Células endoteliais produzem PDGF-B, que promove recrutamento de pericitos na microvasculatura após ativação do Receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ).

Fonte: Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target (159).

### 2.6.1 Expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular no câncer de mama

O VEGF é uma proteína importante na carcinogênese mamária, participando do processo de angiogênese, entretanto o efeito da sua expressão na sobrevida varia de acordo com os subtipos de câncer de mama, deixando seu significado prognóstico controverso. Na maioria dos estudos o VEGF não está relacionado com os fatores prognósticos convencionais. Os

dados sugerem que pacientes com altos níveis de VEGF têm uma doença biologicamente mais agressiva, e a convencional terapia adjuvante pode não reduzir o risco de recorrência. Está correlacionado com sobrevida livre de doença e sobrevida global em câncer de mama, predominantemente em doença localmente avançada e doença metastática (160, 161).

Liu et al. (152) estudaram a associação entre a expressão do VEGF em carcinoma invasivo da mama e os subtipos moleculares em 1.788 pacientes. Os autores encontram positividade do VEGF em 72,5% dos casos, sendo que existia uma correlação com os subtipos ( $p < 0,0001$ ), com alta frequência em luminal B, HER-2, e basal-like comparados com luminal A. Entretanto, não encontraram significância para pior sobrevida quando todos os casos foram comparados juntos. A expressão do VEGF estava associada a um aumento de risco para mortalidade (HR: 1,41; 95% CI=1,01, 1,97) e recorrência à distância (HR: 1,49; 95% CI= 1,07, 2,07) entre as mulheres com tumores do tipo luminal A.

Mais de 25 peptídeos angiogênicos foram descobertos e sequenciados, porém somente uma minoria teve sua expressão testada em tumores humanos. Locopo, Fanelli & Gasparini (148) analisaram o significado clínico dos fatores angiogênicos em câncer de mama. O VEGF estava altamente expressado em câncer de mama. Encontraram alta e moderada expressão do VEGF como um fator prognóstico promissor, relacionado à pior sobrevida global e livre de doença.

Uma análise de estudos retrospectivos para avaliar o valor da medida da densidade de microvasos intratumorais, feita por Gasparini (162), demonstrou que esta medida é um fator prognóstico importante em pacientes com linfonodo axilar negativo e positivo. Foi considerado como importante fator prognóstico, estando relacionado à sobrevida global e sobrevida livre de doença ou ambos. Pacientes com câncer de mama em estágio inicial com altos índices de VEGF, tratadas com terapêutica convencional, tem altas taxas de recorrência e morte comparadas com aquelas que apresentam baixos índices de VEGF.

Um estudo conduzido por Zhao et al. (163), envolveu 59 pacientes submetidas à mastectomia radical, mais linfadenectomia axilar completa, com um segmento médio de 48,6 meses. Foram avaliados os níveis de endostatina e VEGF antes e após três semanas

do procedimento cirúrgico. A conclusão foi que os níveis séricos de VEGF diminuíram significativamente após três semanas de remoção do tumor ( $p < 0,01$ ), e os níveis de endostatina não tiveram um decréscimo significativo ( $p > 0,5$ ). Níveis séricos elevados de VEGF foram encontrados em 25 pacientes, com normalização em 19 pacientes após a cirurgia. Das seis pacientes que permaneceram com elevados níveis de VEGF, quatro tiveram recidiva precoce da doença durante o segmento. A análise mostrou que elevados níveis de VEGF pré-operatório estavam associados com pior sobrevida livre de doença ( $p = 0,02$ ).

Hao et al. (164) analisaram através de imuno-histoquímica a expressão do VEGF e da MMP-9 numa série de 76 pacientes com neoplasias mamárias, demonstrando a correlação com dados clinicopatológicos. A avaliação axilar apresentou linfonodos axilares positivos em 41 casos (53,9%). Os autores encontraram altas taxas de expressão de VEGF em 52 (68%) e MMP-9 em 48 (63%). A hiperexpressão do VEGF e da MMP-9 estava associada ao grau histológico ( $p = 0,003$  e  $p = 0,004$ , respectivamente) e linfonodo axilar positivo ( $p < 0,001$ , em ambos). A concomitante hiperexpressão do VEGF e MMP-9 também estava relacionada com metástase em linfonodo axilar ( $p = 0,03$ ). Concluíram que estes marcadores podem determinar um valor prognóstico no linfonodo axilar.

Kim et al. (165) analisaram 84 amostras de tumores de mama, sendo 21 delas carcinomas in situ, e 63 carcinomas invasivos  $\leq 5$  cm. O VEGF foi avaliado por imuno-histoquímica e considerado positivo quando estava presente em mais que 5% no citoplasma das células. Isto ocorreu em 21(100%) casos de carcinoma in situ e em 57 (90,5%) casos de carcinomas invasivos. A MMP-9 foi avaliada por hibridização in situ e estava positiva em 10 (50%) casos de carcinomas in situ e em 22 (44%) casos de carcinomas invasivos.

Por outro lado, um estudo conduzido por Moran et al. (160) avaliou a expressão do VEGF em uma coorte de pacientes com câncer de mama em estagio inicial tratadas com cirurgia conservadora. O VEGF tinha expressão positiva em 56/368 pacientes (15%), contudo não apresentou nenhuma correlação positiva com características clinicopatológicas e sobrevivência global e livre de doença. Quanto ao local de recidiva, nodal ou à distância, também não foram encontrados dados significativos. Os autores encontraram apenas uma

tendência de aumento do VEGF em mulheres negras (26%) em relação às brancas (13%), com  $p= 0,065$ . Resultados semelhantes também foram encontrados por Dhakal et al. (154) em 468 casos de câncer de mama analisando, através da imuno-histoquímica, a imunorreação do VEGF e do VEGFR-1. A alta expressão do VEGF estava significativamente associada com alta expressão do VEGFR-1 ( $p < 0,001$ ). Entretanto nenhuma associação significativa foi encontrada entre eles e a vascularização tumoral, linfonodo positivo e sobrevida.

Arias-Pulido et al. (166) estudaram a expressão do VEGF-A, através de imuno-histoquímica, em 117 casos de carcinoma inflamatório de mama em mulheres, doença esta com alto potencial angiogênico. Em análise univariada, encontrou a expressão do VEGF-A em 62% dos casos, que mostraram estar relacionado à pobre sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes com receptor de estrogênio positivo ( $p < 0.01$  para ambos), receptor de progesterona positivo ( $p= 0,04$  e  $p= 0,03$ ), Her2 positivo ( $p=0,04$  e  $p= 0,03$ ), e linfonodo axilar positivo ( $p < 0,01$  para ambos). O autor sugere que o VEGF-A pode ser usado como marcador prognóstico de sobrevida, e para selecionar casos de baixo e alto risco para morte e sobrevida, facilitando a indicação de terapia anti-angiogênica.

## **2.7 Metaloproteínas da Matriz e Inibidores Teciduais de Metaloproteínas**

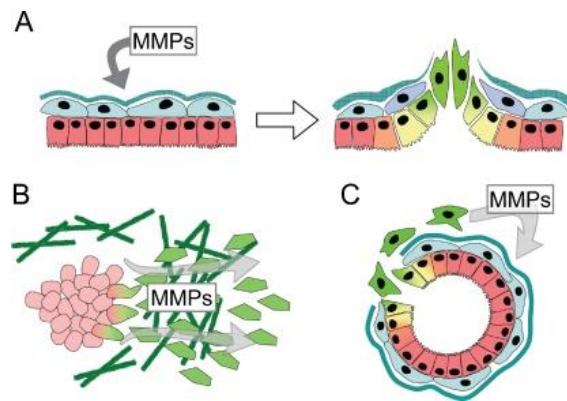
As Metaloproteínas da Matriz Extracelular (MMPs) são endopeptidases neutras da família das proteinases zinco dependentes. Elas têm papel importante nos processos fisiológicos como a embriogênese, remodelação de tecido normal e cicatrização de feridas, onde mantém um balanço com seus inibidores teciduais. Também estão envolvidas em condições patológicas onde existe a ruptura deste equilíbrio, provocando doenças como artrites, retinopatia diabética, psoríase e câncer. Coletivamente estas enzimas podem degradar todos os componentes da MEC, incluindo o colágeno, fibronectina, laminina e glicoproteínas da MB (167, 168).

Elas são sintetizadas como peptídeos por células do tecido conectivo, a maior parte na forma latente (Zimogênios ou pró-enzimas). No espaço extracelular, são proteoliticamente clivadas e ativadas por químicos como os radicais livres. A produção das MMPs é feita por vários tipos de células, incluindo os fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células sinoviais e algumas células malignas. A secreção das MMPs é induzida por certos estímulos como os Fatores de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Interleukin-1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), fagocitose e estresse físico. Todas as MMPs requerem um pH neutro e Ca<sup>+2</sup> para poderem atuar e são inibidas pelos TIMPs. Estes, na maioria, são produzidos pelas células mesenquimatosas, prevenindo a ação descontrolada das MMPs (169, 170).

As MMPs estão envolvidas na degradação da MB e MEC, cuja atividade enzimática auxilia o tumor na invasão e disseminação. Possuem habilidade para degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, como colágeno, laminina, fibronectina, e elastina. Os produtos derivados da clivagem dos componentes da MEC, derivados do colágeno e proteoglicanos, também apresentam atividades promotoras do crescimento, angiogênese e quimiotaxia, facilitando a migração das células tumorais através da MEC afrouxada (171, 173-175).

Recentes achados afirmam que as MMPs desenvolvem um papel importante, como promotoras e mediadoras do processo de transição epitélio-mesenquimal patogênico no câncer de mama. Como podemos ver na figura 14, as MMPs estão associadas a TEM na progressão do tumor através de três distintos mecanismos: A) Através da elevação de níveis de MMPs no microambiente tumoral, podendo induzir diretamente a TEM nas células epiteliais; B) As células neoplásicas que sofreram TEM podem produzir mais MMPs, facilitando a invasão e metástases; C) A TEM pode produzir células estromais não malignas que levam a produção de mais MMPs determinando a progressão do tumor (176).





**Figura 16.** Indução da TEM pelas MMPs.

Fonte: Radisky & Radisky (176).

Os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) são uma família de quatro proteínas (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) de baixo peso molecular, bem identificados em vertebrados e, sua expressão é regulada durante o desenvolvimento e remodelagem tecidual. Os TIMPs são inibidores específicos das Matricinas que participam no controle da atividade das MMPs nos tecidos, exercendo duplo controle, por inibição da forma ativa e do processo de ativação. O TIMP-1 é uma glicoproteína de 28,5 kDa, com preferência pela pró-MMP-9. O TIMP-2, proteína não glicosilada de 21 kDa, e o TIMP-4 exercem afinidade pela pró-MMP-2. A hiperexpressão do TIMP-3 pode induzir a apoptose em células normais e malignas. Os TIMPs ainda estimulam o crescimento de determinadas células, promovem a esteroidogênese, o desenvolvimento de células germinativas e inibem a angiogênese (168, 170, 172, 174, 175, 177).

O papel das MMPs e TIMPs na fisiopatologia tumoral tem gerado um grande interesse nas pesquisas clínicas devido a sua participação no processo de proteólise dos elementos da matriz extracelular, entre eles o colágeno, laminina, fibronectina, tenascina, proteoglicanos e gelatinas e seu envolvimento com tumor invasivo e metastático. A interação entre as células malignas e o tecido benigno peritumoral, incluindo o endotélio vascular, pode servir como um importante mecanismo de regulação para a invasão tumoral e metástases. A habilidade das MMPs de estimular o crescimento celular e facilitar a quebra da MB e da MEC confere a elas um papel importante no processo de invasão e metástase (178, 179).

### **2.7.1 Expressão das Metaloproteínases da Matriz e dos Inibidores Teciduais de Metaloproteínases no câncer de mama**

Roy, Yang & Moses (180) afirmam que as MMPs são potenciais futuros biomarcadores para prognóstico em câncer de mama. Os autores sugerem que estas proteínas participam na inicialização da angiogênese e na manutenção do crescimento vascular, dando suporte para o crescimento do tumor.

Uma pesquisa realizada por Gonzalez et al. (181), comparou a expressão da MMP-9 e MMP-13 no carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal in situ e nos casos mistos. O componente tumoral invasivo apresentava alta expressão das metaloproteínases estudadas, bem como alta expressão de TIMP-1 e TIMP-3.

Um desbalanço entre as MMPs e os TIMPs, em particular a MMP-2 e o TIMP-2 e a MMP-9 e o TIMP-1, favorece a degradação da matriz extracelular, facilitando a invasão e metástases (172). Um trabalho conduzido por Giannelli et al. (182) sugere que este desbalanço MMP/TIMP, especialmente entre a MMP-2/TIMP-2 e a MMP-9/TIMP-1 favoreça a ocorrência de metástases.

Gonzalez et al. (183) realizaram um estudo para determinar a correlação das MMPs e TIMPs com o subtipo luminal A (Re+, HER-2 negativo) e triplo negativo (Re-, RP- e HER-2 negativo). O subtipo triplo negativo apresentou altos escores de MMP-9 e 11, e estavam associados com metástases à distância. No luminal A houve uma alta expressão de MMP-9, MMP-13 e TIMP-2, associadas à curta sobrevida livre de doença.

Talvensaari-Matilla et al. realizaram vários trabalhos para avaliar, através de IHQ, a expressão das MMPs em câncer de mama. Encontraram alta expressão da MMP-2 nos tumores, sendo que estavam correlacionados com curta sobrevida livre de doença e sobrevida global em 5 e 10 anos ( $r= 74,4$ ;  $p< 0,001$ ), e com idade menor que 50 anos ( $r= 4,5$ ;  $p= 0,02$ ). Também encontraram alta expressão da MMP-2 em 98% dos casos com linfonodos fusionados ou com metástases à distância (184-187).

Hirvonen et al. (188) também analisaram por IHQ, tumores de mama T1-2 com linfonodo axilar negativo, em 137 mulheres. Os autores não encontraram relação estatisticamente significativa com a sobrevida, apesar de todas as pacientes MMP-2 negativas estarem vivas em 10 anos, contra 87% das MMP-2 positiva ( $p= 0,07$ ).

A análise IHQ da expressão da MMP-2 e da vascularização tumoral em 75 amostras de tecidos de tumor mamário, realizada por Djonov et al. (189), apresentou correlação significativa com a densidade vascular, sugerindo seu potencial angiogênico no tumor mamário. Outro trabalho publicado por Ranogajec et al. (190), analisou a MMP-2 e 9 em 138 casos de tumores de mama, encontrando uma correlação dos altos níveis de MMP-2 com o tamanho do tumor ( $p= 0,01$ ) e com a presença de novos vasos ( $p= 0,04$ ).

Hao et al. (164) encontraram associação do VEGF ( $p= 0,003$ ) e da MMP-9 ( $p= 0,004$ ) com alto grau histológico e com linfonodos axilares positivos (ambos com  $p < 0,001$ ). Uma tendência negativa entre a expressão da MMP-9 e a invasão vascular, foi encontrada por Baker et al. (191) ao analisarem 44 pacientes com câncer de mama.

Li et. al (192) estudaram 270 casos de câncer de mama linfonodo negativo, mostrando uma associação da MMP-9 com o grau histológico ( $p < 0,002$ ), diâmetro tumoral ( $p= 0,05$ ) e a sobrevida livre de doença ( $p= 0,013$ ). Wu et al. (193) também correlacionaram altos níveis de MMP-9 e TIMP-1 com metástases em linfonodos axilares, estágio clínico avançado e baixa sobrevida livre da doença.

A imunorreatividade da MMP-2 e da MMP-9 em 140 casos de câncer de mama, e a correlação destas com outros fatores clinicopatológicos foi analisada e publicada recentemente por Sullu et al. (194). A MMP-9 apresentou alta expressão em 66% dos casos e estava negativa em 15%. A alta expressão estava correlacionada com o grau histológico ( $p= 0,001$ ), subtipo triplo negativo ( $p= 0,006$ ), receptor de estrogênio negativo ( $p= 0,004$ ) e metástase à distância ( $p= 0,0028$ ). A MMP-2 estava altamente expressa em 75% dos casos, e no subgrupo de pacientes com linfonodos axilares negativos ela estava associada ao receptor de estrogênio negativo e alto grau histológico ( $p= 0,025$  e  $p= 0,026$ ,

respectivamente). Em relação à sobrevida, somente a MMP-9 estava correlacionada a curta sobrevida livre de doença e global ( $p= 0,042$  e  $0,046$ , respectivamente).

A expressão dos TIMPs tem um papel importante na homeostase da matriz extracelular, regulando a atividade das MMPs. Entretanto, este papel atualmente está controverso no estudo da progressão do câncer, devido tanto a sua atividade de inibição das MMPs no carcinoma invasor de mama, como por sua ação anti-apoptose e na angiogênese.

Estudando a influência da expressão da MMP-14, MMP-2 e TIMP-2, conjuntamente, na sobrevida de câncer de mama em 5 anos, Têtu et al. (195) concluíram que casos com alto nível de MMP-14/alto nível de MMP-2/baixo nível de TIMP-2 apresentavam uma sobrevida de 60%, enquanto os casos com baixo nível de MMP-14/ baixo nível de MMP-2/ alto nível de TIMP-2 tinham uma sobrevida maior (74%), porém sem significância estatística.

Os agentes quimioterápicos antracíclicos são consideradas como terapia adjuvante standard no tratamento de câncer de mama inicial, e os trabalhos atuais revelam que tumores de mama com altos níveis de TIMP-1 apresentam uma resistência as antraciclina, mas não aos taxanes (196-198). Além disto, trabalhos publicados por Lipton et al. (26, 199) correlacionaram altos níveis séricos de TIMP-1 como fator preditivo para baixa resposta a terapia endócrina para câncer de mama metastático.

Recentemente foi publicado um estudo de meta-análise, realizado por Lee et al. (200). Os autores avaliaram os níveis séricos de TIMP-1 e alguns parâmetros prognósticos em câncer de mama. Resultados de sobrevida entre altos e baixos níveis séricos de TIMP-1 foram comparados por análise uni e multivariada envolvendo 886 e 844 pacientes com câncer de mama, respectivamente. Pacientes com altos ou elevados níveis de TIMP-1 tinham sobrevida desfavorável, comparadas com aquelas de níveis baixos ou normais, em análise uni e multivariada ( $p < 0,001$  e  $p = 0,033$ ). Em relação ao status do linfonodo axilar e estadiamento clínico, não foi encontrado nenhuma associação.

O TIMP-1 foi analisado em 133 casos de câncer invasor de mama por Nakopoulou et al. (201). A expressão estava aumentada em 60,15% dos casos, com uma relação inversa entre TIMP-1 e grau histológico ( $p = 0,003$ ). Os casos com aumento do TIMP-1 estavam

correlacionados com fatores de prognóstico favorável, principalmente com linfonodo axilar negativo. Ainda as pacientes com TIMP-1 elevado apresentaram uma melhor sobrevida ( $p=0,01$ ). Porém os autores afirmam que o potencial prognóstico do TIMP-1 em câncer de mama não está bem claro. Baker et al. (191) encontrou a redução do TIMP-2 associado ao comprometimento axilar e ao pior índice prognóstico de Nottingham ( $> 3,4$ ), ao contrário, as altas taxas de TIMP-2 estavam associadas a tumores menores que 2,0 cm.

Um desbalanço entre as MMPs e os TIMPs pode determinar o desequilíbrio da MEC e alterar o microambiente, de forma que o crescimento e a invasão das células neoplásicas possam ser facilitados. Têtu et al. (195) em estudo de hibridização in situ, confirmou esta hipótese, analisando o balanço MMP-2/TIMP-2. Os autores encontraram uma pior sobrevida nas pacientes com alta taxa de MMP-2 e baixa de TIMP-2, e uma melhor sobrevida naquelas pacientes com alta taxa de TIMP-2 e baixa de MMP-2. No entanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Outros autores também descreveram a alteração no balanço entre MMPs e TIMPs como responsáveis pelo aumento da produção e atividade das MMPs, desenvolvendo um papel importante na invasão e metástase tumoral. A alteração no balanço MMPs/TIMPs, especialmente as MMPs 2 e 9 e os TIMPs 1 e 2, pode ter profundo efeito na composição da membrana extracelular, afetando varias funções celulares, incluindo a adesão, diferenciação e metástase (155, 201).

### 3 JUSTIFICATIVA

Nesta tese, o autor analisa a casuística do Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período entre 1999 e 2004, buscando identificar as características mais associadas ao risco de recidiva em pacientes com câncer de mama operável.

Considerando a precocidade do surgimento de metástases na história natural do câncer de mama, torna-se imperioso o estudo de variáveis clínicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas, associadas a maior probabilidade da presença de metástases subclínicas. Desta forma, poder-se-á identificar, através de critérios mais seguros, os pacientes que necessitem ou não tratamentos complementares à cirurgia e à radioterapia.

## **4 Objetivos**

### **4.1 Objetivo principal**

Descrever as características clínicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas dos pacientes com câncer de mama operável tratados no Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período entre 1999-2004.

### **4.2 Objetivos secundários**

A) Estudar o impacto das variáveis: idade, raça, menarca, escolaridade, índice de masa corporal, diâmetro do tumor, tipo histológico, grau histológico, invasão vascular, status do linfonodo axilar, número de linfonodos axilares metastáticos, receptor de estrogênio e progesterona, HER2, Ki-67, p53, VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 e subtipos moleculares no estadiamento da doença, tempo de sobrevivência livre de recorrência e sobrevivência global desta população de pacientes.

B) Estudar as potenciais correlações existentes entre idade, raça, menarca, escolaridade, índice de massa corporal, diâmetro do tumor, tipo histológico, grau histológico, invasão vascular, status do linfonodo axilar, número de linfonodos axilares metastáticos, receptor de estrogênio e progesterona, HER2, Ki-67, p53, VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 e subtipos moleculares nesta população de pacientes.

## 5 Referências bibliográficas

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
3. Boyle P. Breast cancer control: signs of progress, but more work required. *Breast*. 2005;14(6):429-38.
4. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(17):2813-20.
5. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The lancet oncology*. 2008;9(8):730-56.
6. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(8):1893-907.
7. INCA. Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil. Available at <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>(accessed: December 15, 2012)
8. DATASUS. Informações de saúde, mortalidade - Brasil 2012. Available at <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/>(accessed: December 15, 2012).
9. GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality, prevalence and disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008. Available at <http://globocan.iarc.fr/>(accessed: December 15, 2012).
10. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(7):2302-10.
11. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*. 2011;5(1):5-23.
12. McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1991;83(3):154-5.
13. Derleth C, Mayer IA. Antiangiogenic therapies in early-stage breast cancer. *Clinical breast cancer*. 2010;10 Suppl 1:E23-31.



14. Munagala R, Aqil F, Gupta RC. Promising molecular targeted therapies in breast cancer. *Indian journal of pharmacology*. 2011;43(3):236-45.
15. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):3797-803.
16. Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN. Emerging targeted therapies for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(20):3366-79.
17. Pircher A, Hilbe W, Heidegger I, Dreves J, Tichelli A, Medinger M. Biomarkers in tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(10):7077-99.
18. Perez EA, Spano JP. Current and emerging targeted therapies for metastatic breast cancer. *Cancer*. 2012;118(12):3014-25.
19. Rykala J, Przybylowska K, Majsterek I, Pasz-Walczak G, Sygut A, Dziki A, et al. Angiogenesis markers quantification in breast cancer and their correlation with clinicopathological prognostic variables. *Pathology oncology research : POR*. 2011;17(4):809-17.
20. Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):3789-96.
21. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(8):1782-90.
22. Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem cells*. 1997;15(3):180-9.
23. Garbett EA, Reed MW, Stephenson TJ, Brown NJ. Proteolysis in human breast cancer. *Molecular pathology : MP*. 2000;53(2):99-106.
24. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clinical Medicine Insights Oncology*. 2010;4:15-34.
25. Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. Tumor microenvironment and progression. *Journal of surgical oncology*. 2011;103(6):468-74.
26. Lipton A, Leitzel K, Chaudri-Ross HA, Evans DB, Ali SM, Demers L, et al. Serum TIMP-1 and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen in metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(16):2653-8.
27. Mannello F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us? *BMC medicine*. 2011; doi: 10.1186/1741-7015-9-95
28. Yang H, Wang Y, Li Y, Zhang L, Deng Y, Qi D, et al. Roles of matrix metalloproteinase-26 in the growth, invasion and angiogenesis of breast cancer. *Oncology letters*. 2012;4(4):832-6.
29. Kuvaja P, Hulkkonen S, Pasanen I, Soini Y, Lehtonen S, Talvensaari-Mattila A, et al. Tumor tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in hormone-independent breast

cancer might originate in stromal cells, and improves stratification of prognosis together with nodal status. *Experimental cell research*. 2012;318(10):1094-103.

30. Waleh NS, Murphy BJ, Zaveri NT. Increase in tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) levels and inhibition of MMP-2 activity in a metastatic breast cancer cell line by an anti-invasive small molecule SR13179. *Cancer letters*. 2010;289(1):111-8.

31. Kohrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC cancer*. 2009; doi:10.1186/1471-2407-9-188

32. Blanco MA, Kang Y. Signaling pathways in breast cancer metastasis - novel insights from functional genomics. *Breast cancer research : BCR*. 2011; doi: 10.1186/bcr2831

33. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine*. 2010; doi: 10.1371/journal.pmed.1000279.

34. Vollan HK, Caldas C. The breast cancer genome--a key for better oncology. *BMC cancer*. 2011; doi:10.1186/1471-2407-11-501.

35. Ginsburg OM, Love RR. Breast cancer: a neglected disease for the majority of affected women worldwide. *The breast journal*. 2011;17(3):289-95.

36. Bultitude MF, Fentiman IS. 16. Breast cancer in older women. *International journal of clinical practice*. 2002;56(8):588-90.

37. Yancik R, Ries LA. Aging and cancer in America. Demographic and epidemiologic perspectives. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2000;14(1):17-23.

38. Turner J, Kelly B, Swanson C, Allison R, Wetzig N. Psychosocial impact of newly diagnosed advanced breast cancer. *Psycho-oncology*. 2005;14(5):396-407.

39. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *International journal of epidemiology*. 2005;34(2):405-12.

40. Yau C, Fedele V, Roydasgupta R, Fridlyand J, Hubbard A, Gray JW, et al. Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone-dependent breast cancers. *Breast cancer research : BCR*. 2007; doi: 10.1186/bcr1765

41. Daidone MG, Coradini D, Martelli G, Veneroni S. Primary breast cancer in elderly women: biological profile and relation with clinical outcome. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2003;45(3):313-25.

42. Fernandopulle SM, Cher-Siangang P, Tan PH. Breast carcinoma in women 35 years and younger: a pathological study. *Pathology*. 2006;38(3):219-22.

43. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62(1):10-29.

44. Bleyer A, Welch HG. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *The New England journal of medicine*. 2012;367(21):1998-2005.

45. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European journal of cancer*. 2010;46(4):765-81.
46. Freitas-Junior R, Gonzaga CM, Freitas NM, Martins E, Dardes Rde C. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. *Clinics*. 2012;67(7):731-7.
47. Lee BL, Liedke PE, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *The lancet oncology*. 2012;13(3):e95-e102.
48. Brasil, Decreto Lei N° 11.664 de 30 de Abril de 2008. Dispõe sobre a efetivação de ações de saúde que assegurem a prevenção, detecção, o tratamento e o seguimento dos cânceres de colo uterino e de mama, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. *Diário Oficial da União, Republica Federativa do Brasil-Imprensa Nacional, Brasília*, p. 1, 30 de Abril de 2008.
49. Brasil, Portarias N° 18 e 19 de 25 de Julho de 2012, Ministério da Saúde – Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, que incorporam o medicamento Trastuzumabe no Sistema Único de Saúde para o tratamento de câncer de mama Inicial e localmente avançado. *Diário Oficial da União, Republica Federativa do Brasil-Imprensa Nacional, Brasília*, p. 57, 25 de Julho de 2012.
50. Brasil, Decreto Lei N° 12.732, de 22 de Novembro de 2012. Dispõe sobre o primeiro tratamento de paciente com neoplasia maligna comprovada e estabelece prazo para seu início. *Diário Oficial da União, Republica Federativa do Brasil-Imprensa Nacional, Brasília*, p.1, 22 de Novembro de 2012.
51. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Neoplasias. *Patologia - Bases Patológicas da Doença*. 7a ed. Rio de Janeiro, Brasil.: Elsevier; 2005. p. 281-333.
52. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
53. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
54. Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prevost G, Zimber A, et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2008;(4-5):123-51.
55. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *The New England journal of medicine*. 2004;350(14):1430-41.
56. Casey T, Bond J, Tighe S, Hunter T, Lintault L, Patel O, et al. Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2009;114(1):47-62.
57. Folkman J. Angiogenesis. *Annual review of medicine*. 2006;57:1-18.
58. Li CI, Malone KE, Daling JR. Differences in breast cancer hormone receptor status and histology by race and ethnicity among women 50 years of age and older. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for*

Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2002;11(7):601-7.

59. Fenton JJ, Barton MB, Geiger AM, Herrinton LJ, Rolnick SJ, Harris EL, et al. Screening clinical breast examination: how often does it miss lethal breast cancer? *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2005;2005(35):67-71.

60. Habel LA, Stanford JL. Hormone receptors and breast cancer. *Epidemiologic reviews*. 1993;15(1):209-19.

61. Peppercorn J, Partridge AH. Breast cancer in young women: a new color or a different shade of pink? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008 Jul 10;26(20):3303-5.

62. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(10):791-9.

63. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.

64. Wellings SR. A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. *Pathology, research and practice*. 1980;166(4):515-35.

65. Menke C. Complicações clínicas do câncer de mama. *Rotinas em Mastologia*. Porto Alegre, RS, Brasil: ARTMED; 2007. p. 221-25.

66. Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no cancer de mama feminina. *Rev Bras Cancerologia*. 2002;48(1):113-31.

67. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1998;11(2):155-68.

68. Winstanley J, Cooke T, George WD, Murray G, Holt S, Croton R, et al. The long term prognostic significance of oestrogen receptor analysis in early carcinoma of the breast. *British journal of cancer*. 1991;64(1):99-101.

69. Roukos DH, Briasoulis E. Individualized preventive and therapeutic management of hereditary breast ovarian cancer syndrome. *Nature clinical practice Oncology*. 2007;4(10):578-90.

70. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1997;47(1):28-51.

71. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2010;120(2):293-308.

72. Clark GM. Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast cancer research and treatment*. 1994;30(2):117-26.

73. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1994;12(5):888-94.

74. Jayasinghe UW, Taylor R, Boyages J. Is age at diagnosis an independent prognostic factor for survival following breast cancer? *ANZ journal of surgery*. 2005;75(9):762-7.
75. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63(1):181-7.
76. Verschraegen C, Vinh-Hung V, Cserni G, Gordon R, Royce ME, Vlastos G, et al. Modeling the effect of tumor size in early breast cancer. *Annals of surgery*. 2005;241(2):309-18.
77. Guerra I, Algorta J, Diaz de Otazu R, Pelayo A, Farina J. Immunohistochemical prognostic index for breast cancer in young women. *Molecular pathology : MP*. 2003;56(6):323-7.
78. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(19):3153-8.
79. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer*. 1994;74(1 Suppl):381-400.
80. Rattan B, Manjari M, Kahlon SK, Kalra N, Bhalla A, Paul S. The Immunohistochemical Expression of the Oestrogen Receptor (ER), HER-2/NEU and Cytokeratin 8/18 and 5/6 in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2012;6(9):1495-8.
81. Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics*. 1993;17(1):263-5.
82. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(12):4258-65.
83. Mann GB, Fahey VD, Feleppa F, Buchanan MR. Reliance on hormone receptor assays of surgical specimens may compromise outcome in patients with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(22):5148-54.
84. Buzdar AU. The ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial: an update. *Clinical breast cancer*. 2004;5 Suppl 1:S6-S12.
85. Kruger K, Stefansson IM, Collett K, Arnes JB, Aas T, Akslen LA. Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer. *Breast*. 2012;22(3):282-8.
86. De Potter CR, Schelfhout AM. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 1995;426(2):107-15.
87. Ito Y, Tokudome N, Sugihara T, Takahashi S, Hatake K. Does lapatinib, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor, constitute a breakthrough in the treatment of breast cancer? *Breast cancer*. 2007;14(2):156-62.

88. Fentiman IS. Fixed and modifiable risk factors for breast cancer. *International journal of clinical practice*. 2001;55(8):527-30.
89. Pertschuk LP, Feldman JG, Kim DS, Nayeri K, Eisenberg KB, Carter AC, et al. Steroid hormone receptor immunohistochemistry and amplification of c-myc protooncogene. Relationship to disease-free survival in breast cancer. *Cancer*. 1993;71(1):162-71.
90. Hanna W, Mobbs BG. Comparative evaluation of ER-ICA and enzyme immunoassay for the quantitation of estrogen receptors in breast cancer. *American journal of clinical pathology*. 1989;91(2):182-6.
91. Munster PN, Norton L. Predictive factor for the response to adjuvant therapy with emphasis in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2001;3(6):361-4.
92. Grabau DA, Thorpe SM, Knoop A, Vach W, Schroder HD, Blichert-Toft M, et al. Immunohistochemical assessment of oestrogen and progesterone receptors: correlations with the DCC method and clinical outcome in primary breast cancer patients. *Breast*. 2000;9(4):208-17.
93. Patani N, Martin LA, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;133(1):1-13.
94. Osborne CK, Schiff R, Arpino G, Lee AS, Hilsenbeck VG. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *Breast*. 2005;14(6):458-65.
95. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9793):771-84.
96. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(10):1973-9.
97. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
98. Hicks DG, Kulkarni S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2008;132(6):1008-15.
99. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC cancer*. 2007;7:153.
100. Gobbi H, Rocha R, Nunes C. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44(2):131-40.

101. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(24):1991-8.
102. van de Vijver MJ, Mooi WJ, Wisman P, Peterse JL, Nusse R. Immunohistochemical detection of the neu protein in tissue sections of human breast tumors with amplified neu DNA. *Oncogene*. 1988;2(2):175-8.
103. Menard S, Valagussa P, Pilotti S, Gianni L, Biganzoli E, Boracchi P, et al. Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(2):329-35.
104. Leong AS, Lee AK. Biological indices in the assessment of breast cancer. *Clinical molecular pathology*. 1995;48(5):M221-38.
105. Ryden L, Landberg G, Stal O, Nordenskjold B, Ferno M, Bendahl PO. HER2 status in hormone receptor positive premenopausal primary breast cancer adds prognostic, but not tamoxifen treatment predictive, information. *Breast cancer research and treatment*. 2008;109(2):351-7.
106. Beenken SW, Grizzle WE, Crowe DR, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Annals of surgery*. 2001;233(5):630-8.
107. Jones S, Clark G, Koleszar S, Ethington G, Mennel R, Paulson S, et al. Low proliferative rate of invasive node-negative breast cancer predicts for a favorable outcome: a prospective evaluation of 669 patients. *Clinical breast cancer*. 2001;1(4):310-4; discussion 5-7.
108. Sahlberg KK, Hongisto V, Edgren H, Makela R, Hellstrom K, Due EU, et al. The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells. *Molecular oncology*. 2013;7(3):392-401.
109. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(22):1656-64.
110. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics*. 1991;11(2):476-7.
111. Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer research*. 1997;57(22):4987-91.
112. Luporsi E, Andre F, Spyrtos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast cancer research and treatment*. 2012;132(3):895-915.

113. Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O. Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant. *Human pathology*. 2013;44(1):39-46.
114. Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2009;116(1):53-68.
115. Gottardi O, Tabiaddon D, Scanzi F, Bono A, Majno M, Ferrari M, et al. Clinical and prognostic usefulness of Ki67 determination in breast carcinoma. *Pathologica*. 1992;84(1094):15-22.
116. Selz J, Stevens D, Jouanneau L, Labib A, Le Scodan R. Prognostic value of molecular subtypes, ki67 expression and impact of postmastectomy radiation therapy in breast cancer patients with negative lymph nodes after mastectomy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;84(5):1123-32.
117. Biglia N, Defabiani E, Ponzzone R, Mariani L, Marengo D, Sismondi P. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(1):69-83.
118. Pierga JY, Girre V, Laurence V, Asselain B, Dieras V, Jouve M, et al. Characteristics and outcome of 1755 operable breast cancers in women over 70 years of age. *Breast*. 2004;13(5):369-75.
119. Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tuchler H. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Annals of surgery*. 1993;218(1):13-21.
120. Ioachim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA, Goussia AC, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer research*. 2000;20(6B):4221-5.
121. Tanyi J, Tory K, Bankfalvi A, Shroder W, Rath W, Fuzesi L. Analysis of p53 mutation and cyclin D1 expression in breast tumors. *Pathology oncology research : POR*. 1999;5(2):90-4.
122. Al-Moundhri M, Nirmala V, Al-Mawaly K, Ganguly S, Burney I, Rizvi A, et al. Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer. *Pathology oncology research : POR*. 2003;9(4):226-31.
123. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwaage D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(1):86-96.
124. Dumay A, Feugeas JP, Wittmer E, Lehmann-Che J, Bertheau P, Espie M, et al. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;132(5):1227-31.



125. Morrison DH, Rahardja D, King E, Peng Y, Sarode VR. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *British journal of cancer*. 2012;107(2):382-7.
126. Chen MB, Zhu YQ, Xu JY, Wang LQ, Liu CY, Ji ZY, et al. Value of TP53 status for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a meta-analysis. *PLoS one*. 2012; doi: 10.1371/journal.pone.0039655
127. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
128. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(16):5678-85.
129. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008;52(1):108-18.
130. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(32):4273-8.
131. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(5):1368-76.
132. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(8):1736-47.
133. Cintra JR, Teixeira MT, Diniz RW, Goncalves Junior H, Florentino TM, Freitas GF, et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2012;58(2):178-87.
134. Hess KR, Esteva FJ. Effect of HER2 status on distant recurrence in early stage breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2013;137(2):449-55.
135. Irvin WJ, Jr., Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *European journal of cancer*. 2008;44(18):2799-805.
136. Dawood S, Hu R, Homes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Connolly J, et al. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. *Breast cancer research and treatment*. 2011;126(1):185-92.
137. Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernandez FA, Buelta L, Val-Bernal JF. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with invasive breast carcinoma by a combination

of classical and biological prognostic factors. *Pathology, research and practice*. 1999;195(9):611-8.

138. Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R, Vana J, Murphy GP. Breast cancer in the medial half. Results of 1978 National Survey of the American College of Surgeons. *Cancer*. 1983;51(8):1333-8.

139. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2000;124(7):966-78.

140. Ghajar CM, Bissell MJ. Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochemistry and cell biology*. 2008;130(6):1105-18.

141. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology*. 2012;196(4):395-406.

142. Byers S, Park M, Sommers C, Seslar S. Breast carcinoma: a collective disorder. *Breast cancer research and treatment*. 1994;31(2-3):203-15.

143. Zhang YG, Du J, Tian XX, Zhong YF, Fang WG. Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas. *Chinese medical journal*. 2007;120(18):1597-605.

144. Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *Journal of pediatric surgery*. 2007;42(1):1-11.

145. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *The New England journal of medicine*. 1995;333(26):1757-63.

146. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*. 1993;71(4):1368-83.

147. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *European journal of cancer*. 2000;36(13 Spec No):1621-30.

148. Locopo N, Fanelli M, Gasparini G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1998;52(1-3):159-73.

149. Fox SB, Generali DG, Harris AL. Breast tumour angiogenesis. *Breast cancer research : BCR*. 2007;9(6):216.

150. Choi JY, Jang YS, Min SY, Song JY. Overexpression of MMP-9 and HIF-1 $\alpha$  in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions. *Journal of breast cancer*. 2011;14(2):88-95.

151. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell cycle*. 2006;5(16):1779-87.

152. Liu Y, Tamimi RM, Collins LC, Schnitt SJ, Gilmore HL, Connolly JL, et al. The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the Nurses' Health Study. *Breast cancer research and treatment*. 2011;129(1):175-84.

153. Mylona E, Nomikos A, Magkou C, Kamberou M, Papassideri I, Keramopoulos A, et al. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. *Histopathology*. 2007;50(3):338-47.
154. Dhakal HP, Naume B, Synnestvedt M, Borgen E, Kaaresen R, Schlichting E, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in invasive breast carcinoma: prognostic significance and relationship with markers for aggressiveness. *Histopathology*. 2012;61(3):350-64.
155. Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast cancer research : BCR*. 2003;5(3):140-6.
156. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
157. Claesson-Welsh L. Blood vessels as targets in tumor therapy. *Upsala journal of medical sciences*. 2012;117(2):178-86.
158. Zhu L, Loo WT, Cheng CW, Chow LW. Possible predictive markers related to micro-metastasis in breast cancer patients. *Oncology reports*. 2006;15(5):1217-23.
159. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438(7070):967-74.
160. Moran MS, Yang Q, Goyal S, Harris L, Chung G, Haffty BG. Evaluation of vascular endothelial growth factor as a prognostic marker for local relapse in early-stage breast cancer patients treated with breast-conserving therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;81(5):1236-43.
161. Wang Z, Shi Q, Wang Z, Gu Y, Shen Y, Sun M, et al. Clinicopathologic correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1alpha in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathology, research and practice*. 2011;207(8):505-13.
162. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *The oncologist*. 2000;5 Suppl 1:37-44.
163. Zhao J, Yan F, Ju H, Tang J, Qin J. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer letters*. 2004;204(1):87-95.
164. Hao L, Zhang C, Qiu Y, Wang L, Luo Y, Jin M, et al. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer letters*. 2007;253(1):34-42.
165. Kim HJ, Park CI, Park BW, Lee HD, Jung WH. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Yonsei medical journal*. 2006;47(3):333-42.
166. Arias-Pulido H, Chaher N, Gong Y, Qualls C, Vargas J, Royce M. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. *BMC cancer*. 2012;12:298.

167. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(2):267-85.
168. Kubben FJ, Sier CF, van Duijn W, Griffioen G, Hanemaaijer R, van de Velde CJ, et al. Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer. *British journal of cancer*. 2006;94(7):1035-40.
169. Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1998;50(2):97-116.
170. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *The oncologist*. 2001;6(5):415-27.
171. Chabottaux V, Noel A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clinical & experimental metastasis*. 2007;24(8):647-56.
172. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003;92(8):827-39.
173. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1991;5(8):2145-54.
174. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast cancer research : BCR*. 2000;2(4):252-7.
175. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(8):781-92.
176. Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2010;15(2):201-12.
177. Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Seminars in cancer biology*. 2002;12(2):131-8.
178. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer research*. 1991;51(18 Suppl):5054s-9s.
179. Kargozaran H, Yuan SY, Breslin JW, Watson KD, Gaudreault N, Breen A, et al. A role for endothelial-derived matrix metalloproteinase-2 in breast cancer cell transmigration across the endothelial-basement membrane barrier. *Clinical & experimental metastasis*. 2007;24(7):495-502.
180. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5287-97.
181. Gonzalez LO, Junquera S, del Casar JM, Gonzalez L, Marin L, Gonzalez-Reyes S, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pure and

mixed invasive and in situ ductal carcinomas of the breast. *Human pathology*. 2010;41(7):980-9.

182. Giannelli G, Erriquez R, Fransvea E, Daniele A, Trerotoli P, Schittulli F, et al. Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;109(5):782-5.

183. Gonzalez LO, Corte MD, Junquera S, Gonzalez-Fernandez R, del Casar JM, Garcia C, et al. Expression and prognostic significance of metalloproteases and their inhibitors in luminal A and basal-like phenotypes of breast carcinoma. *Human pathology*. 2009;40(9):1224-33.

184. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *British journal of cancer*. 2003;89(7):1270-5.

185. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer*. 1998;83(6):1153-62.

186. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. MMP-2 positivity and age less than 40 years increases the risk for recurrence in premenopausal patients with node-positive breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*. 1999;58(3):287-93.

187. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast cancer research and treatment*. 2001;65(1):55-61.

188. Hirvonen R, Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1-2)N0 breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*. 2003;77(1):85-91.

189. Djonov V, Cresto N, Aebersold DM, Burri PH, Altermatt HJ, Hristic M, et al. Tumor cell specific expression of MMP-2 correlates with tumor vascularisation in breast cancer. *International journal of oncology*. 2002;21(1):25-30.

190. Ranogajec I, Jakic-Razumovic J, Puzovic V, Gabrilovac J. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and aminopeptidase N/CD13 in breast cancer patients. *Medical oncology*. 2012;29(2):561-9.

191. Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Molecular pathology : MP*. 2002;55(5):300-4.

192. Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*. 2004;88(1):75-85.

193. Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F, et al. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;122(9):2050-6.

194. Sullu Y, Demirag GG, Yildirim A, Karagoz F, Kandemir B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathology, research and practice*. 2011;207(12):747-53.
195. Tetu B, Brisson J, Wang CS, Lapointe H, Beaudry G, Blanchette C, et al. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast cancer research : BCR*. 2006;8(3):R28. doi:10.1186/bcr1503.
196. Willemoie GL, Hertel PB, Bartels A, Jensen MB, Balslev E, Rasmussen BB, et al. Lack of TIMP-1 tumour cell immunoreactivity predicts effect of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in patients (n=647) with primary breast cancer. A Danish Breast Cancer Cooperative Group Study. *European journal of cancer*. 2009;45(14):2528-36.
197. Tang SC. Taxanes in the adjuvant treatment of early breast cancer, emerging consensus and unanswered questions. *Cancer investigation*. 2009;27(5):489-95.
198. Schmitt M, Sweep FC. Tissue inhibitor metalloproteinase type-1 (TIMP-1), a novel cancer biomarker predicting response of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in patients afflicted with primary breast cancer. *European journal of cancer*. 2009;45(14):2444-6.
199. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Evans DB, Hamer P, et al. Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 level predicts decreased response and survival in metastatic breast cancer. *Cancer*. 2007;109(10):1933-9.
200. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Serum TIMP-1 predicts survival outcomes of invasive breast carcinoma patients: a meta-analysis. *Archives of medical research*. 2011;42(6):463-8.
201. Nakopoulou L, Giannopoulou I, Lazaris A, Alexandrou P, Tsirmpa I, Markaki S, et al. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2003;111(11):1027-36.

## 6 Article

### **Clinical, pathological and immunohistochemical characteristics of patients with operable breast cancer: The experience of an academic institution in Southern Brazil**

Flavio Cabreira Jobim<sup>\*‡</sup>, Diego de Mendonça Uchoa<sup>†</sup>, Dennis Baroni Cruz<sup>†</sup>, Panait Kosmos Nicolau<sup>‡</sup>, Gilberto Schwartzmann<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas; <sup>†</sup>Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil; <sup>‡</sup>Serviço de Mastologia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

Financial support: Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Correspondence:

Flavio Cabreira Jobim

Avenida Nossa Senhora das Dores 2270/1101

CEP: 97050-530 - Santa Maria, RS, Brazil.

e-mail: Jobim.f@gmail.com and 00140844@ufrgs.br

**ABSTRACT:** The aim of this study was to describe the clinical, anatomopathological and immunohistochemical characteristics of 86 patients with operable breast cancer treated at a single academic institution in Southern Brazil. The impact of these characteristics on disease staging, disease-free survival and overall survival was described. This is retrospective cohort study of women with primary breast cancer, subjected to surgical and adjuvant treatment between July 1999 and December 2004. Clinical, pathological and immunohistochemical data (ER, PR, HER2, Ki-67 and p53) were retrieved from hospital files. The expression of VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 was analyzed using the immunohistochemical techniques. Continuous variables were assessed with Spearman's rank correlation coefficient, or the Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis H tests. Pearson's  $\chi^2$  test was employed to assess categorical variables. The possibility of survival was estimated using the non-parametric Kaplan-Meier estimator and the semiparametric Cox regression model. Survival curves were compared using the statistical log-rank test. CI was calculated at 95% and p values <0.05 were considered statistically significant. Disease-free survival and overall survival at 5 and 10 years were 82.2% and 90.2%, and 68% and 82.9%, respectively. Tumor diameter (p= 0.01), number of positive lymph nodes (p= 0.00; p= 0.03), and stage (p= 0.00; p= 0.02) were isolated risk factors for relapse and death. HER2 overexpression was an isolated risk factor for relapse (p= 0.04). Tumor grade and vascular involvement were also associated with adverse outcome. Other factors such as hormone receptor expression and Ki-67 expression were not clearly associated with prognosis probably due to insufficient number of patients. Further studies should include information on tumor molecular profile, for a better characterization of the potential aggressiveness of the disease.

Keywords: breast cancer, angiogenesis, metalloproteases, vascular endothelial growth factor, immunohistochemistry, survival.



## **Introduction**

Although previously regarded as a disease of developed countries, breast cancer has also become a concern for developing countries. The World Health Organization (WHO) estimated approximately 1.38 million new cases and 458,000 deaths worldwide for 2008 [1, 2]. Incidence rates, on the rise for almost a century, have declined somewhat in recent decades, particularly in more developed countries [3].

In the USA, Coleman et al. [4] analyzed data from 1990 to 1994, concluding that annual breast cancer mortality rate declined by 2%. However, incidence and mortality rates are still rising among women in many European countries, Asia, Latin America, and some African nations [1, 2, 5]. For the year 2013, 52,680 new cases of breast cancer are expected in Brazil, representing the highest incidence of malignancy among women, with a mortality rate of 12.6 / 100,000, and 12,705 deaths in 2010 [6].

Tumor diameter, axillary lymph node involvement, hormone receptors, Ki-67 and expression of the protein HER2 are among the main factors used to decide about postoperative adjuvant therapy in women with loco-regional disease. However, these factors reflect only in part tumor aggressiveness [7, 8]. Molecular profiling of the tumor is also gaining relevance as an additional guide for adjuvant treatment decisions in patients with early disease. In the present study, the authors describe the clinical, anatomopathological (AP) and immunohistochemical (IHC) characteristics of a group of patients with operable breast cancer treated in our institutions between the years 1999-2004.

## **Patients and Methods**

The study population comprised a hospital-based retrospective cohort of women diagnosed with operable breast cancer at Breast Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil, between the years 1999-2004.

Data were obtained from 95 patients, including information on clinical, AP and IHC. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (IRB) and the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

The variables were collected from hospital records and categorized, as shown in Tables 1 and 4. The histological grade was classified in accordance with the Scarff-Bloom-Richardson scale (GI, GII, GIII) [9]; vascular invasion: presence of at least one tumor cell nest, clearly visible inside the vascular lumen, detected using the hematoxylin-eosin method; pathological stage (pTNM) according to the International Union Against Cancer – UICC [10]; for biologic markers, the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines were used: positive estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status when  $\geq 1\%$  of immunoreactive tumor cell nuclei were found [11]; human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), considered positive when IHC staining was 3+ (uniform, intensive membrane staining,  $>30\%$  of invasive tumor cells) [12]; cell proliferation antigen (Ki-67), positive when expression was  $\geq 14\%$ ; mutant protein p53 (p53), positive when expression was  $10\%$ ; p) tumor classification in molecular subtypes as recommended by the 12th St Gallen International Breast Cancer Conference - 2011: luminal A, luminal B, HER-2-overexpressing and triple-negative [13].

For tumor evaluation, hematoxylin-eosin (HE) slides were reviewed and a paraffin block for each patient was set aside for IHC analysis of VEGF, MMP-2 and 9, TIMP-1 and 2. Nine cases were excluded from the series: two due to carcinomas in situ, one due to bilateral carcinoma, one due to lack of data in the hospital file, and five patients due to insufficient material in the paraffin block. Thus, 86 out of 95 cases were included in the final analysis.

For analysis of disease-free survival and overall survival, the following data were also collected: a) dates of surgery, relapse, death and last visit; b) type of recurrence (local or distant); c) cause of death (due to the disease or other causes). Disease-free survival was defined as the time elapsed between primary breast cancer surgery and the event of interest (recurrence), diagnosed by clinical examination or laboratory testing, or until the last doctor's visit (censored) for those without occurrence of the event; Overall survival was defined as the

time elapsed between breast cancer surgery and the event of interest or the date of the last visit for those without occurrence of the event.

## **Immunohistochemistry**

The IHC was applied to measure antigen expression in tumors. Immunoreaction was analyzed qualitatively and quantitatively. The qualitative estimate was based on the intensity of cytoplasmic staining in neoplastic cells using the following scores: zero (no staining), one (mild staining), two (medium staining), three (strong staining). Quantitative IHC expression of the protein was rated as percentages from zero to 100%. The final expression of each case was obtained with the following algorithm:  $HSCORE = \sum [(I + 1)] \times PC$ , where I and PC represented staining intensity and percentage of stained cells, respectively [14].

In order to measure VEGF expression, a rabbit anti-human vascular endothelial growth factor polyclonal antibody (Signet's USA™ Ultra Streptavidin Detection) was used at dilution of 1:30, with a VEGF-positive breast tumor specimen as external control. MMP-2 and MMP-9 expression was measured using rat monoclonal antibody NCL-MMP2-507, clone 17B11, and rat monoclonal antibody NCL-MMP9-439, clone 15W2, from Novocastra Laboratories (UK), at dilution of 1:40; normal hepatic tissue was used as external control.

TIMP-1 expression (tissue inhibitor of MMP-9) was analyzed with rat monoclonal antibody NCL-TIMP1-485, clone 6F6a (Novocastra Laboratories), at dilution of 1:75, using normal colon tissue as external control. To establish TIMP-2 expression (tissue inhibitor of MMP-2), rat monoclonal antibody NCL-TIMP2, clone 3A4 (Novocastra Laboratories), was used at dilution of 1:25, with placenta tissue as external control. 3 $\mu$ -thick paraffin sections were cut and placed on histologic slides previously treated with poly-D-lysine.

Next, deparaffinization in xylol and hydration in 100% alcohol were performed. In order to block endogenous peroxidase, the sections were washed in running distilled water and incubated in PBS three times, for five minutes. Antigen retrieval was performed in citrate

buffer, pH 6, in a microwave oven for 20 minutes at 90 °C, and the slides were allowed to stand for a further 20 minutes inside the oven. Once removed, the slides were allowed to stand for 15 minutes at room temperature, and then washed again with running distilled water and incubated in PBS. After application of 5% hydrogen peroxide, they were washed once more and incubated in PBS.

The sections were circled with a Dako-Pen (Dako Lab. Inc.®, New York, NY, USA), the primary antibody was added, and they were left overnight in a moist chamber (EasyPath®, Erviegas) inside a refrigerator. The slides were removed from the refrigerator, washed with distilled water, the secondary antibody LSAB (avidin-biotin, bottle 1, yellow, DakoCytomation™) was added and slides were then placed in the moist chamber for 30 minutes. After incubation in PBS, the procedure was repeated and LSAB (streptavidin peroxidase, DakoCytomation™) was added. The reaction was detected with the chromogenic substrate diaminobenzidine (DAB, DakoCytomation™), until the sections darkened ( $\pm$  30 seconds), and hematoxylin was used as counterstain for 20-30 seconds. After washing with running water and the application of 2% ammonia, the slides were washed again in running water, 100% alcohol and xylol to be mounted.

The semi-quantitative analysis was carried out at the HCPA Pathology Service by two experienced and independent pathologists, using an Olympus light microscope, model BX-2. An external control slide was prepared for every battery of IHC tests and for each marker used. In addition, for all IHC reactions analyzed, the presence of a positive internal control in every slide was carefully checked to ensure the quality of the technique employed.

Positivity for each marker under study was established by the presence of at least one tumor cell with clear, unequivocal brown cytoplasmic staining, regardless of staining intensity. To establish the qualitative score for the reaction in each case, the strongest cytoplasmic coloring was considered, even if a larger number of cells with milder coloring were identified (Fig. 1). For each case, the quantitative expression of markers was calculated by averaging the percentage of stained cells per microscopic field, including all positive cells in at least ten fields, regardless of staining intensity.

## Data analysis and statistical methods

All statistical analyses were carried out using the statistical program SPSS V15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The non-parametric Mann-Whitney U test was applied to analyze the association between continuous variables and other clinicopathological parameters. The association between categorical variables was assessed using Pearson's chi-squared test or the Kruskal-Wallis H test. The correlation between continuous variables was calculated using the Spearman correlation coefficient. The confidence interval was 95% (95% CI) and p values < 0.05 were considered statistically significant.

Survival probability estimates over time were measured using two complementary methods: the Kaplan-Meier non-parametric estimator and semi-parametric Cox Regression Model. The Kaplan-Meier estimator was used to plot overall and disease-free survival curves, as well as curves for each variable category, assessed as a factor associated with death or relapse, respectively. The comparison between survival curves was performed using the log-rank test.

## Results

### Patient Characteristics

Table 1 shows the main clinicopathological characteristics of the 86 patients included in the study. A statistically significant association was found between pathologic tumor diameter and histologic grade ( $\chi^2$ : 19.3; p= 0.004). The undifferentiated histologic grade was present only in pT1c and pT2 tumors, in 13.5% and 17.5% of cases, respectively. Vascular invasion

was present in 44 (51.2%) cases, of which 26 were pT2 and 18 pT1c. There was a significant association between vascular invasion and tumor diameter ( $\chi^2$ : 12.6;  $p= 0.006$ ). On the other hand, all tumors  $\leq 1.0$  cm were found to have no vascular invasion (Fig. 2).

Tumor diameter was also significantly associated with positive axillary lymph nodes ( $\chi^2$ : 8.6;  $p= 0.035$ ) (Fig. 2). In this group of patients, on average  $19.0 \pm 7.4$  axillary lymph nodes were resected, and 42 (48.98%) were positive. A total of 36 (41.8%) were categorized as pN1 (metastasis in 1 to 3 lymph nodes) and six (7.0%) as pN2 (metastasis in 4 to 9 lymph nodes). Of six cases categorized as pN2, five (83.3%) were pT2 ( $> 2$  and  $\leq 5$  cm), whereas 20 (55.5%) of the 36 cases categorized as pN1 were pT2. There was a significant association between tumor diameter and number of positive axillary lymph nodes ( $\chi^2$ : 7.2;  $p= 0.028$ ) (Fig. 2).

Patients with tumor diameter  $> 2.0$  and  $\leq 5.0$  cm showed greater risk of recurrence in comparison with tumor diameters  $\leq 2.0$  cm. Of 46 pT1 tumors ( $\leq 2.0$  cm), only eight (17.4%) patients relapsed, while for the 40 tumors categorized as pT2 ( $> 2$  and  $\leq 5$  cm) relapse occurred in 16 (40.0%) cases, RR = 2.93 (1.25 – 6.87),  $p= 0.01$ . These tumors also posed a greater risk of death, which occurred in 27.5% of patients, RR= 5.13 (1.43 – 18.45),  $p= 0.01$  (Tables 2 and 3).

Vascular invasion in the tumor was also significantly associated with axillary lymph node status ( $\chi^2$ : 24.7;  $p= 0.000$ ). Of 44 cases presenting with vascular invasion, 33 (75.0%) had a positive axillary lymph node. This association was also found between vascular invasion and number of metastatic axillary lymph nodes ( $\chi^2$ : 24.7;  $p= 0.000$ ). Most (78.6%) of the 42 cases without vascular invasion in the tumor had negative axillary lymph nodes (pN0). On the other hand, of the 44 cases with vascular invasion, 25% were pN0, 63.6% pN1, and 11.4% pN2 (Fig. 3).

The disease recurrence rate was significantly higher in the pN2 group (83.3%) in comparison with the pN0 group (25.0%); RR= 5.55 (1.91 – 16.14),  $p= 0.00$ . The latter (pN2) was also shown to be a risk factor for death, with occurrence of the event in 50.0% of cases; RR= 4.95 (1.17 – 20.91),  $p= 0.03$  (Tables 2 and 3).

The immunohistochemical profile of the tumors is shown in Table 4, in which a large amount of data is unavailable. This is likely because the sample was collected from 1999 to 2004 and during that period biological markers, particularly HER2, Ki-67 and P53, were not routinely used in our pathology department. The following results were recorded considering only valid cases for each biologic marker: hormone receptors, 90.4% and 83.8% of the cases were ER and PR-positive, respectively. All eight tumors  $\leq 1.0$  cm (one pT1a and seven pT1b) were ER-positive. Of 36 pT1c tumors, only two (5.5%) were ER-negative, while six (15.4%) of the 39 pT2 tumors were ER-negative; however, there was no significant correlation between them. HER2 overexpression (3+) was found in 14 (23.3%) tumors and considered positive. In eight (13.3%) cases, (2+) expression was recorded and in 38 (63.3%) cases expression observed (1+), which was considered negative.

Disease recurrence was significantly higher in patients with HER2 overexpression, and 50.0% of this group relapsed during the period; RR= 2.96 (1.07 – 8.16),  $p= 0.04$  (Table 2). Ki-67  $\geq 14.0\%$  was present in 29 (65.9%) cases, and 29 (49.2%) cases were positive for p53. However, no association was found between these and the other variables under study. Classification into molecular subtypes was distributed as follows: Luminal A, 12 (24.5%); Luminal B, 32 (65.3%); HER2, two (4.1%), and triple-negative, three (6.1%). The expression of MMPs, TIMPs and VEGF was widespread across the cytoplasm of neoplastic cells and, occasionally, part of the membrane was stained (Figure 1; Tables 4 and 5).

Patients were treated in accordance with the Breast Unit protocol, Table 2. The majority ( $n=45$ , 52.3%) underwent segmentectomy plus axillary lymphadenectomy and adjuvant RT or modified radical mastectomy, 32 (37.2%). With respect to systemic adjuvant treatment, most patients, 39 (45.3%), received tamoxifen only; 20 (23.3%) received chemotherapy and tamoxifen; the same number, 20 (23.3%), underwent chemotherapy alone, and only seven (8.1%) did not receive any adjuvant treatment. When patients who were not submitted to adjuvant treatment were analyzed, four had tumor diameter  $> 0.5$  and  $\leq 1.0$  cm, one had diameter  $> 1.0$  and  $\leq 2.0$  cm, and two had diameter  $> 2.0$  and  $\leq 5.0$  cm. All patients had negative axillary lymph nodes; however, six were ER-positive and one had no data available. The risk of recurrence in patients who were treated with mastectomy alone was greater

compared to those who were subjected to segmentectomy plus axillary lymphadenectomy and adjuvant radiotherapy, but without statistical significance, RR= 2.47 (1.01 – 6.07),  $p=0.05$  (Table 2).

Pathological staging for the group of patients is presented in table 1. The risk of disease relapse was significantly greater in the group of stage III patients, in comparison with stage I, and occurred in 83.3% and 22.2% of cases, respectively; RR= 6.60 (1.99 – 21.85),  $p=0.00$ . When deaths were compared for pathologic staging, the event occurred in three (50%) patients at E IIIA, five (23.8%) at E IIB, four (12.5%) at E IIA, and only two (7.4%) at E I, indicating that disease staging is a risk factor for the occurrence of death; RR= 8.22 (1.37 – 49.52),  $p=0.02$  (Tables 2 and 3).

The mean follow-up time of the 86 patients was  $101.7 \pm 36.4$  months (minimum 13 and maximum 154). Recurrence was observed in 24 (27.9%) patients. Of these, six (25%) were locoregional relapses and when distant relapse occurred, the most frequent sites were the liver and the lung, both with 16.7%. Mean time to recurrence was  $51.8 \pm 32.4$  months (minimum 3 and maximum 116). A positive association was observed between increased tumor diameter and relapse site. Tumors classified as pT1 showed relapses equally distributed between locoregional and distant sites. However, there were 14 (87.5%) cases of distant relapse for pT2 tumors and only two (12.5%) cases of local relapse ( $\chi^2: 4.00$   $p=0.046$ ).

Table 2 depicts the number and percentage of recurrence cases, according to the variables and significance in the univariate Cox proportional hazards model for disease recurrence. In this model, the number of positive axillary lymph nodes pN2: RR= 5.55 (1.91 – 16.14); tumor diameter pT2: RR= 2.93 (1.25 – 6.87); stage III: RR= 6.60 (1.99 – 21.85); and HER2 overexpression: RR= 2.96 (1.07 – 8.16) are isolated risk factors significantly associated with the risk of relapse ( $p < 0.05$ ). All variables were also tested for risk of recurrence using the multivariate Cox proportional hazards model and a 95% confidence interval. Only the number of positive lymph nodes pN2: RR= 3.81 (1.25 – 11.59),  $p=0.02$ , and tumor diameter pT2: RR= 2.60 (1.07 – 6.32),  $p=0.04$  remained as isolated risk factors, with statistical significance.



In Table 3, the number and percentage of deaths are shown according to variables and significance in the univariate Cox proportional hazards model for occurrence of death. In this model, the number of positive axillary lymph nodes pN2: RR= 4.95 (1.17 – 20.91),  $p= 0.03$ ; tumor diameter pT2: RR= 5.13(1.43 – 18.45),  $p= 0.01$ , and stage III: RR= 8.22 (1.37 – 49.52),  $p= 0.02$  were also observed as isolated risks for death, with statistical significance.

All variables were tested with the multiple Cox proportional hazards model for death, with only the number of lymph nodes pN2: RR= 17.89 (3.20 – 99.87),  $p= 0.01$ , remaining as a risk factor at a 90% CI. By estimating the disease-free survival probability over the follow-up time, using the Kaplan-Meier estimator, and comparing the survival curves by means of the log-rank test, a significantly greater probability of relapse was found with pathologic tumor diameter  $> 2.0$  and  $\leq 5.0$  cm ( $p= 0.009$ ), number of metastatic lymph nodes pN2 ( $p= 0.001$ ), stage III ( $p= 0.001$ ) and HER2 overexpression ( $p= 0.028$ ) (Fig. 6). A greater probability of recurrence was observed in patients subjected to mastectomy without adjuvant radiotherapy; however, the log-rank test was not significant,  $p= 0.05$ .

By performing the same survival analysis, using death as the event of interest, a greater likelihood of event occurrence was found in the group with tumor diameter  $> 2.0$  and  $\leq 5.0$  cm ( $p= 0.005$ ), stage III group ( $p= 0.022$ ). It was noted that the probability of death was higher in patients classified as pN2 and overexpression HER2, however the log-rank test was not significant for risk of death (Fig. 7).

Disease-free survival, obtained by the Kaplan–Meier estimator, was 68.0% at the end of the study and 82.2% and 68.0% at 5 and 10 years, respectively. The estimated mean disease-free survival time was 123.2 months, with a 95% CI (112.5; 133.9). Overall survival obtained by the Kaplan–Meier estimator was 75.3% at the end of the study period, and 90.2% and 82.9% at 5 and 10 years, respectively. The estimated mean overall survival time was 137.1 months, with a 95% CI (128.9; 145.3) (Fig. 8).

## Discussion

Breast cancer is the main cause of death among women in Brazil. Recent studies by Freitas-Junior et al. [15] and Lee et al. [16] showed disparities in mortality rates between the geographic regions. From 1980 to 2009, there was a decline in mortality in the states of Rio de Janeiro, São Paulo and Rio Grande do Sul. Probably due to the better health system infrastructure, more awareness about the disease, the more widespread use of mammography, the use of more suitable surgical procedures, better access to radiotherapy and more up-to-date strategies for the systemic treatment of the disease. Menke et al. published the experience of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre in the treatment of breast cancer for three decades, showing a modest decrease of 0.8 cm in median tumor diameter at diagnosis [15].

Our results showed that the disease-free survival and overall survival of the study population at 5 and 10 years were 82.2% and 90.2%, and 68% and 82.9%, respectively. These data are in agreement with previous series [4, 17]. Tumor diameter and stage were also confirmed as risk factors for relapse and death. HER2 overexpression and number positive lymph nodes were also a risk factor for relapse. The impact of this characteristic in the number of deaths, however, did not reach statistical significance. That was probably due to the limited number of cases, in which information about HER2 status was available during that period (1999-2004).

Other significant associations were observed between tumor diameter and histologic grade, vascular invasion, axillary lymph node status, number of metastatic lymph nodes and distant relapse; vascular invasion and axillary lymph node status, and number of metastatic lymph nodes. The mean age of patients in the study sample at the time of diagnosis was  $58.4 \pm 1.2$  years, while 65 (75.6%) were  $\geq 50$  years old. The oldest was 81 and the youngest 32 years old. The Amazon Project conducted by Brazilian Group for Breast Cancer Studies - GBECAM [18], including 4.912 patients treated for breast cancer in 28 treatment centers distributed all across the Brazilian territory, found a mean age of 59.3 years. In the United

States, according to data from the Surveillance Epidemiology and End Results -SEER, mean age is 61 years [19].

The literature suggests that survival rates among young women are lower because their tumors tend to have a more aggressive biologic profile. Studies as those conducted by Nixon et al. [20] and Jayasinghe et al. [21] associate with the patient at higher risk of recurrence and death. However, the EUROCORE-4 [17] study, analyzing 406.587 breast cancer cases in 23 European countries, found a mean five-year survival rate of 79.0%, which remained steady until age 74.

Most patients (96.5%) were caucasian, while only three (3.5%) were African Brazilians. It is important to note that in the patient records the only options for color assignment were caucasian or African brazilians, even though the area had a largely mixed population.

Data from the CONCORD study [4] indicated a lower five-year survival rate for African American women in comparison with Caucasian females of 70.9% and 84.7%, respectively. In our study, the small number of African Brazilian patients hampered statistical analysis; however, this is believed to be related more to the socioeconomic status of the patients than their color, since poorer patients encounter greater difficulty accessing diagnostic services, continued investigation and more suitable treatment.

The group of patients studied had low schooling levels (Table 1). However, no association was found between this data and tumor staging or survival. A study conducted by Herndon et al. [22] concluded that in these patients, it seems that severity is related to a lack of knowledge about the disease and to the difficulties encountered in accessing suitable treatment.

With respect to menstrual status, most patients (51.2%) menstruated at  $\leq 12$  years old. Estrogen is known to induce the growth of mammary cells, in which case patients remain exposed to estrogen for a longer time; consequently, there is an increased potential for genetic and epigenetic alterations, which results in a greater likelihood of developing breast cancer [23].

The mean pathologic tumor diameter was  $2.3 \pm 1.0$  cm. Only nine (19.6%) cases had a tumor diameter  $\leq 1.0$  cm, which is considered low in terms of an early diagnosis with better chance for cure. However, most tumors (52.5%) had a diameter  $\leq 2.0$  cm (pT1), which may still be considered relevant when administering conservative surgical treatment. Tumor diameter is considered an independent prognostic factor associated with axillary metastases, risk of recurrence and death.

In the literature, five-year survival rates range from 45.5% for tumors  $\geq 5.0$  cm with metastatic axillary lymph nodes to 99.0% for tumors  $<1.0$  cm with negative lymph nodes [20, 21, 24-26]. A study by Verschraegen et al. [27] reports that mortality increases by 10.0 - 25.0% in cases of negative lymph nodes and 20.0 - 40.0% in those with positive axillary lymph nodes for each millimeter that the tumor diameter increases, among tumors from 3.0 to 5.0 cm. This underscores the importance of an early diagnosis both for the performance of more conservative surgical treatments and the implementation of a less aggressive and more specific and effective adjuvant therapy.

A vast majority (95.3%) of the tumors studied were invasive ductal tumors with an intermediate histologic grade (60.5%). These data are similar to those found by Amazon Project [18], which showed an incidence of 81.6% and 60.1%, respectively. Undifferentiated tumors showed significant association with tumor diameter  $> 2.0$  and  $\leq 5.0$  cm ( $p= 0.004$ ). This finding is in agreement with the literature, which associates high histologic grade with tumor diameter, shorter disease-free interval and lower survival. Five-year survival is reported to be 75% for GI, and decreases to 53% and 31% for GII and GIII, respectively [28].

Vascular invasion is a prognostic factor that is important in patients with a negative axillary lymph node, but its value is still disputed when the axillary lymph node is positive for metastasis. Some published studies, such as those by Ragage et al. [29], Rakha et al. [30] and Song et al. [31], have shown an association between vascular invasion and tumor diameter, estrogen receptor-negative status, number of positive axillary lymph nodes  $\geq$  four, and worse disease-free and overall survival at five years.

Data analyzed show a significant association ( $p= 0.006$ ) between presence of vascular invasion and tumor diameter. Most (65.0%) tumors classified as pT2, as well as 48.0% of tumors classified as pT1c, showed vascular invasion; however, it was absent from all other tumors  $\leq 1$  cm (pT1a and pT1b). A significant association ( $p < 0.05$ ) was also observed between presence of vascular invasion and number of metastatic axillary lymph nodes.

When pathologic tumor diameter and presence of axillary lymph node metastasis were considered, the presence of metastasis was found in 62.5% of pT2 tumors and in only 12.5% of pT1b tumors. The sole pT1a tumor ( $\leq 0.5$  cm) was observed to have no metastasis in the axillary lymph node. The significant association ( $p= 0.035$ ) found shows us the importance of tumor diameter as a prognostic factor for the presence of metastatic cells in the axillary lymph node. In other words, the earlier breast cancer is diagnosed and the earlier a woman has access to specialized health services, the greater the chance of being treated with early staging and the greater the possibility of survival.

Axillary metastasis was present in 42 (48.8%) of the studied cases, which shows a significant association ( $p=0.028$ ) between tumor diameter and number of positive lymph nodes. Once again, the result points out the problem of late diagnosis, in which a greater growth of the tumor leads to a greater likelihood of a larger number of axillary lymph nodes being affected, reducing the chance of survival. In his study, Verschraegen et al. [27] clearly demonstrated the direct impact on survival, caused by both the increase in tumor diameter and the positive status of the axillary lymph node.

When the pathologic staging of the disease was considered at the time of primary treatment, only 27 (31.4%) cases were observed to be classified as Stage I, which indicated that there was a major delay in the diagnosis of the tumor or referral of the patient to specialized care. However, the occurrence of only six (7%) cases classified as stage III A showed us that the diagnosis and referral of patients for treatment has greatly improved. When these data were compared with those from Amazon Project [18], in that study 20,2% of patients were found to be at stage I and 24,6% at stage III. In our sample, the recurrence event was significantly higher at E III (83.3%) in comparison with E I (22.2%) ( $p=0.00$ ). The occurrence of death was also significantly higher in patients at E III, and 50% of stage III patients died, while only

7.4% of stage I patients had the same outcome ( $p=0.02$ ). These data confirm staging as a risk factor for recurrence and death.

A study conducted at the University Hospital, Universidade Federal de Santa Maria, by Moraes et al [32] showed that overall survival is directly related to breast cancer staging. Survival probabilities at five years for patients at stages I, IIa, IIb, IIIa+IIIb were 97%, 96%, 90% and 73%, and at 10 years, 97%, 87%, 70% e 73%%, respectively.

When data were collected for biologic tumor markers, many data were missing, probably because, in the period of collection, the Mastology and Pathology Service did not conduct the analysis of these markers, especially HER2, p53 and ki-67, while ER and PR were already included in the routine protocol.

In the sample under study, all tumors with pathologic diameter  $\leq 1.0$  cm were ER-positive, and 94.5% of the tumors  $> 1.0$  and  $\leq 2.0$  cm. However, no significant association was found between hormone receptors and tumor diameter. Publications have shown that 60% to 81% of breast tumors are positive for estrogen receptors, which warrants the use of tamoxifen, aromatase inhibitors, or even ovarian ablation as adjuvant therapy. Literature unequivocally demonstrates that there is a relationship between ER and prognosis. ER-positive patients present with a greater disease progression-free time interval and higher overall survival [33-35].

HER2 overexpression or amplification is present in approximately one-fifth of breast cancer and historically was associated with aggressive disease and poorer prognosis. Knowing the status of the HER2 oncogene in breast carcinoma is crucial, considering its importance in the selection of patients eligible for anti-HER2 monoclonal antibody therapy [36, 37].

In this sample, HER2 overexpression was present in 23.3% of the analyzed cases, in agreement with literature. In analyzing the relationship between HER2 and recurrence, 50.0% of patients with overexpression of this protein were observed to have relapse in the period, which means this is a risk factor for recurrence of the disease,  $p= 0.04$ . However, HER2 overexpression was not associated with an increased relative risk for death ( $p= 0.58$ ), this probably occurs due to the small number of cases.

In several studies, HER2 is associated with bad prognostic factors such as ER-negative status, positive axillary lymph nodes, greater tumor size, high histologic grade and lower overall survival. However, HER2 overexpression is a predictive marker for the response to the use of trastuzumab and small molecule tyrosine kinase inhibitors and to chemotherapeutic treatment based on anthracyclines [38-42].

It should be noted that, in this study, only cases scored as 3+ immunohistochemically were considered positive. In 8.0 (13.3%) cases, HER2 expression had a 2+ score; however, no in situ hybridization test was performed, probably due to its high cost. Literature shows that in equivocal cases (2+), the detection of HER2 amplification by FISH can show amplification of the HER2 gene in 15.0 - 21.0% of cases. On the other hand, it also points out that 10.0 to 12.0% of unequivocal cases (3+) by IHC do not demonstrate amplification of the HER2 gene in the FISH test [43].

Ki-67  $\geq$  14.0 % was present in 65.9% of cases, and p53 showed a positive status in 49.2%. However, no association was found between these and the variables under study. Breast tumors with high expression of Ki-67 are associated with recurrence and worse survival, while large tumors with negative axillary lymph node and low rate of Ki-67 show a good prognosis [44, 45]. Mutant p53 is present in 20-50% of breast tumors. It is related with a worse prognosis, lower disease-free survival, lower overall survival, ER-negative status, high nuclear grade, high expression of ki-67, HER2 overexpression, and triple-negative tumors [46-51].

The determination of gene expression through DNA microarray is still quite expensive for routine use in clinical practice, but immunohistochemistry is an accessible method that can be used to identify molecular subgroups, especially luminal subtypes and HER2. Literature shows that triple-negative tumors and HER2-positive tumors are the ones that have the worst prognosis [52, 53]. The tumor classification into molecular subtypes, showed that the Luminal B subtype was the most frequent (65.3%), Luminal A (24.5%) came in at second place, followed by the triple-negative subtype (6.1%), and HER2 (4.1%). In literature, a number of studies mention Luminal A as the most frequent, but in these cases the expression of the

proliferation rate was not used for the classification, and in some cases the histologic grade GIII was employed.

A Brazilian paper published by Cintra et al. [54], considering the expression of Ki-67, found that the luminal B/HER2-negative subtype was the most frequent (41.8%), followed by the triple-negative (24.2%). Another study recently published by El Fatemi et al. [55], analyzing the Moroccan population, found a higher prevalence of the Luminal B subtype (41.8%), followed by Luminal A (30.5%). These rates, as reported by the author, are similar to those seen in our sample.

The Brazilian study that analyzed 4.912 Brazilian women with breast cancer found 73.5% of Luminal subtype cases (hormone receptor-positive status), 19.1% of triple-negative cases, and 7.3% of the HER2 subtype. In view of these data, we can assume that the molecular profile of a breast tumor can vary according to geographic distribution and race. Nevertheless, as different classification parameters were used, other standardized studies should be encouraged to learn about the molecular profile of breast tumors [18].

The expression of VEGF was higher in the group of patients with progesterone receptor-positive status, which showed a significant difference,  $p=0.045$ . Arias-Pulido et al. [56] and Linderholm et al. [57] found high rates of VEGF associated with the triple-negative subtype, poor overall and disease-free survival, suggesting that VEGF can be used as a prognostic marker for survival, which would facilitate the selection of patients for the use of anti-angiogenic therapy.

Most patients were subjected to conservative surgery with adjuvant radiotherapy, as they had a small tumor or a tumor of greater diameter with a negative lymph node. Only two patients underwent conservative surgery without adjuvant radiotherapy, probably because the tumors were considered to be of good prognosis. In this group, an increased risk of relapse was found for those patients that were subjected to mastectomy alone, without adjuvant radiotherapy, but with borderline significance ( $p=0.05$ ). However, there was no increase in the risk of death for local treatment.



Currently, conservative surgery, together with adjuvant radiotherapy, has become the standard treatment for most women with breast cancer at stages I and II, both for the good degree of local control and for the esthetic benefit from breast conservation. In addition, both radical surgery and conservative surgery, accompanied with modern adjuvant therapy, are likely to have the same impact on overall survival [58-60].

When systemic adjuvant treatment was analyzed, 39 (45.3%) of patients were given tamoxifen only, and of these, 36 were aged  $\geq 50$ . In the sample under study, no correlation was found between systemic adjuvant treatment and risk of relapse and/or death. However, a meta-analysis published by the Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) showed a decrease in the annual relative risk of relapse and death by 23% and 17%, respectively, with adjuvant polychemotherapy [61]. The patients were followed for 101.7 months on average. There was disease recurrence in 24 (27.9%) cases. Those with tumor diameter  $> 2.0$  and  $\leq 5.0$  cm had a higher risk of recurrence ( $p=0.01$ ), and 40% of the tumors classified as pT2 had relapse. Tumor diameter is considered an independent prognostic factor and is directly related with axillary metastases and increased risk of relapse and death [24, 26].

Among the patients who had recurrence, most (75%) had it at a distant site, and the most frequent sites were the liver and the lung, with 16.7% each, followed by the bone in 8.7% of cases. Tumor diameter was also associated with the recurrence site, and 87.5% of pT2 tumors had distant recurrence,  $p= 0.046$ . Among the patients who remained alive after recurrence until the end of the study, four (16.6%) had active disease, and six (25%) had no clinical evidence of the disease and were also the ones who were surgically treated for local recurrence.

No association was found between patient age at the time of diagnosis and occurrence of death, even though a higher death incidence took place among patients aged between 50-59 (35.7%). The studies by Nixon et al. [20] and Jayasinghe et al. [21] found in a group of younger women (35 and 40 years, respectively), a higher incidence of tumors with vascular invasion, high histologic grade, negative receptors, higher risk of disease relapse, and worse survival in the group of patients aged between 40 and 69.

When the univariate Cox proportional hazards model was used for relapse, the number of positive axillary lymph nodes pN2, tumor diameter pT2, stage III and HER2 overexpression were found to be isolated risk factors for the occurrence of relapse. These data are in agreement with other published studies [26, 27]. When all variables were analyzed with the multivariate Cox proportional hazards model for the risk of relapse, only number of metastatic axillary lymph nodes (4 and 9) and tumor diameter ( $> 2.0$  and  $\leq 5.0$  cm) remained associated with this risk.

Using the univariate Cox proportional hazards model, all variables were analyzed for the occurrence of death. Once again, the number of positive axillary lymph nodes pN2, tumor diameter pT2 and disease stage III appeared as isolated risk factors for the occurrence of death. When the same variables were tested using the multiple Cox proportional hazards model for death, no association was found between the variables under study for risk of death.

Disease-free survival at 5 and 10 years, in the group under study, was 82.2% and 68.0%, respectively, while overall survival for the same group was 90.2% and 82.9%, respectively. This finding is above the five-year survival rate of 82% observed in Europe and similar to the 89% rate observed in the USA, according to the CONCORD study, [4] with patients diagnosed in the period from 1990 to 1994, in the USA, Switzerland, Japan, Finland and Australia, and by the EURO CARE-4 study, [17] which included patients diagnosed with breast cancer in 23 European countries, in the period from 1995-1999.

In Brazil, study recently published by Freitas-Junior et al. [15] demonstrates the heterogeneity of mortality rates in the country, indicating differences related to the socioeconomic standard of different states, with the southern and southeastern regions showing lower mortality rates. According to the Brazilian Geography and Statistics Institute (IBGE) [62], these states concentrate more than 70% of the Brazilian Gross National Product (GNP), while the northern and northeastern regions contain the ten states with the lowest GNP, together accounting for only 5.3% of the Brazilian GNP, which clearly shows a relationship between socioeconomic standards and breast cancer survival. Coleman et al. [4]

pointed out that people with higher income have better access to health services, even in developed countries like the United States.

In summary, our study confirmed previous observations that tumor diameter, axillary lymph node involvement, stage and HER2 positivity are among the main risk factors for relapse and death in patients with operable breast cancer. Notably, disease-free and overall survival at 5 and 10 years in our group of patients were similar to that reported from developed countries, contrasting with data obtained from other developing countries and also from other geographic regions of Brazil. That may reflect socioeconomic and cultural characteristics of this specific region of Brazil, known for its more organized health system and good standard of medical care.

**Conflict of interest statement:** No conflicts of interest to declare.

## References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917.
2. Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
3. Boyle P. Breast cancer control: signs of progress, but more work required. *Breast* 2005; 14: 429-438.
4. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 2008; 9: 730-756.
5. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 1893-1907.
6. INCA. Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil. Available at <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>, accessed December 15, 2012.
7. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2302-2310.
8. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011; 5: 5-23.
9. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-410.
10. TNM. Classification of Malignant tumors. Washington, D. C. 20306,USA2004. Available at <http://www.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf>, accessed December 9, 2012.
11. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for

immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2784-2795.

12. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-145.

13. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22: 1736-1747.

14. Scorilas A, Karameris A, Arnoyianni N et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001; 84: 1488-1496.

15. Freitas-Junior R, Gonzaga CM, Freitas NM et al. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; 67: 731-737.

16. Lee BL, Liedke PE, Barrios CH et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *Lancet Oncol* 2012; 13: e95-e102.

17. Sant M, Allemani C, Santaquilani M et al. EUROCORE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* 2009; 45: 931-991.

18. GBECAM. Brazilian Study Group Breast Cancer - Projeto Amazona. Available at <http://www.gbecam.org.br>, accessed March 31, 2012.

19. SEER. Surveillance Epidemiology and End Results. Available at <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>, accessed December 9, 2012.

20. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 888-894.

21. Jayasinghe UW, Taylor R, Boyages J. Is age at diagnosis an independent prognostic factor for survival following breast cancer? *ANZ J Surg* 2005; 75: 762-767.
22. Herndon JE, 2nd, Kornblith AB, Holland JC, Paskett ED. Effect of socioeconomic status as measured by education level on survival in breast cancer clinical trials. *Psychooncology* 2013; 22: 315-323.
23. Li CI, Malone KE, Daling JR. Differences in breast cancer hormone receptor status and histology by race and ethnicity among women 50 years of age and older. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 601-607.
24. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004; 9: 606-616.
25. Clark GM. Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 1994; 30: 117-126.
26. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
27. Verschraegen C, Vinh-Hung V, Cserni G et al. Modeling the effect of tumor size in early breast cancer. *Ann Surg* 2005; 241: 309-318.
28. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3153-3158.
29. Ragage F, Debled M, MacGrogan G et al. Is it useful to detect lymphovascular invasion in lymph node-positive patients with primary operable breast cancer? *Cancer* 2010; 116: 3093-3101.
30. Rakha EA, Martin S, Lee AH et al. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer* 2012; 118: 3670-3680.

