

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

EXPRESSÃO DOS FATORES VEGF, MMP-2 E 9, TIMP-1 E 2 NO
CÂNCER DE MAMA: CORRELAÇÃO COM O LINFONODO
SENTINELA E PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS

Flavio Cabreira Jobim

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

Dissertação de Mestrado

2008

J62e

Jobim, Flavio Cabreira

Expressão dos fatores VEGF, MMP-2 e 9, TIMP-1 e 2 no câncer de mama : correlação com o linfonodo sentinela e parâmetros clinicopatológicos / Flavio Cabreira Jobim. – 2008.

91 p. : il. ; 30 cm.

Orientador: Gilberto Schwartzmann

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina : Ciências Médicas, Porto Alegre, RS, 2008

1. Medicina 2. Ginecologia 3. Mastologia 4. Neoplasia mamária 5. Câncer de mama 6. Biópsia 7. Linfonodo sentinela I. Schwartzmann, Gilberto II. Título.

CDU 618.19-006

Ficha catalográfica elaborada por
Maristela Eckhardt - CRB-10/737

Ao meu pai, Adão Gonçalves Jobim (06/10/1914 – 29/12/2005)

“A melhor herança que se deixa para um filho é o estudo, porque o conhecimento ninguém poderá roubar-lhe”.

Em especial as três mulheres da minha casa, Neicy Mara (Médica Dermatologista, esposa), Fabiana (Faby, acadêmica do Curso de Direito / UFSM) e Giovana (Gigi, nos primórdios de uma vida de muitos estudos) – sempre perdoaram as minhas ausências, quando distante ou mesmo em casa absorto nas minhas tarefas de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Nilton Leite Xavier, pelos ensinamentos na mastologia desde os tempos da Residência Médica no Hospital Presidente Vargas, pela amizade fraterna de todos estes anos, pelo incentivo para continuar estudando e principalmente por ter me apresentado ao Professor Gilberto.

Ao Professor Dr. Gilberto Schwartzmann, pela acolhida como orientador, estímulo na realização desta pesquisa e pelo auxílio fundamental nos trabalhos.

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

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

A Sra. Neiva Copetti, técnica do Laboratório de Pesquisa em Patologia do HCPA, pelo valoroso trabalho no aperfeiçoamento da técnica de IHQ e confecção das lâminas.

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.

RESUMO

Objetivo: Analisar a expressão dos fatores angiogênicos (VEGF, MMP-2 e MMP-9), e dos inibidores teciduais específicos de metaloproteinases da matriz (TIMP-1 e TIMP-2) em amostras de tumores, obtidas de um grupo de pacientes com câncer primário de mama, e avaliar a correlação destes com o linfonodo sentinela (LNS) e outros fatores clinicopatológicos selecionados, como idade, diâmetro do tumor, tipo histológico, grau histológico e invasão vascular.

Métodos: Amostras de tumores primários, de 88 mulheres com câncer de mama, fixados em formalina e emblocados em parafina foram analisados. A técnica de imunohistoquímica (IHQ), usando o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase, foi usada para medir a imunorreação dos antígenos nos tumores. A análise estatística para comparar a associação entre fatores estudados com os grupos LNS positivo e negativo e as demais variáveis selecionadas, foi realizada através de programa estatístico, segundo o teste t de Student, Qui-quadrado de Pearson, teste U de Mann-Whitney, teste H de Kruskal-Wallis e correlação de Spearman.

Resultados: Nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada entre a expressão do VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 e a presença de células tumorais no LNS. Entretanto, tumores com maior diâmetro ($p < 0,01$) e a presença de invasão vascular ($p < 0,01$) estavam positivamente correlacionados com a positividade do LNS. Uma correlação significativa entre alta expressão de VEGF ($p = 0,04$) e baixos níveis de TIMP-1 ($p = 0,02$) com o tipo histológico ductal também foi observada. Além disso, baixos níveis de TIMP-2 mostraram uma correlação significativa com a idade jovem (< 50 anos; $p = 0,01$) e tumores de maior diâmetro (2,0 a 5,0 cm; $p = 0,04$).

Conclusão: O LNS positivo foi correlacionado com tumores de maior diâmetro ($p < 0,01$) e com a presença de invasão vascular ($p < 0,01$). Altos níveis de VEGF e baixos níveis de TIMP-1 foram observados em pacientes com tumores do tipo ductal, enquanto altos níveis de TIMP-1 foram observados em tumores lobulares. A confirmação destes resultados necessita mais estudos.

Palavras-Chave: Neoplasias Mamárias; Neovascularização; Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular; Metaloproteinases da Matriz; Inibidores Teciduais de Metaloproteinases; Biópsia do Linfonodo Sentinela.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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	Comite de Ética em Pesquisa
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MS	Ministério da Saúde
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 imunohistoquímica
MB	membrana basal
MEC	matriz extracelular
bFGF	basic fibroblast growth factor; fator básico de crescimento de fibroblastos
IL	interleukin; interleucina
TNF α	tumor necrosis factor alpha; fator alfa de necrose tumoral
K-ras	proto-oncogene K-ras

HER-2	human epidermal growth factor receptor 2; receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano
p53	gene supressor da carcinogênese mamária
Ca ⁺²	íon cálcio
pH	potencial hidrogenoiônico - índice que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de um meio qualquer
VEGFR-3	vascular endothelial growth factor receptor 3; receptor tipo 3 do fator de crescimento endotelial vascular
Ki-67	anticorpo monoclonal que identifica antígenos em núcleos das células em fase proliferativa
HIF-1 α	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 β	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
T1	tumor com diâmetro menor ou igual a 2 cm
T2	tumor com diâmetro maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm
N2	linfonodos metastáticos axilares fusionados

M1	metástases à distância
G	grau
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay; enzima-imunoensaio (método de detecção imunológico que determina um antígeno quantitativamente e qualitativamente)
mRNA	messenger ribonucleic acid - ácido ribonucleico mensageiro
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
Σ	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
χ^2	chi-squared; qui-quadrado

r	correlação de Pearson
ρ	correlação de Spearman
$>$	maior que
$<$	menor que
\geq	maior ou igual
\leq	menor ou igual
α	alfa
β	beta
γ	gama
\emptyset	diâmetro tumoral

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICO DA REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1. Representação espacial da incidência de neoplasia da mama feminina estimadas para o ano 2008, segundo a Unidade da Federação.....	13
TABELA 1. Estimativas para o ano 2008 da incidência e do número de casos novos de câncer, em mulheres, segundo localização primária.....	14
GRÁFICO 1. Taxas brutas de mortalidade por 100.000 mulheres para os tumores mais freqüentes no Brasil, 1979 - 2000 e projeção para 2003.....	15
FIGURA 2. Fatores angiogênicos estimulando a neovascularização e liberação de fatores de crescimento parácrinos provocando crescimento do tumor.....	16
FIGURA 3. Ilustração esquemática da cascata metastática, mostrando as etapas seqüenciais envolvidas na disseminação hematogênica do tumor.....	18
TABELA 2. Fator de crescimento endotelial vascular.....	21
FIGURA 4. Ativação do fator de crescimento endotelial vascular.....	22
FIGURA 5. Estruturas esquemáticas dos domínios das MMPs e MT-MMPs.....	26
TABELA 3. Estudos por IHQ da expressão da MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e VEGF em carcinoma invasor de mama.....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Câncer de mama.....	11
1.1.1 Incidência e Mortalidade.....	11
1.1.2 Angiogênese tumoral e Metástases.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular.....	20
2.1.1 Expressão do fator de crescimento endotelial vascular no câncer de mama.....	22
2.2. Metaloproteinases da matriz e inibidores teciduais de metaloproteinases.....	24
2.2.1 Expressão das metaloproteinases da matriz e dos inibidores teciduais de metaloproteinases no câncer de mama.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1 Objetivo geral.....	38
4.2 Objetivos específicos.....	38
5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	39
6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	46
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	66
ANEXO I – TABELAS.....	68
ANEXO II – FIGURAS.....	73
ANEXO III – PROTOCOLOS DE COLETAS DE DADOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

1.1.1 Incidência e Mortalidade

O câncer de mama é provavelmente o mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta idade sua incidência cresce rápida e progressivamente. Este tipo de câncer representa nos países ocidentais uma das principais causas de morte entre as mulheres. 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 de mais de 50 anos [1, 2].

Nos últimos anos foram realizados inúmeros esforços no sentido de validar novas estratégias para o diagnóstico e tratamento do câncer de mama, proporcionando resultados menos traumáticos e mais efetivos para as pacientes. Os ensaios clínicos confirmaram que os métodos cirúrgicos radicais mutiladores e os conservadores são equivalentes em prognóstico e sobrevida global [3].

A introdução da técnica cirúrgica do linfonodo sentinela (LNS) para o câncer de mama, em 1994 por Giuliano et al [4], trouxe uma esperança ainda mais conservadora quanto à dissecação axilar tradicional e, por outro lado, incentivou a procura pelos casos de câncer sem metástase nos linfonodos axilares, em que essa

técnica e outras menos invasivas podem ser aplicadas, evitando as complicações da linfadenectomia axilar. A descoberta de novos agentes quimioterápicos, o uso de bloqueadores hormonais e a introdução da terapia alvo também trouxeram boas perspectivas para o tratamento da doença [5-8].

Apesar dos avanços relacionados aos métodos propedêuticos, diagnóstico precoce e formas de tratamento, a incidência e a taxa de mortalidade do câncer de mama continuam alarmantes em nosso meio. A complexidade e a frustração no câncer de mama estão refletidas no fato que pacientes com características clínicas e patológicas similares podem apresentar desfechos distintos e variada resposta terapêutica. Estudos mostram que 20% das mulheres com diagnóstico precoce de tumores entre 0,5 - 1,0 cm de diâmetro já apresentam metástases em linfonodos axilares e 25 - 30% das pacientes com linfonodos axilares negativos, classificadas como de bom prognóstico, desenvolvem recorrência da doença. Por outro lado, uma proporção semelhante de pacientes que apresentam linfonodos axilares positivos, alocadas em grupos de pior prognóstico, nunca desenvolvem metástases [9, 10].

Na estatística mundial, o câncer de mama aparece como o segundo tipo de neoplasia mais freqüente e o primeiro entre as mulheres. Dados do Instituto Nacional de Câncer [11] estimam para o Brasil, no ano de 2008, para o sexo feminino, 234.870 novos casos de câncer. Sendo que o câncer de mama será o mais incidente com 49.400 novos casos, seguido do câncer de colo uterino com 18.600 novos casos. A incidência de câncer de mama esperada no Brasil é de 50,71/100 mil mulheres. Na Região Sul esta estimativa é de 67/100 mil mulheres e no Rio Grande do Sul de 85,5/100 mil, com 4.880 casos novos (Figura1 e Tabela1).

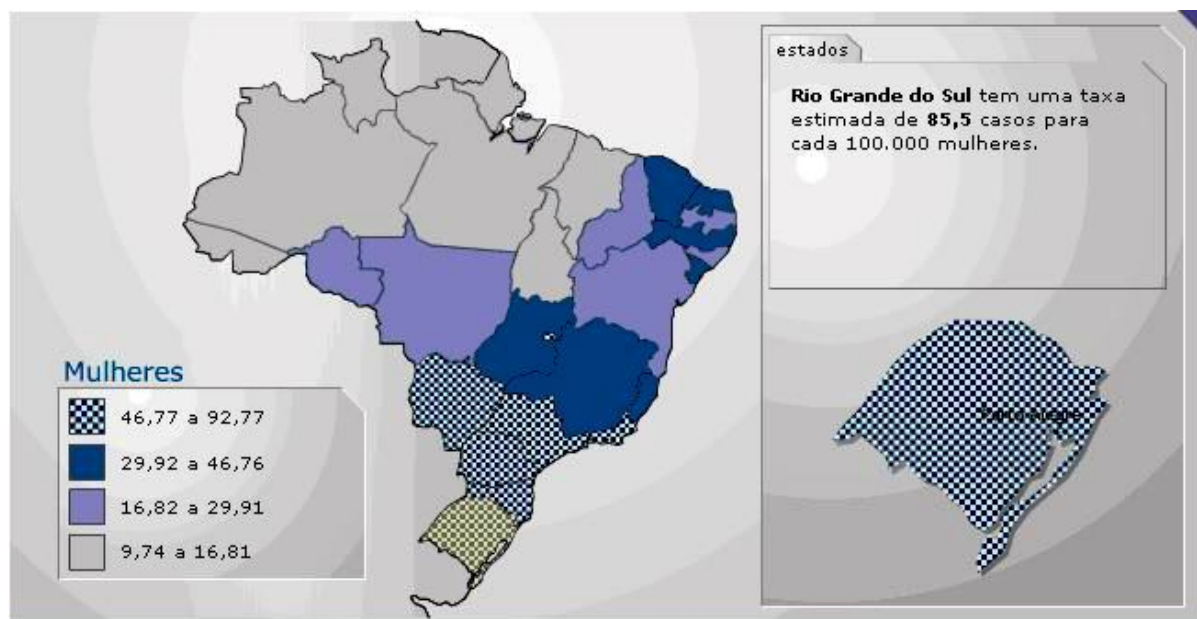


Figura 1. Representação espacial das taxas brutas de incidência da neoplasia maligna da mama feminina por 100.000 mulheres, estimadas para o ano 2008, segundo a Unidade da Federação.

Fonte: MS/ INCA. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>>.

Tabela 1. Estimativas para o ano 2008 das taxas brutas de incidência por 100.000 e do número de casos novos de câncer, em mulheres, segundo localização primária.

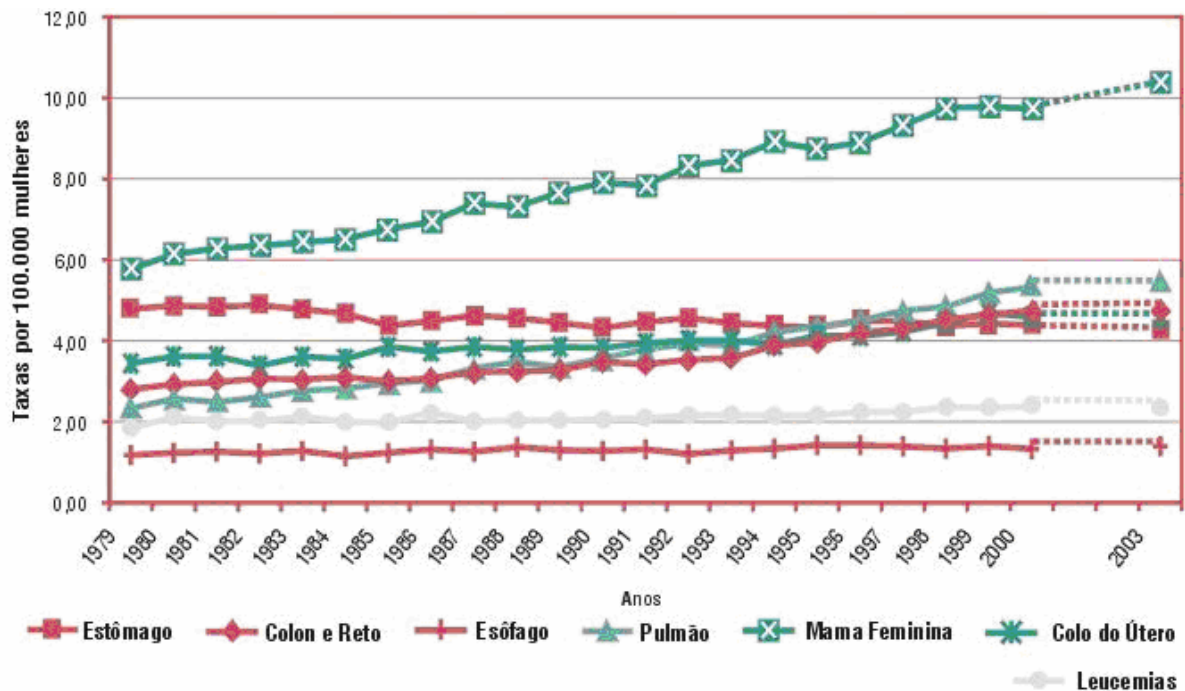
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	RS		Porto Alegre	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	4.880	85,50	950	119,72
Colo do Útero	1.610	28,17	230	29,51
Cólon e Reto	1.610	28,22	360	44,97
Traquéia, Brônquio e Pulmão	1.220	21,42	230	28,74
Estômago	580	10,23	100	12,36
Leucemias	350	6,23	60	7,02
Cavidade Oral	230	3,96	60	7,01
Pele Melanoma	420	7,29	80	10,12
Esôfago	430	7,58	40	5,47
Outras Localizações	6.970	122,13	1.720	215,94
Subtotal	18.300	320,66	3.830	480,85
Pele não Melanoma	4.920	86,22	530	67,04
Todas as Neoplasias	23.220	406,89	4.360	546,84

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: MS/INCA. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>>.

A taxa de mortalidade, no Brasil, é estimada em 10,40/100 mil mulheres e, no ano de 2003 foi responsável por 9.335 óbitos de mulheres, sendo 980 destes ocorridos no Rio Grande do Sul. Estima-se que a sobrevida média geral cumulativa após cinco anos, para mulheres com câncer de mama, seja de 65% nos países desenvolvidos e 56% nos países em desenvolvimento (Gráfico 1) [11].

Gráfico 1. Taxas brutas de mortalidade por 100.000 mulheres para os tumores mais freqüentes no Brasil, 1979 - 2000 e projeção para 2003.



Fonte: MS/ INCA.

Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>>.

1.1.2 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 [12, 13].

Segundo Folkman, 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 a 2 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 2) [14-16].

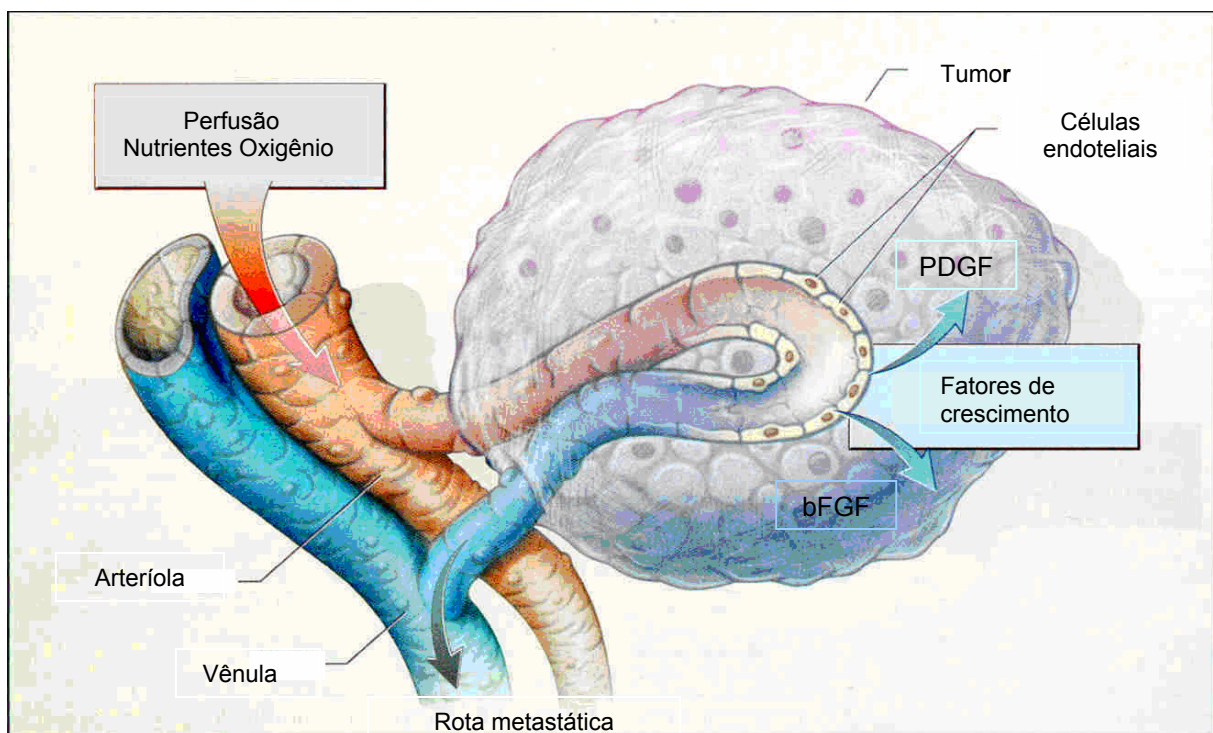


Figure 2. A Neovascularização, provocada pelos fatores angiogênicos, aumenta o aporte de oxigênio e nutrientes para o tumor, favorecendo o seu crescimento. Além disso, as células tumorais também são estimuladas pelos seguintes fatores de crescimento parácrinos, produzidos pelas células endoteliais capilares: Fator básico 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, 1995; 333(26):1757-63 [17]

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 (MB) adjacente, que funciona como barreira para a migração das células tumorais; invasão do tecido conjuntivo adjacente; migração destas células através da matriz extracelular (MEC); 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 sitio a distância, dependente da angiogênese para crescer (Figura 3) [12, 18].

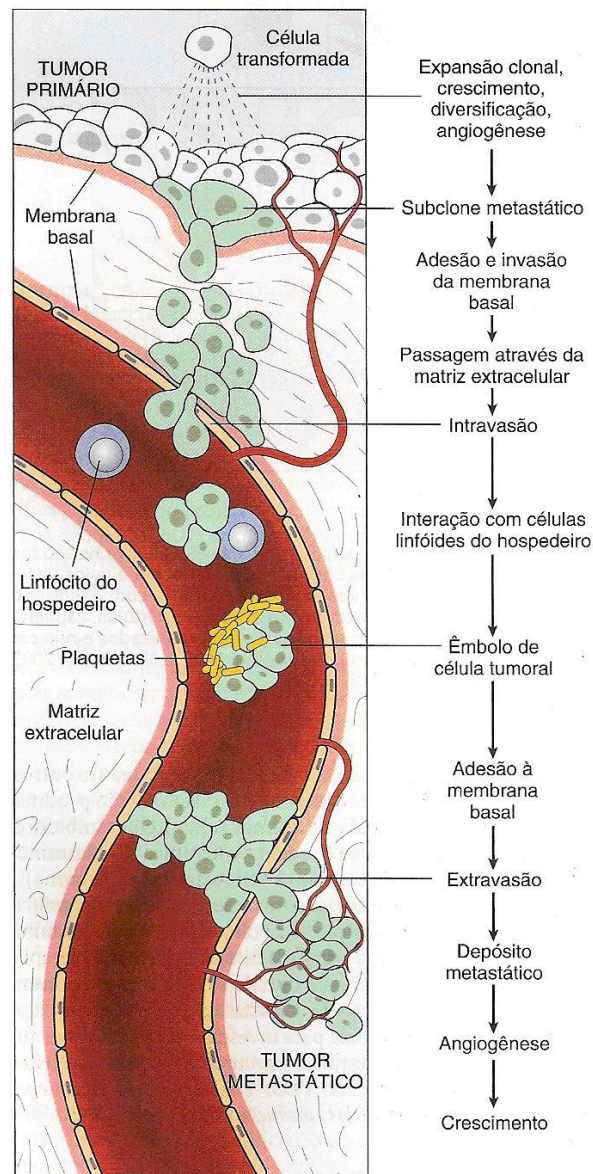


Figura 3. Ilustração esquemática da cascata metastática, mostrando as etapas sequenciais envolvidas na disseminação hematogênica de um tumor.

Fonte: Robbins e Cotran, Patologia – Bases Patológicas das Doenças 7ª Edição pág. 324

A chave para o fenótipo angiogênico envolve uma troca local no equilíbrio entre 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 [19, 20].

Algumas proteínas angiogênicas são bem conhecidas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator alfa de necrose tumoral (TNF α), interleucina 8 (IL-8) e as metaloproteinases da matriz (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 [19-21].

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 metastização das células neoplásicas. Para muitos tumores a densidade vascular pode estabelecer um indicador de potencial metastático e pobre sobrevida [15, 16, 22].

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fator de crescimento endotelial vascular

O VEGF é um potente e seletivo fator mitogênico para o endotélio, que pode induzir rápida e completa resposta angiogênica. Ele aumenta a permeabilidade vascular e promove a formação de novos vasos, facilitando o crescimento e a metastização tumoral. É produzido e secretado por uma série de células normais e têm expressão marcada nas células neoplásicas do aparelho respiratório, digestivo e no câncer de mama. Pertence a uma família das glicoproteínas (VEGF-A, -B, -C e -D). O mais estudado e conhecido é o VEGF-A (aqui chamado de VEGF), 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). O VEGF-B liga-se ao VEGFR-1, podendo facilitar a mobilização das células-tronco endoteliais e tem papel importante na inflamação [23, 24].

O VEGF é um potente indutor da formação de vasos sanguíneos no desenvolvimento inicial (vasculogênese), e tem um papel central no crescimento de novos vasos sanguíneos em adultos (angiogênese). Atua quase exclusivamente no endotélio, onde se encontra o seu maior receptor o VEGFR-2. Além da 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 α e oncogenes como o K-ras e o Her-2. A clivagem das proteínas extracelulares pelas MMPs também libera o VEGF e a endostatina pela

clivagem do colágeno IV, sendo este um inibidor da angiogênese. O gene p53 é conhecido como modulador da neovascularização por regular a expressão do VEGF [20, 23, 24]. Estas informações estão resumidamente apresentadas na tabela 2 e na figura 4.

Tabela 2. Fator de crescimento endotelial vascular

Proteínas	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
Produção	Expressa em baixos níveis numa variedade de tecidos adultos e em níveis maiores em alguns locais como nos podócitos do glomérulo e miócitos cardíacos
Agentes indutores	HIF-1 α K-ras TGF- β PDGF
Receptores	VGFER-1 VGEFR-2 (células endoteliais) VGEFR-3 (células endoteliais linfáticas) Mutações nos receptores resultam na falta de vasculogênese
Funções	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 α); Proto-oncogene K-ras (K-ras); Fator beta de transformação do crescimento (TGF- β); Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); Receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VGFER).

Fonte: Adaptado de Robbins e Cotran, Patologia – Bases Patológicas das Doenças 7^a Edição pág. 114

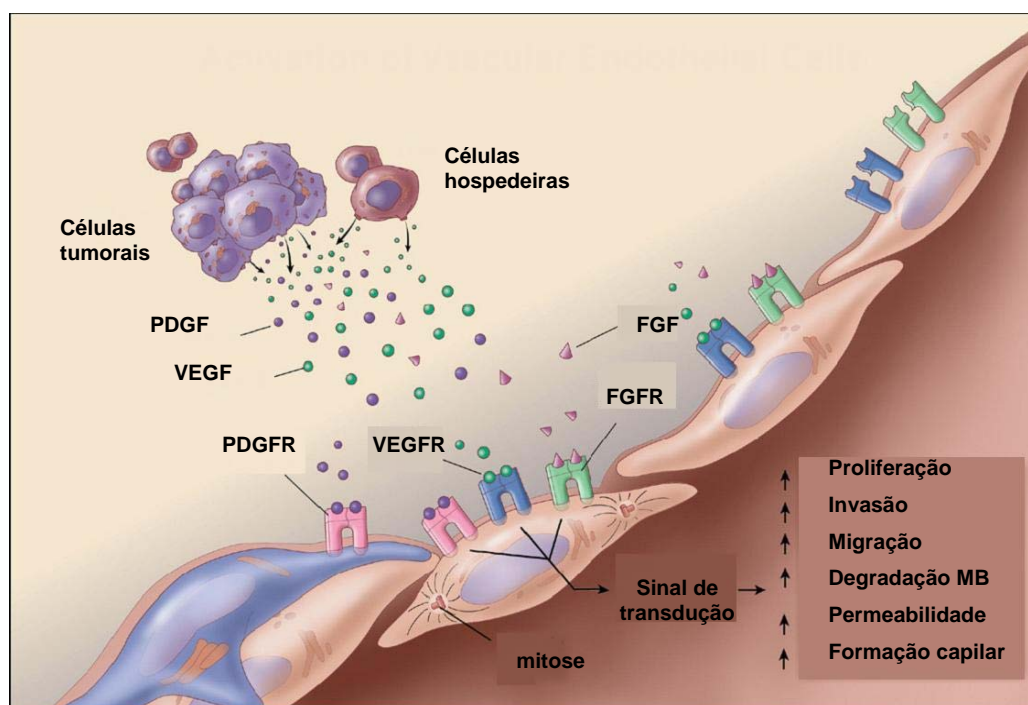


Figura 4. Ativação do fator de crescimento endotelial vascular pelos agentes indutores e ligação com o seu receptor. Fonte: Disponível em: <<http://www.cancerphysicians.org.uk>>.

2.1.1 Expressão do fator de crescimento endotelial vascular no câncer de mama

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.

Mais de 25 peptídeos angiogênicos foram descobertos e seqüenciados, porém somente uma minoria teve sua expressão testada em tumores humanos. Nathalia Locopo [20] analisou o significado clínico dos fatores angiogênicos em câncer de mama. O VEGF estava altamente expressado em câncer de mama. Encontrou a 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 Giampietro Gasparini [25], 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 Jianhua Zhao [26], envolvendo 59 pacientes submetidas à mastectomia radical e Linfadenectomia axilar completa, com um segmento médio de 48,6 meses, avaliou 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 mostra que elevados níveis de VEGF pré-operatório esteve associado com pior sobrevida livre de doença ($p = 0,02$).