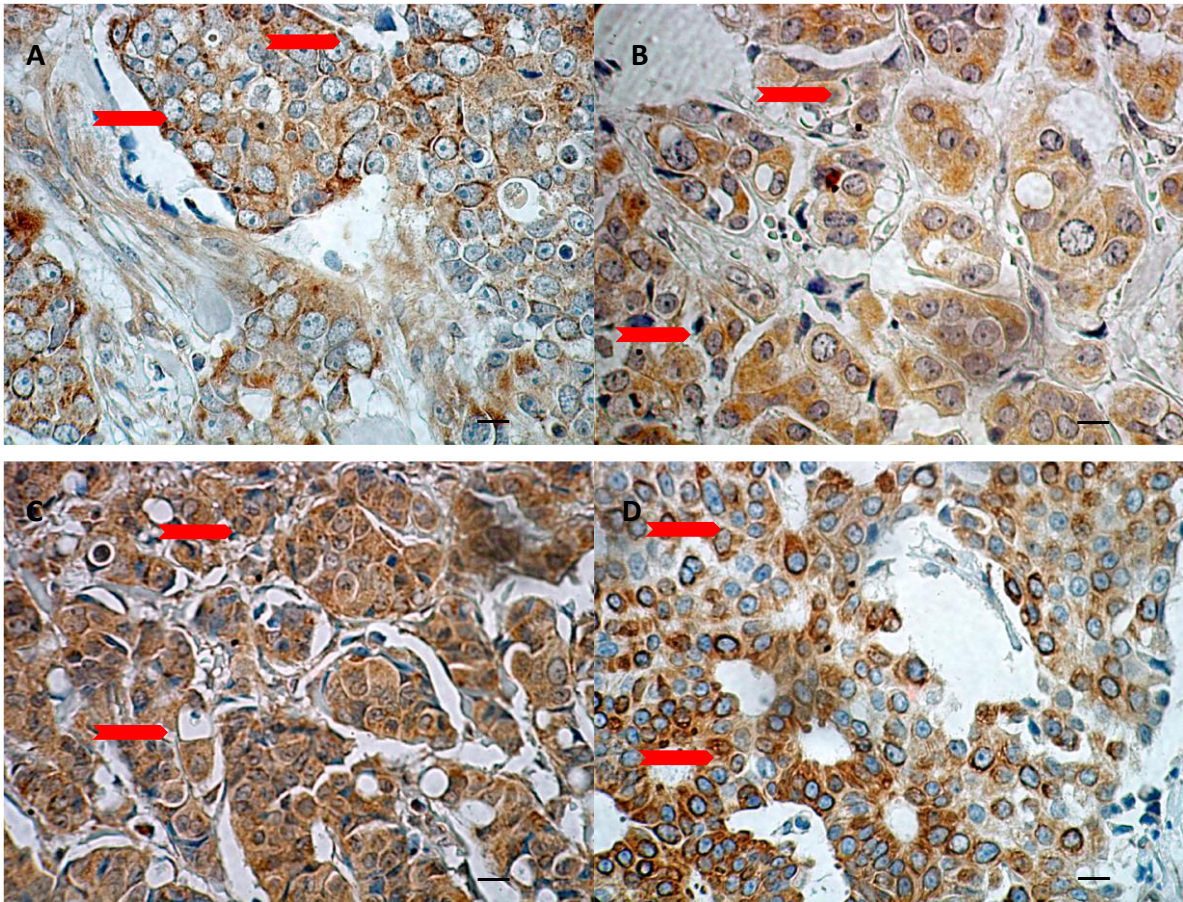
31. Song YJ, Shin SH, Cho JS et al. The role of lymphovascular invasion as a prognostic factor in patients with lymph node-positive operable invasive breast cancer. *J Breast Cancer* 2011; 14: 198-203.
32. de Moraes AB, Zanini RR, Turchiello MS et al. [Survival study of breast cancer patients treated at the hospital of the Federal University in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil]. *Cad Saude Publica* 2006; 22: 2219-2228.
33. Fentiman IS. Fixed and modifiable risk factors for breast cancer. *Int J Clin Pract* 2001; 55: 527-530.
34. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11: 155-168.
35. Osborne CK, Schiff R, Arpino G et al. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *Breast* 2005; 14: 458-465.
36. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14: 320-368.
37. Duchnowska R, Biernat W, Szostakiewicz B et al. Correlation between quantitative HER-2 protein expression and risk for brain metastases in HER-2+ advanced breast cancer patients receiving trastuzumab-containing therapy. *Oncologist* 2012; 17: 26-35.
38. Patani N, Martin LA, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *Int J Cancer* 2013; 133: 1-13.
39. Hicks DG, Kulkarni S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1008-1015.
40. Gobbi H, Rocha R, Nunes C. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. *J Bras Patol Med Lab*. 2008; 44: 131-140.

41. Ryden L, Landberg G, Stal O et al. HER2 status in hormone receptor positive premenopausal primary breast cancer adds prognostic, but not tamoxifen treatment predictive, information. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109: 351-357.
42. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1991-1998.
43. Meijer SL, Wesseling J, Smit VT et al. HER2 gene amplification in patients with breast cancer with equivocal IHC results. *J Clin Pathol* 2011; 64: 1069-1072.
44. Taneja P, Maglic D, Kai F et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol* 2010; 4: 15-34.
45. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
46. Munster PN, Norton L. Predictive factor for the response to adjuvant therapy with emphasis in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 361-364.
47. Ioachim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA et al. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer Res* 2000; 20: 4221-4225.
48. Kruger K, Stefansson IM, Collett K et al. Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer. *Breast* 2012.
49. Beenken SW, Grizzle WE, Crowe DR et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Ann Surg* 2001; 233: 630-638.
50. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwege D et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 86-96.

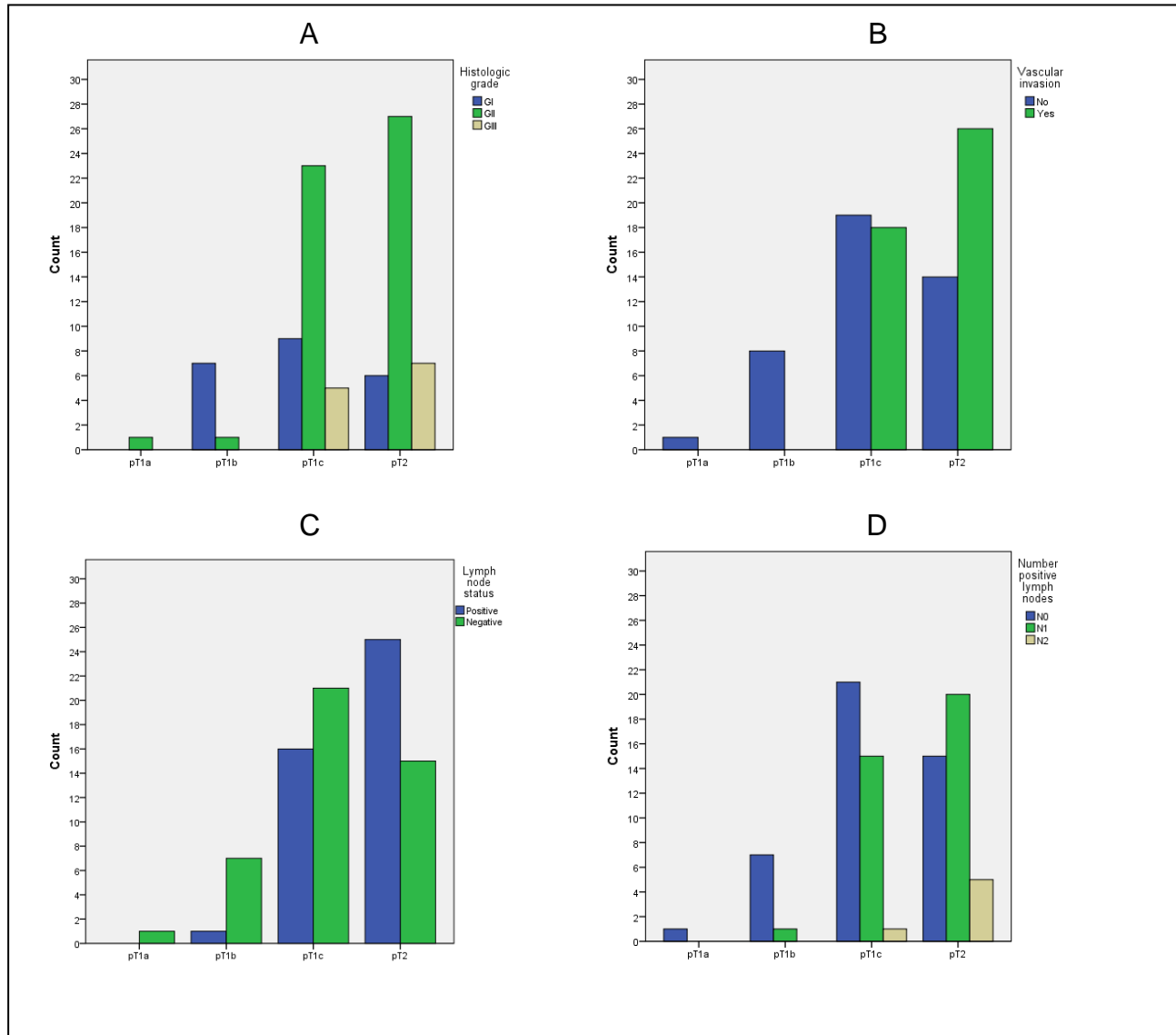


51. Dumay A, Feugeas JP, Wittmer E et al. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int J Cancer* 2013; 132: 1227-1231.
52. Demirci S, Broadwater G, Marks LB et al. Breast conservation therapy: the influence of molecular subtype and margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 83: 814-820.
53. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1684-1691.
54. Cintra JR, Teixeira MT, Diniz RW et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. *Rev Assoc Med Bras* 2012; 58: 178-187.
55. El Fatemi H, Chahbouni S, Jayi S et al. Luminal B tumors are the most frequent molecular subtype in breast cancer of North African women: an immunohistochemical profile study from Morocco. *Diagn Pathol* 2012; 7: 170.
56. Arias-Pulido H, Chaher N, Gong Y et al. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 298.
57. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2009; 20: 1639-1646.
58. Kaufmann M, Morrow M, von Minckwitz G et al. Locoregional treatment of primary breast cancer: consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer* 2010; 116: 1184-1191.
59. Clarke M, Collins R, Darby S et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 366: 2087-2106.
60. Edge SB. Advances in breast surgery, 2002-2012. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11: 53-59.

61. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365: 1687-1717.
62. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Available at <http://www.ibge.gov.br/home/>, accessed April 15, 2012.



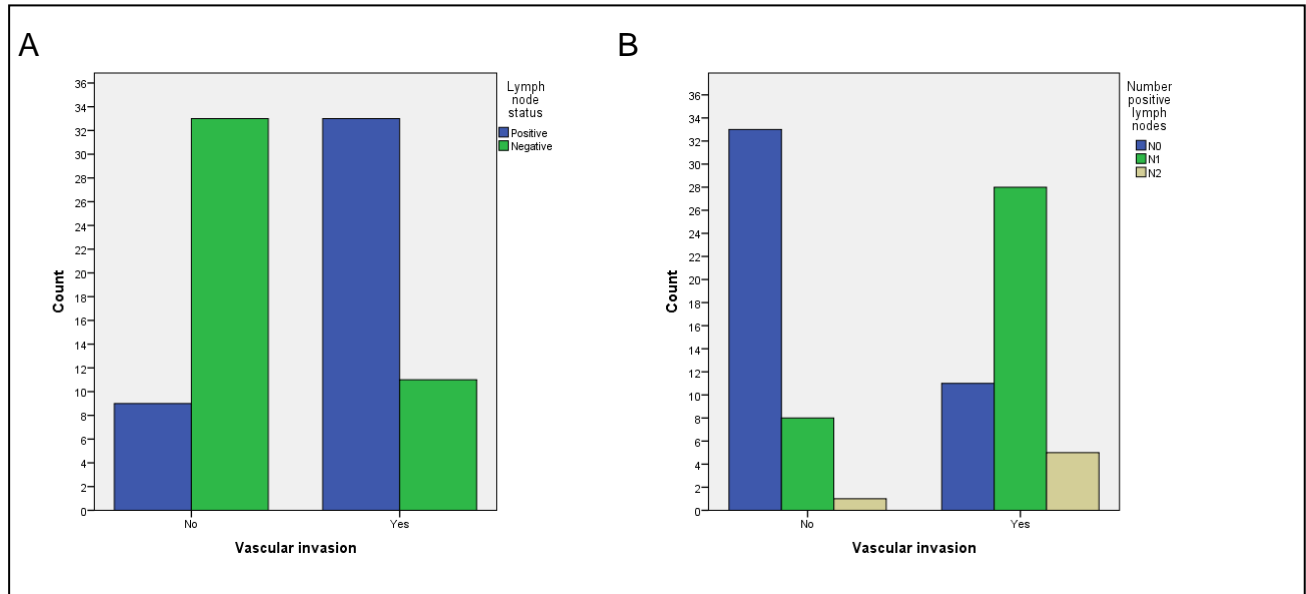
**Figura 1.** Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases MMP-2 (A), MMP-9 (B) and tissue inhibitor metalloproteinases TIMP-1 (C) and TIMP2 (D) in neoplastic cells of a breast tumor. The arrows show the immunoreaction in the cytoplasm of the neoplastic cells. Breast cancer cell are show at 400X magnification (bar = 20  $\mu$ m in all panels).



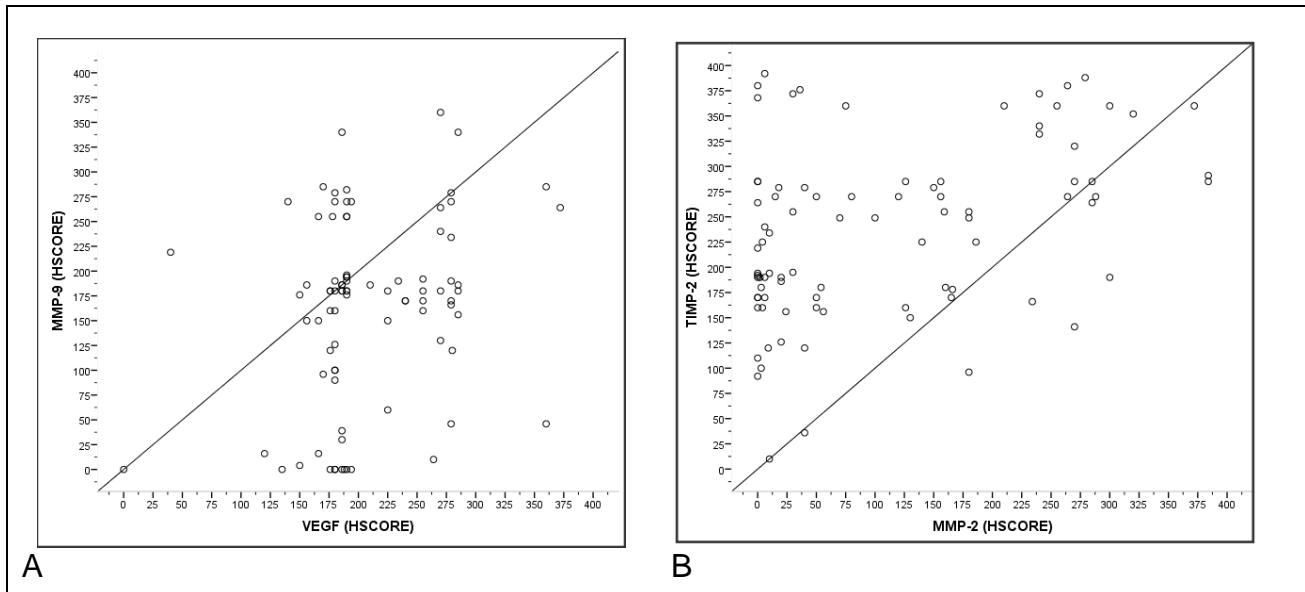
**Figure 2.** Statistically significant association between the pathologic tumor diameter (pT) according to the Union for International Cancer Control, and: A) histologic grade of Scarff Bloom Richardson ( $\chi^2$ : 19.3;  $p= 0.004$ ); B) vascular invasion ( $\chi^2$ : 12.6;  $p= 0.006$ ); C) lymph node status ( $\chi^2$ : 8.6;  $p= 0.035$ ), and D) pN staging (the number of positive lymph nodes), according to the Union for International Cancer Control ( $\chi^2$ : 7.2;  $p= 0.028$ ).

Pathologic tumor diameter – pT1:  $\leq 2.0$  cm ( pT1a:  $\leq 0.5$  cm; pT1b:  $> 0.5$  cm and  $\leq 1.0$  cm; pT1c:  $> 1.0$  cm and  $\leq 2.0$  cm); pT2:  $> 2.0$  cm and  $\leq 5.0$  cm.

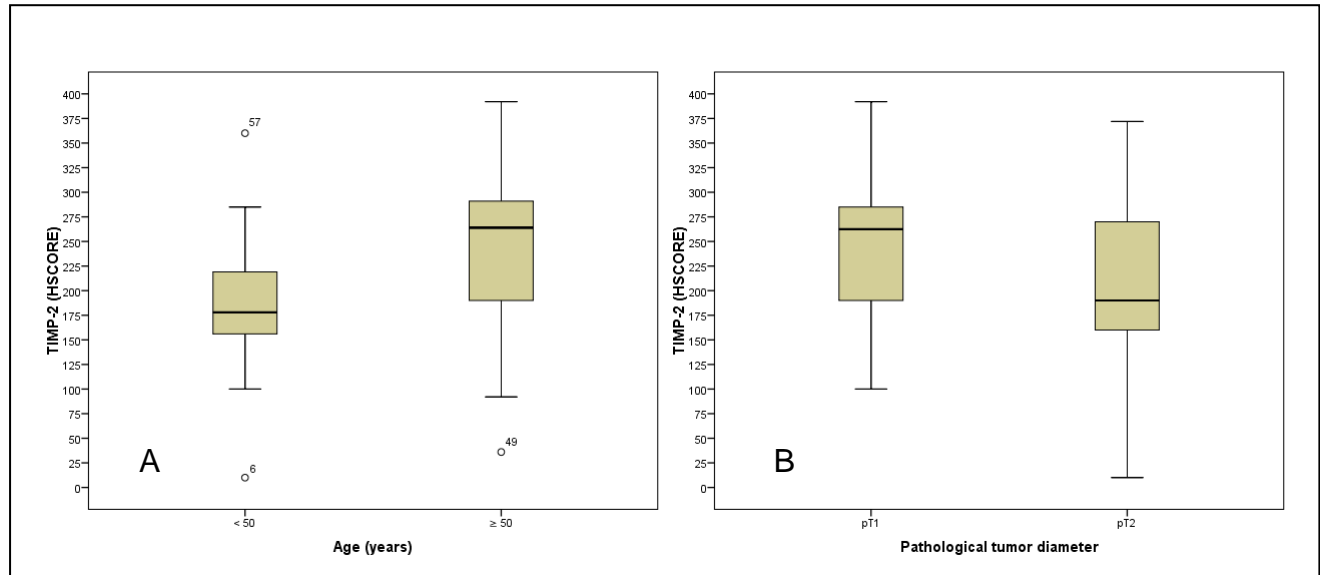
pN staging - pN0: no metastasis; pN1: 1 – 3 positive lymph nodes; pN2: 4 – 9 positive lymph nodes.



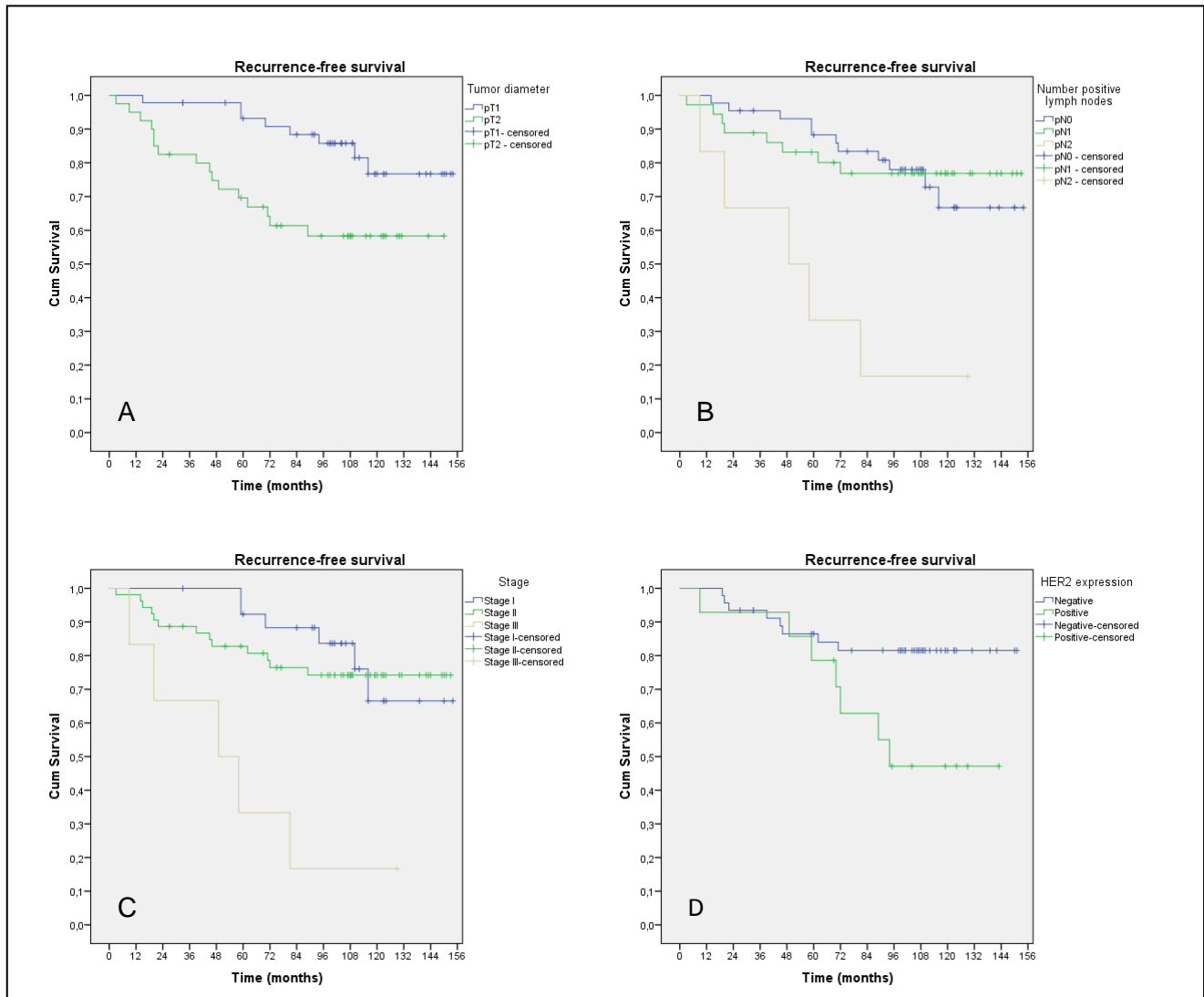
**Figure 3.** Significant association between the presence of vascular invasion in the tumor and: A) lymph node status ( $\chi^2$ : 24.7;  $p= 0.000$ ), and B) number of positive lymph nodes (B) ( $\chi^2$ : 24.7;  $p= 0.000$ ). pN0 staging: no metastases; pN1: 1 – 3 positive lymph nodes; pN2: 4 – 9 positive lymph nodes.



**Figure 4.** A) Significant positive correlation between the immunoreactivity of VEGF and MMP-9. Increased rates of VEGF shows a significant positive correlation with increased rates of MMP-9. Spearman correlation coefficient ( $r_s = 0.246$ ;  $p = 0.023$ ). B) Significant positive correlation between the immunoreactivity of MMP-2 and TIMP-2. Increased rates of MMP-2 shows a significant positive correlation with increased rates of TIMP-2. Spearman correlation coefficient ( $r_s = 0.358$ ;  $p = 0.001$ ).

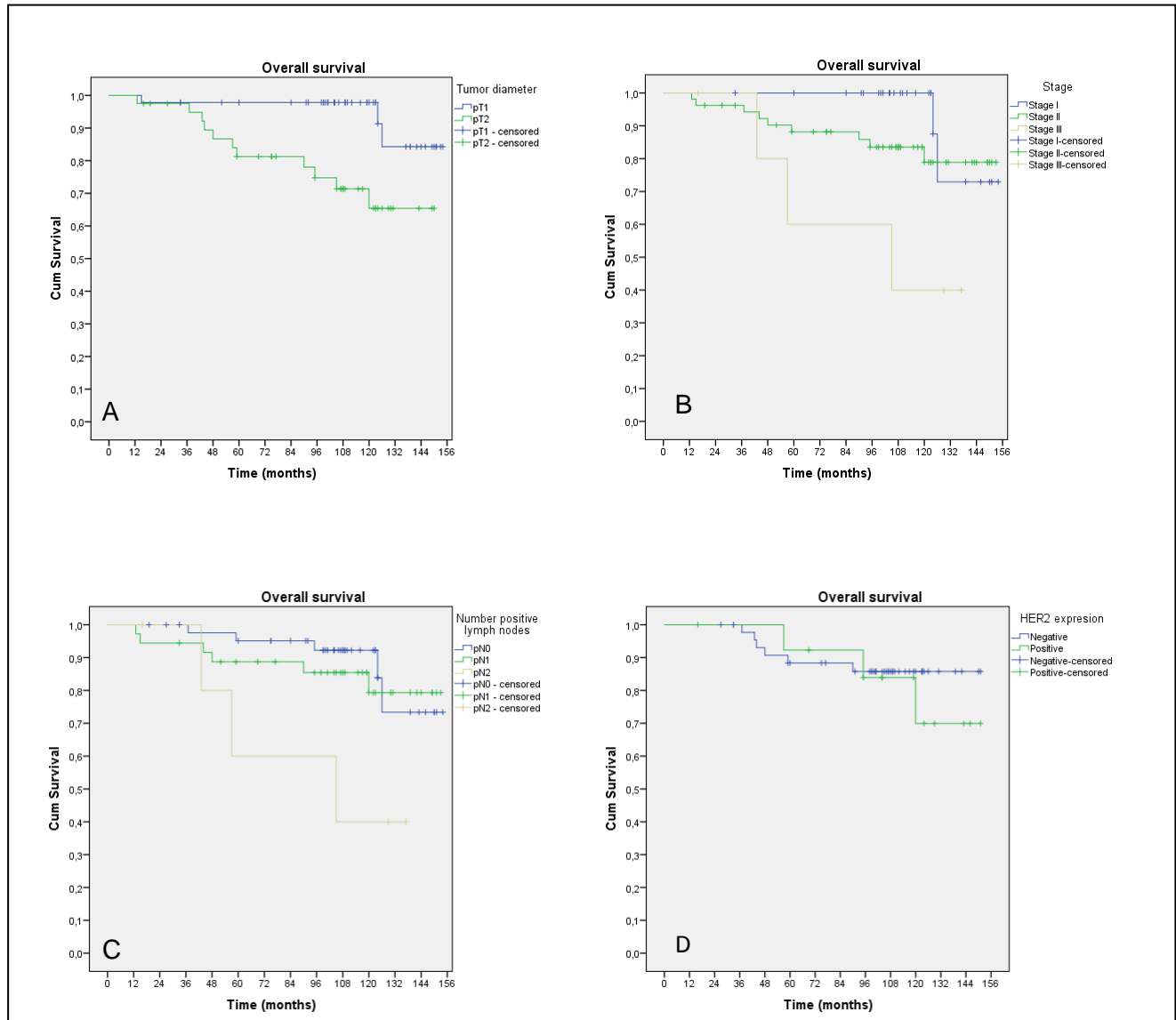


**Figure 5.** A) Comparison of expression of TIMP-2 and age in years: The expression of TIMP-2 is greater in patients aged  $\geq 50$  years, showing a significant difference in TIMP-2 expression between the two groups calculated by the U test of Mann-Whitney: 264 (188-305);  $p= 0.002$ ; B) Comparison of TIMP-2 expression and pathological tumor diameter: The TIMP-2 expression is higher in patients with pT1 tumor diameter. There is a significant difference in TIMP-2 expression between the two groups calculated by the U test of Mann-Whitney: 262 (190-286);  $p= 0.016$ . pT1:  $\leq 2.0$  cm; pT2:  $> 2.0$  cm and  $\leq 5.0$  cm.

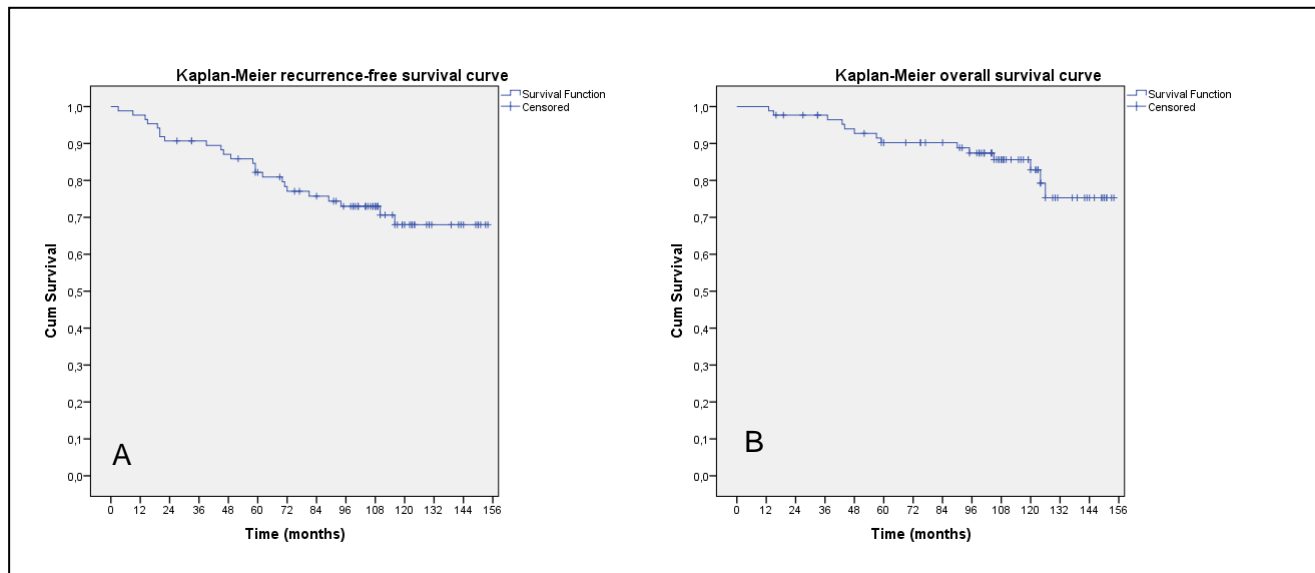


**Figure 6.** Kaplan-Meier curves for recurrence-free survival according to: A) Tumor diameter: observed that the probability of recurrence is significantly higher in patients with pT2 tumor size, compared with pT1. There is a difference between the groups studied in time, determined by the log-rank statistic,  $p = 0.009$ . pT1:  $\leq 2.0$  cm; pT2:  $> 2.0$  cm and  $\leq 5.0$  cm; B) Number of positive lymph nodes: observed that the probability of recurrence is significantly higher in patients with pN2 number of positive lymph nodes in relation to pN0 and pN1. There is a difference between the groups studied in time, determined by the log-rank statistic,  $p = 0.001$ . pN0: no metastasis; pN1: 1 – 3 positive lymph nodes; pN2: 4 – 9 positive lymph nodes; C) Stage of disease; observed that the probability of recurrence is significantly higher in patients and stage III in relation to stage I and II. There is a difference between the groups studied in time, determined by the log-rank statistic,  $p = 0.001$ ; D) Expression of HER2: observed that the probability of relapse is significantly higher in patients with HER2 overexpression. There is a difference between the groups studied in time, determined by the log-rank statistic,  $p = 0.028$ .





**Figure 7.** Kaplan-Meier curves for overall survival according to: A) Tumor diameter: observed that the probability of death is significantly higher in patients with pT2 tumor diameter. There is a difference between the groups studied in time, determined by the log-rank statistic,  $p = 0.005$ . pT1:  $\leq 2.0$  cm; pT2:  $> 2.0$  cm and  $\leq 5.0$  cm; B) Stage of the disease: observed that the probability of death is significantly higher in patients stage III. There is a difference between the groups studied in time, determined by the log-rank statistic,  $p = 0.022$ . C) Number of positive lymph nodes: observed that the probability of death is higher in patients classified as pN2, however the log-rank test was not significant,  $p = 0.054$ . pN0: no metastasis; pN1: 1 – 3 positive lymph nodes; pN2: 4 – 9 positive lymph nodes; D) Expression of HER2: did not show significance for risk of death,  $p = 0.58$ .



**Figure 8.** A) The recurrence-free survival obtained by the Kaplan-Meier method was 68.0% at the end of the study and 82.2% and 68.0% at 5 and 10 years respectively. The estimated average time of disease-free survival was 123.2 months with 95% CI (112.5, 133.9); B) The overall survival obtained by the Kaplan-Meier estimator was 75.3% at the end of the study period and 90.2% and 82.9% at 5 and 10 years, respectively. The estimated mean overall survival was 137.1 months with 95% CI (128.9, 145.3).  
Cum Survival: cumulative proportion of survival.

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of 86 patients with breast cancer

Variables	Frequency	%	% Valid
Age (years)	58.4 ± 11.2		
< 50	21	24.4	24.4
≥ 50	65	75.6	75.6
Color			
Black	03	3.5	3.5
White	83	96.5	96.5
Menarche (years)	12.8 ± 1.4		
≤ 12	44	51.2	51.2
> 12	42	48.8	48.8
Education			
Incomplete primary education	32	37.2	41.6
Complete primary education	24	27.9	31.2
Incomplete secondary education	01	1.2	1.3
Complete secondary education	12	14.0	15.6
Incomplete higher education	02	2.3	2.6
Complete higher education	06	7.0	7.8
Unavailable	09	10.5	-
BMI			
< 30	69	80.2	80.2
≥ 30	17	19.8	19.8
Pathologic tumor diameter (pT, cm)	2.3 ± 1.0		
≤ 2.0	46	53.5	53.5
> 2.0 e ≤ 5.0	40	46.5	46.5
Tumor Classification / UICC			
≤ 0.5 cm (pT1a)	01	1.2	1.2
> 0.5 cm e ≤ 1.0 cm (pT1b)	08	9.3	9.3
> 1.0 cm e ≤ 2.0 cm (pT1c)	37	43.0	43.0
> 2.0 cm e ≤ 5.0 cm (pT2)	40	46.5	46.5
Histologic type			
Ductal	82	95.3	95.3
Lobular	04	4.7	4.7
Histologic grade			
GI	22	25.5	25.5
GII	52	60.5	60.5
GIII	12	14.0	14.0
Vascular invasion			
Yes	44	51.2	51.2
No	42	48.8	48.8
Lymph node status			
Positive	42	48.8	48.8
Negative	44	51.2	51.2
Number of positive lymph nodes			
N0 (No metastasis)	44	51.2	51.2
N1 (1 - 3 positive lymph nodes)	36	41.8	41.8
N2 (4 - 9 positive lymph nodes)	06	7.0	7.0
pTNM Clasification			
pT1N0M0	28	32.6	32.6
pT1N1M0	17	19.8	19.8
pT1N2M0	01	1.2	1.2
pT2N0M0	15	17.4	17.4
pT2N1M0	20	23.2	23.2
pT2N2M0	05	5.8	5.8
Pathologic staging			
stage I	28	32.6	32.6
stage II	52	60.4	60.4
stage III	06	7.0	7.0
pTNM staging			
stage I	28	32.6	32.6
stage IIA	32	37.2	37.2
stage IIB	20	23.2	23.2
stage IIIA	06	7.0	7.0

Data are reported as means ± SD, score (percent). Abbreviations: BMI- Body Mass Index; pT – pathologic tumor diameter; UICC - International Union Against Cancer; pTNM – Pathological classification of malignant tumors, T (tumor), N (lymph node), M (metastasis). Education as there was no data available in nine (10.5%) cases.

**Table 2.** Distribution of patients with breast cancer according to the variables and significance in the univariate Cox proportional hazards model to relapse.

Variables	Cases		Relapse		p	Relative risk (IC95%)
	n	%	n	%		
Age (years)					0.99	
< 50	21	24.4	6	28.6		1.00
≥ 50	65	75.6	18	27.7		0.99 (0.39 – 2.50)
Lymph node status					0.44	
Positive	42	48.8	13	31.0		1.00
Negative	44	51.2	11	25.0		0.73 (0.33 – 1.63)
Number of positive lymph nodes					0.00	
N0 (No metastasis)	44	51.2	11	25.0		1.00
N1 (1 – 3 positive lymph nodes)	36	41.9	8	22.2	0.89	0.94 (0.38 – 2.33)
N2 (4 – 9 positive lymph nodes)**	6	7.0	5	83.3	0.00	5.55 (1.91 – 16.14)
Pathologic tumor diameter (cm)**					0.01	
≤ 2.0	46	53.5	8	17.4		1.00
> 2.0 e ≤ 5.0	40	46.5	16	40.0		2.93 (1.25 – 6.87)
Pathologic Staging**					0.00	
stage I	28	32.6	6	22.2		1.00
stage II	52	60.4	13	24.5	0.66	1.25 (0.47 – 3.28)
stage III	6	7.0	5	83.3	0.00	6.60 (1.99 – 21.85)
Histologii type*					-	
Lobular invasor	4	4.7	0	0.0		-
Ductal invasor	82	95.3	24	29.3		-
Histological grade					0.26	
GI	22	25.6	4	18.2		1.00
GII	52	60.5	18	34.6	0.20	2.04 (0.69 – 6.03)
GIII	12	14.0	2	16.7	0.86	0.86 (0.16 – 4.67)
Vascular invasion					0.71	
No	42	48.8	11	26.2		1.00
Yes	44	51.2	13	29.5		1.16 (0.52 – 2.60)
Estrogen receptor					0.29	
No	8	9.6	1	12.5		1.00
Yes	75	90.4	23	30.7		2.96 (0.40 – 21.93)
Progesterone receptor					0.33	
No	13	16.3	2	15.4		1.00
Yes	67	83.8	21	31.3		2.06 (0.48 – 8.79)
HER2 overexpression**					0.04	
No	46	76.7	8	17.4		1.00
Yes	14	23.3	7	50.0		2.96 (1.07 – 8.16)
Ki-67 expression					0.92	
< 14 %	15	34.1	4	26.7		1.00
≥ 14 %	29	65.9	8	27.6		1.06 (0.32 – 3.54)
p53 expression					0.28	
Negative (≤ 10%)	30	50.8	9	30.0		1.00
Positive (> 10%)	29	49.2	5	17.2		0.55 (0.18 – 1.64)
Molecular subtypes*					-	
Luminal A	12	24.5	3	25.0		1.00
Luminal B	32	65.3	11	34.4	0.65	1,35 (0.38 – 4.83)
HER2 overexpression	2	4.1	0	0.0	-	-
Triple negative	3	6.1	0	0.0	-	-
Local treatment					0.12	
Segmentectomy + Lymphadenectomy + RT	45	52.3	8	17.8		1.00
Mastectomy + Lymphadenectomy + RT	7	8.1	3	42.9	0.06	3.59 (0.95 – 13.56)
Mastectomy + Lymphadenectomy	32	37.2	12	37.5	0.05	2.47 (1.01- 6.07)
Segmentectomy + Lymphadenectomy	2	2.3	1	50.0	0.19	4.01 (0.50 – 32.16)
Adjuvant systemic treatment					0.35	
Hormone therapy	39	45.3	14	35.9		1.00
Hormone therapy + Chemotherapy	20	23.3	6	30.0	0.69	0.82 (0.32 – 2.14)
Chemotherapy	20	23.3	3	15.0	0.11	0.36 (0.10 – 1.27)
Nothing	7	8.1	1	14.3	0.30	0.35 (0.05 – 2.62)
Total	86	100.0	24	27.9		

Results are presented as number and percentage, relative risk (Confidence interval).

\*Convergence problems in model; Missing data: Estrogen receptor (3); Progesterone receptor (6); HER2 expression (26); Ki67 expression (42); p53 expression (27); Molecular subtypes (37).

\*\* Isolated risk factors, significantly associated with the risk of disease recurrence (p< 0.05). Abbreviations: RT= radiotherapy.

**Tabella 3.** Distribution of patients with breast cancer according to the variables and significance in the univariate Cox proportional hazards model to death.

Variables	Cases		Death		p	Relative risk (IC95%)
	n	%	n	%		
Age (years)					0.13	
< 50	21	24.4	6	28.6		1.00
≥ 50	65	75.6	8	12.3		0.45 (0.16 – 1.28)
Lymph node status					0.26	
Positive	42	48.8	9	21.4		1.00
Negative	44	51.2	5	11.4		0.54 (0.18-1.60)
Number of positive lymph nodes					0.08	
N0 (No metastasis)	44	51.2	5	11.4		1.00
N1 (1 - 3 positive lymph nodes)	36	41.9	6	16.7	0.56	1.43 (0.44 – 4.69)
N2 (4 - 9 positive lymph nodes) **	6	7.0	3	50.0	0.03	4.95 (1.17 – 20.91)
Pathologic tumor diameter (cm)					0.01	
≤ 2.0	46	53.5	3	6.5		1.00
> 2.0 e ≤ 5.0 **	40	46.5	11	27.5		5.13 (1.43 – 18.45)
Pathologic staging					0.06	
stage I	28	32.6	2	7.4		1.00
stage II	52	60.4	9	17.0	0.23	2.54 (0.55 – 11.78)
stage III **	6	7.0	3	50.0	0.02	8.22 (1.37 – 49.52)
Histologic type *					-	
Lobular	4	4.7	0	0.0		-
Ductal	82	95.3	14	17.1		-
Histologic grade					0.60	
GI	22	25.6	3	13.6		1.00
GII	52	60.5	10	19.2	0.64	1.36 (0.37 – 4.95)
GIII	12	14.0	1	8.3	0.55	0.50 (0.05 – 4.80)
Vascular Invasion					0.63	
No	42	48.8	6	14.3		1.00
Yes	44	51.2	8	18.2		1.30 (0.45 – 3.75)
Estrogen receptor					0.60	
Negative	8	9.6	1	12.5		1.00
Positive	75	90.4	13	17.3		1.73 (0.23 – 13.22)
Progesterone receptor					0.44	
Negative	13	16.3	1	7.7		1.00
Positive	67	83.8	13	19.4		2.24 (0.29 – 17.13)
HER2 expression					0.58	
Negative	46	76.7	6	13.0		1.00
Positive	14	23.3	3	21.4		1.48 (0.37 – 5.95)
Ki-67 expression					0.79	
< 14%	15	34.1	2	13.3		1.00
≥ 14%	29	65.9	5	17.2		1.25 (0.24 – 6.44)
p53 expression					0.20	
Negative (≤ 10%)	30	50.8	6	20.0		1.00
Positive (> 10%)	29	49.2	2	6.9		0.35 (0.07 – 1.74)
Molecular Subtypes *					-	
Luminal A	12	24.5	2	1.67		1.00
Luminal B	32	65.3	6	18.8	0.97	1.03 (0.21 – 5.10)
HER2 overexpression	2	4.1	0	0.0	-	-
Triple negative	3	6.16	0	0.0	-	-
Local treatment					0.15	
Segmentectomy + Lymphadenectomy + RT	45	52.3	5	11.1		1.00
Mastectomy + RT	7	8.1	2	28.6	0.09	4.17 (0.80 – 21.67)
Mastectomy + Lymphadenectomy	32	37.2	6	18.8	0.20	2.20 (0.66 – 7.33)
Segmentectomy + Lymphadenectomy	2	2.3	1	50.0	0.06	8.35 (0.94 – 74.00)
Adjuvant systemic treatment					0.67	
Hormone therapy	39	45.3	6	15.4		1.00
Hormone therapy + Chemotherapy	20	23.3	5	25.0	0.47	1.55 (0.47 – 5.10)
Chemotherapy	20	23.3	2	10.0	0.50	0.57 (0.12 – 2.85)
Nothing	7	8.1	1	14.3	0.89	0.86 (0.10 – 7.11)
Total	86	100.0	14	16.3		

Results are presented as number and percentage, relative risk (Confidence interval). \*Convergence problems in model; Missing data: Estrogen receptor (3); Progesterone receptor (6); HER2 expression (26); Ki67 expression (42); p53 expression (27); Molecular subtypes (37). \*\* Isolated risk factors, significantly associated with the risk of death (p< 0.05). Abbreviations: RT= radiotherapy.

**Table 4.** Immunohistochemical characteristics of the tumors studied in 86 patients

Parameters	n = 86	%	% Valid
Estrogen			
Positive	75	87.2	90.4
Negative	08	9.3	9.6
Unavailable	03	3.5	-
Progesterone receptor	67	77.9	83.8
Positive	13	15.1	16.3
Negative	06	7.0	-
Unavailable			
HER2	14	16.3	23.3
Positive	46	53.5	76.7
Negative	26	30.2	-
Unavailable			
Ki-67	29	33.7	65.9
Expression ≥ 14 %	15	17.4	34.1
Expression < 14 %	42	48.9	-
unavailable			
P53	29	33.7	49.2
Positive	30	34.9	50.8
Negative	27	31.4	-
Unavailable			
Molecular subtype	12	14.0	24.5
Luminal A	32	37.2	65.3
Luminal B	02	2.3	4.1
Overexpression HER2	03	3.5	6.1
Triple Negative	37	43.0	-
Unavailable			
VEGF	190 (180 - 257)		
MMP-2	52 (6 - 192)		
MMP-9	180 (100 - 223)		
TIMP-1	368 (338 - 380)		
TIMP-2	244 (170 - 285)		

The values are shown in counts (percentage) or median (interquartile range: P25 to P75). The expression levels of MMPs, TIMPs and VEGF were obtained through HSCORE  $\Sigma [(I + 1) \times PC]$ , where I and PC represent the staining intensity and the percent of stained cells, respectively. VEGF = vascular endothelial growth factor, MMP = matrix metalloproteinase, TIMP = Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase.

**Table 5.** Association between angiogenic factors VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 with other clinicopathologic characteristics.

Variables	n(%)	VEGF	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Age (years)	58.4 ± 11.2					
< 50	21(24.4)	190(178-279)	40(2.5-173)	160(42-190)	360(330-370)	178(148-237) <sup>a</sup>
≥ 50	65(75.6)	190(180-255)	75(7.5-222)	180(123-247)	372(336-386)	264(188-305)
Color						
Black	03(3.5)	190(120- -)	0.0(10- -)	194(16- -)	380(194- -)	194(92- -)
White	83(96.5)	190(180-264)	54(6.0-186)	180(100-219)	368(340-380)	249(170-285)
BMI						
< 30	69(80.2)	190(180-270)	56(9.0-783)	180(120-237)	368(340-380)	249(170-285)
≥ 30	17(19.8)	186(166-217)	36(0.0-252)	156(23-188)	360(297-380)	219(160-285)
Menarche (years)	12.8 ± 1.4					
≤ 12	44(51.2)	190(180-270)	50(10-240)	180(121-229)	374(343-388) <sup>b</sup>	259(178-312)
> 12	42(48.8)	186(177-240)	63(3.7-180)	180(94-222)	360(300-380)	225(164-270)
Pathologic tumor diameter (pT, cm)	2.3 ± 1.0					
≤ 2.0	46(53.5)	190(180-270)	40(6.0-216)	183(124-243)	370(338-380)	262(190-286) <sup>c</sup>
> 2.0 and ≤ 5.0	40(46.5)	188(176-251)	72(5.0-180)	170(49-193)	360(307-380)	190(160-270)
Tumor classification / UICC						
≤ 0.5 cm (pT1a)	01(1.2)	255	384	192	376	291
> 0.5 cm and ≤ 1.0 cm (pT1b)	08(9.3)	188(176-205)	25(1.5-226)	186(157-194)	372(340-380)	252(191-285)
> 1.0 cm and ≤ 2.0 cm (pT1c)	37(43.0)	190(180-270)	40(6.0-195)	180(110-264)	368(316-384)	255(188-322)
> 2.0 cm and ≤ 5.0 cm (pT2)	40(46.5)	188(176-251)	72(5.5-180)	170(49-193)	360(307-380)	190(160-270)
Histological type						
Ductal	82(95.3)	175(159-187)	94(18-318)	234(121-284)	384(350-394)	262(255-337)
Lobular	04(4.7)	190(180-265)	52(6.0-192)	180(99-201)	368(329-380)	229(170-285)
Histological grade						
GI	22(25.5)	186(173-195)	138(9.0-181)	186(124-201)	372(329-380)	240(164-285)
GII	52(60.5)	192(180-270)	52(6.0-240)	170(105-228)	368(343-380)	244(170-289)
GIII	12(14.0)	189(180-256)	17(0.0-208)	178(47-249)	368(343-380)	237(191-281)
Vascular invasion						
Yes	44(51.2)	190(177-255)	63(4.0-163)	180(69-255)	360(293-381)	222(160-276)
No	42(48.8)	187(180-270)	45(8.0-235)	180(127-190)	372(340-380)	255(189-234)
Lymph node status						
Positive	42(48.8)	190(180-235)	45(3.7-157)	165(46-228)	360(295-380)	225(160-272)
Negative	44(51.2)	190(178-270)	64(9.2-238)	180(152-224)	372(340-383)	255(172-321)
Number positive lymph nodes						
N0 (no metastases)	44(51.2)	190(178-270)	64(9.2-238)	180(152-224)	372(340-383)	255(172-321)
N1 (1 - 3 positive lymph nodes)	36(41.8)	188(180-231)	45(4.5-159)	165(34-255)	360(293-380)	222(160-270)
N2 (4 - 9 positive lymph nodes)	06(7.0)	207(177-280)	36(0.0-135)	163(87-182)	364(337-374)	259(170-362)
Molecular subtype						
Luminal A	12(14.0)	188(180-255)	165(56-251)	178(22-25)	360(297-379)	277(172-355)
Luminal B	32(37.2)	192(171-270)	90(18-232)	170(49-164)	372(334-387)	255(190-387)
HER2 overexpression	02(2.3)	187(180- -)	144(24- -)	135(0.0- -)	334(297- -)	213(156- -)
Triple Negative	03(3.5)	180(166- -)	10(4.0- -)	16(0.0- -)	292(291- -)	225(10- -)
Unavailable	37(43.0)	-	-	-	-	-
TNM classification						
pT1N0M0	28(32.6)	190(178-276)	45(6.7-238)	186(155-238)	370(340-380)	262(190-289)
pT1N1M0	17(19.8)	190(180-244)	50(4.5-205)	180(68-270)	368(298-380)	255(181-285)
pT1N2M0	01(1.2)	180	0.0	180	380	270
pT2N0M0	15(17.4)	186(176-270)	75(10-180)	180(130-180)	380(352-388)	180(160-340)
pT2N1M0	20(23.3)	183(168-216)	48(55-175)	165(15-246)	360(291-380)	192(157-268)
pT2N2M0	05(5.8)	225(180-282)	70(1.0-190)	156(78-180)	360(315-370)	249(150-315)
pTNM Stage						
stage I	28(32.6)	190(180-270)	40(9.0-234)	186(150-196)	372(340-380)	270(190-291)
Stage IIA	32(37.2)	188(180-266)	97(7.0-225)	180(92-270)	364(343-380)	222(170-285)
Stage IIB	20(23.2)	186(171-232)	40(4.0-170)	170(20-237)	360(291-382)	190(158-267)
Stage IIIA	06(7.0)	207(177-280)	36(0.0-135)	163(87-182)	364(337-374)	259(170-362)

Data are shown by percentage, mean ± SD or median (interquartile range; P25 to P75). U Mann-Whitney test shows an association between higher levels of TIMP-2 with age ≥ 50 years old ( $p = 0.002$ )<sup>a</sup> and tumor diameter ≤ 2.0 cm ( $p = 0.016$ )<sup>c</sup>. High levels of TIMP-1 was associated with menarche ≤ 12 years ( $p = 0.038$ )<sup>b</sup>. For variables with three or more categories test was used H Kruskal-Wallis test.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O câncer de mama é um evidente problema de saúde pública mundial, devido às altas taxas de incidência e mortalidade.

É uma doença de comportamento biológico heterogêneo, caracterizada por múltiplas alterações genéticas cumulativas. O seu curso clínico é muito variável, podendo se manifestar de forma indolente ou de forma agressiva, com o surgimento precoce de metástases à distância. Isto torna as decisões de ordem terapêuticas muito complexas.

Até o presente, as características do tumor primário (diâmetro, grau de diferenciação e presença de invasão vascular ou nervosa), o comprometimento dos linfonodos axilares, expressão de receptores de estrógeno e de progesterona e a presença de amplificação de HER2 têm sido os principais parâmetros utilizados para aferir o prognóstico do câncer de mama operável e orientar a utilização de terapias adjuvantes. Entretanto, isto tem sido insuficiente na tentativa de diminuir as taxas de mortalidade.

Pesquisas moleculares têm sido direcionadas para identificar pacientes de risco para recidiva. Houve avanços no conhecimento da fisiopatologia do câncer de mama, bem como no desenvolvimento de novas terapias alvo, capazes de atacar eventos responsáveis pelo crescimento celular, sobrevivência celular, angiogênese, migração, invasão e metástase.

Mais recentemente a identificação de subtipos moleculares de câncer de mama tem sido possível, melhorando o entendimento sobre o comportamento biológico do câncer de mama. Em alguns países, já são usados testes genômicos como o OncotypeDX<sup>®</sup>, MammaPrint<sup>®</sup> e Symphony<sup>®</sup> para analisar tumores em estágio inicial. Com isto, a identificação de tumores com maior ou menor potencial de produzirem metástases subclínicas tem sido possível, auxiliando na tomada de decisão.



Apesar destes avanços e do diagnóstico precoce, um número significativo de mulheres com tumores da mama operáveis, apresentando evolução desfavorável vêm a sucumbir devido ao surgimento de doença metastática.

Uma melhor compreensão da heterogeneidade do tumor e das características microambientais subjacentes, bem como dos mecanismos e as consequências das suas interações é essencial para melhorar o direcionamento das terapias existentes e desenvolver novos agentes terapêuticos para o câncer.

Diante deste cenário, fica clara a necessidade de que estudos prospectivos adicionais sejam realizados, para que o papel destes marcadores possa ser mais bem estudado. Além disto, a pesquisa de novos marcadores moleculares no câncer de mama é fundamental para que possamos avançar no tratamento desta neoplasia tão prevalente em nosso meio, e muitas vezes letal em um número significativo de pacientes.

Considerando que a estratégia usada, hoje, para a tomada de decisão, ainda é incompleta, e enquanto não podemos dispor de testes genômicos mais sofisticados e dispendiosos, o exame histopatológico, associado à imuno-histoquímica pode ser a solução viável. Esta ainda representa a melhor ferramenta, ao nosso alcance, para predizer o desfecho da doença e sua resposta ao tratamento adjuvante. Entretanto, estes instrumentos nos ajudariam a classificar melhor estas pacientes e, muitas pacientes que são tratadas mais agressivamente, poderiam ser poupadas.

A importância epidemiológica do câncer de mama deve ser entendida, não somente pelos profissionais da saúde envolvidos no diagnóstico e tratamento da doença, mas também pelas autoridades responsáveis pela gestão em saúde e pelas verbas destinadas a educação e pesquisa. O diagnóstico precoce é urgente, entretanto investimentos em pesquisa são necessários, para que se oportunize às pacientes acometidas pela doença uma medicina especializada e de alta precisão.

## 8 APÊNDICES

### Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer

F.C. Jobim<sup>1,4</sup>, N.L. Xavier<sup>2</sup>, D.M. Uchoa<sup>3</sup>, D.B. Cruz<sup>3</sup>,  
M. Saciloto<sup>4</sup>, N. Chemello<sup>2</sup> and G. Schwartzmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas,

<sup>2</sup>Serviço de Mastologia, <sup>3</sup>Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>4</sup>Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

#### Abstract

Our objective was to determine the presence of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 and specific tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1 and TIMP-2) in tumor samples obtained from patients with primary breast cancer. We attempted to correlate these findings with the status of the sentinel lymph node (SLN) and clinical-pathological characteristics such as age, tumor size, histological type, histological grade, and vascular invasion. Tumor samples from 88 patients with primary breast cancer were analyzed. The immunoreactivity of VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in tumors was correlated with clinical and pathological features, as well as SLN status. Nonparametric, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, and Spearman tests were used. Categorical variables were analyzed by the Pearson test. No statistically significant correlation was found between the amount of VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 and the presence of tumor cells in the SLN. However, larger tumor diameter ( $P < 0.01$ ) and the presence of vascular invasion ( $P < 0.01$ ) were correlated positively with a positive SLN. A significant correlation of higher VEGF levels ( $P = 0.04$ ) and lower TIMP-1 levels ( $P = 0.04$ ) with ductal histology was also observed. Furthermore, lower TIMP-2 levels showed a statistically significant correlation with younger age (<50 years) and larger tumor diameter (2.0-5.0 cm). A positive SLN correlated significantly with a larger tumor diameter and the presence of vascular invasion. Higher VEGF and lower TIMP-1 levels were observed in patients with ductal tumors, while higher TIMP-1 levels were observed in lobular tumors.

Key words: Breast cancer; Vascular endothelial growth factor; Matrix metalloproteinase; Metalloproteinase tissue inhibitors; Sentinel lymph node

#### Introduction

Pioneering work done by Judah Folkman in the 1970's suggested that tumor angiogenesis was a critical event for cancer growth (1). The interaction between tumor cells and stroma is a vital condition for the beginning of this process, involving molecules that include growth factors, adhesion molecules, angiogenic stimuli, clotting factors, and proteinases (2-4).

Some angiogenic proteins have been described. These include vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor, tumor necrosis factor alpha, interleukin 8, and matrix metalloproteinases (MMPs) (5).

Endogenous angiogenesis inhibitors such as tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) are necessary to block the mitogenic stimuli in the vascular endothelium (5,6). Modifications in the expression of tumor angiogenic factors as well as their inhibitors have been described in various types of cancer, such as colorectal, lung, head and neck and breast cancer, and malignant melanoma (7,8). VEGF belongs to a family of glycoproteins that includes VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, and placental growth factor. The main mediator of tumor angiogenesis is VEGF-A, commonly referred to as VEGF (2,8,9). A potent and

Correspondence: G. Schwartzmann, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350/399, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: gschwartzmann@hcpa.ufrgs.br

Research supported by the Postgraduate Program on Medical Science of the Federal University of Rio Grande do Sul and by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos, Academic Hospital of Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Received August 10, 2008. Accepted June 22, 2009. Available online September 4, 2009.

selective mitogenic factor for the endothelium, it elicits a rapid and complete angiogenic response and increased capillary permeability. Produced and secreted by a number of normal cells, it shows marked expression in tumor cells, including breast cancer (10,11).

Several factors contribute to the increased expression of VEGF in breast cancer. Low intracellular oxygen concentration blocks the degradation of hypoxia-inducing factor-1 $\alpha$ , raising its levels and determining intracellular hypoxia, which in turn determines the increase in angiogenic activity for the activation of gene transcription of VEGF (2,12,13). The cleavage of proteins by extracellular MMPs also frees VEGF and endostatin by the cleavage of collagen IV, the latter being an inhibitor of angiogenesis (6,8).

The expansion of solid tumors determines the formation of hypoxic regions, leading to increased production of VEGF, which, in addition to determining the growth and survival of endothelial cells, also acts on some tumor cells, protecting them from apoptosis (10,14,15).

The MMPs are neutral endopeptidases, the family of zinc-dependent proteinases. They play an important role in physiological processes, keeping a balance with the TIMPs. They are also involved in pathological conditions where there is a disruption of this balance, causing diseases such as arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis, and cancer (5,7).

Several studies suggest a significant involvement of the MMPs in the process of tumor growth and invasion. A high expression of MMPs, especially MMP-2 and -9, is associated with the histological grade, stage of breast cancer and with the risk of recurrence and death (3,5,7,16,17).

The MMPs are produced by a wide variety of connective tissue cells and also by a variety of malignant cells. Most are in latent forms (zymogens) that are cleaved proteolytically and activated in the extracellular space (5,18).

The MMPs degrade the basement membrane and most components of the extracellular matrix, such as collagen, laminin, fibronectin, and elastin, which are barriers to the normal migration of cells and vascular invasion (6,18).

Molecules with stromal action such as cyclooxygenase-2, adhesion molecules, MMPs, and VEGF accelerate the process of angiogenesis. However, for metastasis to occur, there must be a break-up of the basement membrane, degradation of the extracellular matrix, proliferation and migration of endothelial cells, formation of the vascular lumen, and functional maturation (2,18).

Factors like age, tumor diameter, number of positive axillary lymph nodes, and hormonal and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status are currently used in breast cancer to guide the selection of the appropriate adjuvant therapy for women with locoregional disease (19). However, treatment decisions in patients with clinically negative axillary lymph nodes represent a special therapeutic challenge.

Immunohistochemistry has been used in an attempt

to identify tumors with expression of certain molecules that may serve as biological target for new drugs, and can be combated by more specific and effective therapeutic regimens.

For the reasons given above, we determined by immunohistochemistry the expression of angiogenic factors (VEGF, MMP-2 and MMP-9) as well as TIMP-1 and TIMP-2 in tumor samples obtained from patients with primary breast cancer.

Our objective was to correlate these findings with the status of the sentinel lymph node (SLN) and clinical-pathological characteristics such as age, tumor size, histological type, histological grade, and vascular invasion.

### Patients and Methods

Ninety-five patients with a diagnosis of breast cancer, with clinically negative axillary lymph nodes and without distant metastases, were operated at the Academic Hospital in Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), between January and December 2004. Tissue samples obtained from the primary tumor and from the SLN were analyzed. This transverse study analyzed the expression of VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in formalin-fixed and paraffin blocks with breast tumor samples. Hematoxylin-eosin preparations were checked and a paraffin block from each case was separated for immunohistochemical studies. Two cases of *in situ* carcinoma were excluded from the series, and five cases were discarded due to insufficient material, three of them showing a positive SLN for the presence of malignancy. Thus, 88 patients were included in the final analysis.

The clinical and pathological features were classified according to the following parameters: 1) presence (+) or absence (-) of tumor involvement in the SLN. The SLN was considered to be positive when it presented a cluster of malignant cells  $\geq 0.2$  mm; 2) age,  $< 50$  and  $\geq 50$  years; 3) tumor diameter, categorized as  $\leq 2.0$  cm or between 2.0 and  $\leq 5.0$  cm; 4) histological types classified as ductal or lobular; 5) histological grade, classified as grade 1, grade 2, or grade 3, according to the Scarff Bloom Richardson score (20); 6) presence of at least one nest of tumor cells clearly visible inside the vascular lumen (yes) or absence (no) of vascular invasion detected by hematoxylin-eosin.

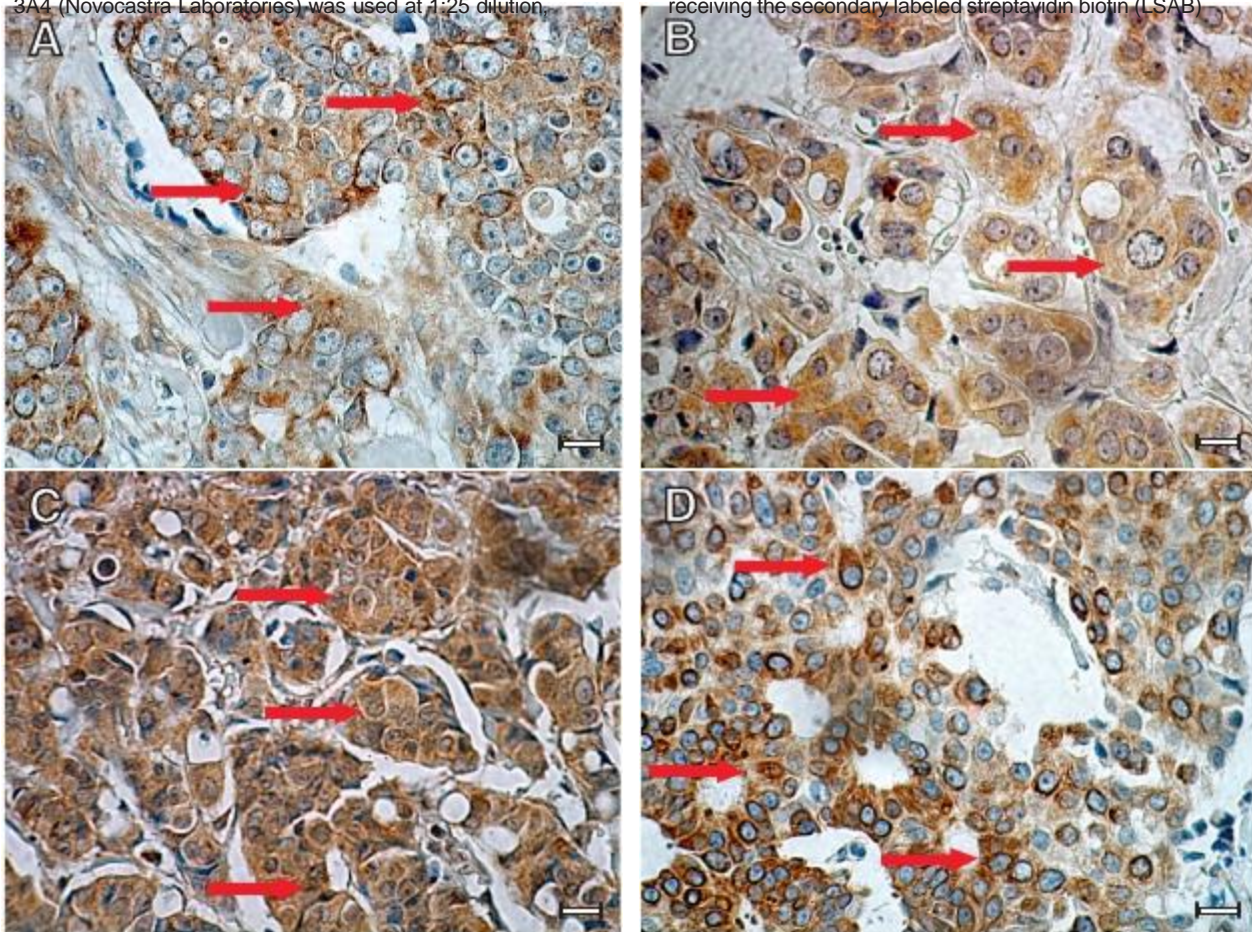
The immunohistochemical technique using the standard avidin-biotin-peroxidase complex was employed to measure the expression of antigens in tumors. The immunoreaction was analyzed in a qualitative and quantitative way. The qualitative estimation was based on the staining intensity of the cytoplasm of neoplastic cells using the following scores: 0 = absence of staining, 1 = slightly positive, 2 = moderately positive, 3 = strongly positive. Protein immunohistochemical expression was quantitated as percentage from 0 (zero) to 100%. The final expression of each case was obtained by the following algorithm: HSCORE =  $\sum[(I + 1)] \times PC$ , where I

and PC represent the staining intensity and the percentage of stained cells, respectively (21,22).

In order to measure the expression of VEGF we used the polyclonal antibody of rabbit anti-factor of vascular human endothelial growth of Signet™, USA, and ultra streptavidin detection at 1:30 dilution, using a sample of breast tumor as external control. The expression of MMP-2 and MMP-9 was measured using the rat monoclonal antibody NCL-MMP2-507, clone 17B11, and the rat monoclonal antibody NCL-MMP9-439, clone 15W2, from Novocastra Laboratories (UK) at 1:40 dilution, using normal hepatic tissue as the external control. The expression of TIMP-1 (tissue inhibitor of MMP-9) was analyzed with the rat monoclonal antibody NCL-TIMP1-485, clone 6F6a (Novocastra Laboratories) at 1:75 dilution, with normal colon tissue as the external control. To determine the expression of TIMP-2 (tissue inhibitor of MMP-2) the rat monoclonal antibody NCL-TIMP2, clone 3A4 (Novocastra Laboratories) was used at 1:25 dilution,

with placental tissue as external control.

Three-micrometer thick paraffin sections were obtained, placed on histological slides treated with poly-D-lysine, deparaffinized with xylol, and rehydrated with 100% alcohol. The slides were washed in tap water and distilled water and incubated in PBS three times for 5 min each time to complete the blockade of endogenous peroxidase. Antigen retrieval was performed with citrate buffer, pH 6, in a microwave oven for 20 min at 90°C. After 15 min at room temperature, the slides were washed again in running and distilled water, and incubated in PBS. After application of 5% hydrogen peroxide, they were washed again and incubated in PBS. The sections were circled with a "Dako-Pen", the primary antibody was added, and the material was left in a moist chamber (Easy Path®, Erviagas, Brazil) in the refrigerator overnight. The slides were then removed from the refrigerator and washed with distilled water. After receiving the secondary labeled streptavidin biotin (LSAB)



**Figure 1.** Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases MMP-2 (A), MMP-9 (B) and tissue inhibitors of metalloproteinases [TIMP-2 (C) and TIMP-1 (D)] in neoplastic cells of a breast tumor. The arrows show the immunoreaction in the cytoplasm of the neoplastic cells. Breast cancer cells are shown at 400X magnification (bar = 20  $\mu$ m in all panels).

antibody (Avidin Biotin, bottle 1, yellow, Dako, USA), the slides were placed in a moist chamber for 30 min. After incubation in PBS, the procedure was repeated by adding the LSAB antibody (streptavidin peroxidase, Dako). The reaction was developed with the chromogenic substrate diaminobenzidine (Dako) for the sections to remain dark ( $\pm$  30 s) and then were counter-stained with hematoxylin for 20-30 s. After rinsing under running water and application of 2% ammonia, the slides were rinsed in running water again, processed with 100% and mounted with xylol.

Semi-quantitative analysis was carried out by two independent pathologists in the Department of Pathology of HCPA, using an Olympus light microscope, UK, model BX-2 with 10 and 40X objectives.

Qualitative immunohistochemical expression was considered to be positive when the tumor showed at least one cell with cytoplasmic clear and unambiguous brownish staining for each marker utilized, regardless of the intensity of coloration (Figure 1). The quantitative expression of each marker was taken as the average percentage of stained cells in at least 10 microscopic fields.

Statistical analysis to compare the association between SLN-positive groups versus SLN-negative groups and the factors under study and with the other variables selected was performed using the statistical program SPSS V15.

Continuous variables such as age and tumor diameter were compared by the Student *t*-test. VEGF, MMP-2, -9, TIMP-1, and -2 were correlated with the other clinical-pathological parameters by the non-parametric Mann-Whitney U-test, and the correlation with the histological grade was calculated by the non-parametric Kruskal-Wallis test. The Pearson chi-square test was used to analyze the categorical variables. The correlation of angiogenic factors with one another was calculated by the Spearman correlation coefficient. The confidence interval was set at 95% (95%CI) and values of  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant. The project was approved by the Postgraduate Research Group and Medical Ethics Commission of HCPA (#01/88CNS).

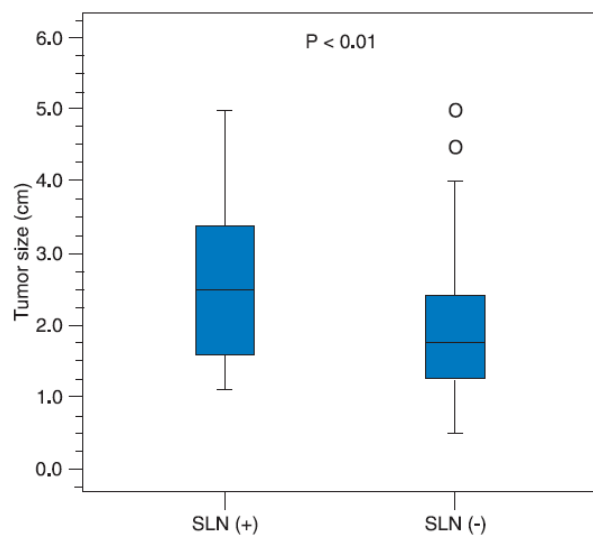
## Results

Table 1 shows the distribution of clinical-pathological and immunohistochemical data according to SLN (+) and SLN (-) status. Mean patient age of 88 patients was 59 years (range: 33-81 years) and mean tumor diameter was 2.3 cm (range: 0.5-5.0 cm). The most frequent histological type was infiltrating ductal carcinoma with 83 (94%) cases, and infiltrating lobular carcinoma was present in 5 cases (6%). The distribution of histological grade according to

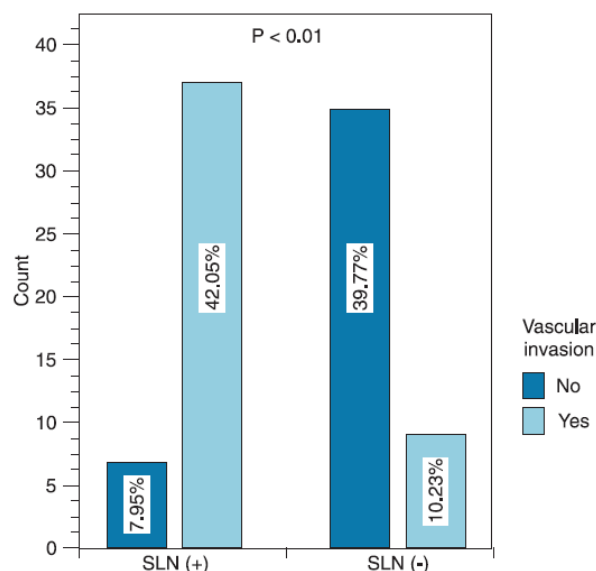
**Table 1.** Clinical-pathological and immunohistochemical data in relation to sentinel lymph node status (SLN): positive and negative SLN groups.

Variables	All (N = 88)	Positive SLN (N = 44)	Negative SLN (N = 44)
Age <sup>a</sup> (years)	58.7 $\pm$ 11.3	58.7 $\pm$ 11.8	58.8 $\pm$ 11.0
Tumor diameter <sup>a*</sup> (cm)	2.3 $\pm$ 1.0	2.7 $\pm$ 1.1	1.9 $\pm$ 1.0
Histological type <sup>b</sup> , N (%)			
Ductal	83 (94%)	42 (96%)	41 (93%)
Lobular	5 (6%)	2 (5%)	3 (7%)
Histological grade <sup>b</sup> , N (%)			
G1	23 (26%)	9 (21%)	14 (32%)
G2	53 (60%)	30 (68%)	23 (52%)
G3	12 (14%)	5.0 (11%)	7.0 (16%)
Vascular invasion <sup>b*</sup> , N (%)			
Yes	46 (52%)	37 (84%)	9 (21%)
No	42 (48%)	7 (16%)	35 (80%)
VEGF <sup>c</sup>	190 (180-255)	190 (177-239)	190 (180-270)
MMP-2 <sup>c</sup>	55 (6-204)	63 (4-176)	52 (9-228)
MMP-9 <sup>c</sup>	180 (100-230)	165 (34-255)	180 (153-196)
TIMP-1 <sup>c</sup>	368 (340-380)	360 (293-380)	372 (340-387)
TIMP-2 <sup>c</sup>	249 (170-285)	225 (160-277)	260 (182-322)
MMP-2/TIMP-2 <sup>c</sup>	0.30 (0.03-0.81)	0.34 (0.01-0.77)	0.26 (0.05-0.88)
MMP-9/TIMP-1 <sup>c</sup>	0.47 (0.29-0.65)	0.47 (0.10-0.70)	0.49 (0.40-0.60)

Data are reported as means  $\pm$  SD, score (percent), or median (interquartile range: P25 to P75). The expression of each protein measured by immunohistochemistry is reported as the mean of the algorithm: HSCORE =  $\Sigma[(I + 1)] \times PC$ , where I and PC represent the staining intensity and the percent of stained cells, respectively. VEGF = vascular endothelium growth factor; MMP = matrix metalloproteinase; TIMP = tissue inhibitors of matrix metalloproteinase. \* $P < 0.05$ , significant correlation with positive SLN (<sup>a</sup>*t*-test, <sup>b</sup>chi-square test, <sup>c</sup>Mann-Whitney U-test).



**Figure 2.** Correlation between tumor diameter and sentinel lymph node status (SLN): positive (+) and negative (-) SLN.  $P < 0.01$  (Spearman).



**Figure 3.** Correlation between the presence of vascular invasion and sentinel lymph node status (SLN): positive (+) and negative (-) SLN. A positive correlation was observed between the presence of vascular invasion and the occurrence of a positive SLN;  $P < 0.01$  (Spearman).

**Table 2.** Attempts to correlate the angiogenic factors VEGF, MMP-2 and MMP-9 with SLN, age, tumor diameter, histology, and vascular invasion.

Variables	N (%)	VEGF	MMP-2	MMP-9
SLN				
Positive	44 (50%)	190 (177-239)	63 (4.0-176)	165 (34-255)
Negative	44 (50%)	190 (180-270)	52 (9.0-228)	180 (153-196)
Age (years)				
<50	21 (24%)	190 (178-279)	40 (1.0-175)	160 (43-190)
≥50	67 (76%)	190 (180-225)	80 (3.0-190)	180 (120-255)
Tumor diameter (cm)				
≤2	47 (53%)	190 (180-270)	40 (6.0-210)	180 (120-240)
>2 and ≤5	41 (47%)	190 (176-248)	75 (7.0-210)	170 (53-207)
Histological type				
Ductal	83 (94%)	190 (180-264)*	54 (6.0-210)	180 (100-219)
Lobular	5.0 (6%)	170 (158-185)	84 (23-267)	186 (50-284)
Histological grade				
G1	23 (26%)	186 (176-210)	126 (6.0-186)	180 (46-196)
G2	53 (60%)	190 (180-255)	56 (10-240)	170 (98-217)
G3	12 (14%)	190 (182-277)	11 (0.0-209)	180 (118-262)
Vascular invasion				
Yes	46 (52%)	190 (176-270)	73 (6.0-169)	180 (57-255)
No	42 (48%)	187 (180-255)	45 (8.0-236)	180 (128-190)

Correlation coefficients were calculated by the Spearman correlation method. Data are reported as score (percent) or median (interquartile range: P25 to P75). The expression of each protein measured by immunohistochemistry is reported as the mean of the algorithm:  $HSCORE = \sum[(I + 1)] \times PC$ , where I and PC represent the staining intensity and the percent of stained cells, respectively. SLN = sentinel lymph node; VEGF = vascular endothelial growth factor; MMP = matrix metalloproteinase. \* $P < 0.05$ , ductal compared to lobular histological type (Mann-Whitney U-test; Kruskal-Wallis H-test for histological grade).

**Table 3.** Attempts to correlate the specific inhibitors TIMP-1, TIMP-2, MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 with SLN, age, tumor diameter, histology, and vascular invasion.

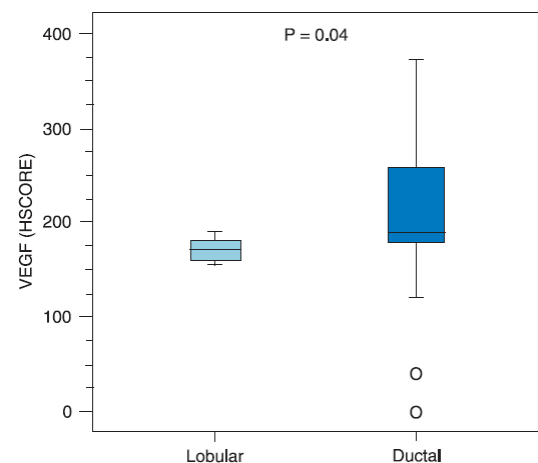
Variables	N (%)	TIMP-1	TIMP-2	MMP-2/TIMP-2	MMP-9/TIMP-1
SLN					
Positive	44 (50%)	360 (293-380)	225 (160-277)	0.34 (0.01-0.77)	0.47 (0.10-0.70)
Negative	44 (50%)	372 (340-387)	260 (182-322)	0.26 (0.05-0.88)	0.49 (0.40-0.60)
Age (years)					
<50	21 (24%)	360 (330-370)	178 (149-237)	0.29 (0.01-0.95)	0.47 (0.11-0.58)
≥50	67 (76%)	372 (340-388)*	264 (190-332)*	0.35 (0.04-0.72)	0.48 (0.31-0.67)
Tumor diameter (cm)					
≤2	47 (53%)	372 (340-380)	270 (190-291)*	0.18 (0.03-0.70)	0.48 (0.31-0.67)
>2 and ≤5	41 (47%)	360 (319-380)	190 (160-270)	0.44 (0.03-0.87)	0.47 (0.14-0.63)
Histological type					
Ductal	83 (94%)	368 (332-380)	234 (170-285)	0.31 (0.03-0.82)	0.47 (0.30-0.63)
Lobular	5 (6%)	388 (360-394)*	270 (255-366)	0.22 (0.11-0.82)	0.48 (0.14-0.72)
Histological grade					
G1	23 (26%)	380 (340-388)	225 (160-285)	0.57 (0.03-0.82)	0.50 (0.12-0.57)
G2	53 (60%)	368 (340-380)	249 (170-306)	0.30 (0.07-0.83)	0.47 (0.28-0.66)
G3	12 (14%)	350 (293-386)	245 (200-281)	0.04 (0.00-0.60)	0.50 (0.33-0.72)
Vascular invasion					
Yes	46 (52%)	360 (296-380)	230 (160-230)	0.32 (0.02-0.79)	0.49 (0.15-0.73)
No	42 (48%)	372 (340-381)	255 (189-334)	0.24 (0.04-0.84)	0.47 (0.33-0.55)

Correlation coefficients were calculated by the Spearman correlation method. Data are reported as score (percent) or median (interquartile range: P25 to P75). The expression of each protein measured by immunohistochemistry is reported as the mean of the algorithm:  $HSCORE = \sum[(I + 1)] \times PC$ , where I and PC represent the staining intensity and the percent of stained cells, respectively. SLN = sentinel lymph node; TIMP = tissue inhibitors of matrix metalloproteinase; MMP = matrix metalloproteinase. \*P < 0.05 (Mann-Whitney U-test; Kruskal-Wallis H-test for histological grade).

the Scarff Bloom Richardson score was classified as G1: 23 (26%), G2: 53 (60%) and G3: 12 (14%). Vascular invasion was documented in 46 (52%) cases. Tumor samples were analyzed in terms of the presence or absence of SLN involvement. Tumor diameter ( $P < 0.01$ ; Figure 2) and the presence of vascular invasion in the primary tumor were correlated significantly ( $P < 0.01$ ; Figure 3) with a positive SLN.

Table 1 also shows the immunohistochemical expression of VEGF, MMP-2 and -9 and TIMP-1 and -2 in the cytoplasm of neoplastic cells, measured by the means of HSCORE and the ratio between MMPs and their specific inhibitors (MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1). VEGF presented a median score of 190 (180-255); MMP-2 presented a median score of 55 (6-204), with 14 (15.9%) negative cases; MMP-9 presented a median score of 180 (100-230), with 10 (11.4%) negative cases; TIMP-1 presented a median score of 368 (340-380), and TIMP-2 a median score of 249 (170-285). No significant correlation between the immunohistochemical expression of the proteins cited above and SLN status was observed.

Table 2 presents the immunoreactivity of VEGF, MMP-2 and MMP-9 in relation to the SLN status and other variables. Tumors with the lobular histological type showed a significantly lower VEGF than the ductal type ( $P = 0.04$ ; Figure 4



**Figure 4.** Correlation between vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and histological tumor type. A positive correlation between VEGF expression and histological type was observed ( $P = 0.04$ ; Spearman).

In Table 3, SLN status and the variables cited above were correlated with TIMP-1 and TIMP-2 levels and with the ratio

**Table 4.** Summary of statistically significant correlations between VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2/TIMP-2, and MMP-9/TIMP-1 levels identified by the Spearman correlation method.

Factors	VEGF	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	MMP-2/TIMP-2	MMP-9/TIMP-1
<b>VEGF</b>							
rho	-		0.26				0.32
P	-		0.01				0.02
<b>MMP-2</b>							
rho		-			0.36	0.92	
P		-			<0.01	<0.01	
<b>MMP-9</b>							
rho	0.26		-				
P	0.01		-				<0.01
<b>TIMP-1</b>							
rho				-			
P				-			
<b>TIMP-2</b>							
rho		0.36			-		
P		<0.01			-		
<b>MMP-2/TIMP-2</b>							
rho		0.92				-	
P		<0.01				-	
<b>MMP-9/TIMP-1</b>							
rho	0.32		0.95				-
P	0.02		<0.01				-

SLN = sentinel lymph node; VEGF = vascular endothelium growth factor; MMP = matrix metalloproteinase; TIMP = tissue inhibitors of matrix metalloproteinase; rho = Spearman rank correlation. Data are reported only for  $P < 0.05$  (Spearman correlation coefficient).

between MMP-2 and MMP-9 and their specific inhibitors (MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1). TIMP-1 levels were higher in tumors of the lobular type ( $P = 0.04$ ) and TIMP-2 levels were higher in older patients ( $P < 0.01$ ) and in smaller tumors ( $P = 0.01$ ). The MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 ratios showed no significant correlation.

The correlation of VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 levels with the MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-2 ratios is shown in Table 4. VEGF levels correlated significantly with the MMP-9 factor ( $P = 0.01$ ). A positive correlation was also observed between MMP-2 and TIMP-2 levels ( $P < 0.01$ ).

## Discussion

The recognition that the occurrence of tumor growth and metastasis depends on the angiogenesis process has promoted the investigation of prognostic and predictive factors such as hormone receptor, HER-2, VEGF and MMPs, in order to elucidate the significance of angiogenesis in breast cancer. The analysis of the expression of these biomarkers in tissues of breast cancer can be of great prognostic value in assessing the metastatic potential of tumor and survival

of patients (3,23).

Several studies have suggested a relationship between VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 expression in primary breast cancer and disease prognosis. Some of them suggested that patients with high levels of VEGF, MMP-2 and MMP-9 expression in the primary tumor might have a more aggressive clinical course, with presentation of early metastases. However, these results are still conflicting and not clear (13,24,25).

Analyzing the literature, it was observed that the quantification of immunohistochemical expression of proteins in tumors is determined in different manners, using the most varied scores. All authors consider the presence of brown staining in neoplastic cells as a parameter for positivity. Some authors consider only the percentage of stained cells to set expression (26,27), while most link the percentage of cells stained with the intensity of staining, but using various formulas (28-30). We applied the algorithm HSCORE, widely described in the literature (19,20), in an attempt to use a method of compression and easy reproducibility. In the present study, larger tumor diameter ( $P < 0.01$ ) and the presence of vascular invasion ( $P < 0.01$ ) were correlated significantly with the presence of a positive SLN.



When comparing the expression of VEGF, MMP-2, MMP-9 and their specific inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 to the presence or absence of tumor cells in the SLN, no statistically significant correlation was found.

Several authors, such as Nakopoulou et al. (31) and Pellikainen et al. (26), found high expressions of MMPs associated with small tumors (T1-2) and negative axillary lymph nodes. However, other authors, such as Kim et al. (32) and Hao et al. (30), found a significant association of VEGF and MMP-9 with advanced histological grade and positive axillary lymph node.

We found a significant correlation between higher VEGF expression ( $P = 0.04$ ) and lower TIMP-1 levels ( $P = 0.04$ ) with the ductal histological type. Furthermore, lower TIMP-2 levels also showed a significant correlation with younger age (<50 years) ( $P = 0.002$ ) and a larger tumor diameter (2.0-5.0 cm;  $P = 0.01$ ).

Nakopoulou et al. (33) studied 133 cases of invasive breast cancer and detected an increased TIMP-1 expression in 60% of cases, with an inverse correlation between TIMP-1 and histological grade ( $P = 0.003$ ). The cases with increased TIMP-1 expression were correlated with favorable prognosis factors, mainly with negative axillary lymph nodes. Yet, elevated TIMP-1 levels were associated with better survival ( $P = 0.01$ ).

Kim et al. (32), when analyzing 63 cases of T1-T2 breast tumors, did not find a correlation of TIMP-2 expression with histological grade or axillary lymph node status. A study of Têtu et al. (34) found the TIMP-2 expression associated with the ductal histological type.

In order to analyze the correlation of the balance between MMPs and their inhibitors with SLN and other variables under study, we calculated the MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 ratios. We did not find a significant correlation between these ratios and SLN involvement.

Jinga et al. (22) analyzed this ratio in benign and malignant breast tissues and found a significant difference in malignant tissues, suggesting that an abnormal balance between MMPs and TIMPs plays an important role in tumor growth patterns.

Analyzing the relationship MMP-2/TIMP-2, Têtu et al. (34) found a worse 5-year survival in those patients with low expression of TIMP-2 and high expression of MMP-2, but did not find an association between the expression of

TIMP-2 and overall survival. In contrast, Nakopoulou et al. (31) observed a better survival in cases with positive TIMP-2 and negative MMP-2 expression, and also in cases that were positive for both factors. Other investigators also reported that changes in the balance between MMPs and TIMPs with an increase in the activity of MMPs played an important role in tumor invasion and metastasis (22,34).

Currently, the angiogenic factors represent an attractive therapeutic target for a new class of anticancer drugs. Although the use of antiangiogenic drugs for the treatment of cancer has increased in recent decades in basic clinical research, their clinical benefits are relatively low (35-38). Bevacizumab (Avastin, Genentech Inc., USA), is the most investigated antiangiogenic agent (2,39). Miller et al. (40) recently published a randomized phase III study comparing the use of paclitaxel associated with bevacizumab versus paclitaxel alone for the initial treatment of metastases in breast cancer. The results showed a significant increase in objective response rates (36.9 vs 21.2%,  $P < 0.001$ ) and in disease-free survival (median, 11.8 vs 5.9 months,  $P < 0.001$ ), both in favor of the paclitaxel/bevacizumab combination.

A better definition of the biological nature of tumors allows individual approaches based on knowledge of the molecular profile of each patient. The use of antiangiogenic agents in combination with other chemotherapeutic agents can improve the efficiency of treatment and prolong the lives of patients with metastatic disease and prevent recurrence in those with initial disease (3,10).

The use of angiogenic factors to identify patient prognosis in early breast cancer is not clear. The data presented in the literature are conflicting and this will remain a problem until the mechanisms involved in carcinogenesis and metastatic invasion are better understood.

In our series of patients with primary breast cancer, a larger tumor diameter and the presence of vascular invasion were correlated with a positive SLN. Higher VEGF levels and lower TIMP-1 levels were shown to be more frequently associated with tumors of the ductal type, while higher TIMP-1 levels were found in patients with tumors with lobular type. Lower TIMP-2 levels showed also a significant correlation with younger patient age and larger tumor diameter. These results warrant further studies.