Li Hao et al [27] analisou por imunohistoquímica a expressão do VEGF e da MMP-9 em uma série de 76 pacientes com neoplasias mamárias, demonstrando a correlação com dados clinicopatológicos. A avaliação axilar apresentou linfonodos

axilares positivos em 41(53,9%). Encontrou altas taxas de expressão de VEGF em 52(68%) e MMP-9 em 48(63%). A hiperexpressão de 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 ($p= 0,03$). Concluiu que estes marcadores podem determinar um valor prognóstico no linfonodo axilar.

KIM, HJ et al [28] avaliaram 84 amostras de tumores de mama, sendo 21 carcinomas in situ, e 63 carcinomas invasivos ≤ 5 cm. O VEGF foi analisado por imunohistoquímica 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.

2.2 Metaloproteinases da matriz e inibidores teciduais de metaloproteinases

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) 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, onde mantém um balanço com seus inibidores teciduais. Também estão envolvidas em condições patológicas onde existe a ruptura deste

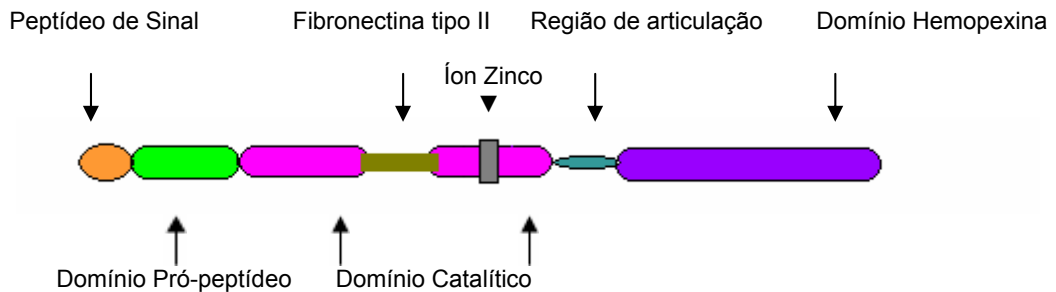
equilíbrio, provocando doenças como artrites, retinopatia diabética, psoríase e câncer [29, 30].

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 (PDGF, EGF), citocinas (IL-1, TNF α), fagocitose e estresse físico. Todas as MMPs requerem um pH neutro e Ca⁺² para poderem atuar e são inibidas pelos TIMPs. Estes, na maioria, são produzidos pelas células mesenquimatosas, prevenindo a ação descontrolada das MMPs. Outros fatores como o fator beta de transformação do crescimento (TGF β), o interferon γ , os hormônios esteróides, incluindo os glicocorticóides e os retinóides também bloqueiam a expressão das MMPs [31, 32].

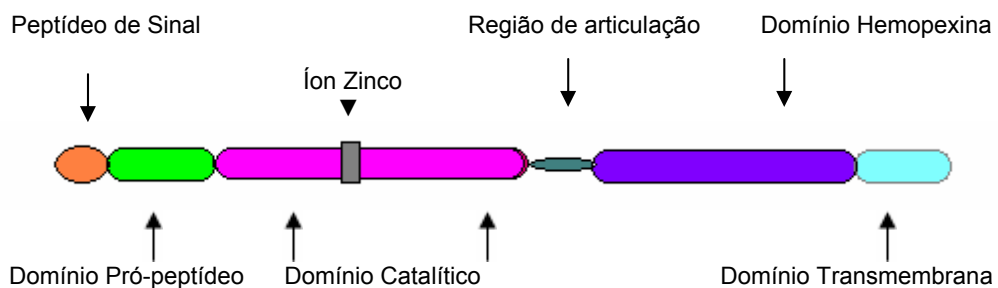
O primeiro membro das MMPs foi descoberto por Gross e Lapiere em 1962, e após este período muitas outras MMPs foram descobertas. Atualmente 24 MMPs foram identificadas em vertebrados, sendo que 23 destas também foram identificadas em humanos. Com base em suas características estruturais e de afinidade por substratos, a família foi dividida em seis grupos: Colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), Gelatinases (MMP-2 e MMP-9), Estromolisinas (MMP-3 e MMP-10, MMP-11), Matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), Metaloproteinases Tipo Membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) e outras MMPs: Metaloelastase (MMP-12), Enamelisinas (MMP-20), Xenopus (MMP-21), CA-MMP (MMP-23), Gallus (MMP-27), Epilysin (MMP-28) e a MMP-19 (Figura 5)[33, 34].

Figura 5. Estruturas esquemáticas dos domínios das MMPs (A) e MT-MMPs (B)

A.



B.



As MMPs contêm um domínio pró-peptídeo, responsável pela latência da enzima, e um domínio catalítico, portador de um íon zinco, estruturas sempre presentes e que caracterizam estas enzimas. São proteínas zinco-dependentes. Um domínio hemopexina determina substratos e inibidores de cada MMP. As Gelatinases são distinguidas pela presença de uma região de inserção da Fibronectina tipo II (A). MMT-MMPs contêm um domínio transmembrana adicional que se acopla à membrana plasmática da célula. Sua ativação é intracelular e apresentam-se ativadas à superfície da membrana plasmática (B). Adaptado de Curran e Murray [19].

A ação das MMPs pode ocorrer no espaço pericelular influenciando a atividade celular. Estão envolvidas na degradação da membrana basal e matriz extracelular, 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. Elas clivam o colágeno do tipo IV da

MEC, cortando a tripla hélice em dois fragmentos desiguais, que são susceptíveis à digestão de outras proteínas. Os produtos derivados da clivagem dos componentes da MEC, derivados do colágeno e proteoglicanos, também apresentam atividades promotoras do crescimento, angiogênese e quimiotaxia. Esta última pode promover a migração das células tumorais através da MEC afrouxada [33, 35-37].

A MMP-2 (72 kDa, Gelatinase A) é expressa por uma grande variedade de células normais e transformadas. Está envolvida com a remodelagem do tecido conectivo e com a invasão tumoral. Sua ativação é mediada por uma metaloproteinase tipo membrana (MT1-MMP) que cliva a GL-A pró-peptídeo GL-A. Paradoxalmente a TIMP-2 participa da ativação da MMP-2, por agir como um adaptador entre a MT1-MMP e a pró-MMP-2, formando o complexo MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP-2, porém isto só acontece quando há baixa concentração de TIMP-2 relativa à MT1-MMP. A MMP-9 (92 kDa, Gelatinase B) é uma importante colagenase que contribui na digestão do colágeno tipo IV e componentes primários da membrana basal. É produzida por queratócitos, monócitos, macrófagos alveolares, leucócitos e uma variedade de células malignas [31-38].

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 [30, 32, 34, 36-38].

O papel das MMPs e TIMPs na fisiopatologia tumoral, tem gerado 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. Este mecanismo envolve uma complexa regulação gênica e interação molecular que ocorre tanto no tecido maligno como no tecido benigno. 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 metástases [39, 40].

2.2.1 Expressão das metaloproteinases da matriz e dos inibidores teciduais de metaloproteinases no câncer de mama

Com o objetivo de encontrar novos e eficientes biomarcadores de prognóstico e desenvolver novas terapias alvo em câncer de mama, as MMPs e os TIMPs têm sido exaustivamente investigados. Na literatura, Klein et al [41] relata a atividade proteolítica das metaloproteinases e a capacidade de ativarem os fatores angiogênicos, entre eles o VEGF, envolvidos no crescimento tumoral, angiogênese e

metástases. Nancy Boudreau e Connie Myers [23] sugerem que o VEGF pode ter sua produção influenciada por altos níveis de metaloproteinases, sendo que a MMP-9 merece mais atenção. Entretanto Joyce Rundhaug [29] em uma revisão relata que os fatores angiogênicos podem induzir a expressão das MMPs no endotélio e no estroma celular, e por outro lado as MMPs podem aumentar a biodisponibilidade destes fatores para seus receptores.

O processo de proteólise é importante em todos os estágios do câncer de mama. 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 [34, 42].

Vários estudos prévios mostraram a hiperexpressão das MMPs e seus inibidores em câncer de mama, usando uma variedade de técnicas, incluindo a imunohistoquímica (IHQ).

Talvensaari et al [43] avaliou a expressão da MMP-2 no tecido mamário de 177 mulheres com câncer primário de mama, através de IHQ. Aproximadamente 84% das amostras eram positivas para MMP-2 e, 22% eram altamente positivas para MMP-2. A expressão estava relacionada à curta sobrevida em 10 anos, mostrando que 56% das pacientes com alta expressão estavam vivas neste período, enquanto 88% daquelas com MMP negativa e 70% daquelas com baixa ou moderada expressão sobreviveram no mesmo período ($r = 7,4$; $p < 0,001$). Uma correlação positiva foi encontrada em pacientes com estágio avançado da doença com idade menor que 55 anos ($r = 4,5$; $p = 0,02$). Em relação ao diâmetro tumoral e linfonodos axilares, não foi encontrada nenhuma correlação significativa, entretanto 93% dos

casos com linfonodos axilares metastáticos fusionados (N2) ou com metástases à distância (M1) tinham MMP-2 positiva.

Em outro estudo, por IHQ, o mesmo autor encontrou uma correlação significativa da MMP-2 com fatores prognósticos desfavoráveis na pós-menopausa. Correlacionou a positividade da MMP-2 com tumores pequenos (T1: tumor \leq 2 cm; T2: tumor $>$ 2 cm e \leq 5 cm) e baixo comprometimento axilar com curta sobrevida. Todas as pacientes MMP-2 negativas estavam vivas em cinco anos, comparadas com 75% das MMP-2 positivas ($p= 0,02$) [44].

Hirvoen et al [45] também analisou por IHQ, tumores de mama T1-2 com linfonodo axilar negativo, em 137 mulheres. Não encontrou relação estatisticamente significativa com a sobrevida, apesar de todas as pacientes MMP-2 negativa estarem vivas em 10 anos, contra 87% das MMP-2 positiva ($p= 0,07$). No entanto Johanna Pellikainen et al [46] encontrou altas taxas de imunorreação das MMPs associadas a tumores pequenos T1-2. A MMP-2 estava associada ao linfonodo negativo ($p= 0,005$), mas não a sobrevida global. A MMP-9 estava associada a pior sobrevida livre de doença ($p = 0,024$) e a pior diferenciação histológica ($p= 0,013$).

A análise da expressão da MMP-2 e da vascularização tumoral em 75 amostras de tecidos de tumor mamário, através de IHQ, não mostrou relação da expressão da MMP-2 com o risco de recorrência da doença, formação de metástases, grau histológico, envolvimento linfonodal ou receptores de estrogênio. No entanto apresentou correlação significativa com a densidade vascular, sugerindo seu potencial angiogênico no tumor mamário [47].

Li Hao et al [27] encontrou associação do VEGF ($p= 0,003$) e da MMP-9 ($p= 0,004$) com alto grau histológico e com linfonodos axilares positivos (ambos com $p < 0,001$),

porém não encontrou nenhuma relação com a idade e o diâmetro tumoral. Uma tendência negativa entre a expressão da MMP-9 e a invasão vascular, foi encontrada por Baker et al [48] ao analisar 44 pacientes com câncer de mama. Mylona et al [49] também encontrou uma associação inversa entre a MMP-9 e a proliferação, medida pelo Ki-67 ($p= 0,034$), ao analisar 138 casos de tumor de mama.

A MMP-2 associada a tumores com diâmetro tumoral maior que 2 cm ($p= 0,022$), mas não com o tipo histológico, grau histológico e linfonodo axilar, foi encontrada no estudo de Lydia Nakopoulou et al [50]. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhang Yun-gang [13], analisando 94 tumores ductais invasivos, associando a alta expressão da MMP-2 com tumores volumosos e baixa expressão do TIMP-2.

Acompanhando 210 pacientes por 62 meses Scorilas et al [51] observou melhor sobrevida livre de doença nas pacientes com linfonodo negativo e MMP-9 positiva ($p= 0,039$) comparadas aquelas com MMP-9 negativa. O diâmetro tumoral maior também estava associado à MMP-9 negativa. Concluiu que pacientes com linfonodo axilar negativo e alta expressão da MMP-9 tem considerável redução do risco de recidiva ($p= 0,039$) ou morte ($p= 0,0099$). He-Cheng Li et al [52] estudou 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 ($p= 0,013$). Porém a sobrevida global não apresentou associação significativa ($p= 0,09$).

Outros estudos publicados usando a técnica de ELISA, também revelam dados discordantes. Decock et al [53] não encontrou nenhuma associação entre os níveis plasmáticos pré-operatórios das metaloproteinases 2 e 9 e os linfonodos axilares,

diâmetro do tumor e grau histológico. Jinga et al [54] analisando tumores de mama benignos e malignos, mostrou que a MMP-9 estava mais elevada em tumores malignos, apresentando uma relação positiva com o diâmetro tumoral. A expressão da MMP-2 estava associada ao linfonodo axilar positivo e tumores maiores que 2 cm ($p= 0,011$ e $p= 0,016$).

Shu-Chih Liu et al [55] determinou a concentração de pró-MMP-2, pró-MMP-9 e MMP-2 e -9 ativas em 60 pacientes com câncer de mama. Os níveis foram significativamente mais elevados nos tecidos tumorais comparados com o tecido normal adjacente ($p < 0,001$). A MMP-2 estava correlacionada com o diâmetro tumoral ($p < 0,01$) enquanto a MMP-9 não apresentou esta correlação. A MMP-2 também estava mais elevada naquelas pacientes com doença metastática ($p < 0,05$) e com alto grau histológico ($p= 0,006$).

Anne Talvensaari-Mattila [56] analisou a MMP-9 em 71 pacientes e realizou um acompanhamento durante 10 anos. Concluiu que baixos níveis de MMP-9 pré-operatórios estavam associados a pior sobrevida livre de doença ($p= 0,005$). Encontrou uma menor sobrevida livre de doenças naquelas com baixa taxa de MMP-9, com linfonodo axilar negativo ($p= 0,03$) e naquelas com menos de 50 anos ($p= 0,02$). Por outro lado, Sirpa Leppä et al [57] encontrou melhor sobrevida naquelas com baixas taxas de MMP-2 ($p= 0,002$). As metástases ósseas e viscerais também estavam associadas a altas taxas de MMP-2 ($p= 0,05$ e $p= 0,018$).

A concentração e a atividade plasmática da MMP-2 e da MMP-9 foi medida através de imunocaptura por Somiari et al [58], para comparar grupos com câncer de mama ($n= 31$), doença benigna ($n= 38$), alto risco ($n= 31$) e baixo risco ($n= 24$) de desenvolver câncer de mama. A concentração de MMP-2 total foi significativamente

mais baixa nas pacientes de baixo risco em relação aquelas com doença benigna ou com alto risco ($p < 0,001$, respectivamente) e câncer de mama ($p = 0,002$). A atividade da MMP-2 total também foi mais baixa nas mulheres com baixo risco comparado com câncer, doença benigna e alto risco ($p < 0,001$, respectivamente). A concentração da MMP-2 ativa foi mais alta no grupo de baixo risco, comparado com os grupos de alto risco ($p = 0,001$), doença benigna ($p = 0,022$) e câncer ($p = 0,038$). A MMP-9 total mostrou-se significativamente mais alta no grupo de baixo risco comparado com os grupos de câncer ($p = 0,013$), doença benigna ($p < 0,001$) e alto risco ($p < 0,001$). Por outro lado as pacientes com câncer apresentavam concentração mais alta da MMP-9 total em relação aquelas com doença benigna ($p < 0,001$). A MMP-9 ativa estava mais baixa no grupo de baixo risco, comparadas com os grupos de alto risco, doença benigna ($p < 0,001$, respectivamente) e câncer ($p = 0,015$).

O TIMP-1 foi analisado em 133 casos de câncer invasor de mama por Lydia Nakopoulou [59]. 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 afirma que o potencial prognóstico do TIMP-1 em câncer de mama não está bem claro. Baker et al [48] 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 cm.

Wurtz et al [60] associou o TIMP-1 mRNA à pior prognóstico em neoplasias, inclusive a mamária. Esta afirmação pode causar surpresa, mas pode ser explicada

pela atividade proteolítica ao formar complexo com a pró-MMP-9. O aumento do TIMP-1 também está relacionado ao aumento do VEGF em algumas neoplasias. Acredita-se que seja decorrente da sua atividade anti-apoptótica e seu efeito angiogênico. Isto determinaria sua associação com o crescimento tumoral, invasão e metástase. Outros autores associaram os TIMPs a pior prognóstico: Xu-Wen Liu et al [61] mostrou, por imunoavaliação, a atividade anti-apoptótica do TIMP-1 em câncer de mama, associando a expressão do TIMP-1 com mau prognóstico. Stetler-Stevenson e Dong-Wan Seo [62] concluíram, através de hibridização in situ, que o TIMP-2 em níveis baixos forma complexos com a MT1-MMP para ativar a pró-MMP-2, desregulando a atividade proteolítica no espaço extracelular.

Hee Jung Kim et al [28] analisando, por IHQ, 63 casos de tumores de mama T1-T2, não encontrou nenhuma correlação das taxas de TIMP-2 com o grau histológico e linfonodo axilar. Bernard Têtu et al [63] por estudo de hibridização in situ, também não encontrou uma associação entre o TIMP-2 e a sobrevida. Mas analisando o balanço MMP-2/TIMP-2 encontrou uma pior sobrevida em cinco anos (60%) naquelas pacientes com alta taxa de MMP-2 e baixa de TIMP-2. Uma melhor sobrevida em 5 anos (74%) foi encontrada naquelas pacientes com alta taxa de TIMP-2 e baixa de MMP-2. No entanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Este balanço também foi analisado, através de IHQ, por Lydia Nakopoulou [50], que associou a MMP-2 elevada ao diâmetro tumoral maior que 2 cm ($p=0,002$), mas não com o tipo histológico, grau histológico e linfonodo axilar. O balanço entre MMP-2/TIMP-2 estava correlacionado significativamente com a sobrevida ($p=0,021$), sendo melhor nos casos TIMP-2 positivo e MMP-2 negativa e, também naqueles em que ambas eram positivas.

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 várias funções celulares, incluindo a adesão, diferenciação e metástase [23, 59]. Jinga et al [54] analisou, através do método gelatino-zimográfico e ELISA, esta razão entre tecidos benignos e malignos de mama e encontrou diferença significativa em relação aos tecidos malignos, sugerindo que o balanço anormal entre MMPs e TIMPs tem papel importante na configuração e crescimento do tumor. Também encontrou altas taxas de MMP-2 e redução do TIMP-2 nas pacientes com linfonodos axilares positivos ($p = 0,011$). Tumores com índice prognóstico de Nottingham bom ($\leq 3,4$) apresentaram alta taxa de TIMP-2 ($p = 0,038$) e baixa taxa de MMP-2/TIMP-2 ($p = 0,016$). Os estudos por imunohistoquímica, sobre a expressão do VEGF, MMPs 2 e 9 e os inibidores específicos das MMPs (TIMP 1 e 2) no câncer de mama estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3. Estudos por IHQ da expressão da MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e VEGF em carcinoma invasor de mama.

Autor	Fatores	Expressão (%)	Linfonodo axilar	Idade	Ø tumor	Tipo histológico	Grau histológico	Invasão vascular	Sobrevida
Scorilas A ⁵¹ n= 210	MMP-9	80,0	NS	p= 0,01	p= 0,014	p= 0,037	NS	NS	p< 0,02 ^a p< 0,01 ^b
Kim HJ ²⁸ n= 63	MMP-2	-	NS	-	NS	-	NS	NS	-
	MMP-9	44,0	NS	-	NS	-	NS	NS	-
	VEGF	90,5	p= 0,012	-	NS	-	NS	NS	-
Hao L ²⁷ n= 76	MMP-9	63,0	p< 0,001	NS	NS		p= 0,004	-	-
	VEGF	68,0	p< 0,001	NS	NS		p= 0,003	-	-
Mylona E ⁴⁹ n= 175	MMP-9	74,1	NS	-	NS	NS	NS	-	p= 0,027 ^a p= 0,015 ^b
Talvensaari-M ⁴³ n= 100	MMP-2	69,0	SIG	-	SIG	-	SIG	-	p< 0,05 ^a p= 0,02 ^b
Li HC ⁵² n= 270	MMP-2	56,7	-	-	p= 0,012	-	p< 0,001	-	p= 0,016 ^a
	MMP-9	59,6	-	-	NS	-	p< 0,002	-	p= 0,015 ^b
Tetu B ⁶³ n= 539	TIMP-2	41,7	-	-	-	p= 0,003	-	p=0,027	NS
	MMP-2	48,8	p= 0,014	-	-	-	-	-	NS
Nakoupoulo L ⁵⁰ n= 135	MMP-2	75,6	NS	-	p= 0,022	NS	NS	-	NS
Nakoupoulo L ⁵⁹ n= 133	TIMP-1	60,1	p= 0,025	-	-	-	p= 0,003	-	p = 0,01 ^b
Pellikainen JM ⁴⁶ n= 421	MMP-2	80,0	p= 0,005	-	-	-	-	-	NS
	MMP-9	85,0	-	-	-	-	p= 0,013	-	p= 0,024 ^a

Abreviaturas: Imunohistoquímica (IHQ); Metaloproteinase da matriz (MMP); Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP); Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Diâmetro do tumor (Ø tumor); Significativo (SIG) e Não significativo (NS).

^aSobrevida livre de doença; ^bSobrevida global.

3. JUSTIFICATIVA

Câncer de mama é uma doença biologicamente heterogênea, complexa, caracterizada por múltiplas alterações genéticas cumulativas. O seu curso clínico pode ser altamente variável. Fatores como idade, diâmetro tumoral, número de linfonodos axilares positivos, receptores hormonais (RE e RP) e a expressão da proteína HER-2 são usualmente utilizados para orientar a terapia adjuvante mais apropriada para mulheres com doença locorregional. Entretanto, estes dados se mostram insuficientes para refletir o real potencial de agressividade do tumor. A tomada de decisão ao abordarmos pacientes com linfonodos axilares clinicamente negativos representa um especial desafio terapêutico. A identificação de novos marcadores é a chave para este dilema. Fica, portanto, evidente a necessidade de pesquisarmos novos marcadores moleculares preditivos que, associados às características clínicas e aos marcadores usados rotineiramente, sejam capazes de identificar diferentes grupos prognósticos para receberem um regime terapêutico mais adequado e efetivo. Na literatura, estudos recentes têm mostrado que o VEGF e as MMPs têm forte associação com a angiogênese, invasão tumoral e a presença de metástases. Entretanto, o papel destes marcadores não está plenamente estabelecido na oncologia mamária.

Por esta razão, decidimos estudar a expressão dos fatores angiogênicos (VEGF, MMP-2 e MMP-9) e dos inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2) em tumores primários de mama e correlacioná-los com o envolvimento do linfonodo sentinela, bem como outras características clinicopatológicas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estudar a expressão dos fatores angiogênicos (VEGF, MMP-2 e MMP-9) e dos inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2) em amostras de tumores malignos primários de mama.

4.2 Objetivos específicos

Correlacionar à expressão dos fatores VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 com as seguintes variáveis:

- a) Envolvimento do linfonodo sentinela
- b) Idade
- c) Diâmetro tumoral
- e) Tipo histológico
- f) Grau histológico
- g) Invasão vascular

5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(16):1233-41.
- [4] Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994;220(3):391-8; discussion 8-401.
- [5] Vlastos G, Verkooijen HM. Minimally invasive approaches for diagnosis and treatment of early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2007;12(1):1-10.
- [6] Motomura K, Egawa C, Komoike Y, Kataoka T, Nagumo S, Koyama H, et al. Sentinel node biopsy for breast cancer: technical aspects and controversies. *Breast Cancer*. 2007;14(1):25-30.
- [7] Noguchi M. Role of breast surgeons in evolution of the surgical management of breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14(1):1-8.
- [8] Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer - the present. *Histopathology*. 2008;52(1):82-90.
- [9] Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast cancer research and treatment*. 1998;52(1-3):125-36.

- [10] Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*. 2008;52(1):67-81.
- [11] INCA. Instituto Nacional de Câncer. Incidência do Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>>. Acesso em: 05 fev. 2008.
- [12] Byers S PM, Sommers C, Seslar S. Breast carcinoma: a collective disorder. *Breast cancer research and treatment*. 1994;31(2-3):203-15.
- [13] 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.
- [14] Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg*. 2007;42(1):1-11.
- [15] Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(8):1782-90.
- [16] Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells*. 1997;15(3):180-9.
- [17] Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*. 1995;333(26):1757-63.
- [18] Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*. 1993;71(4):1368-83.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.

- [22] Garbett EA, Reed MW, Stephenson TJ, Brown NJ. Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol*. 2000;53(2):99-106.
- [23] Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2003;5(3):140-6.
- [24] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
- [25] Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*. 2000;5 Suppl 1:37-44.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005;9(2):267-85.
- [30] 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. *Br J Cancer*. 2006;94(7):1035-40.
- [31] 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.
- [32] Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist*. 2001;6(5):415-27.

- [33] Chabottaux V, Noel A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis*. 2007;24(8):647-56.
- [34] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
- [35] Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J*. 1991;5(8):2145-54.
- [36] 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.
- [37] Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J*. 1999;13(8):781-92.
- [38] Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*. 2002;12(2):131-8.
- [39] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer research*. 1991;51(18 Suppl):5054s-9s.
- [40] 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. *Clin Exp Metastasis*. 2007;24(7):495-502.
- [41] 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.
- [42] 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*. 2004;109(5):782-5.

- [43] Talvensaari-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.
- [44] Talvensaari-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.
- [45] Hirvonen R, Talvensaari-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.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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 research and treatment*. 2003;77(2):145-55.

- [51] 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 1;84(11):1488-96.
- [52] 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.
- [53] Decock J, Hendrickx W, Wildiers H, Christiaens MR, Neven P, Drijkoningen 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.
- [54] 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.
- [55] Liu S-C. Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 2006;371(1-2):92-6.
- [56] Talvensaaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. Preoperative serum MMP-9 immunoreactive protein is a prognostic indicator for relapse-free survival in breast carcinoma. *Cancer letters*. 2005;217(2):237-42.
- [57] Leppa S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(3):1057-63.
- [58] Somiari SB, Shriver CD, Heckman C, Olsen C, Hu H, Jordan R, et al. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. *Cancer letters*. 2006;233(1):98-107.
- [59] 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(11):1027-36.

[60] Wurtz SO, Schrohl AS, Sorensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):215-27.

[61] Liu XW, Bernardo MM, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40364-72.

[62] Stetler-Stevenson WG, Seo DW. TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Trends Mol Med*. 2005;11(3):97-103.

[63] 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 Res*. 2006. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/8/3/R28>>. Acesso em: 21 nov. 2007.

6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Vascular-endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in early breast cancer

Flavio Cabreira Jobim (1,4), Nilton Leite Xavier (2), Diego de Mendonça Uchoa (3), Marcio Saciloto (4), Natália Chemello (2) & Gilberto Schwartzmann (1).

(1) Postgraduate Program in Medicine & Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

(2) Breast Unit, Academic Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

(3) Pathology Unit, Academic Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

(4) Academic Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

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

Address correspondence to: Prof. G. Schwartzmann, Academic Hospital, Federal University, Rua Ramiro Barcelos 2350/399; Porto Alegre, RS, Brazil, CP 90035903; email address: gschwartzmann@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Objective: The expression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 and specific tissue inhibitors of matrix metalloproteinase TIMP-1 and TIMP-2 was analyzed in tumor samples obtained from patients with primary breast cancer, aiming to correlate these findings with the status of the sentinel lymph node (SLN) and clinical-pathological characteristics, such as age, menopausal status, tumor size and vascular invasion.

Methods: Tumor samples from 88 patients with primary breast cancer were analyzed. The immune-reactivity of various marker antigens in tumors was correlated with clinical and pathological features, as well as the status of the sentinel lymph node (SLN).

Results: No statistically significant correlation was found for the expression 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 positively correlated with a positive SLN. A significant correlation between higher VEGF expression ($p = 0.04$) and lower TIMP-1 levels ($p = 0.02$) with ductal histology was also observed. Furthermore, lower TIMP-2 levels showed a significant correlation with younger age (< 50 years; $p = 0.01$) and larger tumor diameter (2.0 - 5.0 cm; $p = 0.04$).

Conclusion: A positive SLN was correlated with a larger tumor diameter ($p < 0.01$) and the presence of vascular invasion ($p < 0.01$). Higher VEGF and lower TIMP-1 levels were observed in patients with ductal tumors, while higher TIMP-1 levels were observed in lobular tumors. These results warrant further studies.

Key words: Breast cancer; Vascular Endothelial Growth Factor; Matrix Metalloproteinase; Metalloproteinase Tissue Inhibitors; Sentinel Lymph Node.

INTRODUCTION

Pioneer 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 beginning this process, involving molecules that include growth factors, adhesion molecules, angiogenic stimuli, clotting factors and proteinases [2]. A metanalysis of 87 publications on microvascular density and prognosis in breast cancer revealed a finding statistically significant correlation between the presence of tumor angiogenesis, analyzed by vascular microdensity, and patient survival [3].