## References

1. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133: 275-288.
2. Fox SB, Generali DG, Harris AL. Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res* 2007; 9: 216.
3. Doyle DM, Miller KD. Development of new targeted therapies for breast cancer. *Breast Cancer* 2008; 15: 49-56.
4. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 2004; 64: 2941-2955.
5. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1621-1630.
6. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and

- metastasis. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 252-257.
7. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 267-285.
  8. Locopio N, Fanelli M, Gasparini G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 159-173.
  9. Hayes DF, Miller K, Sledge G. Angiogenesis as targeted breast cancer therapy. *Breast* 2007; 16 (Suppl 2): S17-S19.
  10. Banerjee S, Dowsett M, Ashworth A, Martin LA. Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 536-550.
  11. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3: 95-117.
  12. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 309-314.
  13. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000; 5 (Suppl 1): 37-44.
  14. Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 125-136.
  15. Barr MP, Bouchier-Hayes DJ, Harmeij JJ. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *Int J Oncol* 2008; 32: 41-48.
  16. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 65: 55-61.
  17. Hirvonen R, Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1-2)N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77: 85-91.
  18. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.
  19. Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer - the present. *Histopathology* 2008; 52: 82-90.
  20. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-410.
  21. Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P, Trangas T, et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001; 84: 1488-1496.
  22. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 499-510.
  23. Tsakonas G, Kosmas C. Integration of novel targeted therapies into the systemic treatment of breast cancer - a review. *J BUON* 2007; 12: 319-327.
  24. Garbett EA, Reed MW, Stephenson TJ, Brown NJ. Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol* 2000; 53: 99-106.
  25. Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88: 75-85.
  26. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7621-7628.
  27. Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol* 2002; 55: 300-304.
  28. Mylona E, Nomikos A, Magkou C, Kamberou M, Papassideri I, Keramopoulos A, et al. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2007; 50: 338-347.
  29. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18: 143-152.
  30. Hao L, Zhang C, Qiu Y, Wang L, Luo Y, Jin M, et al. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2007; 253: 34-42.
  31. Nakopoulou L, Tsirmpa I, Alexandrou P, Louvrou A, Ampela C, Markaki S, et al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77: 145-155.
  32. Kim HJ, Park CI, Park BW, Lee HD, Jung WH. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma *in situ* and invasive ductal carcinoma of the breast. *Yonsei Med J* 2006; 47: 333-342.
  33. Nakopoulou L, Giannopoulou I, Lazaris A, Alexandrou P, Tsirmpa I, Markaki S, et al. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. *APMIS* 2003; 111: 1027-1036.
  34. Têtu B, Brisson J, Wang CS, Lapointe H, Beaudry G, Blanchette C, et al. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R28.
  35. Sledge GW Jr. Implications of the new biology for therapy in breast cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 76-81.
  36. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039-2049.
  37. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 178-193.
  38. Sparano JA, Bernardo P, Stephenson P, Gradishar WJ, Ingle JN, Zucker S, et al. Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4683-4690.
  39. Wedam SB, Low JA, Yang SX, Chow CK, Choyke P, Danforth D, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 769-777.
  40. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2666-2676.

## **Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico**

### **Expression of MMP-9 and VEGF in breast cancer: correlation with other prognostic indicators**

**Flavio Cabreira Jobim<sup>I</sup>; Gilberto Schwartzmann<sup>II</sup>; Nilton Leite Xavier<sup>III</sup>; Diego de Mendonça Uchoa<sup>IV</sup>; Marcio Saciloto<sup>V</sup>; Natália Chemello<sup>VI</sup>**

<sup>I</sup>Pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Porto Alegre, Brasil; Professor Auxiliar do Curso de Medicina da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Santa Maria (RS), Brasil

<sup>II</sup>Professor do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Porto Alegre (RS), Brasil

<sup>III</sup>Professor Pesquisador do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA - Porto Alegre (RS), Brasil; Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Porto Alegre (RS), Brasil

<sup>IV</sup>Patologista do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA - Porto Alegre (RS), Brasil

<sup>V</sup>Residente do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário de Santa Maria - HUSM - Santa Maria (RS), Brasil

<sup>VI</sup>Acadêmica do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Porto Alegre (RS), Brasil

## **RESUMO**

**OBJETIVO:** analisar a expressão da metaloproteinase da matriz 9 (MMP-9) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em um grupo de pacientes com câncer primário de mama, e correlacioná-los entre si e com outros indicadores de prognóstico.

**MÉTODOS:** estudo transversal que analisou a expressão da MMP-9 e do VEGF em 88 casos consecutivos de tumores primários de mama. As amostras foram obtidas de pacientes portadoras de câncer primário de mama, submetidas a tratamento cirúrgico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio

Grande do Sul, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2004. A técnica de imuno-histoquímica, usando o complexo avidina-biotina-peroxidase, foi aplicada para avaliar a imunoreação dos antígenos nos tumores. A expressão qualitativa das proteínas foi avaliada por meio da observação da intensidade da coloração acastanhada dos anticorpos no citoplasma das células malignas, considerando positiva quando pelo menos uma célula tumoral apresentava coloração nítida e inequívoca para cada um destes marcadores. Para a determinação do escore qualitativo (0=ausente, 1=fraca, 2=média e 3=forte), foi considerada a intensidade da coloração citoplasmática mais forte na lâmina, independente do número de células coradas. A expressão quantitativa foi determinada pela percentagem média de células coradas, observadas em pelo menos dez campos microscópicos. A

quantificação final da expressão da MMP-9 e do VEGF foi feita por meio da aplicação do algoritmo  $HSCORE = \sum[(I+1)] \times PC$ , no qual I e PC representam a intensidade da coloração e a percentagem das células coradas, respectivamente.

**RESULTADOS:** a MMP-9 e o VEGF apresentaram alto percentual de positividade nos tumores estudados. A expressão final mostrou escore mediano de 180 e 190, respectivamente. Quando se comparou a expressão da MMP-9 e do VEGF com as variáveis "idade", "diâmetro tumoral", "tipo histológico", "grau histológico", "linfonodo axilar" e "invasão vascular", não foi encontrada nenhuma correlação significativa. Comparadas entre si, a MMP-9 e o VEGF apresentaram uma correlação significativa ( $\rho=0,23$ ;  $p=0,03$ ). A positividade do linfonodo axilar apresentou uma correlação positiva com o maior diâmetro tumoral ( $2,7 \pm 1,1$  cm;  $p < 0,01$ ) e com a presença de invasão vascular (84,1%;  $p < 0,01$ ).

**CONCLUSÕES:** os resultados encontrados não mostraram correlação entre a expressão da MMP-9 e do VEGF com os indicadores de prognóstico selecionados, mas uma correlação significativa quando correlacionados entre si.

**Palavras-chave:** Neoplasias mamárias, Metaloproteinase 9 da matriz/análise, Fator A de crescimento do endotélio vascular/análise, Imunohistoquímica, Prognóstico

## ABSTRACT

**PURPOSE:** to analyze the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a group of patients with primary breast cancer, and correlate them to one another and with other prognostic indicators.

**METHODS:** transversal study that has analyzed the expression of MMP-9 and of VEGF in 88 consecutive cases of primary breast tumors. The samples were obtained from patients with primary breast cancer, submitted to surgical treatment in the Clinical Hospital of Porto Alegre of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, from January 2000 to December 2004. An immunohistochemical technique has been applied, using the avidin-biotin-peroxidase complex to evaluate the antigen immunoreactions in the tumors. The qualitative expression of proteins has been assessed through the observation of the brownish stain intensity of antibodies in the cytoplasm of malignant cells, when at least one of the tumoral cells presented clear and unequivocal staining with each of those markers. To determine the qualitative score (0=absent, 1=weak, 2=average and 3=strong), the stronger cytoplasmic staining intensity on the glass slide has been taken into consideration, independently of the stained cells. The quantitative expression was determined by the average percentage of stained cells, observed in at least ten microscopic fields. The MMP-9 and VEGF final quantification expression has been done by the application of the  $HSCORE = \sum[(I+1)] \times PC$ , where I and PC represent the staining intensity and the percentage of stained cells, respectively.

**RESULTS:** MMP-9 and VEGF presented a significant correlation in the tumors studied. The final expression has shown a median score of 180 and 190, respectively. When MMP-9 and VEGF expression were compared with the variables "age", "tumoral diameter", "histological type", "histological grade", "axillary lymph node" and "vascular invasion", it was impossible to find any significant correlation. Compared to one another, MMP-9 and VEGF have presented a positive correlation ( $\rho=0.23$ ;  $p=0.03$ ). The axillary lymph node positivity has presented a positive

correlation with the larger tumoral diameter ( $2.7\pm 1.1$  cm;  $p<0.01$ ) and with the presence of vascular invasion (84.1%;  $p<0.01$ ).

**CONCLUSIONS:** The present results do not show correlation between the MMP-9 and VEGF with the selected prognostic indicators, but shown a significant correlation between one another.

**Keywords:** Breast neoplasms, Matrix metalloproteinase 9/analysis, Vascular endothelial growth factor A/analysis, Immunohistochemistry, Prognosis

## Introdução

A interação entre as células tumorais e o estroma é uma condição vital para o crescimento do tumor, invasão celular e metastatização. Este processo envolve fatores de crescimento, moléculas de adesão, estímulos angiogênicos, fatores de coagulação e proteinases. As metaloproteinases da matriz (MMPs), especialmente a MMP-2 e a MMP-9, são responsáveis pela degradação dos elementos constituintes da membrana basal e da matriz extracelular<sup>1-3</sup>.

A proteólise da membrana basal e da matriz extracelular é pré-requisito para a formação de novos vasos. Estes estabelecem tanto a nutrição para o tumor quanto a rota para que as células neoplásicas entrem na circulação e atinjam outros órgãos à distância<sup>3,4</sup>.

As metaloproteinases da matriz extracelular são endopeptidases neutras, da família das proteinases zinco-dependentes. Elas têm papel importante nos processos fisiológicos, como embriogênese, remodelação de tecido normal e cicatrização de feridas, mantendo um balanço com os inibidores teciduais de metaloproteinases. Estão também envolvidas em condições patológicas nas quais existe a ruptura deste equilíbrio, provocando doenças como artrites, retinopatia diabética, psoríase e câncer<sup>2,3</sup>.

Vários estudos apontam uma participação importante das metaloproteinases no processo de crescimento e invasão tumoral<sup>2,3,5</sup>. As MMPs são sintetizadas como peptídeos por células do tecido conectivo, a maior parte na forma latente (zimogênios ou pró-enzimas), que são proteoliticamente clivadas e ativadas no espaço extracelular<sup>6,7</sup>.

As MMPs são produzidas por vários tipos de células, incluindo os queratócitos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, algumas células sinoviais e uma variedade de células malignas<sup>2,7,8</sup>. A expressão gênica das metaloproteinases pode ser estimulada pela interleucina-1, pelo fator de crescimento epidérmico, pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e pelo fator alfa de necrose tumoral<sup>3</sup>. As MMPs degradam a membrana basal e a maioria dos componentes da matriz extracelular, como colágeno, laminina, fibronectina e elastina, que são barreiras normais para a migração das células e invasão vascular<sup>7,9</sup>. Além disto, interagem com as moléculas de adesão celular, como a laminina-5 e a e-caderina, alterando a adesão entre as células tumorais e facilitando o movimento destas através da matriz extracelular<sup>2</sup>.

A MMP-9 (92-kDa, gelatinase B) é uma importante collagenase que contribui para a digestão do colágeno tipo IV e dos componentes primários da membrana basal. O processo de proteólise é importante em todos os estágios do câncer de mama. As collagenases clivam o colágeno sob condições fisiológicas, cortando a hélice tripla em dois fragmentos desiguais, que são susceptíveis à digestão de outras proteínas<sup>9-11</sup>.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um potente e seletivo fator mitogênico para o endotélio. Ele produz uma rápida e completa resposta angiogênica e um aumento da permeabilidade capilar. Produzido e secretado por uma série de células normais, ele tem expressão marcada em células tumorais, incluindo o câncer de mama<sup>12,13</sup>. Pertence a uma família das glicoproteínas, que inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário. O principal mediador da angiogênese tumoral é o VEGF-A, usualmente referido como VEGF<sup>12-14</sup>.

Vários fatores contribuem para o aumento da expressão do VEGF no câncer de mama. A baixa concentração de oxigênio intracelular bloqueia a degradação do fator indutor da hipóxia (HIF-1a), o que eleva os níveis e determina a hipóxia intracelular, que, por sua vez, determina o aumento da atividade angiogênica pela ativação da transcrição do gene VEGF<sup>12,13</sup>.

A clivagem das proteínas extracelulares pelas MMPs também libera o VEGF e a endostatina pela clivagem do colágeno IV, sendo esta última um inibidor da angiogênese<sup>9,12,14</sup>. Uma mutação no gene supressor p53, que é um modulador da neovascularização, também determina um aumento na expressão do VEGF<sup>13,15</sup>. No carcinoma colo-retal, neoplasias do aparelho respiratório e da mama, as moléculas com ação estromal, como COX2, metaloproteinases, moléculas de adesão e VEGF, aceleram o processo da angiogênese. Entretanto, para que ocorra metástase, há necessidade de ruptura da membrana basal, degradação da matriz extracelular, proliferação e migração das células endoteliais, formação do lúmen vascular e maturação funcional<sup>7,16,17</sup>.

O câncer de mama é uma doença biologicamente heterogênea e, no seu curso clínico, pode se apresentar de forma indolente, com evolução lenta, ou de forma rápida, agressiva, com metástases precoces<sup>18</sup>. Fatores como o diâmetro tumoral, estado dos linfonodos axilares e receptores hormonais são bem conhecidos e usados para determinar o fenótipo dos tumores e estabelecer um perfil prognóstico para o tratamento. Entretanto, é importante estabelecer fatores prognósticos e preditivos, especialmente nos casos com linfonodos negativos, que possam selecionar pacientes com prognóstico diferente, aos quais é possível oferecer uma terapia mais específica e eficaz.

Nosso objetivo neste estudo foi analisar a expressão dos fatores angiogênicos, a MMP-9 e o VEGF, em um grupo de pacientes com câncer primário de mama, e correlacioná-los entre si e com outros indicadores de prognóstico selecionados. Além disto, correlacionar o *status* dos linfonodos axilares com os fatores angiogênicos e as demais variáveis.

## Métodos

Neste estudo transversal, foram incluídas 88 pacientes portadoras de câncer de mama, com linfonodos axilares clinicamente negativos e sem evidências de metástase à distância nos exames laboratoriais, submetidas a tratamento cirúrgico com pesquisa do linfonodo sentinela.

Avaliou-se por imuno-histoquímica a expressão da MMP-9 e do VEGF em amostras de tumores de mama fixados em formalina e emblocados em parafina, armazenadas no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Inicialmente, foram selecionados de um banco de dados do Serviço de Mastologia do HCPA, 95 casos consecutivos de pacientes portadoras de câncer de mama, submetidas a tratamento cirúrgico com pesquisa do linfonodo sentinela no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2004.

Após a identificação dos casos, as lâminas de hematoxilina-eosina foram revisadas, e um bloco de parafina de cada caso foi separado para a análise imuno-histoquímica. Foram excluídos dois casos de carcinoma *in situ* e cinco casos de carcinoma ductal invasor por não apresentarem material adequado no bloco de parafina para a realização do exame. Destes, três apresentavam linfonodos sentinelas positivos. No final, foram incluídos 88 casos neste estudo. Para avaliação da axila, foi usada a técnica de linfonodo sentinela com dissecação completa, quando estes fossem positivos.

O objetivo primário foi analisar a expressão da metaloproteinase da MMP-9 e do fator de VEGF em um grupo de pacientes com câncer primário de mama, e correlacioná-los entre si e com as seguintes variáveis: metástases em linfonodos axilares, categorizado em positivos ou negativos; idade em anos, como variável contínua ou categorizada em duas faixas (<50 e  $\geq 50$ ); diâmetro tumoral em cm, como variável contínua ou categorizada em 1:  $\leq 2,0$  e 2:  $> 2,0$  e 3:  $\leq 5,0$ ); tipo histológico, 1: ductal e 2: lobular; grau histológico, classificado em G1: grau 1; G2: grau 2 e G3: grau 3; invasão vascular, categorizada em presente e ausente.

A técnica de imuno-histoquímica, usando o complexo avidina-biotina-peroxidase, foi aplicada para avaliar a expressão dos antígenos nos tumores. A imunoreação foi analisada de forma qualitativa e quantitativa. A classificação qualitativa foi feita de acordo com a intensidade da coloração acastanhada no citoplasma das células neoplásicas, usando os seguintes escores: 0=ausência de coloração; 1=coloração fraca; 2=coloração média e 3=coloração forte. A análise quantitativa da expressão das proteínas foi classificada em índices percentuais de 0 a 100%. A expressão final de cada caso foi obtida por meio da aplicação do algoritmo HSCORE (do inglês "histochemical score")= $\sum[(I+1)] \times PC$ , no qual I e PC representam a intensidade da coloração e a percentagem das células coradas, respectivamente<sup>19,20</sup>.

Para avaliar a expressão da MMP-9, foi empregado o anticorpo monoclonal de rato (NCL-MMP9-439, clone 15W2) da Novocastra Laboratories Ltd.<sup>TM</sup> (Benton Lane, UK), na diluição de 1:40, usando como controle externo positivo tecido normal de fígado. Para avaliar a expressão do VEGF, foi utilizado o anticorpo policlonal de

coelho anti-fator de crescimento endotelial vascular humano da Signet's USA™ Ultra Streptavidin Detection, na diluição 1:30, usando como controle externo amostra de tumor de mama positivo para a expressão do VEGF.

Os cortes de parafina foram seccionados na espessura de 3  $\mu$  e dispostos em lâminas previamente tratadas com o aderente poli-D-lisina. A seguir, foi feita desparafinização em xilol e rehidratação em álcool 100%. Para realizar o bloqueio da peroxidase endógena, foram lavadas em água corrente e destilada e incubadas em PBS por três vezes durante cinco minutos. A recuperação antigênica foi realizada com tampão de citrato pH6 em forno de microondas por 20 minutos, a 90°C, com descanso das lâminas por mais 20 minutos dentro do forno. Retiradas do forno, as lâminas foram deixadas por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas novamente em água corrente e destilada, e incubadas em PBS. Após aplicação de peróxido de hidrogênio 5%, foram outra vez lavadas e incubadas em PBS. Os cortes foram circulados com caneta Dako Pen (Dako Lab. Inc. ®, New York, NY, USA) e adicionado o anticorpo primário, deixando em câmara úmida (EasyPath®, Erviagas) durante a noite, na geladeira. As lâminas foram retiradas da geladeira, lavadas com água destilada e foi adicionado o anticorpo secundário LSAB (avidina biotina, frasco 1, amarelo, DakoCytomation™), e colocado em câmara úmida por 30 minutos. Após incubação no PBS, repetiu-se o procedimento, adicionando o LSAB (estreptavidina peroxidase, DakoCytomation™). A reação foi revelada com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™), até os cortes ficarem escuros ( $\pm$ 30segundos) e contra-corada com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após lavagem em água corrente e aplicação de amônia a 2%, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente, álcool 100% e xilol para serem montadas.

A análise semiquantitativa foi realizada no Serviço de Patologia do HCPA, por patologista experiente, usando microscópio óptico marca Olympus, modelo BX-2. A cada bateria de exame imuno-histoquímico realizada e para cada marcador utilizado, uma lâmina de controle externo foi confeccionada. Além disso, em todas as reações imuno-histoquímicas analisadas, tomou-se o cuidado de verificar também a presença de controle interno positivo dentro de cada lâmina, assegurando-se, assim, a qualidade da técnica utilizada.

A definição de positividade para os marcadores VEGF e MMP-9 foi determinada pela presença de pelo menos uma célula tumoral com coloração citoplasmática acastanhada nítida e inequívoca para cada um destes marcadores, independente da intensidade da coloração.

Para a determinação do escore qualitativo da reação em cada caso, foi considerada a intensidade da coloração citoplasmática mais forte, mesmo que se identificasse um número maior de células com tonalidade mais fraca.

A expressão quantitativa dos dois marcadores, para cada caso, foi calculada por meio da média do percentual de células coradas por campo microscópico, incluindo-se todas as células positivas, independente da intensidade da coloração, em pelo menos dez campos ([Figuras 1 e 2](#)).



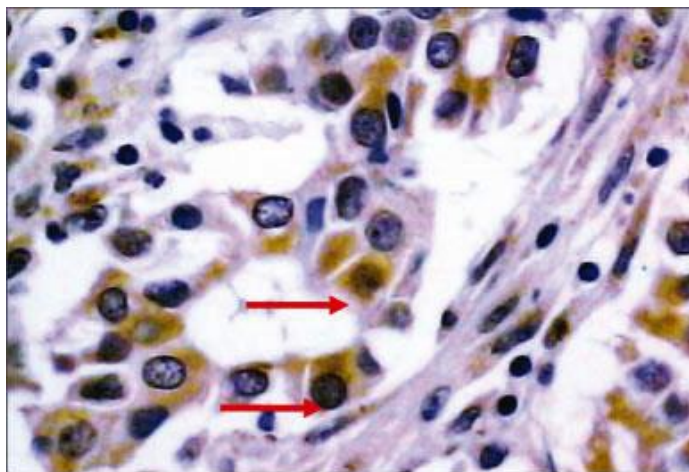


Figura 1 - Imuno-histoquímica para metaloproteinase 9 em carcinoma ductal da mama; Magnificação 400X. As setas mostram a imunoreação positiva no citoplasma das células neoplásicas.

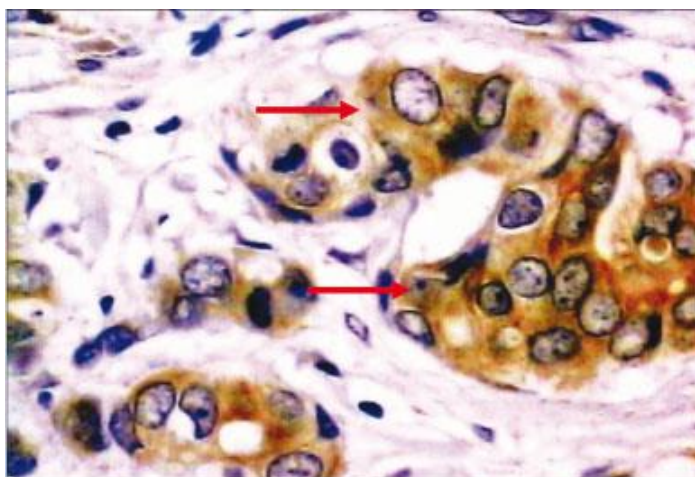


Figura 2 - Imuno-histoquímica do fator de crescimento endotelial vascular em tumor da mama. Magnificação 400X. As setas mostram a imunoreação positiva no citoplasma das células neoplásicas.

A quantificação definitiva da imunoreação de cada marcador foi determinada pela aplicação do algoritmo HSCORE, que leva em consideração tanto a intensidade da coloração quanto a percentagem de células coradas na lâmina.

A análise estatística dos dados coletados foi feita por meio do programa estatístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 11. As variáveis contínuas com distribuição simétrica, idade e diâmetro tumoral, foram analisadas pelo teste  $t$ , e os dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (dp). O teste do  $\chi^2$  de Pearson foi usado para analisar as variáveis categóricas: tipo histológico, grau histológico e invasão vascular. A expressão do VEGF e da MMP-9, por ter distribuição assimétrica, foi analisada pelos testes não paramétricos U de Mann-Whitney e H de

Kruskal-Wallis, e os dados apresentados como mediana e amplitude interquartil (p25 a p75). O intervalo de confiança foi fixado em 95% (IC95%) e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

O projeto foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa da Pós-graduação e Comissão de Ética Médica do HCPA, de acordo com as Normas de Pesquisa em Saúde (portaria 01/88 CNS).

## Resultados

A [Tabela 1](#) apresenta a distribuição das variáveis clínicas e histopatológicas nos grupos com linfonodos positivo e negativo. A idade das mulheres foi de  $58,7 \pm 11,3$  anos, sendo que a paciente mais jovem tinha 33 anos e a mais idosa, 81 anos. O diâmetro do tumor apresentou média de  $2,3 \pm 1,0$  cm, variando de 0,5 a 5,0 cm. O tipo histológico mais freqüente foi o carcinoma ductal infiltrante, com 83 (94,3%) casos, e o carcinoma lobular infiltrante foi diagnosticado em cinco (5,7%) casos. A distribuição do grau histológico, segundo Scarff Bloom Richardson, foi G1: 23 (26,1%), G2: 53 (60,2%) e G3: 12 (13,7%). A invasão vascular estava presente em 46 (52,3%) casos. Os linfonodos positivos e negativos estavam distribuídos ao acaso em 44 para cada grupo. A presença de linfonodos positivos estava correlacionada com tumores maiores e com presença de invasão vascular.

A expressão da MMP-9 e do VEGF estava presente difusamente no citoplasma das células neoplásicas e, ocasionalmente, parte da membrana estava corada ([Figuras 1 e 2](#)), sendo que a MMP-9 apresentou expressão percentual mediana de 85 (50-90) nas células neoplásicas, com 11 (12,5%) casos negativos, e o VEGF apresentou expressão percentual mediana de 90 (85-95) nas células tumorais, com apenas um caso negativo.

Analisando a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas, a expressão qualitativa da MMP-9 ficou assim distribuída: a coloração fraca estava presente em 60 casos (68,2%); a coloração média, em 14 (15,9%); a coloração forte, em três (3,4%); e 11 (25%) casos não apresentaram nenhuma coloração. O VEGF apresentou coloração fraca em 60 casos (68,2%), coloração média em 22 (25%) casos, coloração forte em cinco (5,7%) e apenas um caso não apresentou nenhuma coloração.

Para determinar a expressão final das proteínas nos tumores mamários, aplicou-se o algoritmo HSCORE. O resultado mostrou expressão mediana de 180 para a MMP-9 e 190 para o VEGF.

Na [Tabela 2](#), é apresentada a correlação entre a expressão dos fatores angiogênicos MMP-9 e VEGF e as variáveis histopatológicas do tumor. Considerando o diâmetro tumoral, há tendência de redução da expressão da MMP-9 nos tumores com diâmetro entre 2,1 e 5,0 cm. Os carcinomas lobulares apresentaram expressão significativamente mais baixa de VEGF em relação aos ductais ( $p=0,04$ ).

Correlacionando a expressão da MMP-9 e do VEGF, encontrou-se significância estatística ( $\rho=0,23$  e  $p=0,03$ ).

## Discussão

A alta expressão destes fatores em neoplasias mamárias está relatada na literatura. Os estudos sugerem que a MMP-9 e o VEGF estão relacionados com o prognóstico em câncer de mama e que pacientes com altos níveis destes fatores têm uma doença biologicamente mais agressiva, com metástases mais precoces<sup>15,21,22</sup>.

Fazendo uma análise crítica da literatura, observa-se que a quantificação da expressão imuno-histoquímica das proteínas nos tumores é determinada de diferentes maneiras, usando os mais variados escores. Todos os autores consideram a presença de coloração acastanhada nas células neoplásicas como parâmetro para positividade. Alguns consideram somente o percentual de células coradas para definir a expressão<sup>23,24</sup>, enquanto a maioria associa a porcentagem de células coradas com a intensidade da coloração, porém usando fórmulas variadas<sup>22,25,26</sup>. Decidiu-se aplicar o algoritmo HSCORE, amplamente descrito na literatura<sup>19,20</sup>, na tentativa de usar uma metodologia de fácil compressão e reprodutibilidade.

Quando se comparou a expressão dos fatores MMP-9 e VEGF nos tumores de mama com os linfonodos axilares negativos e positivos, não foi encontrada nenhuma correlação entre eles. Entretanto, outros autores mostraram correlação positiva significativa entre estes fatores e a presença de metástases nos linfonodos axilares<sup>25,27</sup>. Estes dados, considerando apenas a MMP-9, estão de acordo com os encontrados em um estudo de 210 casos de câncer de mama, usando a mesma técnica empregada neste estudo<sup>20</sup>.

Um estudo com técnicas de imuno-histoquímica em 76 amostras de tumor invasivo de mama mostrou que a co-expressão do VEGF e MMP-9 estava associada à positividade do linfonodo axilar. Isto pode ser devido à estimulação do VEGF pela MMP-9, facilitando a migração e a proliferação das células endoteliais, resultando em angiogênese<sup>25</sup>.

Em relação às demais variáveis, como idade, diâmetro tumoral, grau histológico e invasão vascular, também não foi encontrada nenhuma correlação destas com a expressão da MMP-9 e do VEGF. Estes resultados estão de acordo com outras publicações que também não encontraram correlação destas variáveis com a expressão dos fatores em estudo<sup>25,26</sup>.

Entretanto, Scorilas et al.<sup>20</sup>, quantificando a expressão da MMP-9 por meio da aplicação do HSCORE, demonstraram a associação da alta expressão da MMP-9 com a idade maior que 55 anos, tumores com diâmetro entre 2 e 5 cm e com o tipo histológico ductal.

Outros estudos usando a técnica de imuno-histoquímica em câncer de mama, também mostraram associação do VEGF e da MMP-9 com o alto grau histológico<sup>24</sup>

e da MMP-9 com o grau histológico, diâmetro tumoral e a sobrevida livre de doença. Não houve associação significativa com a sobrevida global<sup>27</sup>.

Publicações usando a técnica de ELISA (do inglês Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) também revelam dados discordantes, desde nenhuma associação entre a MMP-9 e os linfonodos axilares, diâmetro tumoral e grau histológico<sup>28</sup>, até alto nível de associações com pior sobrevida<sup>29</sup>, ou, finalmente, apenas correlação positiva entre MMP-9 e o diâmetro tumoral<sup>19</sup>.

Encontrou-se correlação significativa dos fatores MMP-9 e VEGF quando comparados entre si ( $\rho=0,23$  e  $p=0,03$ ). Na literatura há relato<sup>30</sup> da atividade proteolítica das metaloproteinases e a capacidade de ativarem os fatores angiogênicos, entre eles o VEGF, envolvidos no crescimento tumoral, angiogênese e metástases. Outros<sup>12</sup> sugerem que o VEGF pode ter sua produção influenciada por altos níveis de metaloproteinases, sendo que a MMP-9 merece mais atenção. Entretanto, os fatores angiogênicos podem induzir a expressão das MMPs no endotélio e no estroma celular<sup>3</sup> e, por outro lado, as MMPs podem aumentar a biodisponibilidade destes fatores para seus receptores, o que foi confirmado em estudo de carcinogênese em ilhotas pancreáticas de ratos transgênicos<sup>31,32</sup>.

Os resultados do presente trabalho não demonstraram nenhuma correlação entre os fatores angiogênicos em estudo e a positividade dos gânglios axilares, idade, tamanho do tumor, grau histológico e invasão vascular. Encontrou-se uma correlação entre o tipo histológico e o VEGF, porém o pequeno número de casos não permite uma conclusão definitiva, mas merece estudos adicionais, porque o carcinoma lobular é pouco freqüente.

Os dados apresentados na literatura são conflitantes e dificultam uma explicação diante do conceito dos mecanismos moleculares que envolvem a carcinogênese e a invasão metastática. Talvez isto ocorra pela diversificação das técnicas laboratoriais utilizadas, pelos diferentes anticorpos usados, pelas diferentes formas de valorar a imunoreação destes fatores e pelo baixo número de casos analisados em cada estudo.

**Tabela 1** - Distribuição das variáveis epidemiológicas, clínicas e histopatológicas nos grupos com linfonodos axilares positivos (+) e negativos (-)

Variáveis	Todos n=88	Lna (+) n=44	Lna (-) n=44	p
Idade (anos)	58,7±11,3	58,7±11,8	58,8±11,0	0,9 <sup>a</sup>
Diâmetro tumoral (cm)	2,3±1,0	2,7±1,1	1,9±1,0	<0,01 <sup>a</sup>
Tipo histológico				
Ductal	83 (94,3)	42 (50,6)	41 (49,4)	0,6 <sup>b</sup>
Lobular	5 (5,7)	2 (40,0)	3 (60,0)	
Grau histológico, n (%)				
G1	23 (26,1)	9 (20,5)	14 (31,8)	0,3 <sup>b</sup>
G2	53 (60,2)	30 (68,2)	23 (52,3)	
G3	12 (13,6)	5 (11,4)	7 (15,9)	
Invasão vascular, n (%)	46 (52,3)	37 (84,1)	9 (20,5)	<0,01 <sup>b</sup>
MMP-9	180 (102-190)	170 (50-196)	180 (150-190)	0,4 <sup>c</sup>
VEGF	190 (180-221)	190 (180-196)	190 (180-251)	0,7 <sup>c</sup>

Os dados são apresentados como média±desvio padrão, contagem (percentual) ou mediana (amplitude interquartil: p25 a p75). Os níveis de expressão dos fatores angiogênicos foram obtidos por meio do algoritmo HSCORE= $\sum[(I+1)] \times PC$ , no qual I e PC representam a intensidade e a percentagem de coloração das células, respectivamente. Lna=linfonodo axilar MMP-9= metaloproteinase da matriz 9; VEGF= fator de crescimento vascular endotelial.

Testes estatísticos: <sup>a</sup>teste  $t$ ; <sup>b</sup> $\chi^2$  de Pearson; <sup>c</sup>teste U de Mann-Whitney.  
p<0,05.

**Tabela 2** - Correlação entre a expressão dos fatores angiogênicos MMP-9 e VEGF e as variáveis histopatológicas do tumor

Variáveis	n (%)	MMP-9 HSCORE	p	VEGF HSCORE	p
Linfonodos axilares					
Positivos	44 (50)	170 (50-196)	0,4	190 (180-196)	0,7 <sup>a</sup>
Negativos	44 (50)	180 (150-190)		190 (180-251)	
Diâmetro tumoral (cm)					
≤2	47 (53,4)	180 (120-194)	0,1	190 (180 - 210)	0,6 <sup>a</sup>
>2 e ≤5	41 (46,6)	170 (60-180)		190 (180 - 232)	
Tipo histológico					
Ductal	83 (94,3)	180 (110-190)	0,5	190 (180 - 240)	0,04 <sup>a</sup>
Lobular	5 (5,7)	190 (50-288)		170 (160 - 185)	
Grau histológico					
G1	23 (26,1)	180 (20-190)	0,9	190 (160 - 190)	0,2 <sup>b</sup>
G2	53 (60,2)	180 (115-190)		190 (180 - 262)	
G3	12 (13,6)	180 (117-180)		190 (182 - 194)	
Invasão vascular					
Presente	46 (52,3)	180 (95-217)	0,4	190 (180-196)	0,4 <sup>a</sup>
Ausente	42 (47,7)	180 (118-190)		190 (180-247)	

Os dados são apresentados como contagem (percentual) ou mediana (amplitude interquartil: p25 a p75). Os níveis de expressão dos fatores angiogênicos foram obtidos por meio do algoritmo HSCORE= $\sum[(I+1)] \times PC$ , no qual I e PC representam a intensidade e a percentagem de coloração das células, respectivamente. MMP-9=metaloproteinase da matriz 9; VEGF=fator de crescimento vascular endotelial.

Testes estatísticos: <sup>a</sup>teste U de Mann-Whitney e <sup>b</sup>teste H de Kruskal-Wallis.  
p<0,05.

## Referências

- Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*. 1993;71(4):1368-83. [ [Links](#) ]
- Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*. 2000;36(13 Spec No):1621-30. [ [Links](#) ]
- Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005;9(2):267-85. [ [Links](#) ]

4. Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg.* 2007;42(1):1-11. [[Links](#)]
5. Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;50(2):97-116. [[Links](#)]
6. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist.* 2001;6(5):415-27. [[Links](#)]
7. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-39. [[Links](#)]
8. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999;13(8):781-92. [[Links](#)]
9. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2000;2(4):252-7. [[Links](#)]
10. Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res.* 2005;65(8):3193-9. [[Links](#)]
11. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4. [[Links](#)]
12. Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2003;5(3):140-6. [[Links](#)]
13. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):309-14. [[Links](#)]
14. Locopo N, Fanelli M, Gasparini G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52(1-3):159-73. [[Links](#)]
15. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:37-44. [[Links](#)]
16. Giannelli G, Erriquez R, Fransvea E, Daniele A, Trerotoli P, Schittulli F, et al. Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2004;109(5):782-5. [[Links](#)]
17. Bartsch JE, Staren ED, Appert HE. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res.* 2003;110(2):383-92. [[Links](#)]
18. Byers S, Park M, Sommers C, Seslar S. Breast carcinoma: a collective disorder. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;31(2-3):203-15. [[Links](#)]
19. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer:

correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med.* 2006;10(2):499-510.

[ [Links](#) ]

20. Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P, Trangas T, et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer.*

2001;84(11):1488-96. [ [Links](#) ]

21. Garbett EA, Reed MW, Stephenson TJ, Brown NJ. Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol.* 2000;53(2):99-106. [ [Links](#) ]

22. Mylona E, Nomikos A, Magkou C, Kamberou M, Papassideri I, Keramopoulos A, et al. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. *Histopathology.* 2007;50(3):338-47. [ [Links](#) ]

23. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7621-8. [ [Links](#) ]

24. Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol.* 2002;55(5):300-4. [ [Links](#) ]

25. Hao L, Zhang C, Qiu Y, Wang L, Luo Y, Jin M, et al. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Lett.* 2007;253(1):34-42. [ [Links](#) ]

26. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol.* 2005;18(1):143-52. [ [Links](#) ]

27. Kim HJ, Park CI, Park BW, Lee HD, Jung WH. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Yonsei Med J.* 2006;47(3):333-42. [ [Links](#) ]

28. Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;88(1):75-85. [ [Links](#) ]

29. Decock J, Hendrickx W, Wildiers H, Christiaens MR, Neven P, Drijckoningen M, et al. Plasma gelatinase levels in patients with primary breast cancer in relation to axillary lymph node status, Her2/neu expression and other clinicopathological variables. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(6):495-502. [ [Links](#) ]

30. Zhao J, Yan F, Ju H, Tang J, Qin J. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2004;204(1):87-95. [ [Links](#) ]

31. Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;50(2):87-100. [ [Links](#) ]

32. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat Cell Biol. 2000;2(10):737-44. [ [Links](#) ]

 **Correspondência:**

Flavio Cabreira Jobim

Avenida Nossa Senhora das Dores, 2.270/1.101

CEP 97050-530 - Santa Maria/RS

E-mail: [jobim.f@gmail.com](mailto:jobim.f@gmail.com) e [00140844@ufrgs.br](mailto:00140844@ufrgs.br)

Recebido: 30/4/2008

Aceito com modificações:25/6/2008

O estudo foi financiado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (Fipe)



# 16<sup>th</sup> World Congress

of the Senologic International Society

29<sup>th</sup> National Congress  
of the Spanish Society of Senology and Breast Disease

5<sup>a</sup> Reunión de la Sección de Enfermería y Técnicos en Senología

22 de Octubre de 2010 / 22nd October 2010

Certificamos que la comunicación titulada: / We certificate that the communication entitled:

**656 - PREVALENCE OF VASCULAR-ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR, MATRIX METALLOPROTEINASES AND TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES IN PRIMARY BREAST CANCER.**

de los autores: / by the authors:

**Jobim, Flavio; Xavier, Nilton; Uchoa, Diego; Schwartzmann, Gilberto**

ha sido presentada como **COMUNICACIÓN ORAL** en el "16th World Congress of the Senologic International Society" y el "29 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria", que ha tenido lugar del 20 al 22 de octubre de 2010 en el Palacio de Congresos de Valencia.

has been presented as **ORAL COMMUNICATION** in the "16th World Congress of the SIS" and the "29th National Congress of the Spanish Society of Senology and Breast Disease", held from 20<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup> October 2010 at the Palacio de Congresos de Valencia.



Dr. Carlos Vázquez Albaladejo  
Presidente del Congreso



Dr. Vicente Guillem Porta  
Presidente del Comité Científico Nacional

Scientific Secretary Valencia

Juan de Austria, 36 puerta 8. 46002 Valencia, Tel: (+34) 95 394 22 10. Fax: (+34) 96 394 22 10. e-mail: sisbreast.valencia@grupoaran.com www.congresomundialisis.com

Scientific Secretary Madrid

Grupo Arán de Comunicación, Castelló, 128 1<sup>o</sup>. 28006 Madrid, Tel: (+34) 91 782 00 33. Fax: (+34) 91 561 57 87. e-mail: congreso@grupoaran.com www.grupoaran.com



## XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOLOGIA

VI Encontro Brasileiro das Instituições Filantrópicas e Grupos de Apoio pela Saúde da Mama e Curso de Atualização da Escola Brasileira de Mastologia  
17 a 20 de outubro de 2007 - Hotel Oásis Atlântico  
Fortaleza - Ceará - Brasil

Promovido



SOCIEDADE  
BRASILEIRA  
DE MASTOLOGIA



Patrocínio



# Certificado

Certificamos que

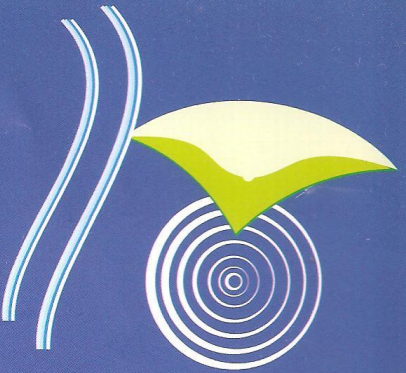
**FLAVIO CABREIRA JOBIM**

participou do XIV Congresso Brasileiro de Mastologia, realizado no período de 17 a 20 de outubro de 2007, no Hotel Oásis Atlântico, Fortaleza, Ceará na qualidade de Autor do trabalho "Expressão dos Fatores MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 no Câncer de Mama: Correlação com o Linfonodo Sentinela e Parâmetros Cirúrgico-patológicos".

Fortaleza, 20 de outubro de 2007

*Marta de Freitas*  
Márcia D. S. Costa de Freitas  
Presidente do Congresso

*Diógenes Basegio*  
Diógenes Basegio  
Presidente da Sociedade  
Brasileira de Mastologia



## XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOLOGIA

VI Encontro Brasileiro das Instituições Filantropicas e Grupos de Apoio para Saúde da Mama e Curso de Atualização da Escola Brasileira de Mastologia 17 a 20 de outubro de 2007 - Hotel Oásis Atlântico Fortaleza - Ceará - Brasil

Promotor



SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA



Patrocinador



# Certificado

Certificamos que

**FLAVIO CABREIRA JOBIM**

participou do XIV Congresso Brasileiro de Mastologia, realizado no período de 17 a 20 de outubro de 2007, no Hotel Oásis Atlântico, Fortaleza, Ceará na qualidade de Autor do trabalho "Expressão dos Fatores Angiogênicos MMP9 e VEGF no Câncer de Mama: Correlação com Linfonodo Sentinela e Parâmetros Clinicopatológicos".

Fortaleza, 20 de outubro de 2007

*Marcia de Freitas*  
 Marcia D. S. Costa de Freitas  
 Presidente do Congresso

*Diógenes Basegio*  
 Diógenes Basegio  
 Presidente da Sociedade Brasileira de Mastologia

Tabela 1. Características clinicopatológicas das 86 pacientes com câncer de mama

Parâmetros	Frequência	%	% válido
Idade (anos)	58,4 ± 11,2		
< 50	21	24,4	24,4
≥ 50	65	75,6	75,6
Cor			
Preta	03	3,5	3,5
Branca	83	96,5	96,5
Menarca (anos)	12,8 ± 1,4		
≤ 12	44	51,2	51,2
>12	42	48,8	48,8
Escolaridade			
Fundamental incompleto	32	37,2	41,6
Fundamental completo	24	27,9	31,2
Médio incompleto	01	1,2	1,3
Médio completo	12	14,0	15,6
Superior incompleto	02	2,3	2,6
Superior completo	06	7,0	7,8
Indisponível	09	10,5	-
IMC			
< 30	69	80,2	80,2
≥ 30	17	19,8	19,8
Diâmetro patológico do tumor (pT, cm)	2,3 ± 1,0		
≤ 2,0	46	53,5	53,5
> 2,0 e ≤ 5,0	40	46,5	46,5
Classificação patológica do tumor / UICC			
≤ 0,5 cm (pT1a)	01	1,2	1,2
> 0,5 cm e ≤ 1,0 cm (pT1b)	08	9,3	9,3
> 1,0 cm e ≤ 2,0 cm (pT1c)	37	43,0	43,0
> 2,0 cm e ≤ 5 cm (pT2)	40	46,5	46,5
Tipo histológico			
Ductal	82	95,3	95,3
Lobular	04	4,7	4,7
Grau histológico			
GI	22	25,5	25,5
GII	52	60,5	60,5
GIII	12	14,0	14,0
Invasão vascular			
Sim	44	51,2	51,2
Não	42	48,8	48,8
Status do linfonodo axilar			
Positivo	42	48,8	48,8
Negativo	44	51,2	51,2
Número de linfonodos positivos			
N0 (ausência de metástase)	44	51,2	51,2
N1 (metástases 1 a 3 linfonodos)	36	41,8	41,8
N2 (metástases 4 a 9 linfonodos)	06	7,0	7,0
Classificação pTNM			
pT1N0M0	28	32,6	32,6
pT1N1M0	17	19,8	19,8
pT1N2M0	01	1,2	1,2
pT2N0M0	15	17,4	17,4
pT2N1M0	20	23,3	23,3
pT2N2M0	05	5,8	5,8
Estádio patológico			
Estádio I	28	32,6	32,6
Estádio II	52	60,4	60,4
Estádio III	06	7,0	7,0
Estádio pTNM			
Estádio I	28	32,6	32,6
Estádio IIA	32	37,2	37,2
Estádio IIB	20	23,2	23,2
Estádio IIIA	06	7,0	7,0

Os dados são mostrados como média ± dp, contagem e percentuais. Abreviaturas: IMC- índice de massa corporal; pt – diâmetro patológico do tumor; UICC - International Union Against Cancer; pTNM – classificação patológica dos tumores malignos, T (tumor), N (linfonodo), M (metástase). Em relação à escolaridade não havia o dado disponível em 9 (10,5%) casos.

**Tabela 2.** Distribuição das pacientes com câncer de mama segundo as variáveis e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado para recidiva.

Variáveis	Casos		Recidiva		p	Risco relativo (IC95%)
	n	%	n	%		
Idade (anos)					0,99	
< 50	21	24,4	6	28,6		1,00
≥ 50	65	75,6	18	27,7		0,99 (0,39 – 2,50)
Status linfonodo axilar					0,44	
Positivo	42	48,8	13	31,0		1,00
Negativo	44	51,2	11	25,0		0,73 (0,33 – 1,63)
Número de linfonodos positivos					0,00	
No (ausência de metastase)	44	51,2	11	25,0		1,00
N1 (metástases 1 a 3 linfonodos)	36	41,9	8	22,2	0,89	0,94 (0,38 – 2,33)
N2 (metástases 4 a 9 linfonodos)**	6	7,0	5	83,3	0,00	5,55 (1,91 – 16,14)
Diâmetro patológico do tumor (cm)**					0,01	
≤ 2,0	46	53,5	8	17,4		1,00
> 2,0 e ≤ 5,0	40	46,5	16	40,0		2,93 (1,25 – 6,87)
Estadio patológico**					0,00	
Estádio I	28	32,6	6	22,2		1,00
Estádio II	52	60,4	13	24,5	0,66	1,25 (0,47 – 3,28)
Estádio III	6	7,0	5	83,3	0,00	6,60 (1,99 – 21,85)
Tipo histológico*					-	
Lobular invasor	4	4,7	0	0,0		-
Ductal invasor	82	95,3	24	29,3		-
Grau histológico do tumor					0,26	
GI	22	25,6	4	18,2		1,00
GII	52	60,5	18	34,6	0,20	2,04 (0,69 – 6,03)
GIII	12	14,0	2	16,7	0,86	0,86 (0,16 – 4,67)
Invasão vascular					0,71	
Não	42	48,8	11	26,2		1,00
Sim	44	51,2	13	29,5		1,16 (0,52 – 2,60)
Receptor de estrogênio					0,29	
Negativo	8	9,6	1	12,5		1,00
Positivo	75	90,4	23	30,7		2,96 (0,40 – 21,93)
Receptor de progesterona					0,33	
Negativo	13	16,3	2	15,4		1,00
Positivo	67	83,8	21	31,3		2,06 (0,48 – 8,79)
Expressão do HER2**					0,04	
Negativo	46	76,7	8	17,4		1,00
Positivo	14	23,3	7	50,0		2,96 (1,07 – 8,16)
Expressão do K-i67					0,92	
< 14%	15	34,1	4	26,7		1,00
≥ 14%	29	65,9	8	27,6		1,06 (0,32 – 3,54)
Expressão do p53					0,28	
Negativo (≤ 10%)	30	50,8	9	30,0		1,00
Positivo (> 10%)	29	49,2	5	17,2		0,55 (0,18 – 1,64)
Subtipos moleculares*					-	
Luminal A	12	24,5	3	25,0		1,00
Luminal B	32	65,3	11	34,4	0,65	1,35 (0,38 – 4,83)
Superexpressão HER2	2	4,1	0	0,0	-	-
Triplo negativo	3	6,1	0	0,0	-	-

Continuação da Tabela 2. Distribuição das pacientes com câncer de mama segundo as variáveis e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado para recidiva.

Variáveis	Casos		Recidiva		p	Risco relativo (IC95%)
	n	%	n	%		
Tratamento local					0,12	
Setorectomia + linfadenectomia + RT	45	52,3	8	17,8		1,00
Mastectomia + linfadenectomia + RT	7	8,1	3	42,9	0,06	3,59 (0,95 – 13,56)
Mastectomia + linfadenectomia	32	37,2	12	37,5	0,05	2,47 (1,01- 6,07)
Setorectomia + linfadenectomia	2	2,3	1	50,0	0,19	4,01 (0,50 – 32,16)
Tratamento adjuvante sistêmico					0,35	
Hormonioterapia	39	45,3	14	35,9		1,00
Hormonioterapia + quimioterapia	20	23,3	6	30,0	0,69	0,82 (0,32 – 2,14)
Quimioterapia	20	23,3	3	15,0	0,11	0,36 (0,10 – 1,27)
Nenhum	7	8,1	1	14,3	0,30	0,35 (0,05 – 2,62)
Total	86	100,0	24	27,9		

Resultados são apresentados em número e percentual, Risco relativo (Intervalo de Confiança).

\*Problemas de convergência no modelo; Dados faltantes: Receptor de estrogênio (3); Receptor de progesterona (6); Expressão da proteína HER2 (26); Expressão do Ki-67 (42); Expressão do p53 (27); Subtipos moleculares (37)

\*\* Fatores de risco isolados, significativamente associados com o risco de recidiva da doença ( $p < 0,05$ ).

Abreviatura: RT= radioterapia

**Tabela 3.** Distribuição das pacientes com câncer de mama segundo as variáveis e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado para óbito.

Variáveis	Casos		Óbitos		p	Risco relativo (IC95%)
	n	%	n	%		
Idade (anos)					0,13	
< 50	21	24,4	6	28,6		1,00
≥ 50	65	75,6	8	12,3		0,45 (0,16 – 1,28)
Status linfonodo axilar					0,26	
Positivo	42	48,8	9	21,4		1,00
Negativo	44	51,2	5	11,4		0,54 (0,18-1,60)
Número de linfonodos positivos					0,08	
No (ausência de metástase)	44	51,2	5	11,4		1,00
N1 (metástases em 1 a 3 linfonodos)	36	41,9	6	16,7	0,56	1,43 (0,44 – 4,69)
N2 (metástases em 4 a 9 linfonodos)**	6	7,0	3	50,0	0,03	4,95 (1,17 – 20,91)
Diâmetro do tumor (cm)					0,01	
≤ 2,0	46	53,5	3	6,5		1,00
> 2,0 e ≤ 5,0**	40	46,5	11	27,5		5,13 (1,43 – 18,45)
Estádio patológico					0,06	
Estádio I	28	32,6	2	7,4		1,00
Estádio II	52	60,4	9	17,0	0,23	2,54 (0,55 – 11,78)
Estádio III**	6	7,0	3	50,0	0,02	8,22 (1,37 – 49,52)
Tipo histológico*					-	
Lobular invasor	4	4,7	0	0,0		-
Ductal invasor	82	95,3	14	17,1		-
Grau histológico do tumor					0,60	
GI	22	25,6	3	13,6		1,00
GII	52	60,5	10	19,2	0,64	1,36 (0,37 – 4,95)
GIII	12	14,0	1	8,3	0,55	0,50 (0,05 – 4,80)
Invasão vascular					0,63	
Não	42	48,8	6	14,3		1,00
Sim	44	51,2	8	18,2		1,30 (0,45 – 3,75)
Receptor de estrogênio					0,60	
Negativo	8	9,6	1	12,5		1,00
Positivo	75	90,4	13	17,3		1,73 (0,23 – 13,22)
Receptor de progesterona					0,44	
Negativo	13	16,3	1	7,7		1,00
Positivo	67	83,8	13	19,4		2,24 (0,29 – 17,13)
Expressão do HER2					0,58	
Negativo	46	76,7	6	13,0		1,00
Positivo	14	23,3	3	21,4		1,48 (0,37 – 5,95)

Continuação Tabela 3. Distribuição das pacientes com câncer de mama segundo as variáveis e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado para óbito.

Variáveis	Casos		Óbitos		p	Risco relativo (IC95%)
	n	%	n	%		
Expressão do Ki-67					0,79	
< 14%	15	34,1	2	13,3		1,00
≥ 14%	29	65,9	5	17,2		1,25 (0,24 – 6,44)
Expressão do p53					0,20	
Negativo (≤ 10%)	30	50,8	6	20,0		1,00
Positivo (> 10%)	29	49,2	2	6,9		0,35 (0,07 – 1,74)
Subtipos moleculares*					-	
Luminal A	12	24,5	2	16,7		1,00
Luminal B	32	65,3	6	18,8	0,97	1,03 (0,21 – 5,10)
Superexpressão HER2	2	4,1	0	0,0	-	-
Triplo negativo	3	6,1	0	0,0	-	-
Tratamento local					0,15	
Setorectomia + linfadenectomia + RT	45	52,3	5	11,1		1,00
Mastectomia + linfadenectomia + RT	7	8,1	2	28,6	0,09	4,17 (0,80 – 21,67)
Mastectomia + linfadenectomia	32	37,2	6	18,8	0,20	2,20 (0,66 – 7,33)
Setorectomia +linfadenectomia	2	2,3	1	50,0	0,06	8,35 (0,94 – 74,00)
Tratamento adjuvante sistêmico					0,67	
Hormonioterapia	39	45,3	6	15,4		1,00
Hormonioterapia + quimioterapia	20	23,3	5	25,0	0,47	1,55 (0,47 – 5,10)
Quimioterapia	20	23,3	2	10,0	0,50	0,57 (0,12 – 2,85)
Nenhum	7	8,1	1	14,3	0,89	0,86 (0,10 – 7,11)
Total	86	100,0	14	16,3		

Os dados são apresentados em números, percentuais e risco relativo (intervalo de confiança)

\*Problemas de convergência no modelo; Dados faltantes: Receptor de estrogênio (3); Receptor de progesterona (6); Expressão da proteína HER2 (26); Expressão do Ki67 (42); Expressão do p53 (27); Subtipos moleculares (37)

\*\* Fator de risco isolado para o óbito, com significância estatística, o número de linfonodos axilares positivos (p= 0,03), diâmetro do tumor T2 (p= 0,01) e Estádio III (p= 0,02).

Abreviatura: RT= radioterapia.



**Tabela 4.** Características imuno-histoquímicas dos tumores estudados em 86 pacientes

Parâmetros	N = 86	%	% válido
Receptor de estrogênio			
Positivo	75	87,2	90,4
Negativo	08	9,3	9,6
Indisponível	03	3,5	-
Receptor de progesterona			
Positivo	67	77,9	83,8
Negativo	13	15,1	16,3
Indisponível	06	7,0	-
HER2			
Positivo	14	16,3	23,3
Negativo	46	53,5	76,7
Indisponível	26	30,2	-
Ki-67			
Expressão ≥ 14%	29	33,7	65,9
Expressão < 14%	15	17,4	34,1
Indisponível	42	48,9	-
P53			
Positivo (≤ 10%)	29	33,7	49,2
Negativo (> 10%)	30	34,9	50,8
Indisponível	27	31,4	-
Subtipo molecular			
Luminal A	12	14,0	24,5
Luminal B	32	37,2	65,3
Superexpressão HER2	02	2,3	4,1
Triplo Negativo	03	3,5	6,1
Indisponível	37	43,0	-
VEGF	190 (180-257)		
MMP-2	52 (6-192)		
MMP-9	180 (100-223)		
TIMP-1	368 (338-380)		
TIMP-2	244 (170-285)		

Os valores são mostrados em contagem (percentual) ou mediana (amplitude interquartil: p25 a p75) Os níveis de expressão das MMPs, TIMPs e VEGF foram obtidos por meio do algoritmo HSCORE=  $\Sigma[(I + 1)] \times PC$ , no qual I e PC representam a intensidade e a percentagem de coloração das células, respectivamente. VEGF = Fator de Crescimento Endotelial Vascular; MMP = Metaloproteinase da Matriz; TIMP = Inibidor Tecidual da Metaloproteinase da Matriz.

**Tabela 5.** Resumo das correlações estatisticamente significativas entre os níveis de VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP2, identificados pelo método da correlação de Spearman.

Fatores	VEGF	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
VEGF					
$r_s$	-	-	0,246	-	-
p	-	-	0,023	-	-
MMP-2					
$r_s$	-	-	-	-	0,358
p	-	-	-	-	0,001
MMP-9					
$r_s$	0,246	-	-	-	-
p	0,023	-	-	-	-
TIMP-1					
$r_s$	-	-	-	-	-
p	-	-	-	-	-
TIMP-2					
$r_s$	-	0,358	-	-	-
p	-	0,001	-	-	-

VEGF= fator de crescimento endotelial vascular; MMP= metaloproteinases da matrix; TIMP= inibidor tecidual de metaloproteinases da matrix.;  $r_s$ = coeficiente de Spearman. Somente são mostrados os dados com  $p < 0.05$ .

**Tabela 6.** Associação dos fatores angiogênicos VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 com os demais parâmetros clinicopatológicos.

Variáveis	N(%)	VEGF	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Idade (anos)	58,4 ± 11,2					
< 50	21(24,4)	190(178-279)	40(2,5-173)	160(42-190)	360(330-370)	178(148-237) <sup>a</sup>
≥ 50	65(75,6)	190(180-255)	75(7,5-222)	180(123-247)	372(336-386)	264(188-305)
Cor						
Preta	03(3,5)	190(120- -)	0,0(10- -)	194(16- -)	380(194- -)	194(92- -)
Branca	83(96,5)	190(180-264)	54(6,0-186)	180(100-219)	368(340-380)	249(170-285)
IMC						
< 30	69(80,2)	190(180-270)	56(9,0-783)	180(120-237)	368(340-380)	249(170-285)
≥ 30	17(19,8)	186(166-217)	36(0,0-252)	156(23-188)	360(297-380)	219(160-285)
Menarca (anos)	12,8 ± 1,4					
≤ 12	44(51,2)	190(180-270)	50(10-240)	180(121-229)	374(343-388) <sup>b</sup>	259(178-312)
> 12	42(48,8)	186(177-240)	63(3,7-180)	180(94-222)	360(300-380)	225(164-270)
Diâmetro patológico do tumor (pT, cm)	2,3 ± 1,0					
≤ 2,0	46(53,5)	190(180-270)	40(6,0-216)	183(124-243)	370(338-380)	262(190-286) <sup>c</sup>
> 2,0 e ≤ 5,0	40(46,5)	188(176-251)	72(5,0-180)	170(49-193)	360(307-380)	190(160-270)
Classificação do tumor UICC						
≤ 0,5 cm (pT1a)	01(1,2)	255	384	192	376	291
> 0,5 cm e ≤ 1,0 cm (pT1b)	08(9,3)	188(176-205)	25(1,5-226)	186(157-194)	372(340-380)	252(191-285)
> 1,0 cm e ≤ 2,0 cm (pT1c)	37(43)	190(180-270)	40(6,0-195)	180(110-264)	368(316-384)	255(188-322)
> 2,0 cm e ≤ 5,0 cm (pT2)	40(46,5)	188(176-251)	72(5,5-180)	170(49-193)	360(307-380)	190(160-270)
Tipo histológico						
Ductal	82(95,3)	175(159-187)	94(18-318)	234(121-284)	384(350-394)	262(255-337)
Lobular	04(4,7)	190(180-265)	52(6,0-192)	180(99-201)	368(329-380)	229(170-285)
Grau histológico						
GI	22(25,5)	186(173-195)	138(9,0-181)	186(124-201)	372(329-380)	240(164-285)
GII	52(60,5)	192(180-270)	52(6,0-240)	170(105-228)	368(343-380)	244(170-289)
GIII	12(14)	189(180-256)	17(0,0-208)	178(47-249)	368(343-380)	237(191-281)

Continuação da Tabela 6. Associação dos fatores angiogênicos VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 com os demais parâmetros clinicopatológicos.

Invasão vascular						
Sim	44(51,2)	190(177-255)	63(4,0-163)	180(69-255)	360(293-381)	222(160-276)
Não	42(48,8)	187(180-270)	45(8,0-235)	180(127-190)	372(340-380)	255(189-234)
Status do linfonodo axilar						
Positivo	42(48,8)	190(180-235)	45(3,7-157)	165(46-228)	360(295-380)	225(160-272)
Negativo	44(51,2)	190(178-270)	64(9,2-238)	180(152-224)	372(340-383)	255(172-321)
Número de linfonodos positivos						
N0 (ausência de metástase)	44(51,2)	190(178-270)	64(9,2-238)	180(152-224)	372(340-383)	255(172-321)
N1 (metástases 1 a 3 linfonodos)	36(41,8)	188(180-231)	45(4,5-159)	165(34-255)	360(293-380)	222(160-270)
N2 (metástases 4 a 9 linfonodos)	06(7,0)	207(177-280)	36(0,0-135)	163(87-182)	364(337-374)	259(170-362)
Subtipo molecular						
Luminal A	12(14)	188(180-255)	165(56-251)	178(22-25)	360(297-379)	277(172-355)
Luminal B	32(37,2)	192(171-270)	90(18-232)	170(49-164)	372(334-387)	255(190-387)
Superexpressão HER2	02(2,3)	187(180- -)	144(24- -)	135(0,0- -)	334(297- -)	213(156- -)
Triplo Negativo	03(3,5)	180(166- -)	10(4,0- -)	16(0,0- -)	292(291- -)	225(10- -)
Indisponível	37(43)	-	-	-	-	-
Classificação TNM						
pT1N0M0	28(32,6)	190(178-276)	45(6,7-238)	186(155-238)	370(340-380)	262(190-289)
pT1N1M0	17(19,8)	190(180-244)	50(4,5-205)	180(68-270)	368(298-380)	255(181-285)
pT1N2M0	01(1,2)	180	0,0	180	380	270
pT2N0M0	15(17,4)	186(176-270)	75(10-180)	180(130-180)	380(352-388)	180(160-340)
pT2N1M0	20(23,3)	183(168-216)	48(55-175)	165(15-246)	360(291-380)	192(157-268)
pT2N2M0	05(5,8)	225(180-282)	70(1,0-190)	156(78-180)	360(315-370)	249(150-315)
Estadio pTNM						
Estadio I	28(32,6)	190(180-270)	40(9,0-234)	186(150-196)	372(340-380)	270(190-291)
Estadio IIA	32(37,2)	188(180-266)	97(7,0-225)	180(92-270)	364(343-380)	222(170-285)
Estadio IIB	20(23,2)	186(171-232)	40(4,0-170)	170(20-237)	360(291-382)	190(158-267)
Estadio IIIA	06(7,0)	207(177-280)	36(0,0-135)	163(87-182)	364(337-374)	259(170-362)

Os dados são mostrados através de percentuais, média  $\pm$  dp ou mediana (amplitude interquartil; p25 a p75). O teste U de Mann-Whitney mostra uma associação entre os níveis mais elevados de TIMP-2 com idade  $\geq$  50anos ( $p= 0,002$ )<sup>a</sup> e diâmetro do tumor  $\leq$  2 cm ( $p= 0,016$ )<sup>c</sup>. Os níveis elevados de TIMP-1 estavam associados a menarca  $\leq$  12 anos ( $p= 0,038$ )<sup>b</sup>. Para as variáveis categorizadas em 3 ou mais itens foi usado o teste H de Kruskal-Wallis

**Tabela 7.** Associação dos fatores angiogênicos VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 com os marcadores biológicos e os subtipos moleculares de câncer de mama.

Variáveis	N(%)	VEGF	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Receptor de estrogênio						
Negativo	08(9,3)	188(180-193)	7,0(0,5-	105(4,0-238)	328(291-371)	192(164-255)
Positivo	75(87,2)	190(178-264)	111)	180(120-219)	372(340-380)	255(170-285)
Indisponível	03(3,5)	-	56(6,0-210)	-	-	-
			-			
Receptor de progesterona						
Negativo	13(15,1)	180(175-190)	80(15-213)	126(10-183)	340(294-372)	225(189-311)
Positivo	67(77,9)	190(180-270)	50(4,0-180)	180(120-234)	372(340-380)	249(170-361)
Indisponível	06(7,0)	a	-	-	-	-
		-				
HER2						
Negativo	46(53,5)	189(176-270)	128(20-	178(42-255)	360(300-380)	252(170-298)
Positivo	14(16,3)	232(189-265)	240)	170(87-183)	372(344-388)	256(182-297)
Indisponível	26(30,2)	-	50(14-201)	-	-	-
			-			
Ki-67						
Expressão < 14%	15(17,4)	190(180-255)	165(50-	190(0,0-270)	360(297-380)	270(170-340)
Expressão ≥ 14%	29(33,7)	190(170-262)	255)	170(46-183)	372(316-382)	255(180-302)
Indisponível	42(48,9)	-	126(19-	-	-	-
			255)			
			-			
P53						
Negativo (≤ 10%)	30(34,9)	190(180-270)	125(16-	173(42-192)	360(300-380)	252(170-286)
Positivo (> 10%)	29(33,7)	190(176-271)	240)	170(108-255)	372(318-388)	249(165-346)
Indisponível	27(31,4)	-	75(22-210)	-	-	-
			-			
Subtipo molecular						
Luminal A	12(14)	188(180-255)	165(56-	178(22-25)	360(297-379)	277(172-355)
Luminal B	32(37,2)	192(171-270)	251)	170(49-164)	372(334-387)	255(190-387)
Superexpressão HER2	02(2,3)	187(180- -)	90(18-232)	135(0,0- -)	334(297- -)	213(156- -)
Triplo Negativo	03(3,5)	180(166- -)	144(24- -)	16(0,0- -)	292(291- -)	225(10- -)
Indisponível	37(43)	-	10(4,0- -)	-	-	-
			-			

Os valores são expressos como contagem (percentuais) ou mediana (amplitude interquartil: p25 a p75). Teste estatístico: teste U de Mann-Whitney: os níveis mais elevados de VEGF estavam associados significativamente a positividade dos receptores de progesterona ( $p=0,045$ ). <sup>a</sup> O teste H de Kruskal- Wallis foi usado nas variáveis com 3 ou mais categoria.

**Tabela 8.** Distribuição das pacientes segundo o tratamento recebido

Tratamento	N = 86	%
Tratamento local		
Setorectomia + linfadenectomia + RT	45	52,3
Mastectomia + linfadenectomia + RT	7,0	8,1
Mastectomia + linfadenectomia	32	37,2
Setorectomia + Linfadenectomia	02	2,3
Tratamento adjuvante		
TAM	39	45,3
TAM + QT	20	23,3
QT	20	23,3
Nenhum	07	8,1

Os dados são mostrados como contagem e percentagem. Abreviaturas: Radioterapia (RT), Quimioterapia (QT), Tamoxifeno (TAM).

**Tabela 9.** Distribuição da recorrência da doença em 86 pacientes segundo o local das metástases.

Recorrência/Local	N = 86	%	%Válido
Recorrência			
Sim	24	27,9	27,9
Não	62	72,1	72,1
Local			
MAMA	03	3,5	12,5
CUT	03	3,5	12,5
OSS	02	2,3	8,3
PUL	04	4,7	16,7
HEP	04	4,7	16,7
PUL+HEP	02	2,3	8,3
PUL+HEP+OSS	01	1,2	4,2
OSS+HEP	02	2,3	8,3
CER	01	1,2	4,2
PUL+HEP+CER	01	1,2	4,2
CER+OSS	01	1,2	4,2

Os dados são mostrados como contagem e percentual.

Abreviaturas: CUT- cutânea; OSS- osso; PUL- pulmão; HEP- hepática; CER- cérebro.

**Tabela 10.** Distribuição das 86 pacientes segundo o estado atual

Viva/Óbito	N	%
Viva sem doença	63	73,3
Viva com doença	04	4,7
Óbito	19	22,0
Causa do óbito		
Associado a doença	14	73,7
Falência de múltiplos órgãos	06	42,9
Insuficiência respiratória	05	35,7
Insuficiência hepática	03	21,4
Não associado à doença	05	26,3
Pancreatite biliar	01	20,0
Aneurisma cerebral	01	20,0
Câncer de pâncreas	01	20,0
Infarto agudo miocárdio	01	20,0
Doença de Alzheimer	01	20,0

Os dados são mostrados em contagem e percentual.

**Tabela 11.** Modelo de riscos proporcionais de Cox múltiplo, para tempo livre de recorrência da doença.

Variáveis	p	Risco relativo (IC95%)
Número de linfonodos comprometidos	0,02	
No (ausência de metástase)		1,00
N1 (metástases 1 a 3 linfonodos)	0,59	0,77 (0,31 – 1,96)
N2 (metástases 4 a 9 linfonodos)	0,02	3,81 (1,25 – 11,59)
Diâmetro do tumor (cm)	0,04	
≤ 2,0		1,00
> 2,0 e ≤ 5,0		2,60 (1,07 – 6,32)

Os dados são apresentados como risco relativo (intervalo de confiança). Significância estatística:  $p < 0,05$ .

**Tabela 12.** Análise das variáveis contínuas (MMPs, TIMPs e VEGF) e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado, para tempo livre de recorrência da doença.

Variáveis	Recidiva (n=24)	Censura (n=62)	p	Risco relativo (IC95%)
HSCORE VEGF	213,21 ± 45,06	207,23 ± 64,96	0,79	1,001 (0,995 – 1,007)
HSCORE MMP2	110,04 ± 118,36	110,00 ± 115,53	0,97	1,000 (0,997 – 1,004)
HSCORE MMP9	163,54 ± 81,58	161,21 ± 97,88	0,94	1,000 (0,996 – 1,004)
HSCORE TIMP1	351,25 ± 42,76	348,03 ± 48,85	0,86	1,001 ( 0,992 – 1,010)
HSCORE TIMP2	237,63 ± 88,42	235,29 ± 86,32	0,87	1,000 (0,996 – 1,005)

Os valores estão expressos em média ± dp e risco relativo (intervalo de confiança). Significância estatística:  $p < 0,05$ .

**Tabela 13.** Análise das variáveis contínuas ( MMPs, TIMPs, e VEGF), e significância no modelo de riscos proporcionais de Cox univariado para o risco de óbito

Variáveis	Óbito (n=14)	Censura (n=72)	p	Risco relativo (IC95%)
HSCORE VEGF	208,71 ± 44,11	208,93 ± 62,73	0,88	0,999 (0,991 – 1,008)
HSCORE MMP2	106,43 ± 129,32	110,71 ± 113,75	0,89	0,999 (0,995 – 1,004)
HSCORE MMP9	135,07 ± 72,92	167,07 ± 96,15	0,17	0,996 (0,991 – 1,002)
HSCORE TIMP1	342,21 ± 43,05	350,24 ± 47,91	0,50	0,997 ( 0,987 – 1,007)
HSCORE TIMP2	211,29 ± 87,85	240,74 ± 85,90	0,31	0,997 (0,991 – 1,003)

Os valores estão expressos em média ± dp e risco relativo (intervalo de confiança). Significância estatística:  $p < 0,05$ .

**Tabela 14.** Modelo de riscos proporcionais de Cox múltiplo, para o risco de óbito.

Variáveis	p	Risco relativo (IC90%)
Número de linfonodos comprometidos	0,02	
No (ausência de metástase)		1,00
N1 (metástases 1 a 3 linfonodos)	0,21	2,98 (0,71– 12,61)
N2 (metástases 4 a 9 linfonodos)	0,01	17,89 (3,20 – 99,87)
Expressão do p53	0,10	
Negativo ( $\leq 10\%$ )		1,00
Positivo ( $> 10\%$ )		0,25(0,06 – 1,00)

Os valores estão expressos como risco relativo (intervalo de confiança). Significância estatística:  $p < 0,05$ .

**Tabela 15.** Expressão das MMPs 2 e 9, seus inibidores TIMPs 1 e 2, e VEGF e tempo de sobrevida livre de recorrência.

Variáveis	Casos		Recidivas		p	Risco relativo (IC95%)
	n	%	n	%		
VEGF					0,915	
0 < VEGF ≤ 180	31	36,0	7	29,2		1,00
180 < VEGF ≤ 190	21	24,4	6	25,0	0,688	1,250 (0,420-3,723)
190 < VEGF ≤ 257	13	15,2	4	16,6	0,590	1,404 (0,409-4,815)
257 < VEGF ≤ 372	21	24,4	7	29,2	0,509	1,424 (0,499-4,060)
MMP-2					0,573	
0 < MMP-2 ≤ 6	23	26,7	8	33,3		1,00
6 < MMP-2 ≤ 52	20	23,3	3	12,5	0,188	0,410 (0,109-1,547)
52 < MMP-2 ≤ 192	22	25,6	6	25,0	0,746	0,839 (0,291-2,420)
192 < MMP-2 ≤ 384	21	24,4	7	29,2	0,993	1,004 (0,364-2,771)
MMP-9					0,453	
0 < MMP-9 ≤ 100	22	25,6	5	20,8		1,00
100 < MMP-9 ≤ 180	30	34,9	10	41,7	0,357	1,657 (0,565-4,857)
180 < MMP-9 ≤ 223	13	15,1	5	20,8	0,353	1,800 (0,520-6,224)
223 < MMP-9 ≤ 360	21	24,4	4	16,6	0,674	0,754 (0,202-2,810)
TIMP-1					0,706	
194 < TIMP-1 ≤ 338	21	24,4	5	20,8		1,00
338 < TIMP-1 ≤ 368	25	29,0	9	37,6	0,516	1,438 (0,481-4,301)
368 < TIMP-1 ≤ 380	23	26,8	5	20,8	0,694	0,779 (0,225-2,697)
380 < TIMP-1 ≤ 396	17	19,8	5	20,8	0,659	1,322 (0,383-4,571)
TIMP-2					0,952	
10 < TIMP-2 ≤ 170	23	26,7	7	29,2		1,00
170 < TIMP-2 ≤ 244	20	23,3	5	20,8	0,765	0,839 (0,266-2,648)
244 < TIMP-2 ≤ 285	25	29,0	6	25,0	0,773	0,851 (0,286-2,535)
285 < TIMP-2 ≤ 392	18	20,0	6	25,0	0,830	1,127 (0,379-3,353)

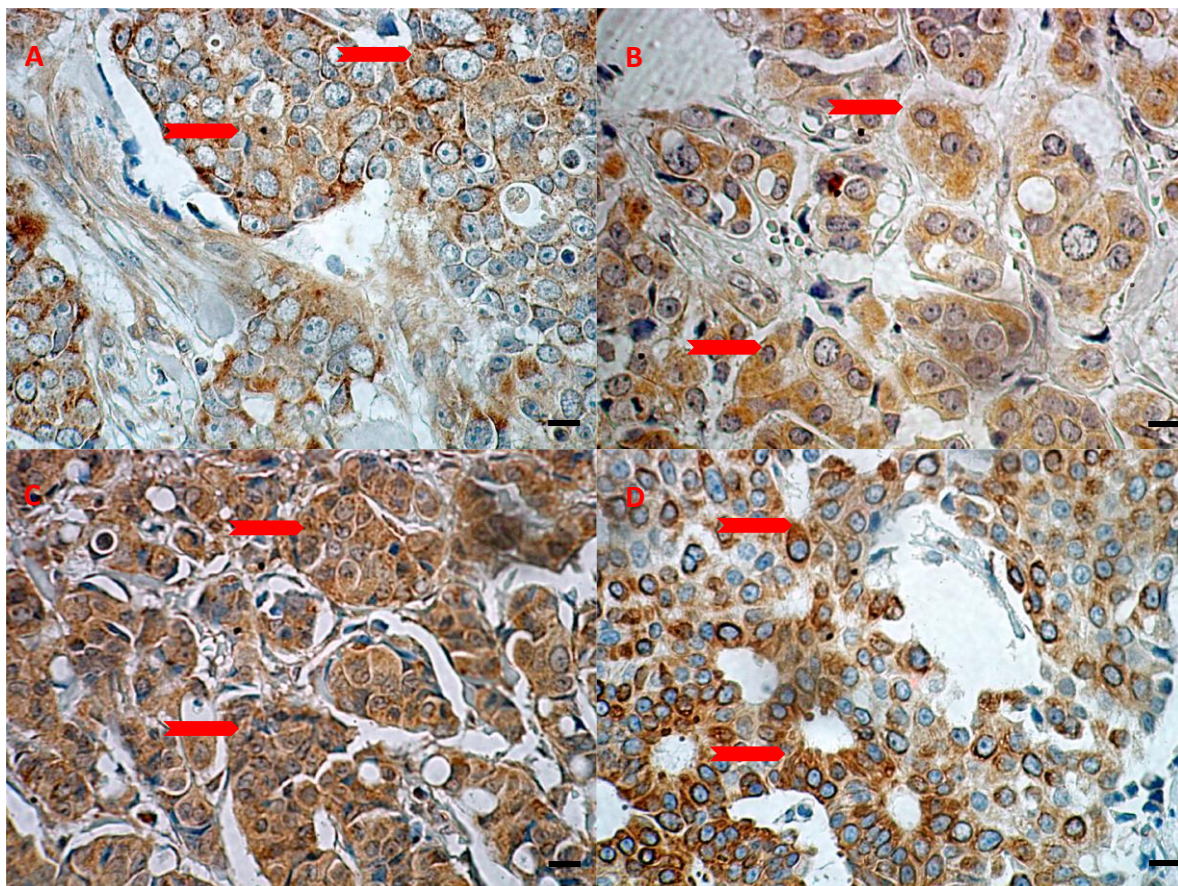
Os dados referentes à expressão das MMPs, TIMPs e VEGF são expressos em HSCORE, contagem, percentual e risco relativo (intervalo de confiança). Significância estatística:  $p < 0,05$ .



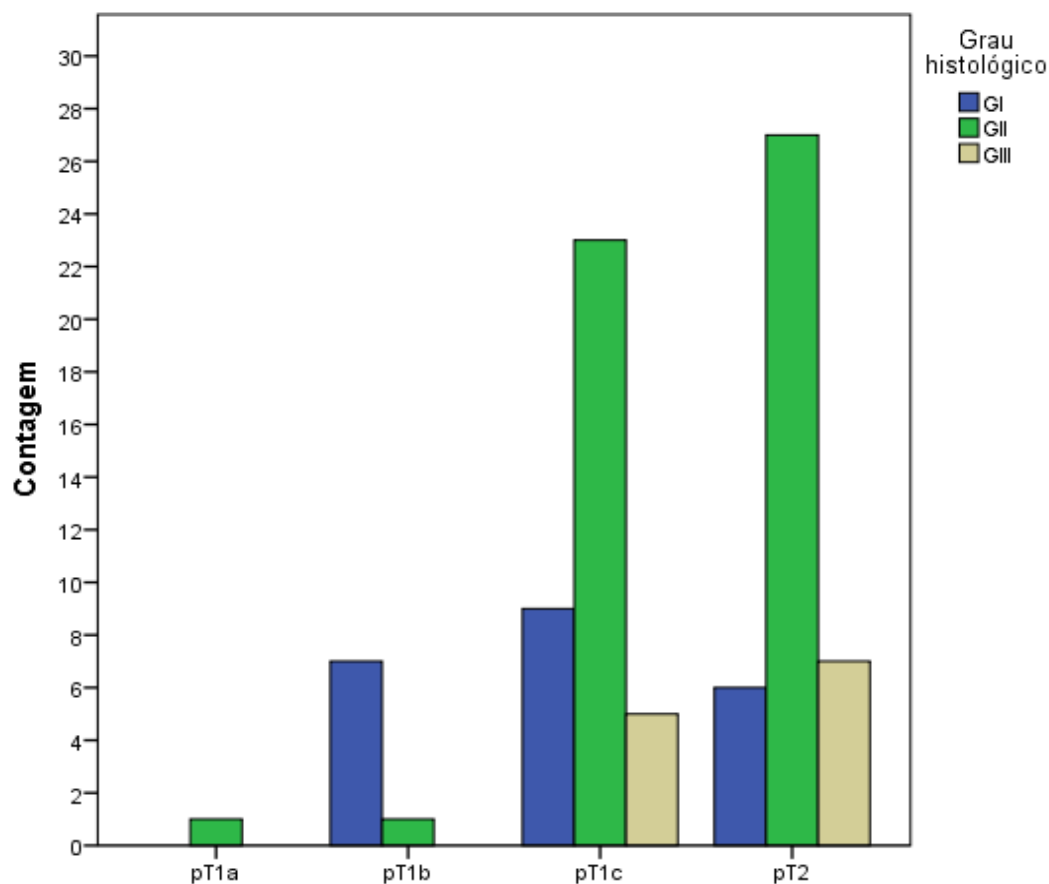
**Tabela 16.** Expressão das MMPs 2 e 9, TIMPs 1 e 2, e VEGF comparados com tempo de sobrevivência global.

Variáveis	Casos		Óbitos		p	Risco relativo (IC95%)
	n	%	n	%		
VEGF					0,595	
0 < VEGF ≤ 180	31	36,0	4	28,6		1,00
180 < VEGF ≤ 190	21	24,4	3	21,4	0,996	0,996 (0,222- 4,459)
190 < VEGF ≤ 257	13	15,2	4	28,6	0,255	2,257 (0,556 – 9,155)
257 < VEGF ≤ 372	21	24,4	3	21,4	0,982	0,982 (0,219 – 4,406)
MMP-2					0,289	
0 < MMP-2 ≤ 6	23	26,7	7	50,0		1,00
6 < MMP-2 ≤ 52	20	23,3	1	7,1	0,099	0,171(0,021-1,392)
52 <MMP-2 ≤ 192	22	25,6	2	14,3	0,205	0,361(0,075-1,744)
192 <MMP-2 ≤ 384	21	24,4	4	28,6	0,461	0,630(0,184-2,157)
MMP-9					0,959	
0 < MMP-9 ≤ 100	22	25,6	4	28,6		1,00
100 <MMP-9 ≤ 180	30	34,9	6	42,8	0,907	1,079(0,301-3,862)
180 <MMP-9 ≤ 223	13	15,1	4	28,6	0,608	1,441(0,357-5,820)
223 <MMP-9 ≤ 360	21	24,4	0	0	0,957	0,00(0,00-7,909E+191)
TIMP-1					0,351	
194 < TIMP-1 ≤ 338	21	24,4	4	28,6		1,00
338 < TIMP-1 ≤ 368	25	29,0	7	50,0	0,802	1,173(0,337-4,088)
368 < TIMP-1 ≤ 380	23	26,8	1	7,1	0,147	0,197(0,022-1,767)
380 < TIMP-1 ≤ 396	17	19,8	2	14,3	0,504	0,560(0,102-3,066)
TIMP-2					0,645	
10 < TIMP-2 ≤ 170	23	26,7	6	42,8		1,00
170 < TIMP-2 ≤ 244	20	23,3	3	21,4	0,397	0,549(0,137-2,199)
244 < TIMP-2 ≤ 285	25	29,0	3	21,4	0,395	0,547(0,136-2,196)
285 < TIMP-2 ≤ 392	18	20,0	2	14,3	0,280	0,414(0,083-2,050)

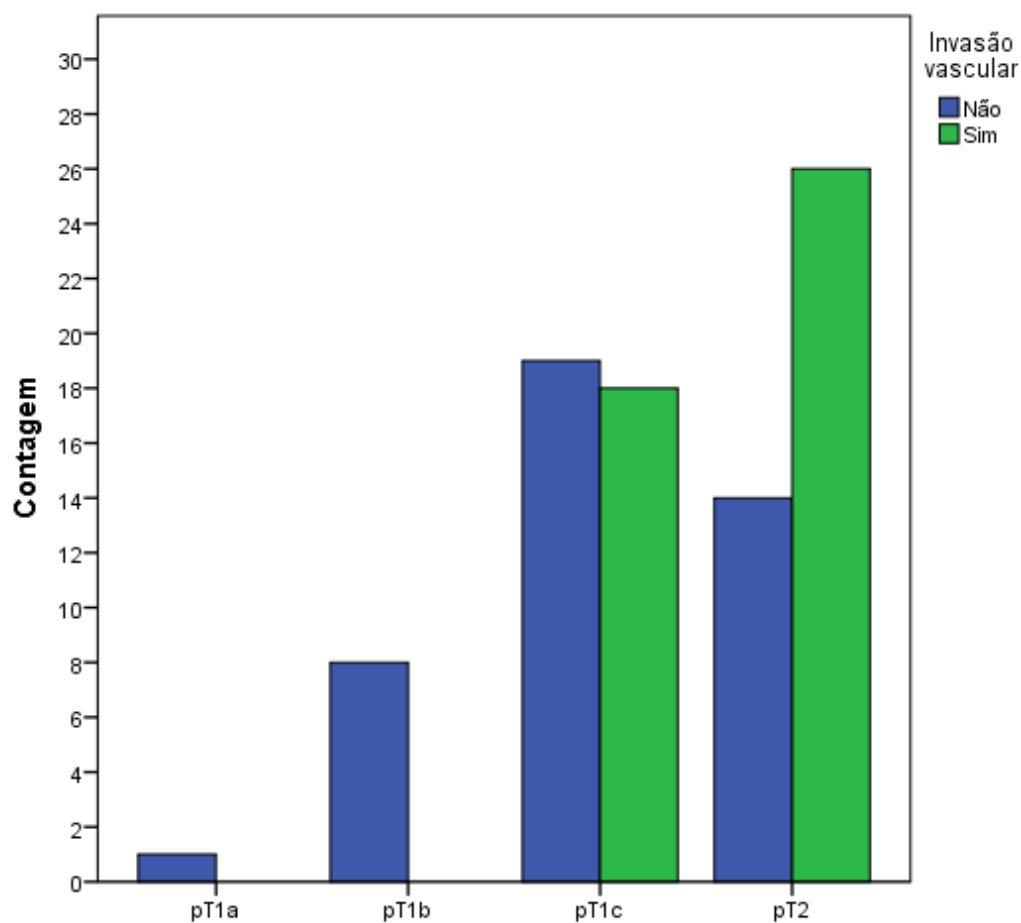
Os dados referentes à expressão das MMPs, TIMPs e VEGF são expressos em HSCORE, contagem, percentual e risco relativo (intervalo de confiança). Significância estatística:  $p < 0,05$ .