Some angiogenic proteins are well known such as the vascular endothelial growth factor (VEGF), the basic fibroblast growth factor (bFGF), tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin 8 (IL-8) and the matrix metalloproteinases (MMPs). The angiogenesis endogenous inhibitors are necessary to decrease the mitogenic stimuli in the vascular endothelium. The best known are angiostatin, platelet factor 4, interferon alpha and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs). Adhesion molecules such as integrin $\alpha_v\beta_3$ and laminin also play important role in angiogenesis, tumor invasion and metastasis [4, 5]. Modifications in the expression of tumor angiogenic factors as well as their inhibitors were described in various types of cancer, such as colorectal, lung, head and neck, malignant melanoma and breast cancer [6, 7].

Breast cancer, in particular, is a biologically heterogenous disease and its clinical course can be highly variable. Factors such as age, tumor diameter, number of

positive axillary lymph nodes, hormonal and HER-2 receptor status are currently used to guide selection of the appropriate adjuvant therapy for women with locoregional disease. However, treatment decisions in patients with clinically-negative axillary lymph nodes represent a special therapeutic challenge. For the above reason, we decided to study whether the expression of angiogenic factors (VEGF, MMP-2 and MMP-9) and specific tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in the primary tumor could be correlated with the status of the sentinel lymph node (SLN), as well as to other clinicopathological features.

METHODS

Ninety-five patients with the diagnosis of breast cancer, with clinically negative axillary lymph node and without distant metastasis, 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 as well as from the sentinel lymph node (SLN) were analyzed. This cross-sectional study analyzed the expression of VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in formalin-fixed and paraffin embedded blocks with breast tumor samples. Hematoxylin-eosin (HE) slides 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, while 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 project was approved by Postgraduate Research Group and Medical Ethics Commission of HCPA; number 01/88CNS. The aims of the study were to correlate VEGF, matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1 and TIMP-2) level of expression in the primary tumor with the following parameters: 1) presence (+) or absence (-) of tumor involvement in the SLN; 2) age, < 50 and ≥ 50 years; 3) tumor diameter, categorized as ≤ 2.0 or between 2.0 and ≤ 5.0 cm; 4) histological types classified as ductal or lobular; 5) histological grade, classified as grade 1, grade 2 or grade 3; 6) presence of absence of vascular invasion.

The IHC technique, using the standard avidin-biotin-peroxidase complex, was used to measure the expression of antigens in tumors. The immuno-reaction 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: medium positive, 3: strongly positive. The quantitative analysis of the expression of protein was estimated in percentages from 0 (zero) up to 100%. The final expression of each case was obtained by the means of algorithm: $HSCORE = \sum[(I + 1)] \times PC$, where I and PC represent the staining intensity and the percentage of stained cells, respectively [8, 9].

In order to measure the expression of VEGF, we utilized the polyclonal antibody of rabbit antifactor of vascular human endothelial growth of Signet's USA™ Ultra Streptavidin detection, at dilution 1:30, using as external control as sample of breast tumor. The expression of MMP-2 and of MMP-9 was measured by monoclonal antibody of rat (NCL-MMP2-507, clone 17B11) and monoclonal antibody of rat (NCL-MMP9-439, clone 15W2) of Novacastra Laboratories™, at dilution of 1:40, using the external control of hepatic normal tissue. The expression of TIMP-1 (tissue inhibitor

of MMP-9) was analyzed with the monoclonal antibody of rat (NCL-TIMP1-485, clone 6F6a) of Novacastra Laboratories™, at dilution of 1:75, with external control of colon tissue. For analyzing the expression of TIMP-2 (tissue inhibitor of MMP-2) it was used monoclonal antibody of rat (NCL-TIMP2- clone 3A4) of Novacastra Laboratories™, at the dilution of 1:25 and the external control used was placenta tissue. Standard positive and negative controls were also included in the experiments.

The semi-quantitative analysis was carried out by an experienced pathologist at the Department of Pathology of HCPA, using optical microscope Olympus pattern BX-2. The qualitative expression was considered positive when the tumor showed at least one cell with clear cytoplasmic positivity for each marker utilized. The quantitative expression of each marker was taken as the average of the percentage of stained cells in at least 10 microscopic fields.

The statistical analysis to compare the association between SLN positive group versus negative group with the factors being studied and the other variables selected was done by means of statistical program SPSS V11. The continuous variables such as age and tumor diameter were analyzed by Student t test. The vascular endothelial growth factor, the matrix metalloproteinase 2 and 9 and the tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 were correlated with the other clinical-pathological parameters by the non-parametrical Mann-Whitney U test, since the correlation with the histological grade was done by the non-parametrical Kruskal-Wallis H test. The Pearson chi-squared test (χ^2) was used to analyze categoric variables. The correlation of angiogenic factors among them was analyzed through the Spearman correlation coefficient. The confidence interval was set at 95% (IC 95%) and the values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Table 1 shows the distribution of clinical-pathological and immunohistochemical data according to SLN (+) and SLN (-) status. The average age of patients was 59 (33 - 81) years. The tumor diameter showed an average of 2.3 (0.5 - 5.0) cm. The most frequent histological type was the infiltrating ductal carcinoma with 83 (94%) cases and the infiltrating lobular carcinoma was present in 5 cases (5.7%). The distribution of histological type, according Scarff Bloom Richardson was classified in G1: 23 (26.1%), G2: 53 (60.2%) and G3: 12 (13.6%). Vascular invasion was documented in 46 (52%) of the cases. Tumor samples were analyzed in relation to the presence of absence of SLN involvement. There was a statistically significant correlation between tumor diameter ($p < 0.01$; Figure 1) and presence of vascular invasion in the primary tumor ($p < 0.01$; Figure 2) with a positive SLN.

Table 1 also shows the expression of VEGF, MMPs 2 and 9 and TIMPs 1 and 2 in the cytoplasm of neoplastic cells, measured by the median of HSCORE and the ratio between matrix metalloproteinases and their specific inhibitors (MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1). VEGF presented an median score of 190(180-221). MMP-2 presented an median score of 60(3-190), with 18(20.5%) negative cases; MMP-9 presented an median score of 180(102-190), with 11(12,5%) negative cases; TIMP-1 presented median score of 368(325-391) and TIMP-2, an median score of 225(180-285). No significant correlation of the expression of the above factors with the status of the SLN was observed.

In Table 2, the expression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 is presented in relation to the status of SLN and other variables tumors with the lobular histological type showed a statistically significant VEGF expression lower than the ductal type ($p=0.04$). In Table 3, the status of SLN and the above mentioned variables were correlated with TIMP-1 and TIMP-2 levels and with ratio between MMP-2 and MMP-9 and their specific inhibitors (MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1). TIMP-1 levels showed a higher expression in tumors of the lobular type ($p=0.02$). TIMP-2 levels were higher in younger patients ($p=0.01$) and in smaller tumors ($p=0.04$). The ratios between MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 showed no statistical correlation.

The correlation of VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 expression levels with the ratio between MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-2 is showed in Table 4. VEGF expression did not correlate significantly with any of the factors nor with their ratios. However, a positive correlation was found between MMP-2 and TIMP-2 levels ($p<0.01$), MMP-2 levels and MMP-2/TIMP-2 ratio ($p<0.01$) and MMP-9 levels and MMP-9/TIMP-1 ratio ($p<0.01$).

DISCUSSION

In our study, patients with larger tumor diameter ($p<0.01$) and the presence of vascular invasion ($p<0.01$) had a statistically significant correlation 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. However, a significant

correlation between higher VEGF expression ($p= 0.04$) and lower TIMP-1 levels ($p= 0.02$) with the ductal histological type was observed. Furthermore, lower TIMP-2 levels showed also a significant correlation with younger (< 50 years) age ($p= 0.01$) and larger tumor diameter (2.0 - 5.0 cm; $p= 0.04$).

Kim et al [10] found the VEGF significantly correlated with a positive axillary lymph node. Choi et al [11] found a significant correlation between the VEGF expression by RT-PCR and peritumoral vascularizaty ($p 0.002$). Hao et al [12] found an association of VEGF ($p= 0.003$) and MMP-9 ($p= 0.004$) with advanced histological grade and a positive axillary lymph node (both with $p < 0,001$), but no relation with age and tumor diameter.

Several studies have suggested a relationship between VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 expression in the primary breast cancer and prognosis of this disease. In some of them, there was a suggestion that patients with high levels of expression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 in the primary tumor might have a more aggressive clinical course [13-15]. However, these results are still conflicting.

A review of 89 publications was done by Gasparini G. [13] that identified a significant correlation between the high levels of VEGF and overall and disease-free survival. Patients with early stage breast cancer with tumors with elevated VEGF levels had a higher likelihood of recurrence or death, when compared with patients with low VEGF levels. Talvensaaari-Mattila et al [16] found a significant correlation of MMP-2 with unfavorable prognostic factors in postmenopausal patients. The authors correlated the expression of MMP-2 with small tumors (T1-2) and low axillary involvement with short survival. All negative MMP-2 patients were alive in 5 years, compared with 75% of positive MMP-2 ($p= 0.02$). Hirvonen R. at al [17] also analyzed 137 women with TI-

2 negative axillary lymph node and did not find a statistically significant correlation with survival ($p= 0.07$).

MMP-2 expression was associated with a tumor diameter higher than 2 cm ($p= 0.022$), but not with histological type, histological grade and axillary lymph node status in another study by Nakopoulou et al [18]. However, Pellikainen et al [19] found high expressions of MMPs associated with small tumors T1-2. MMP-2 was associated with negative lymph node ($p= 0.005$), but not with overall survival. MMP-9 expression was associated with a shorter disease free survival ($p= 0.024$) and with more aggressive histological type ($p= 0.013$).

Scorilas A. et al [8] followed 210 patients for 62 months, observing a better disease-free survival in patients with negative lymph nodes and high MMP-9 expression ($p= 0.039$). The largest tumor diameter was associated with negative MMP-9. The author concluded that patients with negative axillary lymph node and high expression of MMP-9 had a considerable reduction in the risk of death. Li et al [15] studied 270 cases of breast cancer with negative axillary lymph node, finding an association of MMP-9 expression with histological grade ($p < 0.002$), tumor diameter ($p= 0.05$) and disease free survival ($p= 0.013$). Baker et al [20] found a negative tendency between the expression of MMP-9 and vascular invasion in 44 patients with breast cancer, while Mylona [21] found an inverse association between the MMP-9 and tumor cell proliferation, measured by Ki67 ($p= 0.034$) in 138 cases of primary breast carcinomas.

Nakopoulou et al [22] studied 133 cases of invasive breast cancer, finding 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 a negative axillary lymph node. Yet, elevated TIMP-1 levels were associated with a better survival ($p= 0.01$). Wurtz et al [23] also found an association between TIMP-1 expression and worse prognosis.

Kim et al [10], when analyzing 63 cases of breast tumors T1-T2, did not find a correlation of TIMP-2 expression with histological grade and axillary lymph node status. Têtu et al [24] did not find association between TIMP-2 and overall survival. However, by analyzing the balance MMP-2/TIMP-2, he found a worse survival in those with low TIMP-2 and high MMP-2 expression. TIMP-2 expression was associated with the ductal histological type ($p= 0.002$). In contrast, Nakopoulou et al [18] observed a better survival in cases with positive TIMP-2 and negative MMP-2 expression. Other authors also described changes in the balance between MMPs and TIMPs with the increase in the activity of MMPs, as playing an important role in tumor invasion and metastasis [9, 24, 25].

In order to analyze the correlation between the balance between MMPs and their inhibitors with SLN and other variables in 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 [9] analyzed this ratio in benign and malignant breast tissues and found a significant difference in malignant tissues, suggesting that the abnormal balance between MMPs and TIMPs plays important role tumor growth patterns.

Têtu et al [24] analyzing the balance between MMP-2 and TIMP-2 found a worse survival at 5 years (60%) in those patients with high MMP-2 and low TIMP-2. A better survival at 5 years (74%) was found in those patients with high rate of TIMP-2 and

low MMP-2. However, these differences were not statistically significant. This balance also was studied by Nakopoulou L. et al [18] that analyzed the balance between MMP-2/TIMP-2, showing a significant correlation with survival ($p= 0.021$), being better in positive TIMP-2 and negative MMP-2 cases and also in those that were both positive.

In summary, the role of angiogenic factors as a means to identify different prognostic groups in early breast cancer is still unclear. This could be due to the heterogeneity of this disease, or to the variability in laboratory techniques applied in the studies. In our series of patients with primary breast cancer, a larger tumor diameter and the presence of vascular invasion was 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.

In the face of this scenario, it is clear the need to hold additional prospective studies, so that the role of these markers can be better studied. The search for new molecular markers in breast cancer, it is essential for us to move forward in the treatment this neoplasm, so prevalent in our country, and often lethal in a significant number of patients.

CONFLICTS OF INTEREST: The authors state no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*. 1971;133(2):275-88.
- [2] Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells*. 1997;15(3):180-9.
- [3] 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 research*. 2004;64(9):2941-55.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Tandle A, Blazer DG, 3rd, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med*. 2004;2(1):22.
- [8] 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.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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):34-43.
- [13] Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:37-44.
- [14] Garbett EA, Reed MW, Stephenson TJ, Brown NJ. Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol.* 2000;53(2):99-106.
- [15] 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.
- [16] Talvensaari-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.
- [17] Hirvonen R, Talvensaari-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.
- [18] 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 research and treatment.* 2003;77(2):145-55.

- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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(11):1027-36.
- [23] Wurtz SO, Schrohl AS, Sorensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(2):215-27.
- [24] 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 Res.* 2006; URL: <http://breast-cancer-research.com/content/8/3/R28>. Acces on 10/21/2007.
- [25] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer research.* 1991;51(18 Suppl):5054s-9s.

TABLES

Table 1. Distribution of clinico-pathological data and immunohistochemistry data in relation to sentinel lymph node status (SLN): SLN (+) and SLN (-) groups.

Variables	All n= 88	SLN (+) n= 44	SLN (-) n= 44	P
Age, yr	58.7±11.3	58.7±11.8	58.8±11.0	0.96 ^a
Tumor Diameter, cm	2.3±1.0	2.7±1.1	1.9±1.0	< 0.01 ^a
Histological type, n (%)				
Ductal	83 (94.3)	42 (95.5)	41 (93.2)	0.64 ^b
Lobular	5 (5.7)	2 (4.5)	3 (6.8)	
Histological grade, n (%)				
G1	23 (26.1)	9 (20.5)	14 (31.8)	0.31 ^b
G2	53 (60.2)	30 (68.2)	23 (52.3)	
G3	12 (13.7)	5 (11.3)	7 (15.9)	
Vascular invasion, n (%)				
Yes	46 (52.3)	37 (84.1)	9 (20.5)	< 0.01 ^b
No	42 (47.7)	7 (15.9)	35 (79.5)	
VEGF	190 (180-221)	190 (180-196)	190 (180-251)	0.70 ^c
MMP-2	60 (3-190)	60 (3-180)	55 (2-194)	0.90 ^c
MMP-9	180 (102-190)	170 (50-196)	180 (150-190)	0.47 ^c
TIMP-1	368 (325-391)	360 (300-380)	380 (340-392)	0.23 ^c
TIMP-2	225 (180-285)	210 (162-285)	247 (180-285)	0.29 ^c
MMP-2/TIMP-2	0.35 (0.01-0.78)	0.37 (0.01-0.77)	0.30 (0.00-0.78)	0.96 ^c
MMP-9/TIMP-1	0.47 (0.29-0.59)	0.45 (0.13-0.69)	0.48 (0.39-0.55)	0.70 ^c

Data are shown as average ± pattern deviation, score (percentage), or median (amplitude inter-quartil: p25 a p75). The expression of each protein was obtained by the means of algorithm: HSCORE= $\sum[(I + 1)] \times PC$, where I and PC represent the staining intensity and the percentage of stained cells, respectively.

Abbreviations: Sentinel lymph node (SLN); Vascular endothelium growth factor (VEGF); Matrix metalloproteinase (MMP); Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP).

Statistical tests: ^aStudent t test, ^bChi-squared test of Pearson, ^cMann-Whitney U test.

p< 0,05

Table 2. Correlation of angiogenic factors VEGF, MMP-2 and MMP-9 with the SLN and selected variables.

Variables	N(%)	VEGF	p	MMP-2	p	MMP-9	p
SLN							
Positive	44 (50.0)	190 (180-196)	0.70	60 (3-180)	0.70	170 (50-196)	0.47 ^a
Negative	44 (50.0)	190 (180-251)		55 (2-194)		180 (150-190)	
Age, yr							
< 50	21 (23.9)	190 (180-285)	0.22	15 (1-175)	0.19	170 (80-185)	0.28 ^a
≥ 50	67 (76.1)	190 (180-196)		90 (3-190)		180 (120-194)	
Tumor diameter, cm							
≤ 2	47 (53.4)	190 (180-210)	0.60	40 (0-190)	0.33	180 (120-194)	0.11 ^a
> 2 and ≤ 5	41 (46.6)	190 (180-232)		80 (7-195)		170 (60-180)	
Histological type							
Ductal	83 (94.3)	190 (180-240)	0.04	60 (2-190)	0.54	180 (110-190)	0.50 ^a
Lobular	5 (5.7)	170 (160-185)		120 (30-195)		190 (50-288)	
Histological grade							
G1	23 (26.1)	190 (160-190)	0.20	120 (3-190)	0.36	180 (20-190)	0.97 ^b
G2	53 (60.2)	190 (180-262)		60 (6-190)		180 (115-190)	
G3	12 (13.6)	190 (182-194)		3 (0-217)		180 (117-180)	
Vascular invasion							
Yes	46 (52.3)	190 (180-196)	0.40	70 (3-180)	0.78	180 (95-217)	0.40 ^a
No	42 (47.7)	190 (180-247)		40 (3-213)		180 (118-190)	

Data are shown as score (percentage) or median (amplitude inter-quartil: P25 a P75). The expression of each protein was obtained by the means of algorithm: HSCORE= $\sum[(I + 1)] \times PC$, where I and PC represent the staining intensity and the percentage of stained cells, respectively.

Abbreviations: Sentinel lymph node (SLN); Vascular endothelium growth factor (VEGF); Matrix metalloproteinase (MMP).

Statistical tests: ^aMann-Whitney U test and ^bKruskal-Wallis H test.

p< 0.05

Table 3. Correlation of specific inhibitors TIMPs 1 and 2, MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 with the SLN and selected variables.

Variables	N(%)	TIMP-1	TIMP-2	MMP-2/TIMP-2	MMP-9/TIMP-1
SLN					
Positive	44 (50.0)	360 (300-380)	210 (162-285)	0.37 (0.01-0.77)	0.45 (0.13-0.69)
Negative	44 (50.0)	380 (340-392)	247 (180-285)	0.30 (0.00-0.78)	0.48 (0.39-0.55)
p value		0.23	0.30	0.96	0.70 ^a
Age, yr					
< 50	21 (23.9)	360 (350-380)	176.0 (140-203)	0.18 (0.00-0.98)	0.45 (0.21-0.53)
≥ 50	67 (76.1)	380 (320-392)	270.0 (180-285)	0.40 (0.01-0.75)	0.47 (0.31-0.63)
p value		0.95	0.01	0.87	0.35 ^a
Tumor diameter, cm					
≤ 2	47 (53.4)	380 (340-392)	270.0 (190-285)	0.18 (0.00-0.67)	0.48 (0.32-0.59)
> 2 and ≤ 5	41 (46.6)	360 (300-380)	190.0 (165-270)	0.47 (0.03-0.89)	0.46 (0.16-0.59)
p value		0.18	0.04	0.08	0.46 ^a
Histological type					
Ductal	83 (94.3)	360 (320-388)	196.0 (180-285)	0.33 (0.01-0.79)	0.47 (0.31-0.59)
Lobular	5 (5.7)	392 (380-396)	285.0 (255-312)	0.42 (0.11-0.63)	0.50 (0.13-0.73)
p value		0.02	0.15	0.90	0.91 ^a
Histological grade					
G1	23 (26.1)	380 (320-392)	190.0 (170-285)	0.54 (0.01-0.84)	0.48 (0.05-0.56)
G2	53 (60.2)	360 (340-388)	240.0 (178-285)	0.37 (0.03-0.75)	0.46 (0.31-0.64)
G3	12 (13.6)	380 (310-395)	262.5 (199-281)	0.01 (0.00-0.62)	0.46 (0.30-0.61)
p value		0.78	0.42	0.13	0.98 ^b
Vascular invasion					
Yes	46 (52.3)	364 (330-383)	203 (160-285)	0.38(0.01-0.80)	0.49 (0.25-0.67)
No	42 (47.7)	374 (320-392)	262 (180-340)	0.22 (0.01-0.76)	0.46 (0.31-0.54)
p value		0.83	0.09	0.91	0.35 ^a

Data are shown as score (percentage) or median (amplitude inter-quartil: P25 a P75). The expression of each protein was obtained by the means of algorithm: HSCORE= $\sum[(I + 1)] \times PC$, where I and PC represent the staining intensity and the percentage of stained cells, respectively.

Abbreviations: Sentinel lymph node (SLN); Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP); Matrix metalloproteinase (MMP).

Statistical tests: ^aMann-Whitney U test and ^bKruskal-Wallis H test.

p < 0.05

Table 4. Correlation of factors VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1, among them.

Factors	VEGF	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	MMP-2/TIMP-2	MMP-9/TIMP-1
VEGF	-	0.77	0.03	0.40	0.28	0.28	0.04
MMP-2	0.77	-	0.10	0.29	< 0.01	< 0.01	0.19
MMP-9	0.03	0.10	-	0.25	0.08	0.32	< 0.01
TIMP-1	0.40	0.29	0.25	-	0.57	0.27	0.14
TIMP-2	0.28	< 0.01	0.08	0.57	-	0.66	0.15
MMP-2/TIMP-2	0.28	< 0.01	0.32	0.27	0.66	-	0.53
MMP-9/TIMP-1	0.04	0.19	< 0.01	0.14	0.15	0.53	-

Abbreviations: Vascular endothelium growth factor (VEGF); Matrix metalloproteinase (MMP); Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP).

Statistical test: Spearman correlation coefficient.

p < 0.05

FIGURES

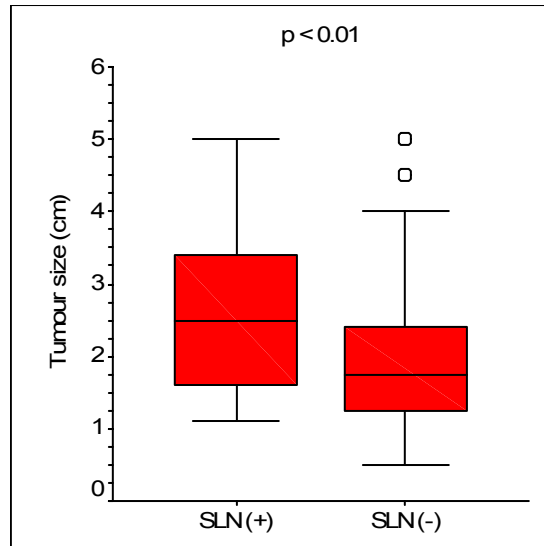


Figure 1. Correlation between the tumor diameter, and the status of sentinel lymph node (SLN). A positive correlation was observed between vascular invasion and the occurrence of a SLN (+). $p < 0.01$.

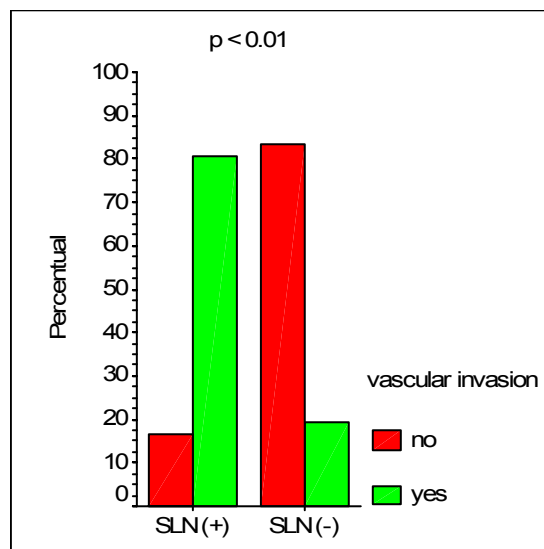


Figure 2. Correlation between the presence of vascular invasion and the status of the sentinel lymph node (SLN). A positive correlation was observed between vascular invasion and the occurrence of a SLN (+). $p < 0.01$

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O câncer de mama 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. O fato de pacientes com características clínicas e patológicas semelhantes poder apresentar desfechos clínicos muito distintos, torna as decisões de ordem terapêuticas muito complexas.

Mulheres com doença inicial e linfonodos axilares negativos são classificadas como de bom prognóstico. Entretanto, apesar do tratamento cirúrgico adequado e do uso de tratamentos adjuvantes, cerca de um terço destas pacientes apresenta recidiva da doença na evolução. Isto indica que os métodos atuais de análise prognóstica são falhos para um número significativo de pacientes. Daí, a necessidade de novos marcadores biológicos, capazes de selecionar de forma mais eficaz os diferentes subgrupos prognósticos.

No câncer de mama, as características biológicas do tumor e o envolvimento dos linfonodos axilares são rotineiramente usados na escolha do tratamento e para estimativa do prognóstico. Apesar de todos os esforços realizados para identificar novos marcadores moleculares, somente o receptor de estrogênio (RE) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) foram adequadamente padronizados e mostraram força estabelecida como marcadores prognósticos e preditivos no manejo do câncer de mama. O receptor de progesterona (RP) também é largamente usado, contudo o seu real valor está por ser plenamente estabelecido.

Os estudos sobre o papel dos fatores angiogênicos no câncer de mama, publicados na literatura, são ainda controversos. Isto se deve em parte à heterogeneidade da doença e à variabilidade das técnicas laboratoriais aplicadas. Em nossa série de pacientes com tumor primário de mama, o maior diâmetro tumoral e a presença de invasão vascular podem ser correlacionados com a presença de linfonodo sentinela positivos. A alta expressão do VEGF e a baixa expressão do TIMP-1 foram também associadas ao tipo histológico ductal, enquanto a alta expressão do TIMP-1 foi encontrada em pacientes com tumores do tipo lobular. A alta expressão do TIMP-2 mostrou associação positiva com pacientes com idade ≥ 50 anos e com tumores com diâmetro ≥ 2 cm.

Diante deste cenário, fica clara a necessidade de que estudos prospectivos adicionais sejam realizados, para que o papel destes marcadores possa ser melhor 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.

Pesquisas de novos fatores prognósticos que possam predizer o potencial risco de invasão e metástase no câncer de mama, especialmente nos casos linfonodos negativo, não têm apenas interesse acadêmico. Também ocupam um papel importante na escolha de terapias adjuvantes mais adequadas, como as terapias alvo, com estratégias mais efetivas em termos de cura, abordagem individual e custo-efetividade.

ANEXO I - TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos dados clinicopatológicos e imunohistoquímicos em relação ao linfonodo sentinela (LNS): grupos LNS (+) e LNS (-).....	61
Tabela 2. Correlação dos fatores angiogênicos VEGF, MMP-2 e MMP-9 com o LNS e outras variáveis selecionadas.....	62
Tabela 3. Correlação dos inibidores específicos TIMP-1 e 2, e razão MMPs/TIMPs com o LNS e outras variáveis selecionadas.....	63
Tabela 4. Correlação dos fatores VEGF, MMP-2 e 9, TIMP-1 e 2, e razão MMPs/TIMPs entre si.....	64

Tabela 1. Distribuição dos dados clinicopatológicos e imunohistoquímicos em relação ao linfonodo sentinela (LNS): grupos LNS (+) e LNS (-).

Variáveis	Todos n= 88	LNS (+) n= 44	LNS (-) n= 44	p
Idade, anos	58,7±11,3	58,7±11,8	58,8±11,0	0,96 ^a
Diâmetro tumoral, cm	2,3±1,0	2,7±1,1	1,9±1,0	< 0,01 ^a
Tipo histológico, n (%)				
Ductal	83 (94,3)	42 (95,5)	41 (93,2)	0,64 ^b
Lobular	5 (5,7)	2 (4,5)	3 (6,8)	
Grau histológico, n (%)				
G1	23 (26,1)	9 (20,5)	14 (31,8)	0,31 ^b
G2	53 (60,2)	30 (68,2)	23 (52,3)	
G3	12 (13,7)	5 (11,3)	7 (15,9)	
Invasão vascular, n (%)				
Sim	46 (52,3)	37 (84,1)	9 (20,5)	< 0,01 ^b
Não	42 (47,7)	7 (15,9)	35 (79,5)	
VEGF	190 (180-221)	190 (180-196)	190 (180-251)	0,70 ^c
MMP-2	60 (3-190)	60 (3-180)	55 (2-194)	0,90 ^c
MMP-9	180 (102-190)	170 (50-196)	180 (150-190)	0,47 ^c
TIMP-1	368 (325-391)	360 (300-380)	380 (340-392)	0,23 ^c
TIMP-2	225 (180-285)	210 (162-285)	247 (180-285)	0,29 ^c
MMP-2/TIMP-2	0,35 (0,01-0,78)	0,37 (0,01-0,77)	0,30 (0,00-0,78)	0,96 ^c
MMP-9/TIMP-1	0,47 (0,29-0,59)	0,45 (0,13-0,69)	0,48 (0,39-0,55)	0,70 ^c

Os dados são mostrados como média ± desvio padrão, contagem (percentual), ou mediana (amplitude interquartil: P25 a P75). A expressão de cada proteína foi obtida por meio do algoritmo: HSCORE= $\sum[(I + 1)] \times PC$, onde I e PC representam a intensidade da coloração e o percentual de células coradas, respectivamente. Abreviaturas: Linfonodo sentinela (LNS); Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Metaloproteinase da matriz (MMP); Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP); Razão entre as Metaloproteinases da matriz e seus inibidores teciduais específicos (MMP/TIMP).