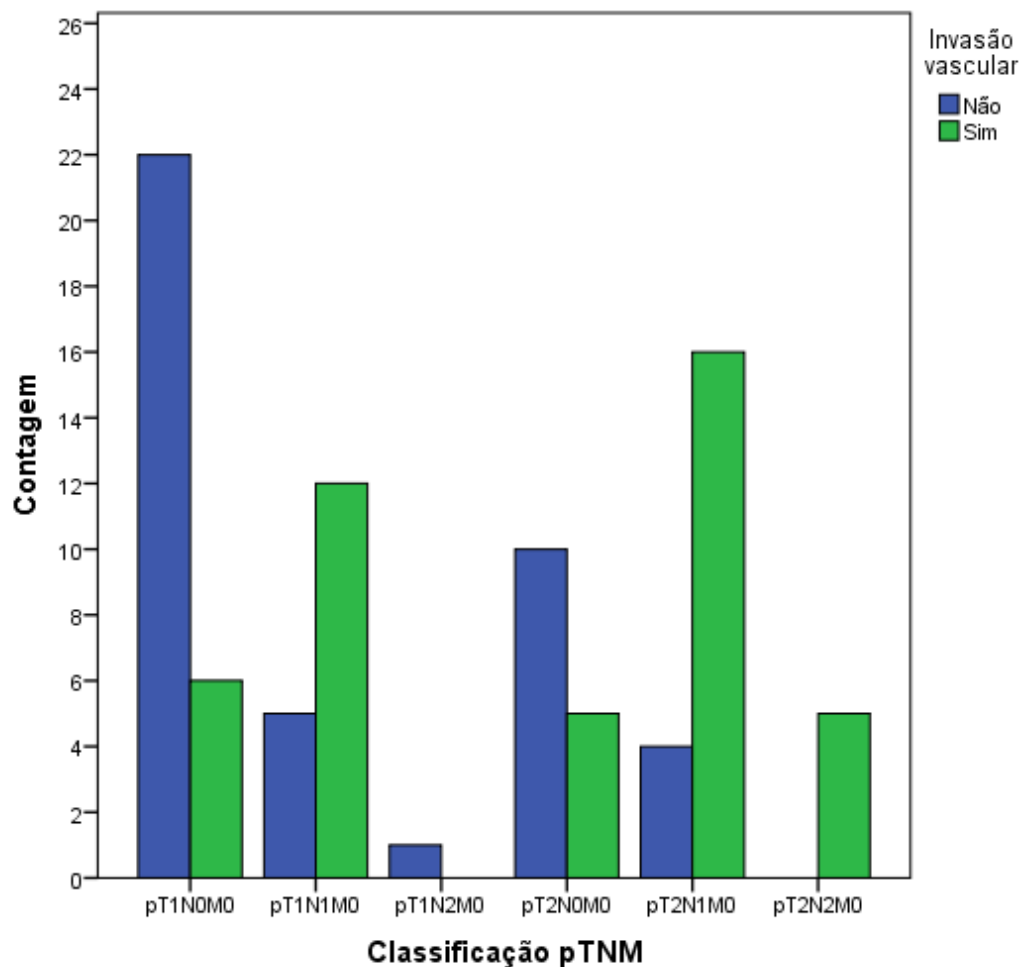
**Figura 1.** Expressão imunohistoquímica das metaloproteinases MMP-2 (A), MMP-9 (B), e inibidores teciduais das metaloproteinases TIMP-1 (C), TIMP2 (D), nas células neoplásicas de tumor de mama. As setas mostram a imunorreacção no citoplasma das células neoplásicas, que são mostradas em magnificação de 400X (barra = 20  $\mu$ m em todos os painéis).



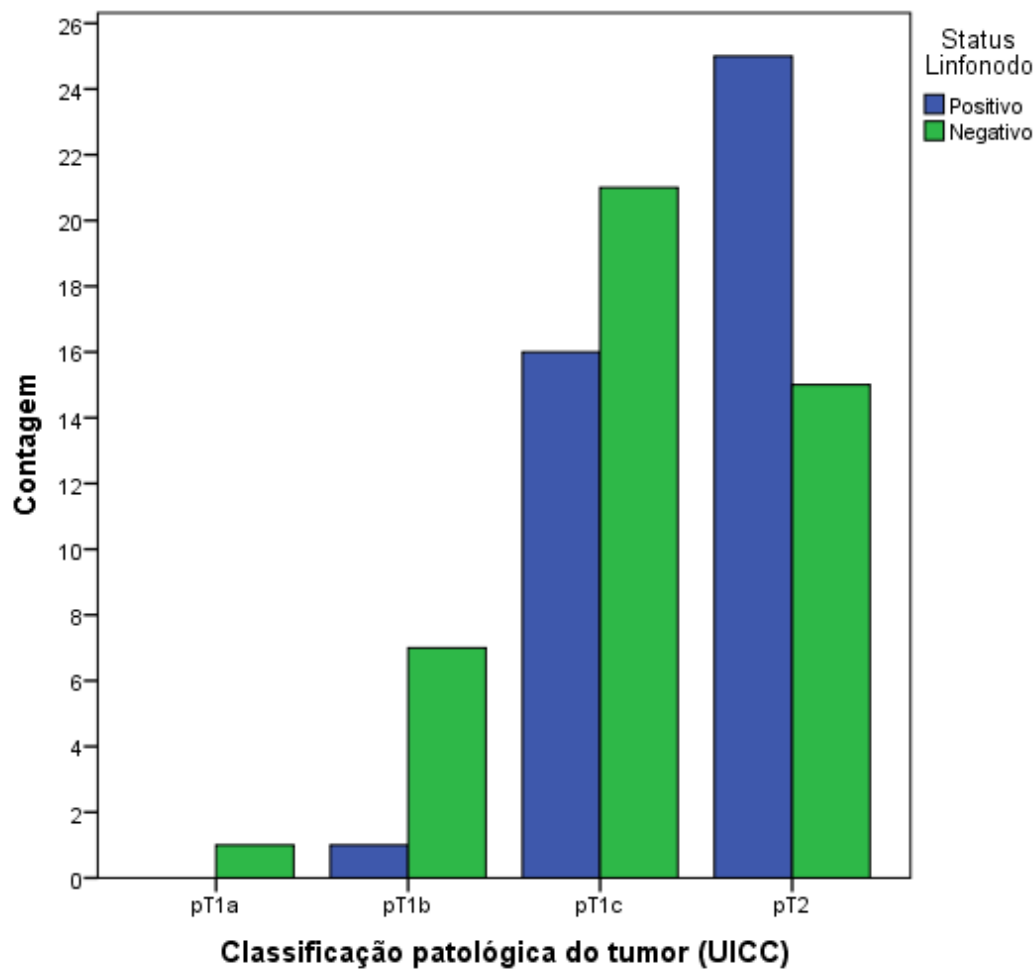
**Figura 2.** Associação estatisticamente significativa, entre o diâmetro patológico do tumor (pT), segundo a UICC (União Internacional de Controle do Câncer) e o grau histológico de Richardson Scarff Bloom ( $\chi^2$ : 19,3;  $p= 0,004$ ). Diâmetro tumoral patológico - pT1a:  $\leq 0,5$  cm; pT1b:  $> 0,5$  cm e  $\leq 1,0$  cm ; pT1c:  $> 1,0$  cm e  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$ cm.



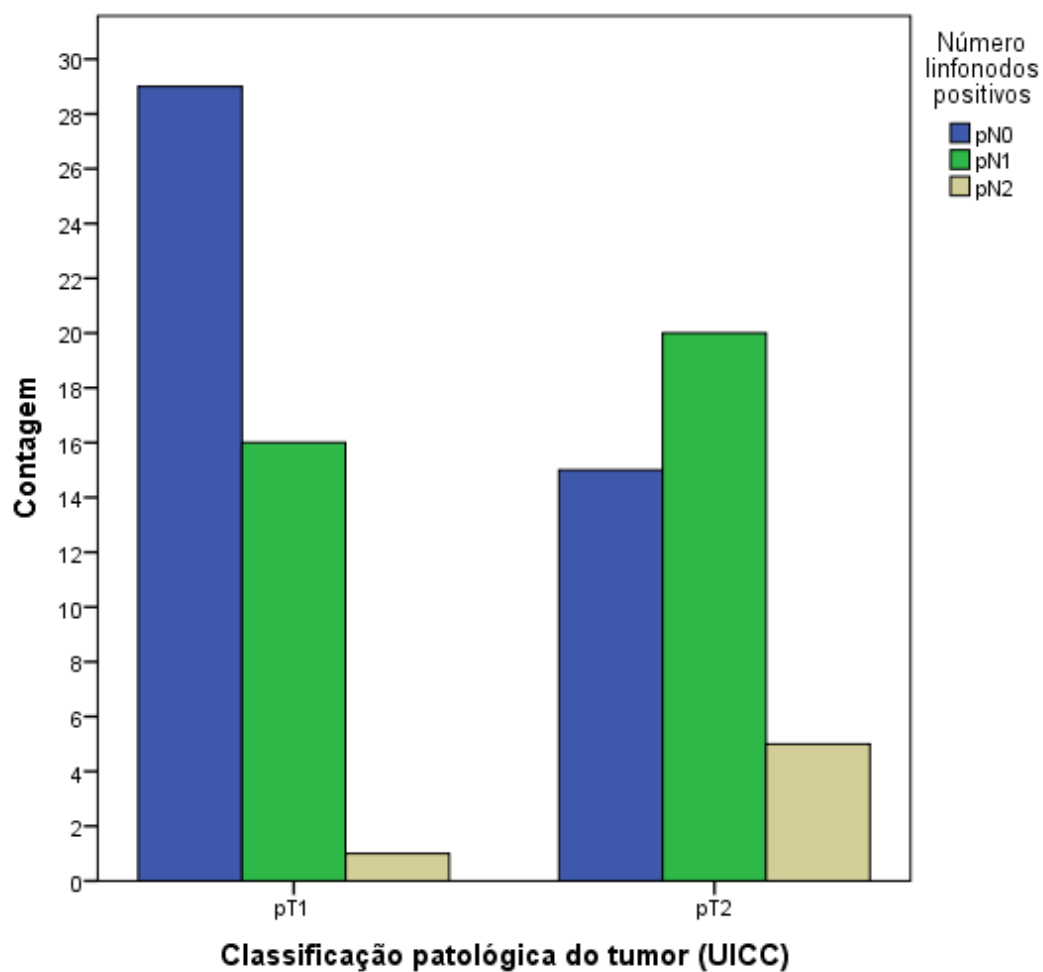
**Figura 3.** Associação estatisticamente significativa, entre o diâmetro patológico (pT) do tumor, segundo a UICC (União Internacional de Controle do Câncer) e a invasão vascular ( $\chi^2$ : 12,6;  $p= 0,006$ ). Diâmetro tumoral patológico - pT1a:  $\leq 0,5$  cm; pT1b:  $> 0,5$  cm e  $\leq 1,0$  cm ; pT1c:  $> 1,0$  cm e  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$ cm.



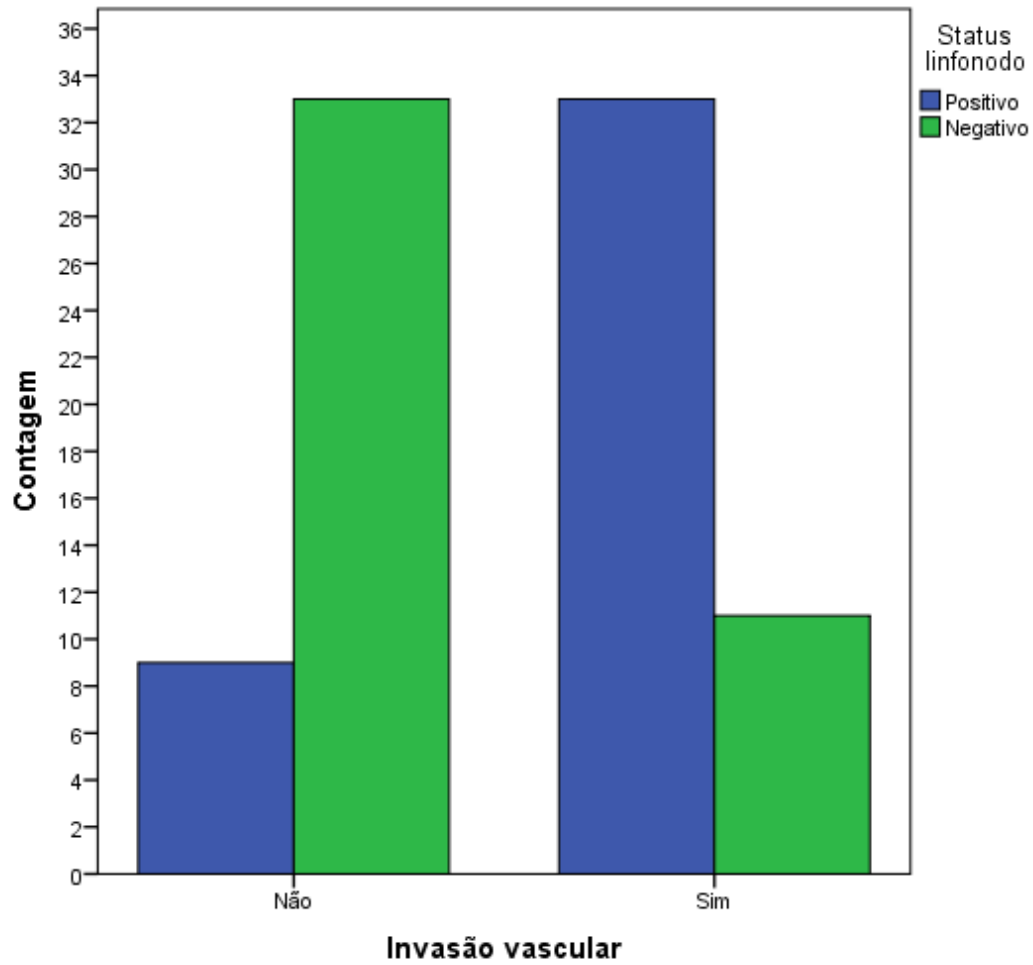
**Figura 4.** Associação estatisticamente significativa, entre a classificação pTNM (patológico Tumor-Nódulo-Metástases), segundo a UICC, e a Invasão vascular ( $\chi^2$ : 26,8;  $p = 0,000$ ). Diâmetro tumoral patológico - pT1:  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$  cm. Número de linfonodos positivos - N0: ausência de metástases nos linfonodos; N1: 1 – 3 linfonodos positivos; N2: 4 – 9 linfonodos positivos. M0: ausência de metástases a distância.



**Figura 5.** Associação estatisticamente significativa, entre o diâmetro patológico do tumor (pT), segundo a UICC, e o status do linfonodo axilar ( $\chi^2$ : 8,6;  $p= 0,035$ ). Diâmetro patológico do tumor - pT1a:  $\leq 0,5$  cm; pT1b:  $> 0,5$  cm e  $\leq 1,0$  cm; pT1c:  $> 1,0$  cm e  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$ cm.

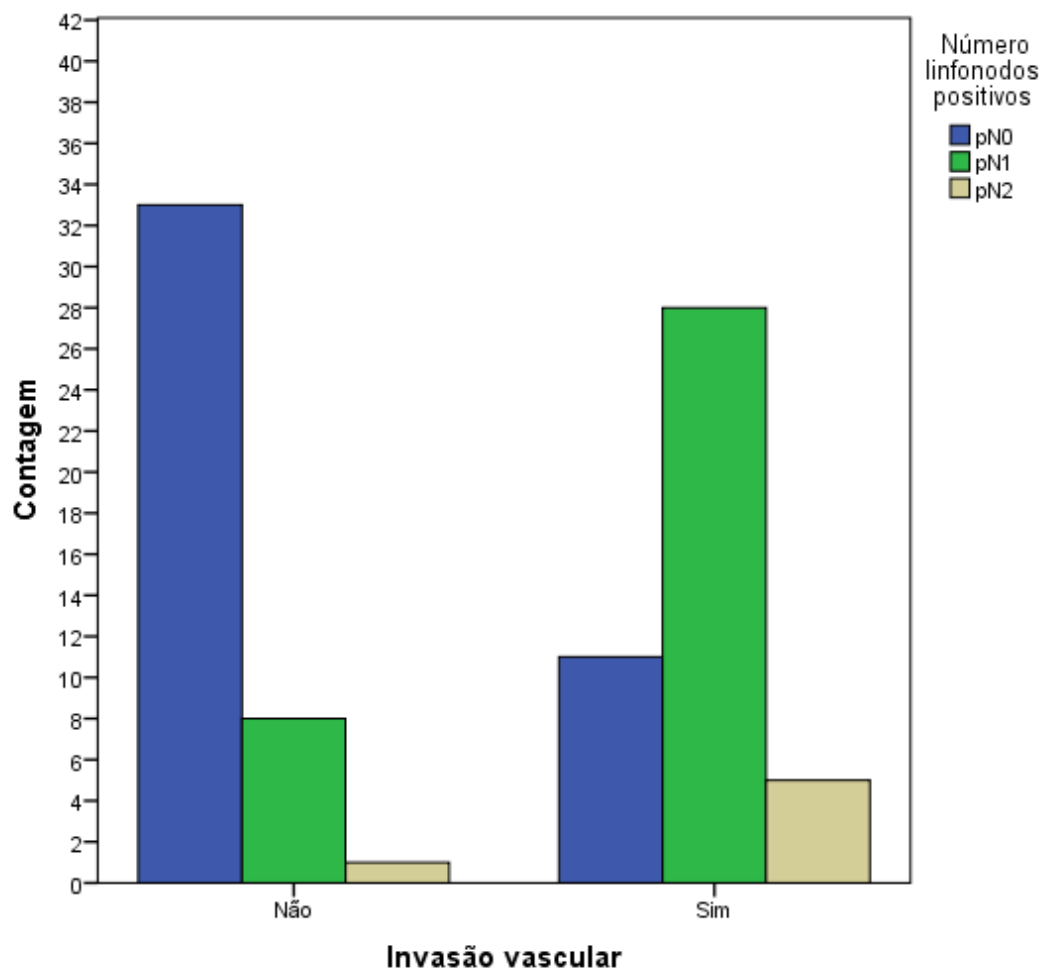


**Figura 6.** Associação significativa entre o diâmetro patológico do tumor (pT) e o número de linfonodos axilares comprometidos (pN), segundo a UICC ( $\chi^2$ : 7,2;  $p=0,028$ ). pT1:  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$  cm; pN0: ausência de metástases; pN1: 1 – 3 linfonodos positivos; pN2: 4 – 9 linfonodos positivos.

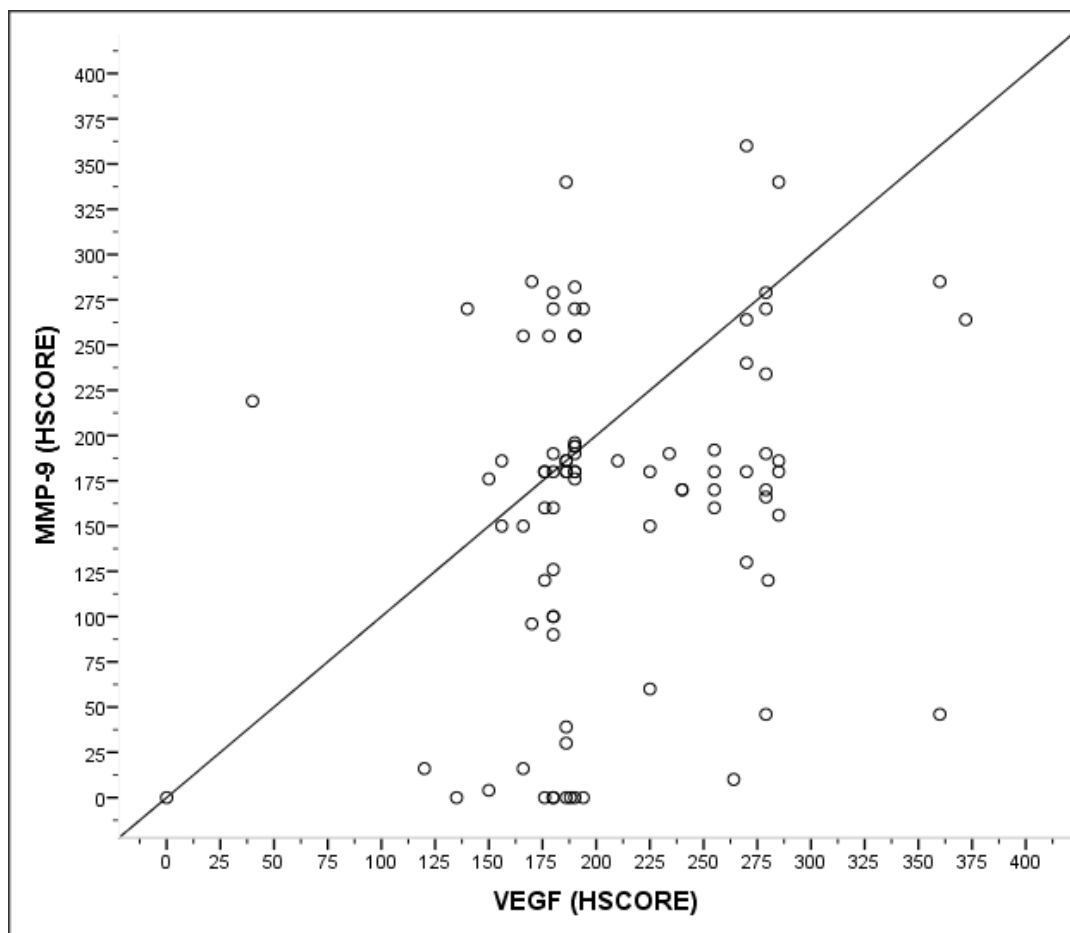


**Figura 7.** Associação significativa entre a presença de invasão vascular no tumor e o status do linfonodo axilar ( $\chi^2$ : 24,7;  $p= 0,000$ ).

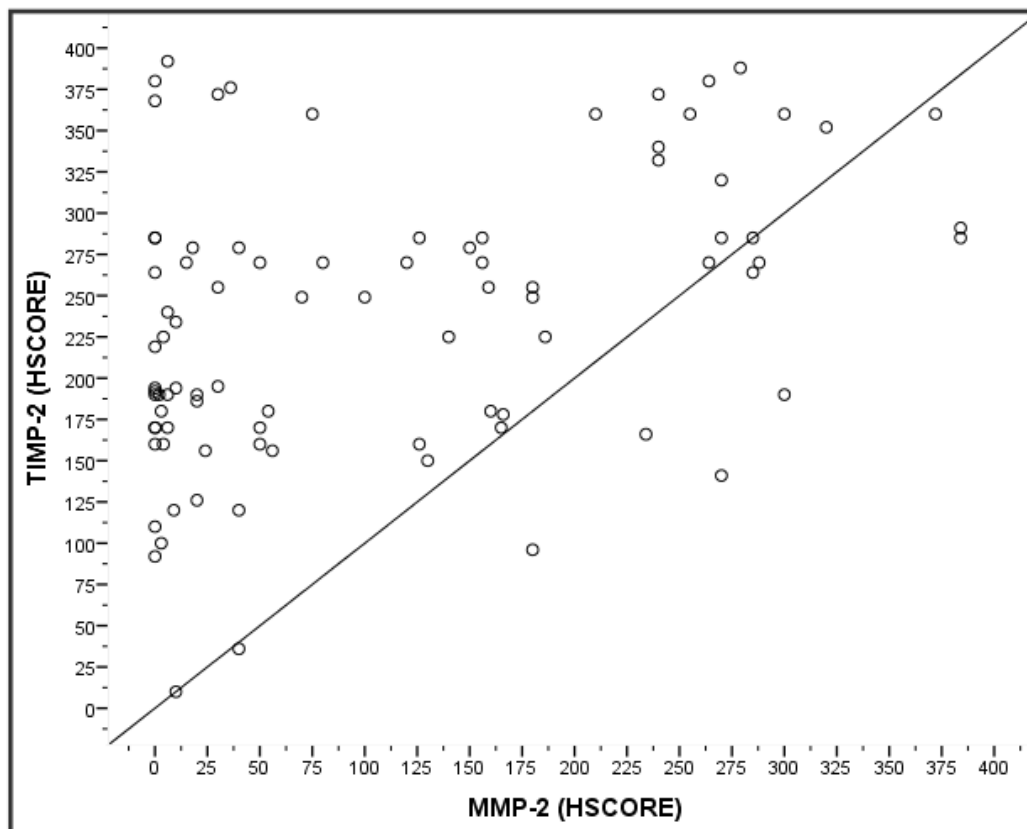




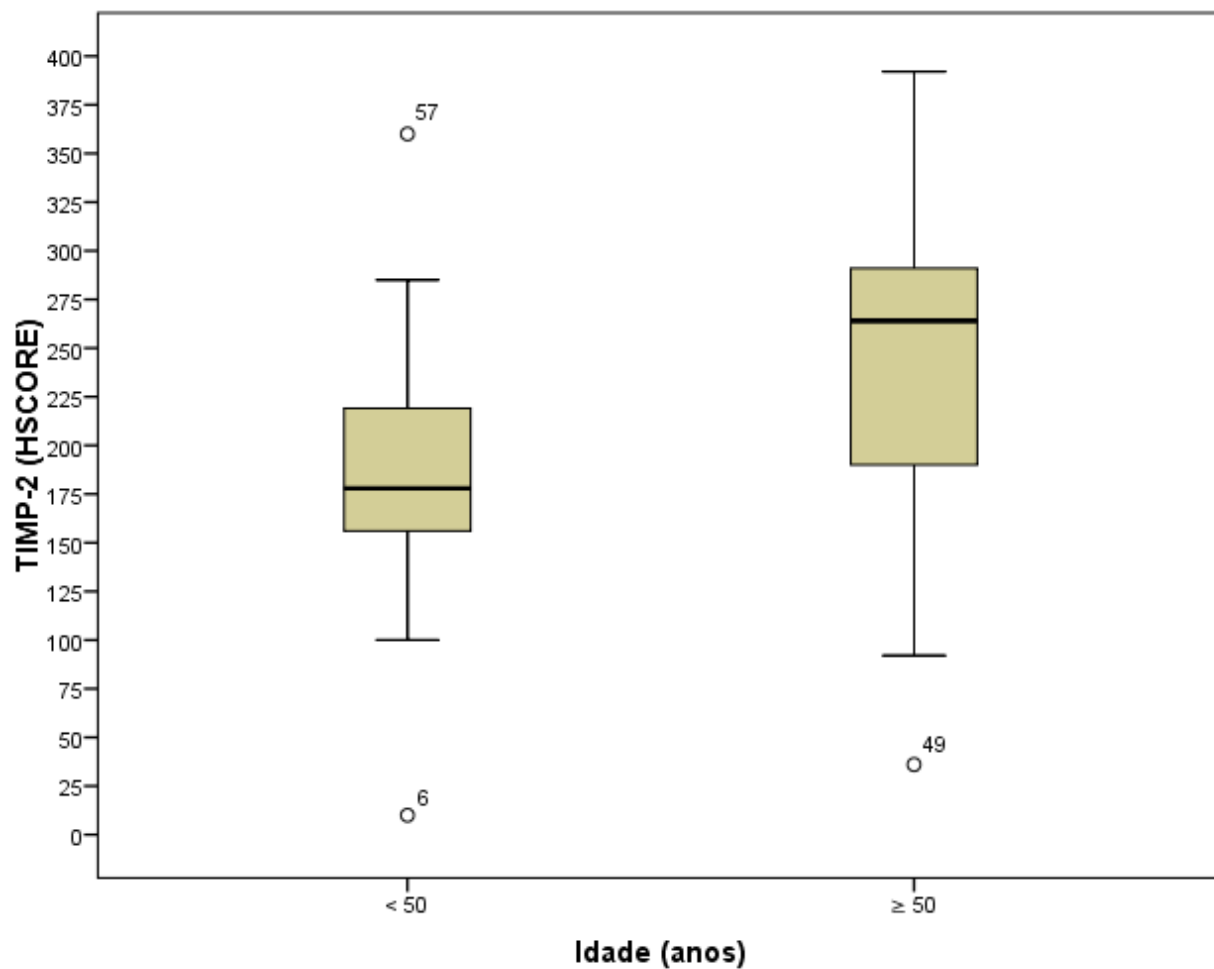
**Figura 8.** Associação significativa entre a presença de invasão vascular no tumor e o número de linfonodos axilares positivos ( $\chi^2$ : 24,7;  $p= 0,000$ ). pN0: ausência de metástases; pN1: 1 – 3 linfonodos positivos; pN2: 4 – 9 linfonodos positivos.



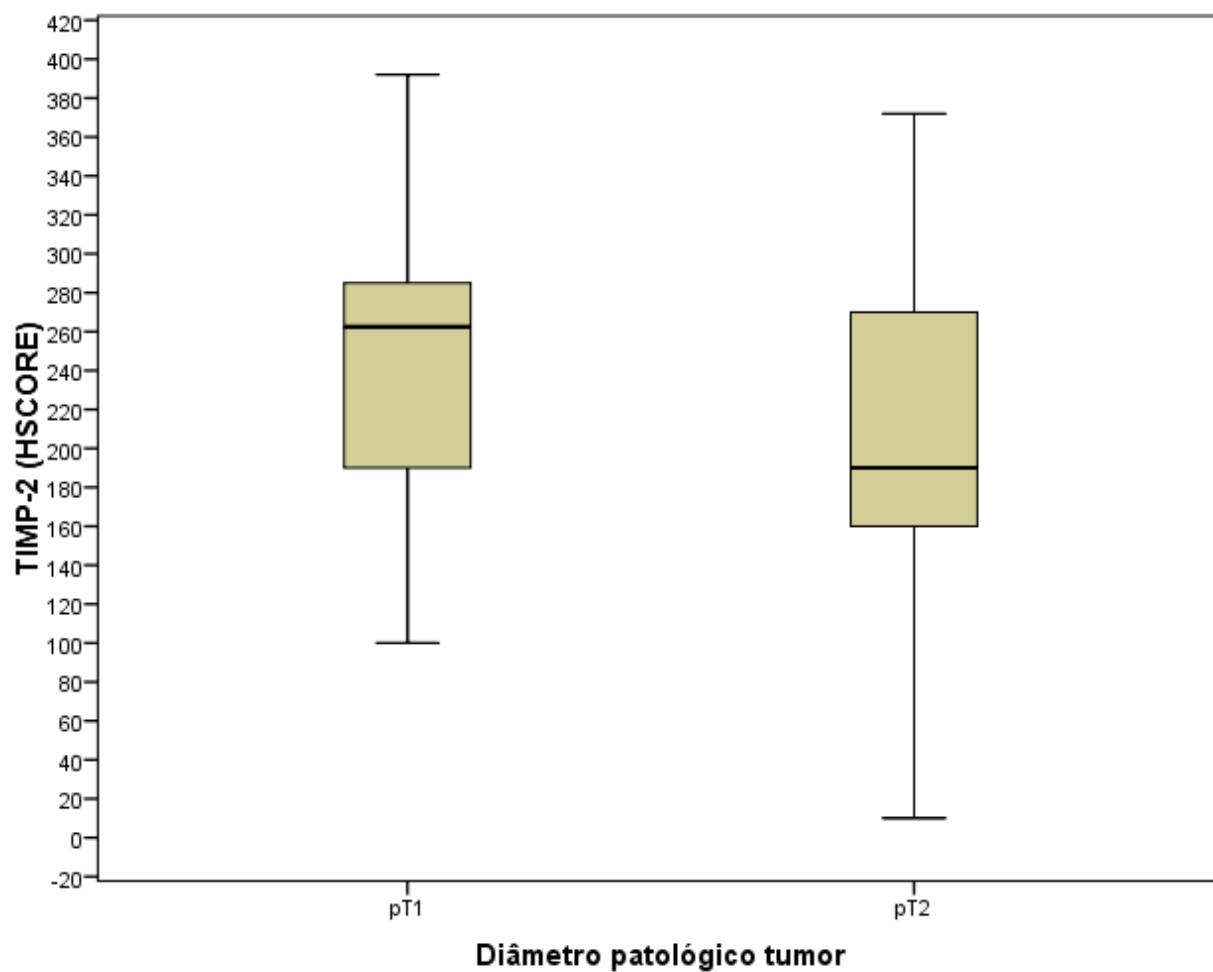
**Figura 9.** Correlação positiva significativa entre a imunorreatividade do VEGF e da MMP-9. O aumento da expressão do VEGF mostra uma correlação positiva significativa com o aumento da expressão da MMP-9. Coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s = 0,246$ ;  $p = 0,023$ ).



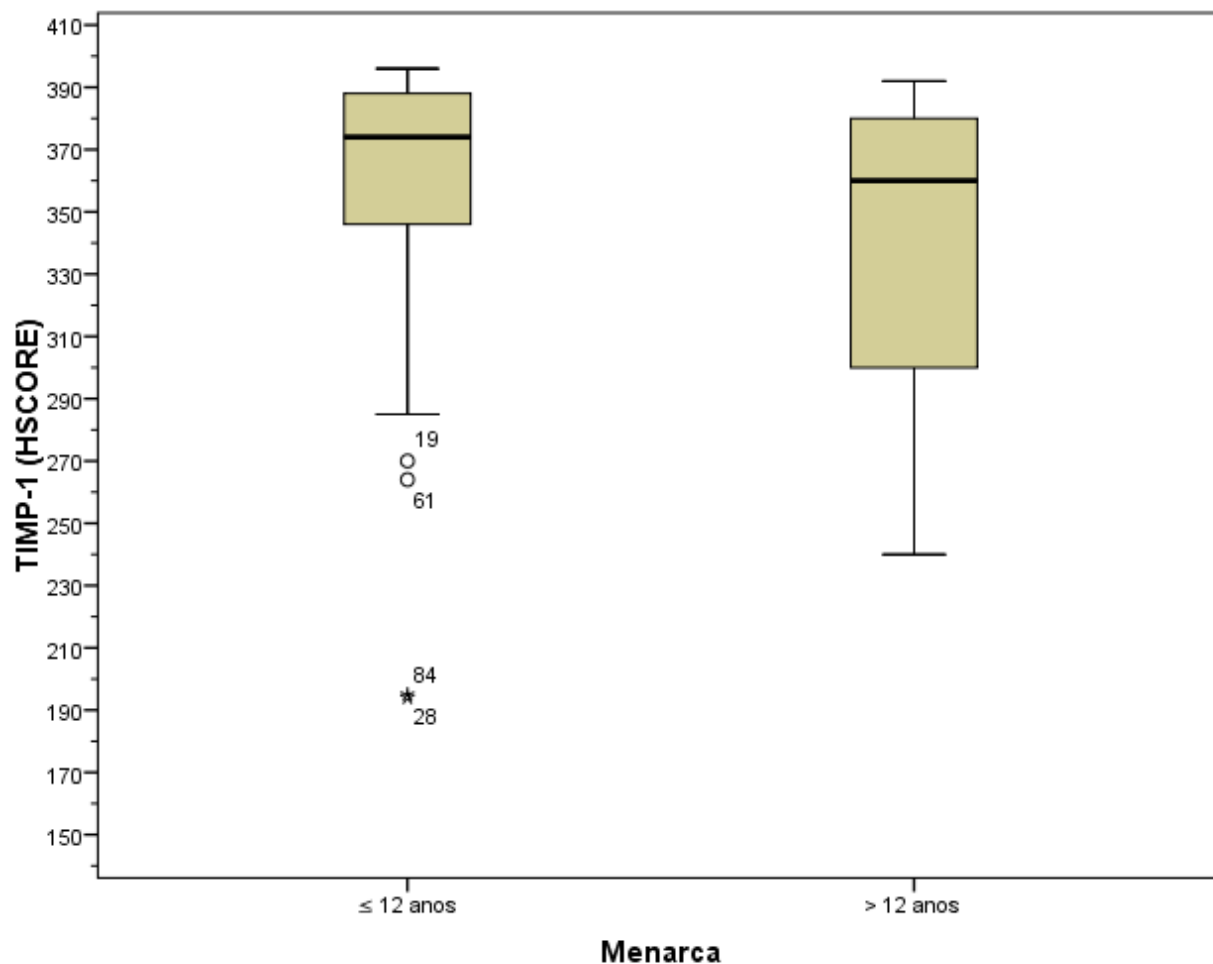
**Figura 10.** Correlação positiva entre a imunorreatividade da MMP-2 e da TIMP-2. O aumento da expressão da MMP-2 apresenta uma correlação positiva significativa com o aumento da expressão do TIMP-2. Coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s = 0,358$ ;  $p = 0,001$ ).



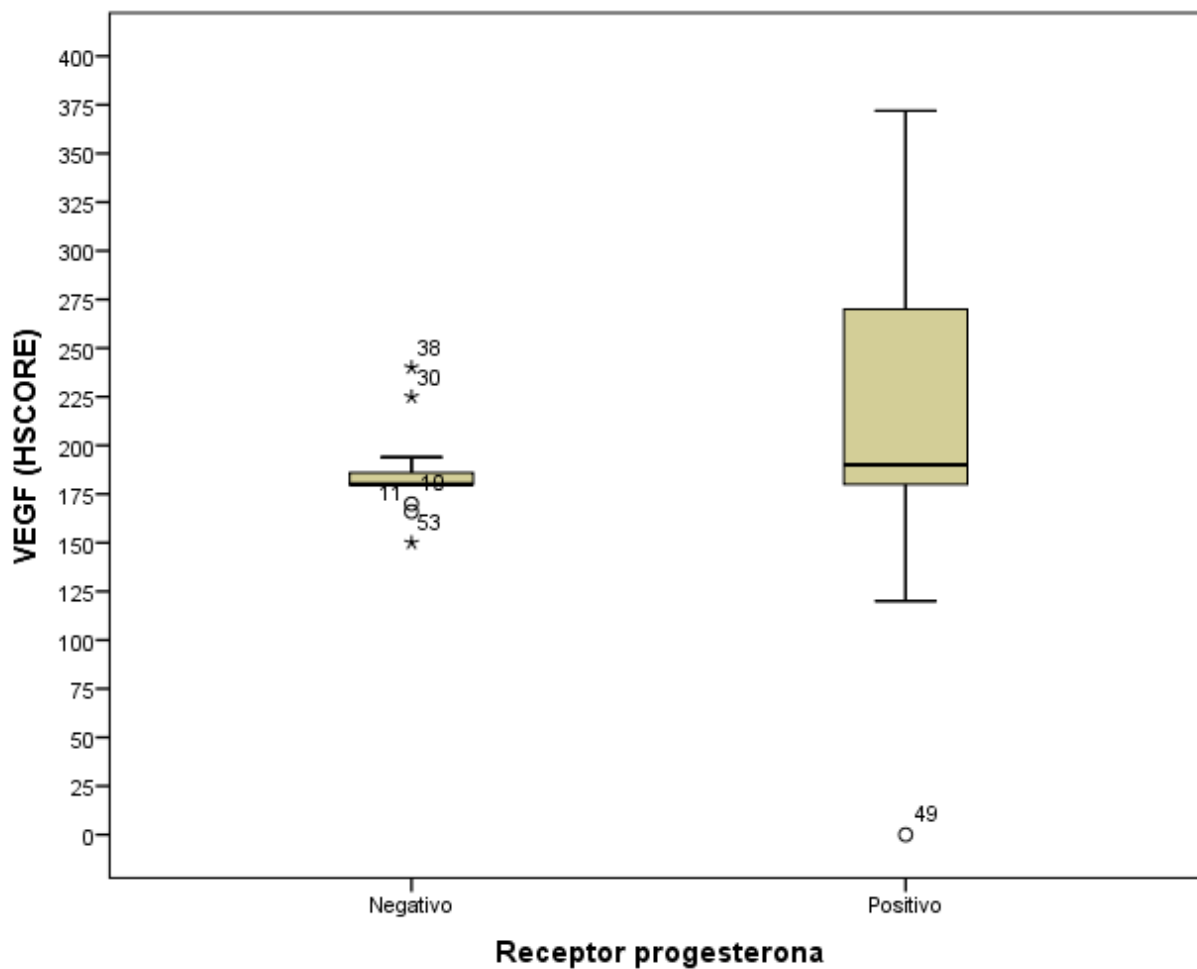
**Figura 11.** Comparação entre a expressão do TIMP-2 e a idade. A expressão do TIMP-2 é maior no grupo de pacientes com idade  $\geq 50$  anos, mostrando uma diferença significativa na expressão do TIMP-2 entre os dois grupos, calculada através do Teste U de Mann-Whitney : 264 (188-305),  $p= 0,002$ .



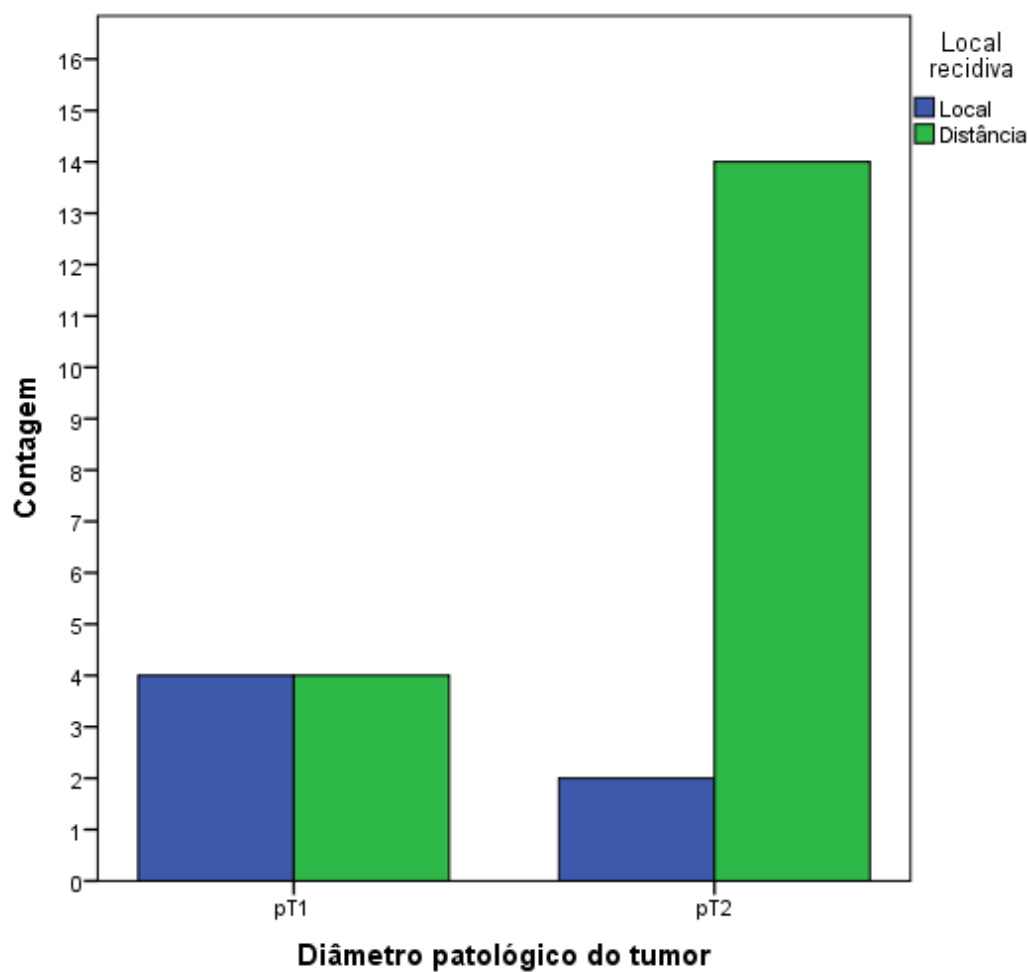
**Figura 12.** Comparação entre expressão do TMP-2 e o diâmetro tumoral patológico. A expressão do TMP-2 é maior no grupo de pacientes com diâmetro tumoral pT1. Existe uma diferença significativa na expressão do TIMP-2 entre os dois grupos, calculada através do Teste U de Mann-Whitney: 262(190-286),  $p= 0,016$ . pT1:  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$  cm.



**Figura 13.** Comparação entre expressão do TMP-1 e a idade da menarca. A expressão do TMP-1 é maior no grupo de pacientes com menarca  $\leq 12$  anos. Existe uma diferença significativa na expressão do TIMP-1 entre os dois grupos, calculada através do Teste U de Mann-Whitney: 374 (343-388),  $p= 0,038$ ).