Teste estatístico: ^aTeste t de Student, ^bQui-quadrado, ^cTeste U de Mann-Whitney.
p < 0,05

Tabela 2. Correlação dos fatores angiogênicos VEGF, MMP-2 e MMP-9 com o LNS e outras variáveis selecionadas.

Variáveis	N(%)	VEGF	p	MMP-2	p	MMP-9	p
LNS							
Positivo	44 (50,0)	190 (180-196)	0,70	60 (3-180)	0,70	170 (50-196)	0,47 ^a
Negativo	44 (50,0)	190 (180-251)		55 (2-194)		180 (150-190)	
Idade, anos							
< 50	21 (23,9)	190 (180-285)	0,22	15 (1-175)	0,19	170 (80-185)	0,28 ^a
≥ 50	67 (76,1)	190 (180-196)		90 (3-190)		180 (120-194)	
Diâmetro tumoral, cm							
≤ 2	47 (53,4)	190 (180-210)	0,60	40 (0-190)	0,33	180 (120-194)	0,11 ^a
> 2 e ≤ 5	41 (46,6)	190 (180-232)		80 (7-195)		170 (60-180)	
Tipo histológico							
Ductal	83 (94,3)	190 (180-240)	0,04	60 (2-190)	0,54	180 (110-190)	0,50 ^a
Lobular	5 (5,7)	170 (160-185)		120 (30-195)		190 (50-288)	
Grau histológico							
G1	23 (26,1)	190 (160-190)	0,20	120 (3-190)	0,36	180 (20-190)	0,97 ^b
G2	53 (60,2)	190 (180-262)		60 (6-190)		180 (115-190)	
G3	12 (13,6)	190 (182-194)		3 (0-217)		180 (117-180)	
Invasão vascular							
Sim	46 (52,3)	190 (180-196)	0,40	70 (3-180)	0,78	180 (95-217)	0,40 ^a
Não	42 (47,7)	190 (180-247)		40 (3-213)		180 (118-190)	

Os dados são mostrados como contagem (percentual) ou mediana (amplitude interquartil: P25 a P75). A expressão de cada proteína foi obtida por meio do algoritmo: HSCORE= $\sum[(I + 1)] \times PC$, onde I e PC representam a intensidade da coloração e o percentual de células coradas, respectivamente. Abreviaturas: Linfonodo sentinela (LNS); Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Metaloproteinase da matriz (MMP).
 Teste estatístico: ^aTeste U de Mann-Whitney e ^bTeste H de Kruskal-Wallis.
 p< 0.05

Tabela 3. Correlação dos inibidores específicos TIMP-1 e 2, e razão MMPs/TIMPs com o LNS e outras variáveis selecionadas.

Variáveis	N(%)	TIMP-1	p	TIMP-2	p	MMP-2/TIMP-2	p	MMP-9/TIMP-1	p
LNS									
Positivo	44 (50,0)	360 (300-380)	0,23	210 (162-285)	0,30	0,37 (0,01-0,77)	0,96	0,45 (0,13-0,69)	0,70 ^a
Negativo	44 (50,0)	380 (340-392)		247 (180-285)		0,30 (0,00-0,78)		0,48 (0,39-0,55)	
Idade, anos									
< 50	21 (23,9)	360 (350-380)	0,95	176 (140-203)	0,01	0,18 (0,00-0,98)	0,87	0,45 (0,21-0,53)	0,35 ^a
≥ 50	67 (76,1)	380 (320-392)		270 (180-285)		0,40 (0,01-0,75)		0,47 (0,31-0,63)	
Diâmetro tumoral, cm									
≤ 2	47 (53,4)	380 (340-392)	0,18	270 (190-285)	0,04	0,18 (0,00-0,67)	0,08	0,48 (0,32-0,59)	0,46 ^a
> 2 e ≤ 5	41 (46,6)	360 (300-380)		190 (165-270)		0,47 (0,03-0,89)		0,46 (0,16-0,59)	
Tipo histológico									
Ductal	83 (94,3)	360 (320-388)	0,02	196 (180-285)	0,15	0,33 (0,01-0,79)	0,90	0,47 (0,31-0,59)	0,91 ^a
Lobular	5 (5,7)	392 (380-396)		285 (255-312)		0,42 (0,11-0,63)		0,50 (0,13-0,73)	
Grau histológico									
G1	23 (26,1)	380 (320-392)	0,78	190 (170-285)	0,42	0,54 (0,01-0,84)	0,13	0,48 (0,05-0,56)	0,98 ^b
G2	53 (60,2)	360 (340-388)		240 (178-285)		0,37 (0,03-0,75)		0,46 (0,31-0,64)	
G3	12 (13,6)	380 (310-395)		262 (199-281)		0,01 (0,00-0,62)		0,46 (0,30-0,61)	
Invasão vascular									
Sim	46 (52,3)	364 (330-383)	0,83	203 (160-285)	0,09	0,38(0,01-0,80)	0,91	0,49 (0,25-0,67)	0,35 ^a
Não	42 (47,7)	374 (320-392)		262 (180-340)		0,22 (0,01-0,76)		0,46 (0,31-0,54)	

Os dados são apresentados como contagem (percentual) ou mediana (amplitude interquartil: P25 a P75). A expressão de cada proteína foi obtida por meio do algoritmo: HSCORE= $\sum[(I + 1)] \times PC$, onde I e PC representam a intensidade da coloração e o percentual de células coradas, respectivamente.

Abreviaturas: Linfonodo sentinela (LNS); Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP); Metaloproteinase da matriz (MMP).

Teste estatístico: ^aTeste U de Mann-Whitney e ^bTeste H de Kruskal-Wallis.

p < 0.05

Tabela 4. Correlação dos fatores VEGF, MMP-2 e 9, TIMP-1 e 2 e da razão MMPs/TIMPs entre si.

Fatores	VEGF	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	MMP-2/TIMP-2	MMP-9/TIMP-1
VEGF	-	0,77	0,03	0,40	0,28	0,28	0,04
MMP-2	0,77	-	0,10	0,29	< 0,01	< 0,01	0,19
MMP-9	0,03	0,10	-	0,25	0,08	0,32	< 0,01
TIMP-1	0,40	0,29	0,25	-	0,57	0,27	0,14
TIMP-2	0,28	< 0,01	0,08	0,57	-	0,66	0,15
MMP-2/TIMP-2	0,28	< 0,01	0,32	0,27	0,66	-	0,53
MMP-9/TIMP-1	0,04	0,19	< 0,01	0,14	0,15	0,53	-

Abreviaturas: Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Metaloproteinase da matriz (MMP); Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP); Razão entre as Metaloproteinases da matriz e seus inibidores teciduais específicos (MMP/TIMP).

Teste estatístico: Coeficiente de correlação de Spearman.

$p < 0.05$

ANEXO II – FIGURAS

Figura 1. Expressão imunohistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular, nas células neoplásicas do tumor mamário.....	76
Figura 2. Distribuição da expressão do fator de crescimento endotelial vascular, segundo à intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas.....	76
Figura 3. Distribuição numérica dos casos, segundo à expressão percentual de positividade do fator de crescimento endotelial vascular nas células neoplásicas.....	77
Figura 4. Expressão imunohistoquímica da metaloproteinase 2, nas células neoplásicas do tumor mamário.....	77
Figura 5. Distribuição da expressão da metaloproteinase 2, segundo a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas.....	78
Figura 6. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade da metaloproteinase 2 nas células neoplásicas.....	78
Figura 7. Expressão imunohistoquímica da metaloproteinase 9, nas células neoplásicas do tumor mamário.....	79
Figura 8. Distribuição da expressão da metaloproteinase 9, segundo a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas.....	79
Figura 9. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade da Metaloproteinase 9 nas células neoplásicas.....	80
Figura 10. Expressão imunohistoquímica do inibidor tecidual de metaloproteinase 1, nas células neoplásicas do tumor mamário.....	80
Figura 11. Distribuição da expressão do Inibidor tecidual de metaloproteinase 1, segundo a intensidade da coloração do citoplasma nas células neoplásicas.....	81

Figura 12. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade do Inibidor tecidual de metaloproteinase 1 nas células neoplásicas...	81
Figura 13. Expressão imunohistoquímica do inibidor tecidual de metaloproteinase 2 nas células neoplásicas do tumor mamário.....	82
Figura 14. Distribuição da expressão do Inibidor de metaloproteinase 2, segundo a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas.....	82
Figura 15. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade do Inibidor tecidual de metaloproteinase 2 nas células neoplásicas...	83
Figura 16. Expressão mediana do Fator de crescimento endotelial vascular, Metaloproteinases 2 e 9, e dos Inibidores teciduais de metaloproteinases 1 e 2 nas células neoplásicas mamárias, determinada pelo algoritmo $HSCORE = \sum[(I + 1)] \times PC$	83
Figura 17. Correlação entre o status do linfonodo sentinela (LNS) e o diâmetro tumoral. Uma correlação positiva foi observada entre o diâmetro tumoral e o LSN (+); $p < 0,01$	84
Figura 18. Correlação entre o status do linfonodo sentinela (LNS) e a presença de invasão vascular. Uma correlação positiva foi observada entre a invasão vascular e a ocorrência de LSN (+); $p < 0,01$	84
Figura 19. Correlação entre a expressão do VEGF e o tipo histológico do tumor. O tipo histológico ductal apresentou alta expressão do VEGF; $p = 0,04$	85
Figura 20. Correlação entre a expressão do TIMP-1 e o tipo histológico do tumor. O tipo histológico ductal apresentou baixa expressão do TIMP-1; $p = 0,02$.	85
Figura 21. Correlação entre a expressão do TIMP-2 e a idade da mulher. Pacientes com idade de 50 anos ou mais apresentaram alta expressão do TIMP-2; $p = 0,01$	86

- Figura 22.** Correlação entre a expressão do TIMP-2 e o diâmetro tumoral. Tumores com diâmetro de 2 cm ou menos apresentaram correlação positiva com a alta expressão do TIMP-2; $p= 0,04$ 86
- Figura 23.** Correlação entre a expressão do TIMP-2 e a presença de invasão vascular. A baixa expressão do TIMP-2 apresentou uma tendência de correlação com presença de invasão vascular; $p= 0,09$ 87
- Figura 24.** Correlação entre a razão MMP-2/TIMP-2 e o diâmetro tumoral. Maior razão MMP-2/TIMP-2 apresentou uma tendência de correlação com tumores maiores; $p= 0,08$ 87
- Figura 25.** Correlação entre a expressão do VEGF e da MMP-9. Altas taxas de VEGF apresentaram uma correlação positiva com o aumento da expressão da MMP-9; $p= 0,03$ 88
- Figura 26.** Correlação entre a expressão da MMP-2 e do TIMP-2. Altas taxas de MMP-2 apresentaram uma correlação positiva com o aumento da expressão do TIMP-2; $p< 0,01$ 88

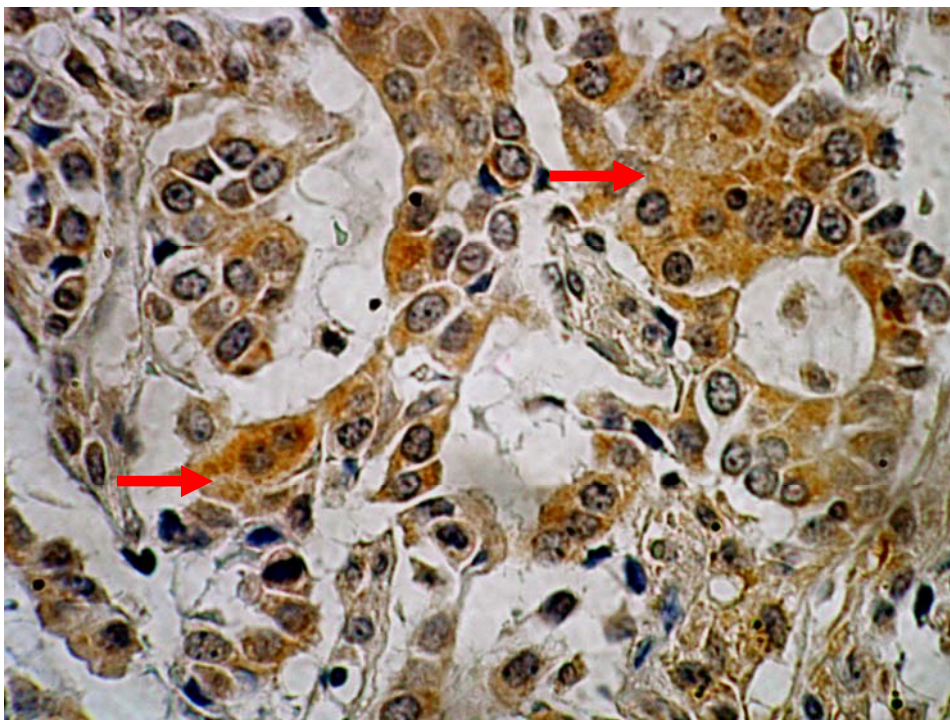


Figura 1. Expressão imunohistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular nas células neoplásicas do tumor mamário; Magnificação 400X. As setas mostram a imunorreação forte no citoplasma das células neoplásicas.

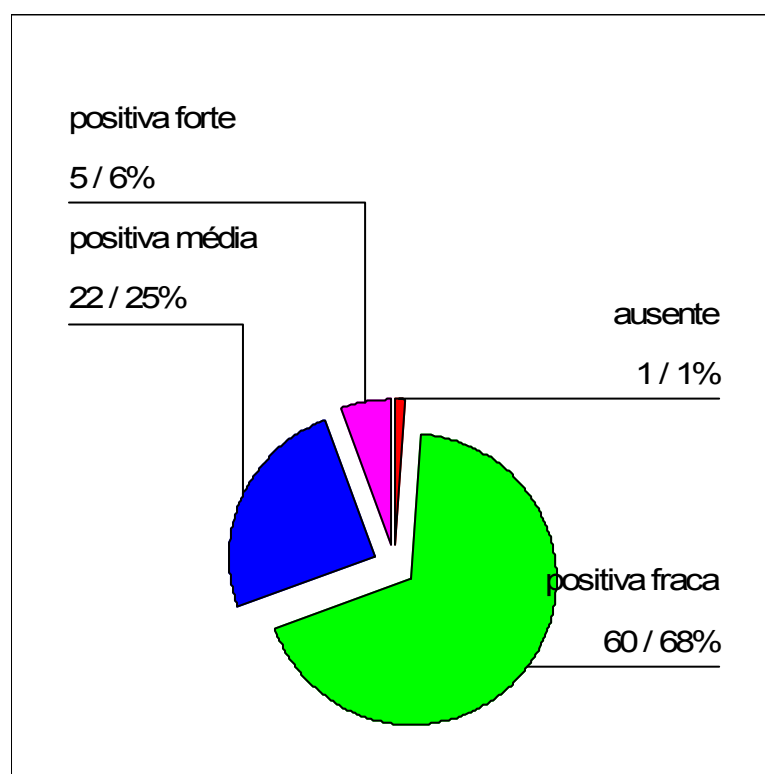


Figura 2. Distribuição da expressão do fator de crescimento vascular endotelial, segundo a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas.

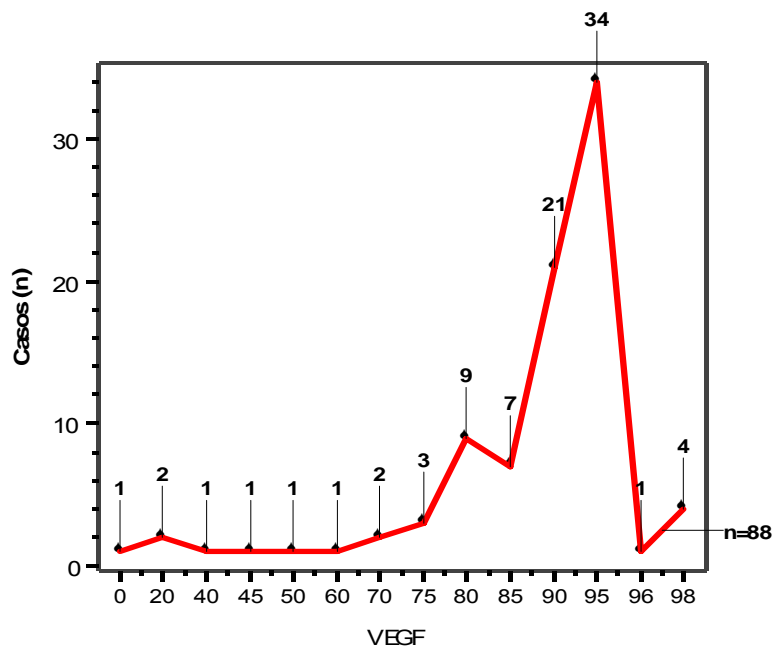


Figura 3. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade do fator de crescimento endotelial vascular nas células neoplásicas.

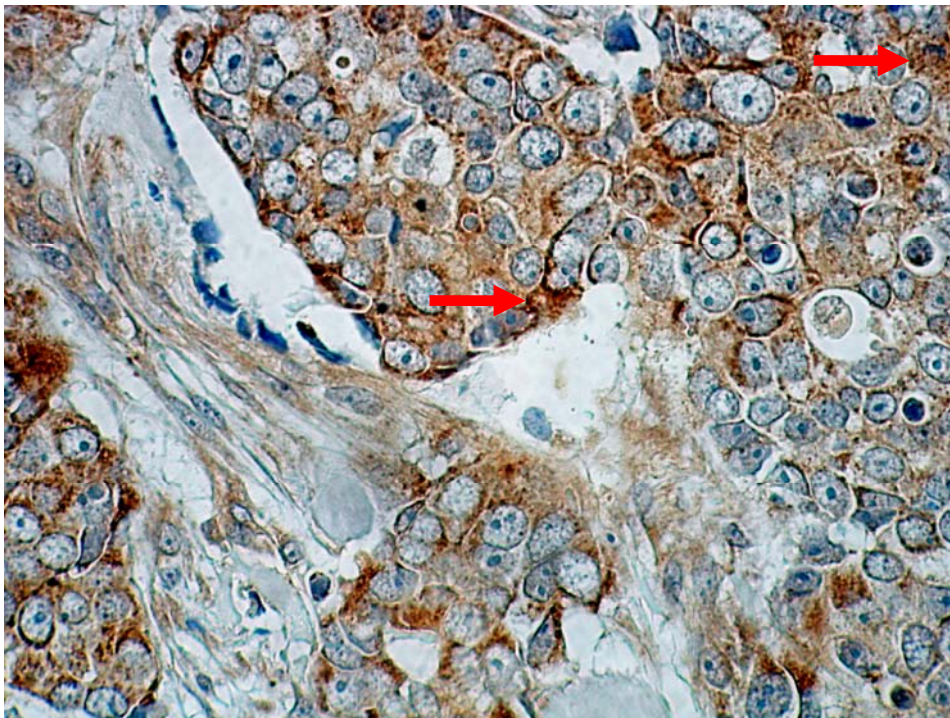


Figura 4. Expressão imunohistoquímica da metaloproteinase 2 nas células neoplásicas do tumor mamário; Magnificação 400X. As setas mostram a imunorreção forte no citoplasma das células neoplásicas.

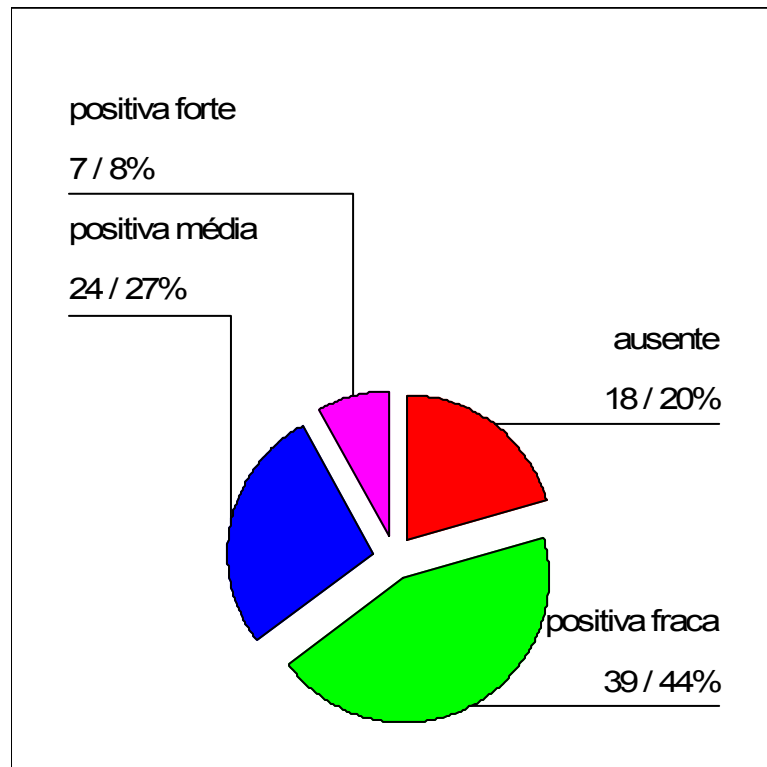


Figura 5. Distribuição da expressão da metaloproteinase 2, segundo a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas.

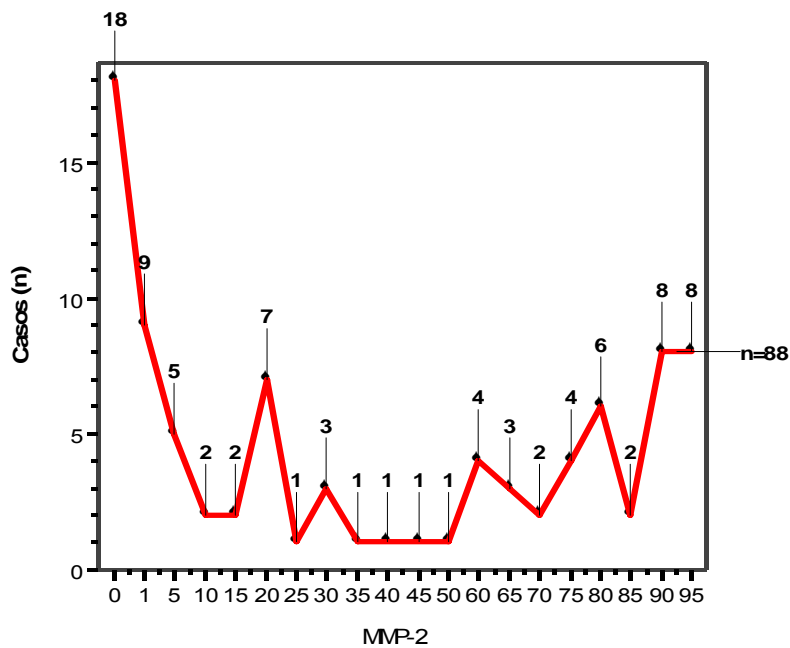


Figura 6. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade da metaloproteinase 2 nas células neoplásicas.

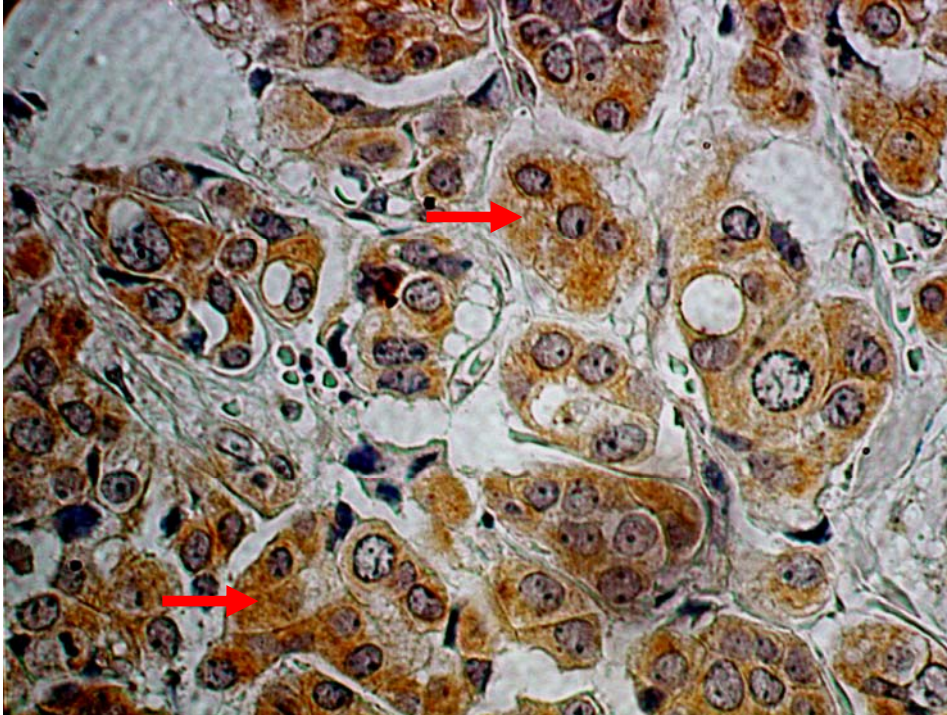


Figura 7. Expressão imunohistoquímica da metaloproteinase 9, nas células neoplásicas do tumor mamário; Magnificação 400X. As setas mostram a imunorreação forte no citoplasma das células neoplásicas.

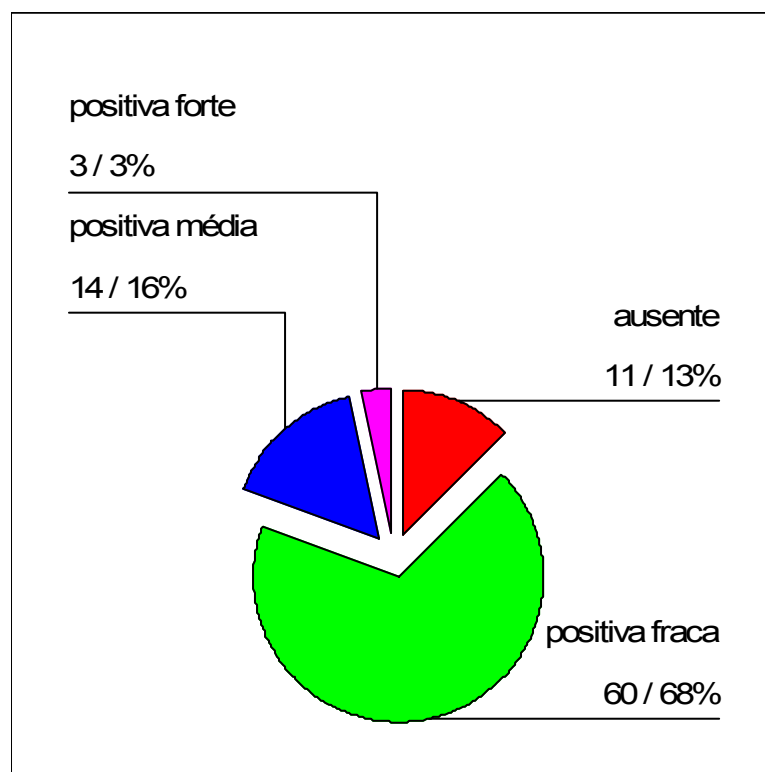


Figura 8. Distribuição da expressão da metaloproteinase 9, segundo a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas.

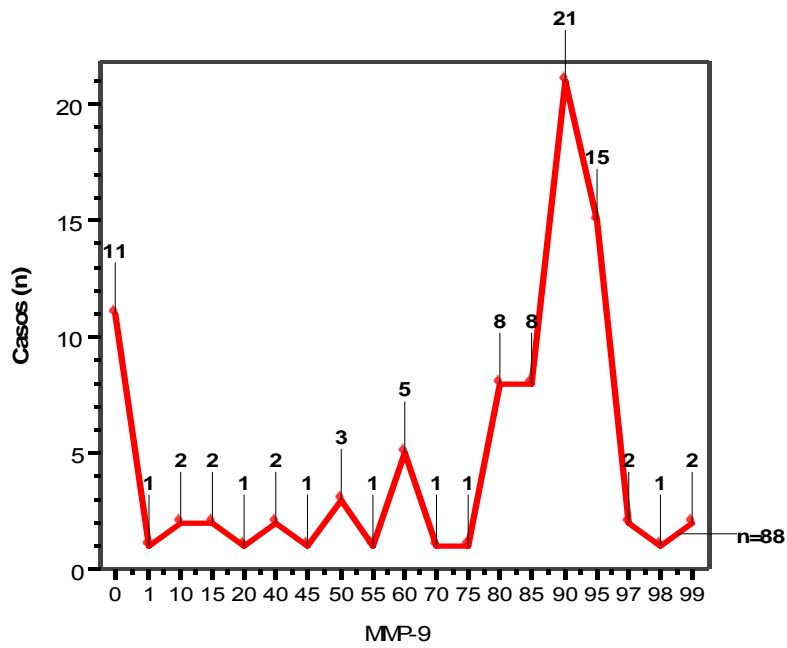


Figura 9. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade da metaloproteínase 9 nas células neoplásicas.