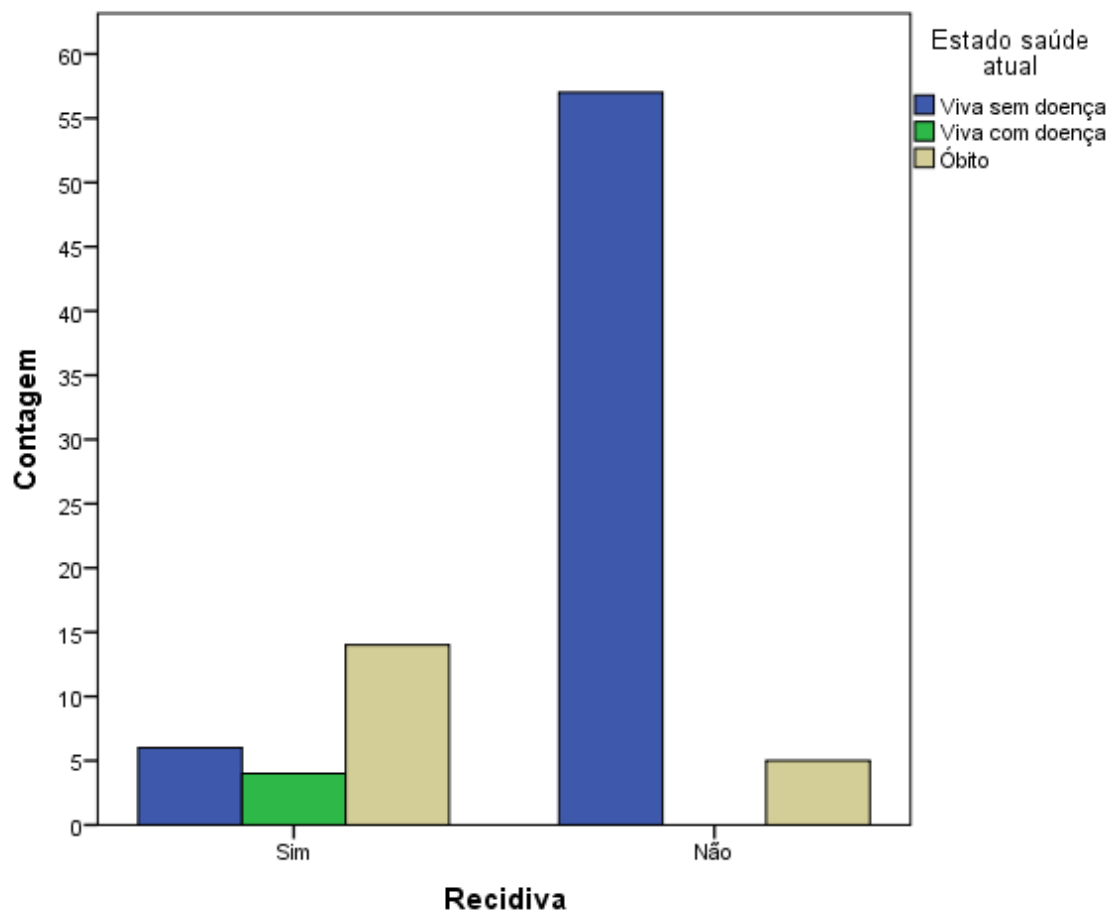


**Figura 14.** Comparação entre expressão do VEGF e o receptor de progesterona. A expressão de VEGF é maior no grupo de pacientes com receptor de progesterona positivo. Existe uma diferença significativa na expressão do VEGF entre os dois grupos, calculada através do Teste U de Mann-Whitney: 190(180-270),  $p= 0,045$ .

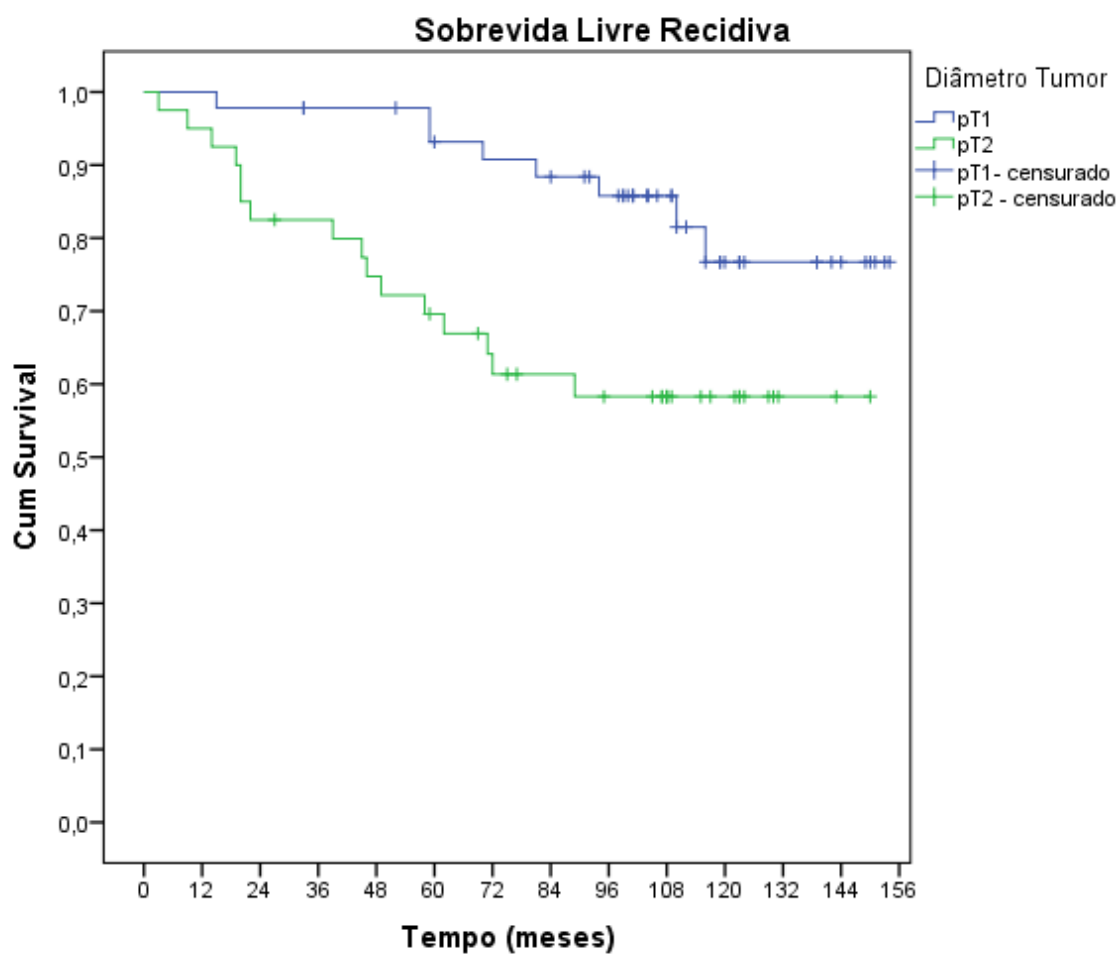


**Figura 15.** Associação positiva entre o diâmetro patológico do tumor e o local de recidiva da doença. Os tumores maiores (pT2) apresentaram mais recidiva a distância em relação a recidiva local ( $\chi^2$ : 4,00;  $p$ = 0,046). pT1:  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$  cm.

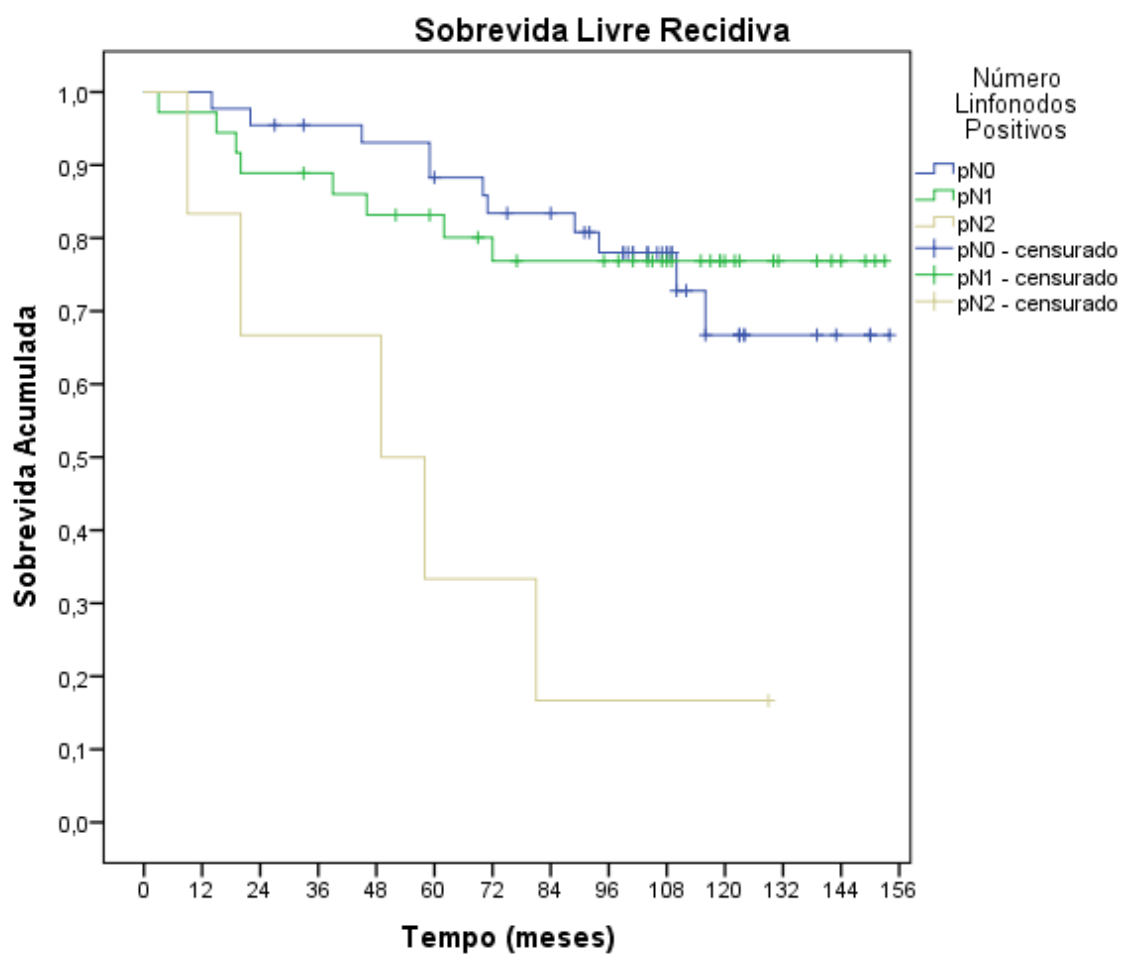




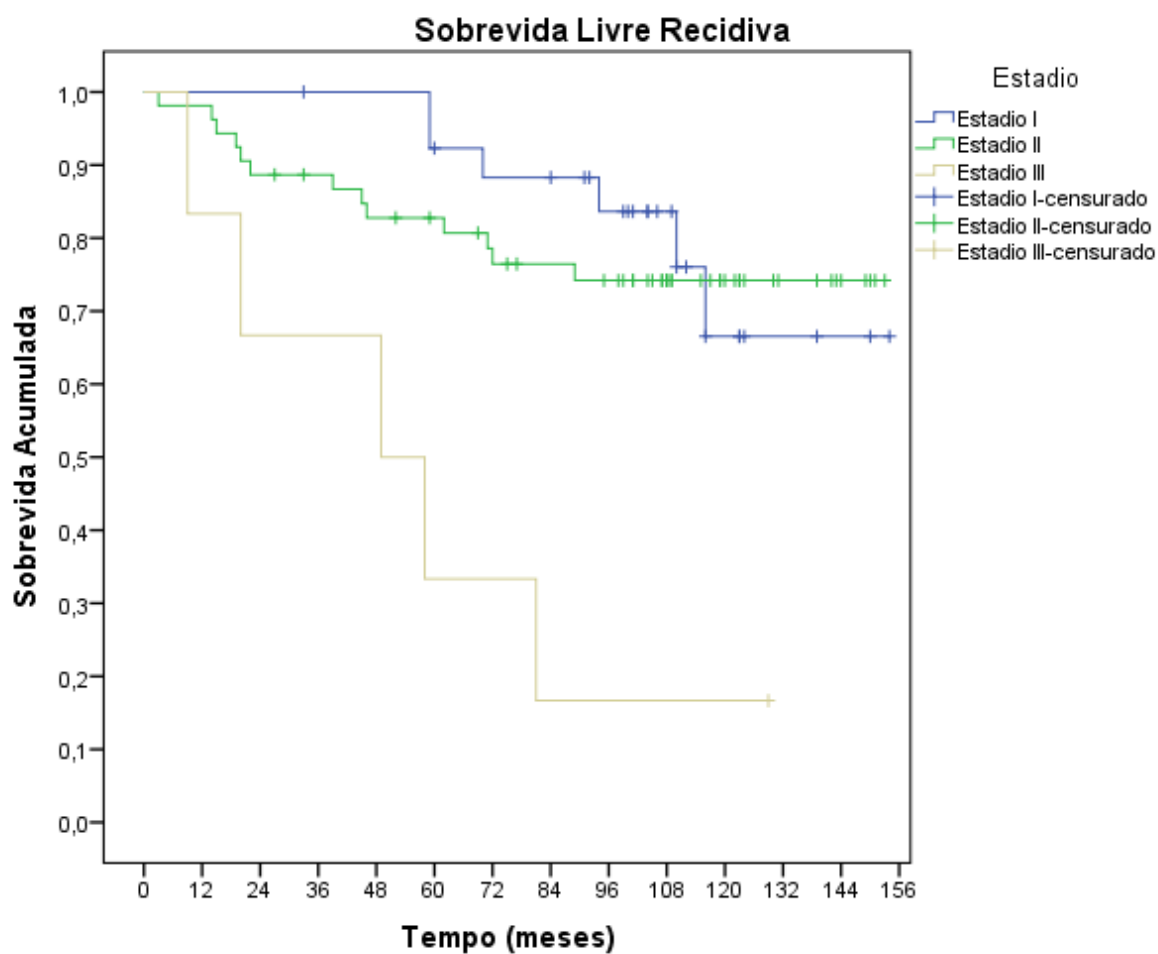
**Figura 16.** Associação estatisticamente significativa entre a recorrência da doença e o estado atual das pacientes. A maioria das pacientes que recidivaram tiveram óbito ( $\chi^2$ : 40,7;  $p= 0,000$ ).



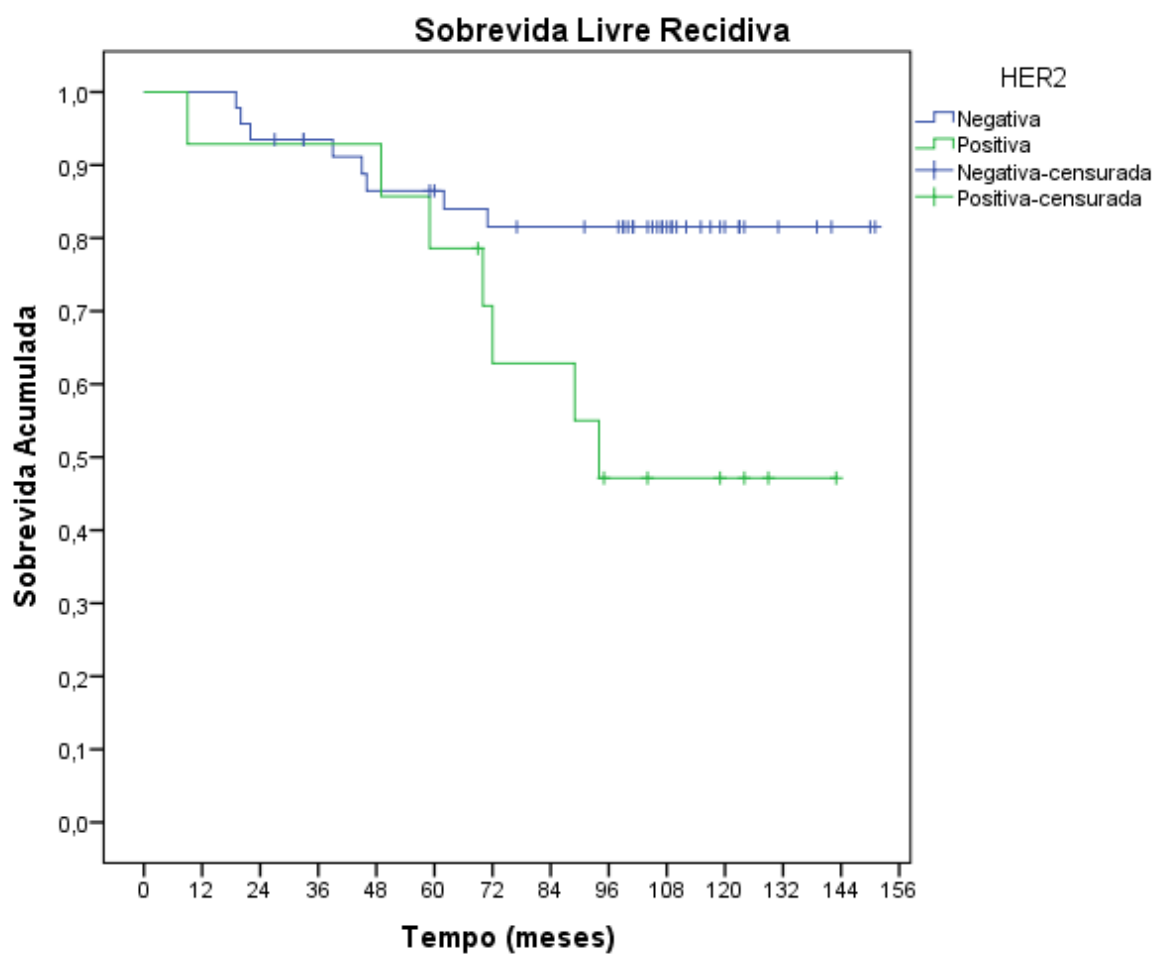
**Figura 17a.** Curva de Kaplan-Meier para recidiva de acordo com o diâmetro tumoral. Observa-se que a probabilidade de recidiva é significativamente maior nas pacientes com diâmetro tumoral pT2 comparadas com o pT1. Existe uma diferença entre os dois grupos, estudados no tempo, determinada pela estatística de log-rank,  $p=0,009$ . pT1:  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$  cm.



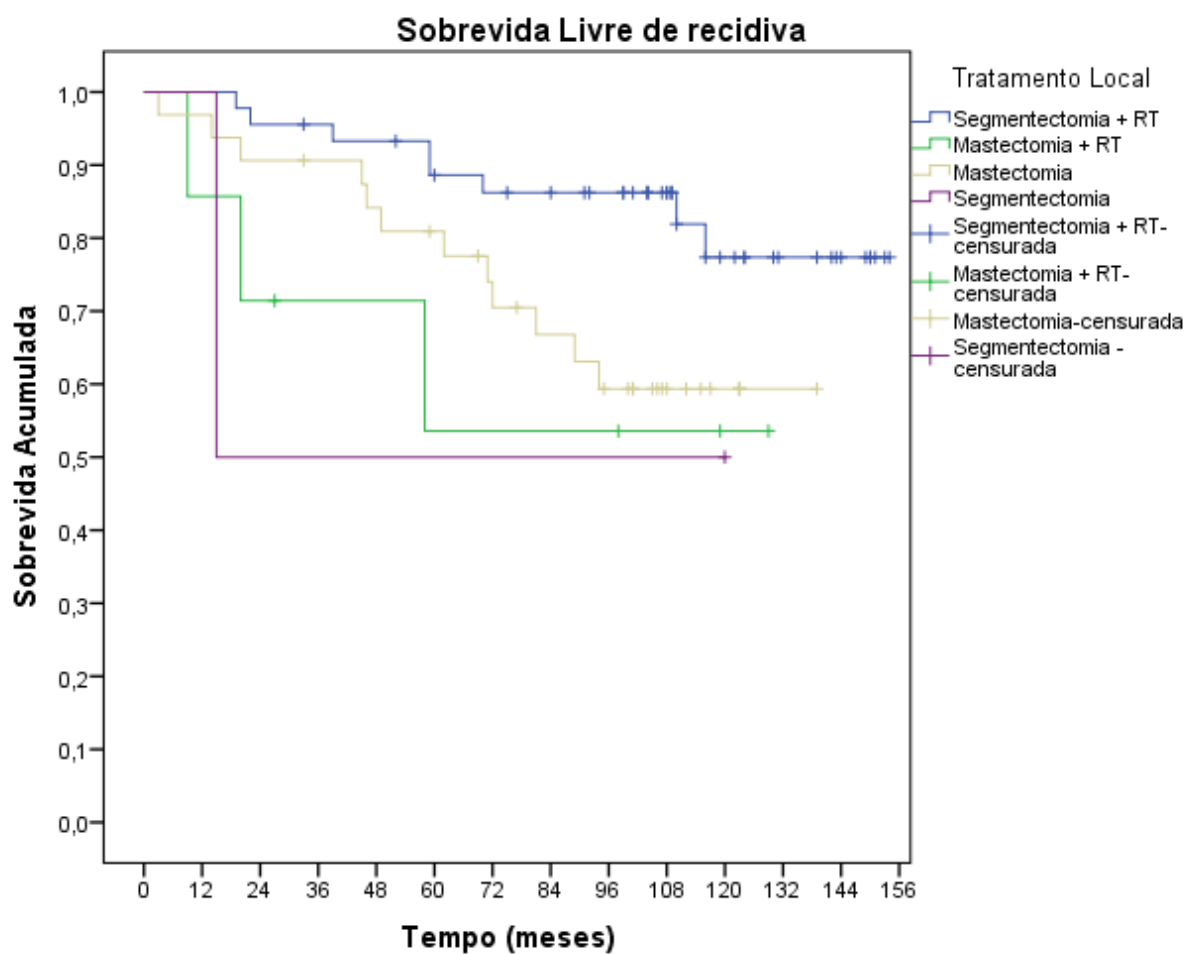
**Figura 17b.** Curva de Kaplan-Meier para recidiva, de acordo com o número de linfonodos metastáticos. Observa-se que a probabilidade de recidiva é significativamente maior nas pacientes com número de linfonodos metastáticos pN2 em relação ao pN0 e pN1. Existe uma diferença entre os grupos, estudados no tempo, determinada pela estatística de log-rank,  $p= 0,001$ . pN0: ausência de metástases; pN1: 1 – 3 linfonodos positivos; pN2: 4 – 9 linfonodos positivos.



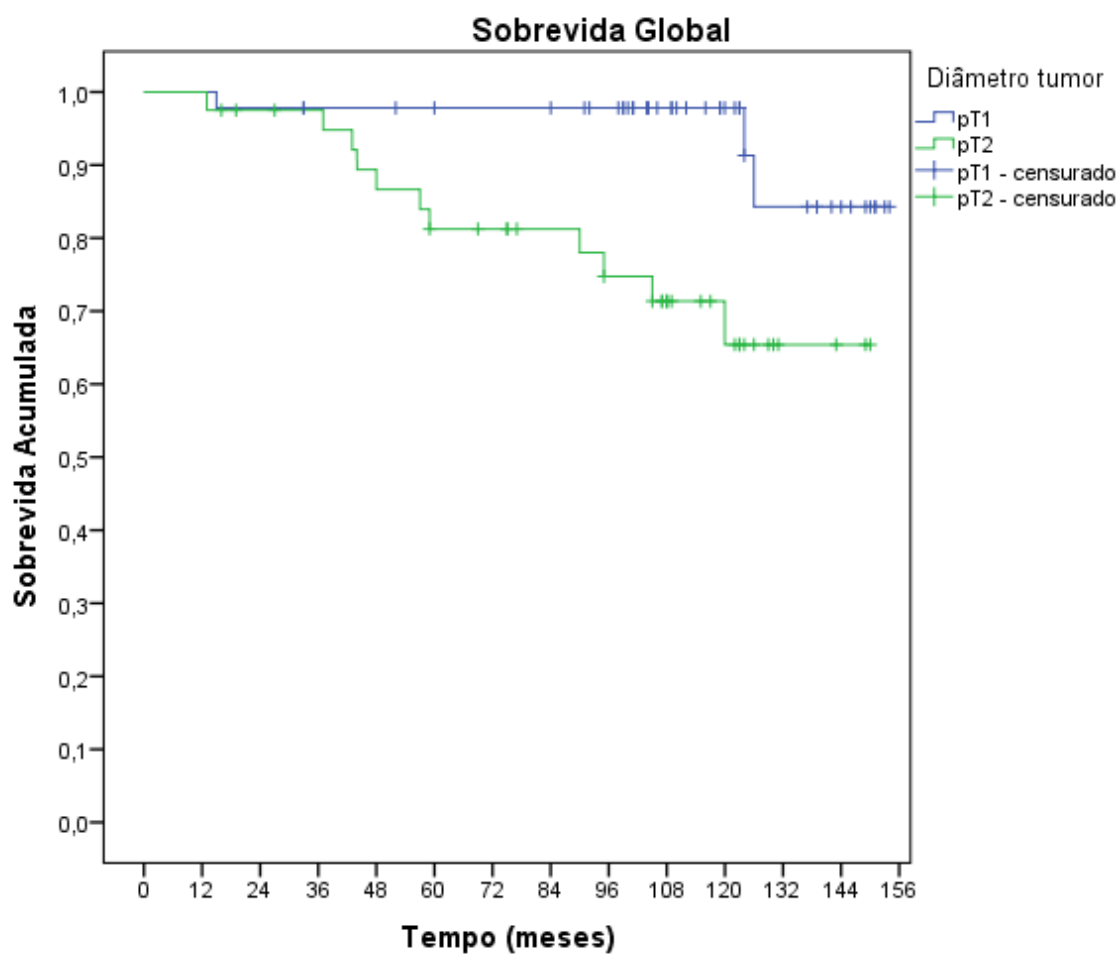
**Figura 17c.** Curva de Kaplan-Meier para recidiva, de acordo com o estágio da doença. Observa-se que a probabilidade de recidiva é significativamente maior nas pacientes do E III em relação ao E I e E II. Existe uma diferença entre os grupos, estudados no tempo, determinada pela estatística de log-rank,  $p= 0,001$ .



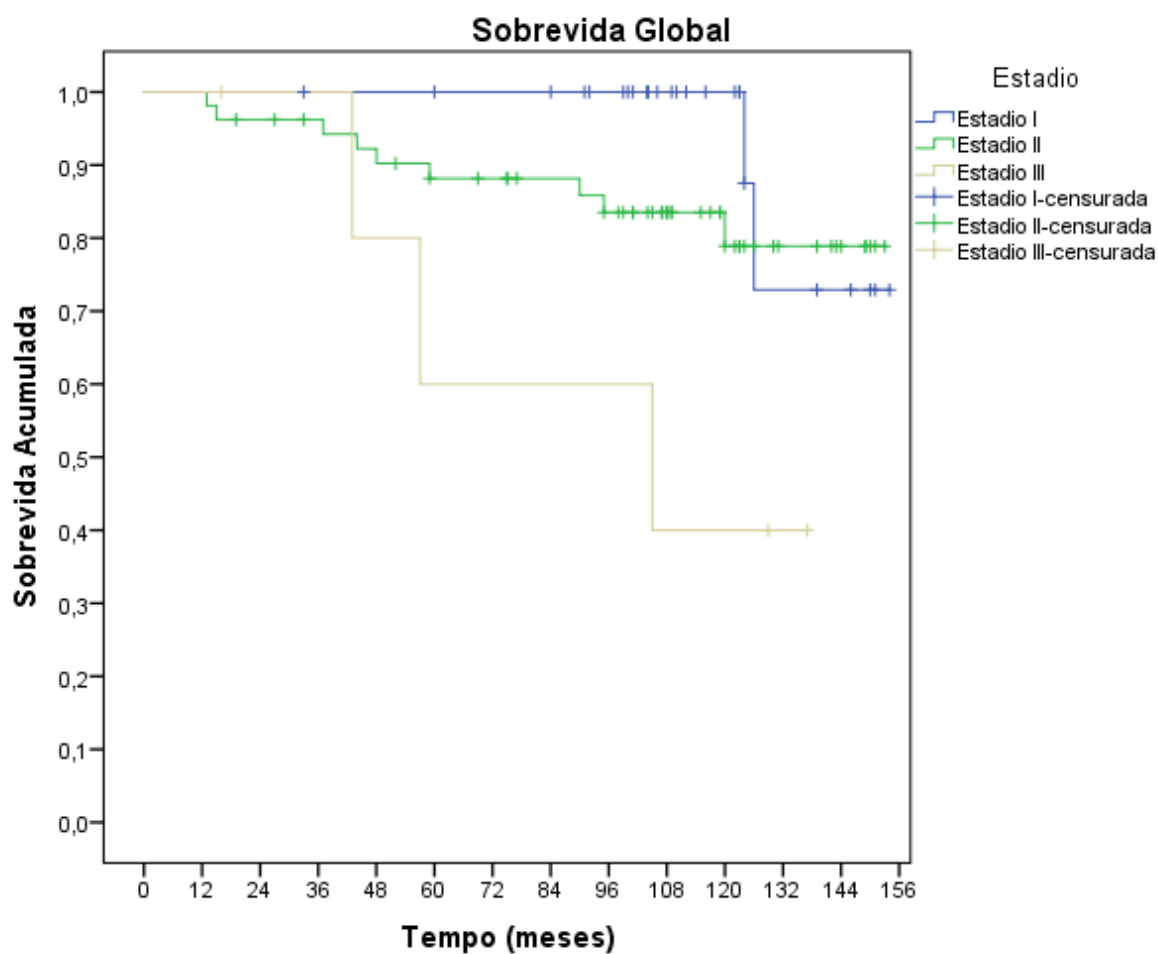
**Figura 17d.** Curva de Kaplan-Meier para recidiva, de acordo com a expressão do HER2. Observa-se que a probabilidade de recidiva é significativamente maior nas pacientes com superexpressão de HER2. Existe uma diferença entre os grupos, estudados no tempo, determinada pela estatística de log-rank,  $p= 0,028$ .



**Figura 17e.** Curva de Kaplan-Meier para recidiva, de acordo com o tratamento local. Observa-se que a probabilidade de recidiva é maior nas pacientes submetidas à mastectomia ou segmentectomia sem radioterapia adjuvante, entretanto o teste log-rank não foi significativo,  $p = 0,092$ .

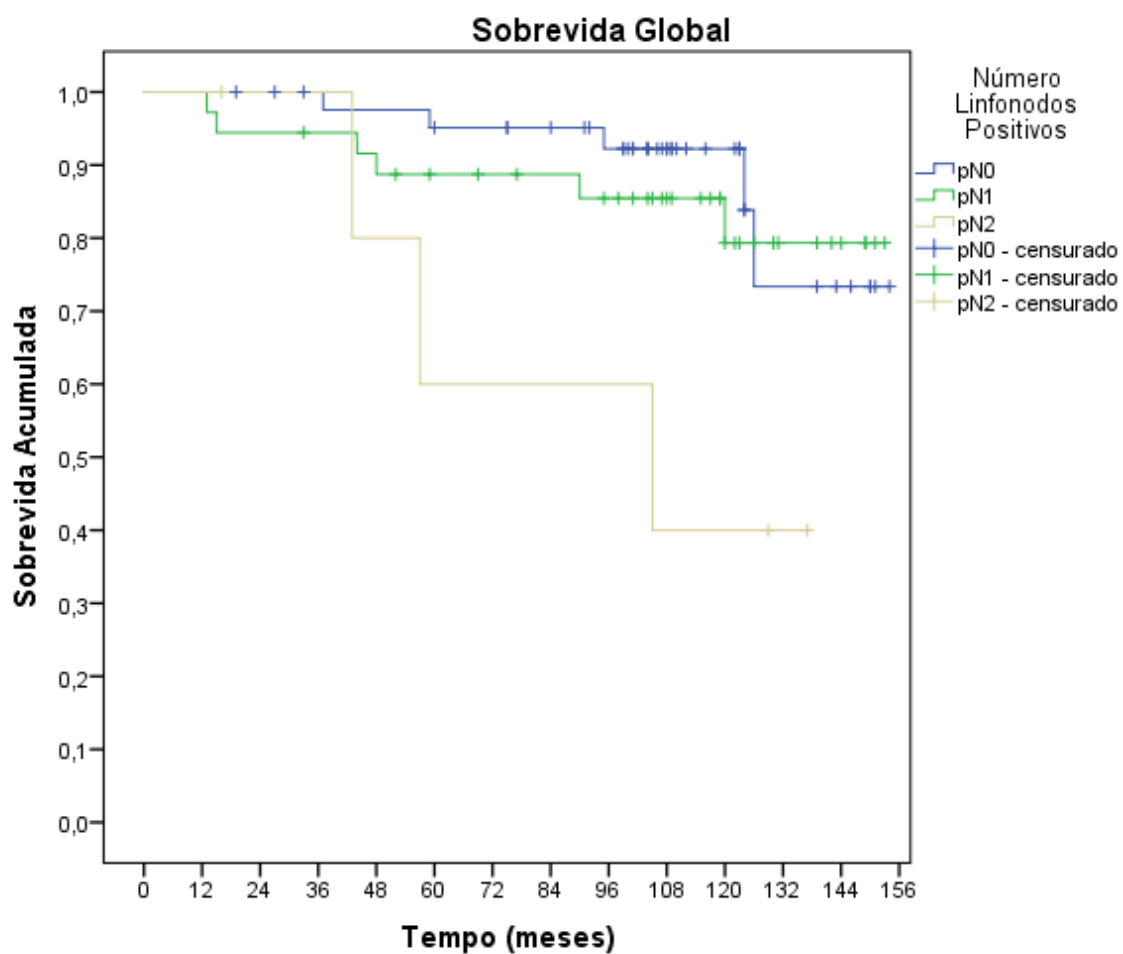


**Figura 18a.** Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global, de acordo com o diâmetro tumoral patológico. Observa-se que a probabilidade de óbito é significativamente maior nas pacientes com diâmetro tumoral pT2 comparadas com pT1. Existe uma diferença entre os grupos, estudados no tempo, determinada pela estatística de log-rank,  $p= 0,005$ . pT1:  $\leq 2,0$  cm; pT2:  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$  cm.

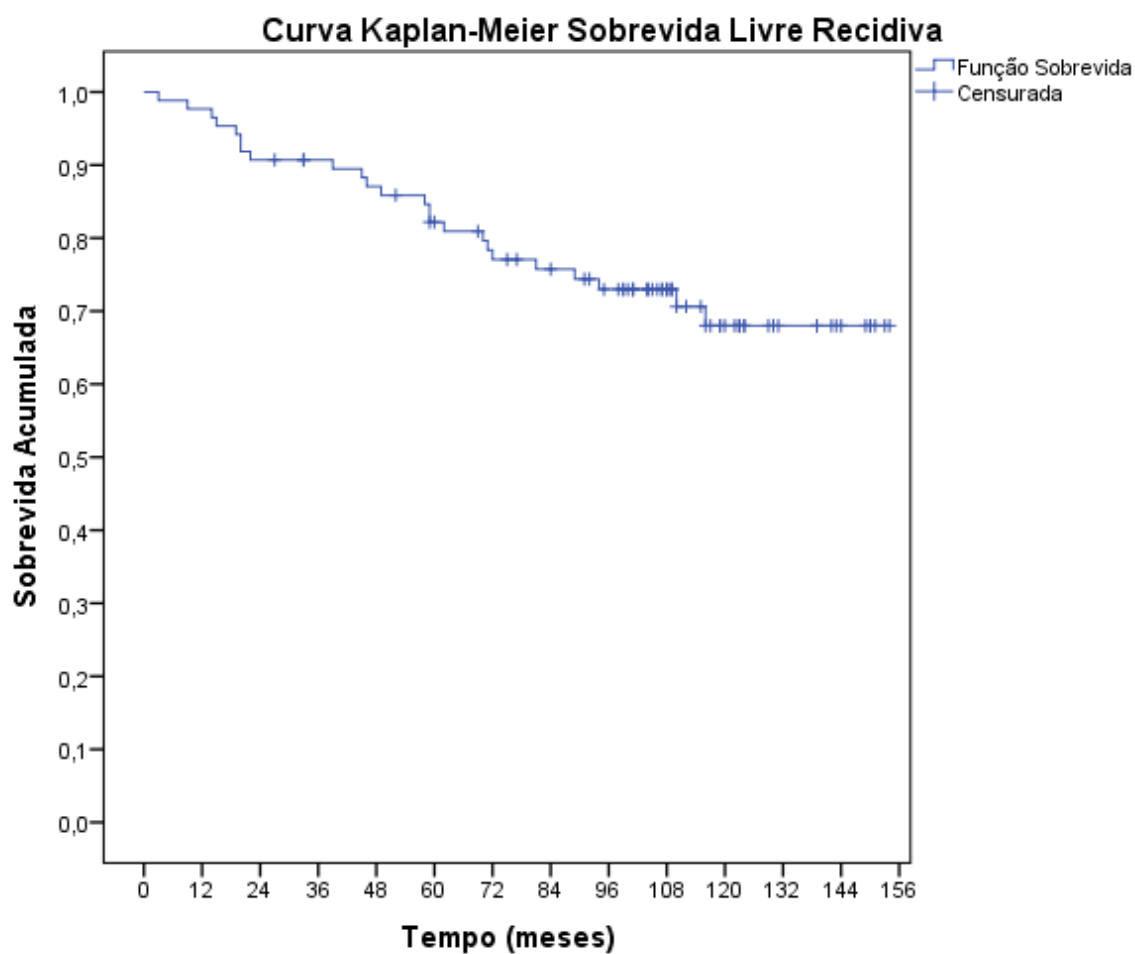


**Figura 18b.** Curva de Kaplan-Meier para óbito, de acordo com o estágio da doença. Observa-se que a probabilidade de óbito é significativamente maior nas pacientes E III, comparadas com EI e E II. Existe uma diferença entre os grupos, estudados no tempo, determinada pela estatística de log-rank,  $p = 0,033$ .

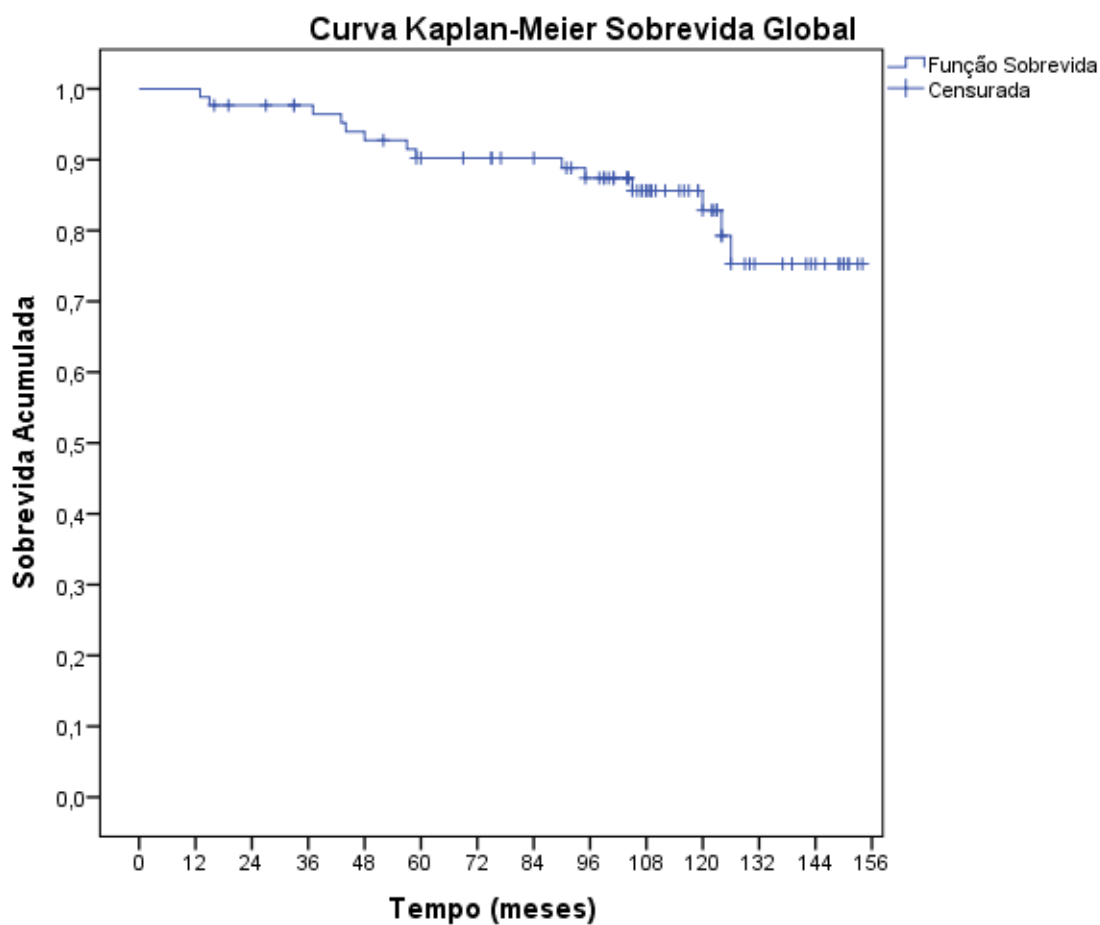




**Figura 18c.** Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global, de acordo com o número de linfonodos metastáticos. Observa-se que a probabilidade de óbito é maior nas pacientes classificadas como pN2, comparadas com pN0 e pN1, entretanto o teste log-rank não foi significativo,  $p = 0,054$ . pN0: ausência de metástases; pN1: 1 – 3 linfonodos positivos; pN2: 4 – 9 linfonodos positivos.



**Figura 19a.** A sobrevivência livre de recorrência, obtida através do estimador de Kaplan-Meier foi de 68,0% ao final do estudo e de 82,2% e 68,0% em 5 e 10 anos respectivamente. A estimativa do tempo médio de sobrevivência livre de doença foi de 123,2 meses com IC 95% (112,5; 133,9). Time = tempo livre de recidiva da doença. Cum Survival = proporção cumulativa de sobrevivência livre de doença.



**Figura 19b.** Curva de sobrevivência global das pacientes, com óbito como evento de interesse. A sobrevida global (SG) obtida pelo estimador de Kaplan–Meier foi de 75,3% ao final do período do estudo e de 90,2% e 82,9% em 5 e 10 anos, respectivamente. A estimativa do tempo médio de sobrevivência global é de 137,1 meses com IC95% (128,9; 145,3). Time = tempo de sobrevivência em meses; Cum Survival = proporção cumulativa de sobrevivência.

### Protocolo 1. Coleta de dados gerais

Nome:.....

Nº prontuário:.....

Idade, anos:.....

Peso, Kg:.....

Altura, cm:.....

#### HISTOPATOLOGIA DO LNS

CONGELAÇÃO LNS	1: positivo	2: negativo
PARAFINA LNS	1: positivo	2: negativo

#### HISTOPATOLOGIA DOS LINFONODOS AXILARES

Total de linfonodos axilares:.....	Nº Linfonodos axilares positivos:.....
------------------------------------	--

#### PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS DO TUMOR

Diâmetro, cm	.....	////////////////////	////////////////////	////////////////////	////////////////////
Invasão Vascular	1: sim	2: não	////////////////////	////////////////////	////////////////////
Grau histológico	1: G1	2: G2	3: G3	////////////////////	////////////////////
Tipo histológico	1: Ductal	2: Lobular	3: In Situ	////////////////////	////////////////////
Expressão Her-2	1: +/-neg.	2: ++/pos.	3: +++/pos.	4. indisponível	////////////////////
Expressão Ki-67	1: < 14%	2: ≥ 14%	3. indisponível	////////////////////	////////////////////
Expressão p53	1: neg.	2: fraco +	3: forte +	4. indisponível	////////////////////
Receptor estrogênio	1: < 1%	2: ≥ 1%	3: indisponível	////////////////////	////////////////////
Receptor progesterona	1: < 1%	2: ≥ 1%	3: indisponível	////////////////////	////////////////////

**Protocolo 2. Análise imunohistoquímica**

	Número Prontuário	Nome Paciente	Registro Patologia	VEGF	VEGF	MMP-2	MMP-2	MMP-9	MMP-9	TIMP-1	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-2
				exp.%	cor (+)	exp.%	cor (+)	exp.%	cor (+)	exp.%	cor (+)	exp.%	cor (+)
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
22													
23													
24													
25													

Expressão quantitativa (percentual): 0 a 100%

Expressão qualitativa (intensidade da coloração): 0: ausente; 1+: fraca positiva; 2+: média positiva; 3+: forte positiva.

Protocolo 3: Sobrevida/ MMPs e câncer de mama/projobim/HCPA,UFRGS				
Nome:				
Prontuário:				
Registro patologia:				
Data cirurgia:				
Tipo cirurgia: ( ) mastectomia radical ( ) segmentectomia				
Histopatológico:				
Imunohistoquímica				
Re	Rp	HER2	Ki67	p53
Tratamento adjuvante				
( ) quimioterapia ( ) radioterapia ( ) hormonioterapia ( ) nenhum				
Data recidiva:				
Local da recidiva:				
Tratamento cirúrgico recidiva				
( ) mastectomia ( ) ressecção da lesão ( ) nenhum ( ) outro: .....				
Tratamento adjuvante recidiva				
( ) quimioterapia ( ) radioterapia ( ) hormonioterapia ( ) clinico ( ) nenhum				
Histopatológico:				
Imunohistoquímica				
Re	Rp	HER2	Ki67	P53
Data óbito:				
Causa óbito:				



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 05-027

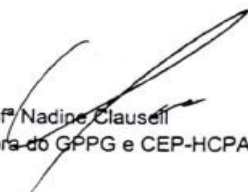
**Pesquisadores:**

NILTON LEITE XAVIER  
DIEGO DE MENDONCA UCHOA  
FLAVIO CABRERA JOBIM

**Título:** EXPRESSÃO DOS FATORES VEGF, MMP-2 E 9 TIMP-1 E 2, NO CÂNCER DA MAMA, E SUA CORRELAÇÃO COM O LINFONODO SENTINELA

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 31 de março de 2005.

  
Prof. Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA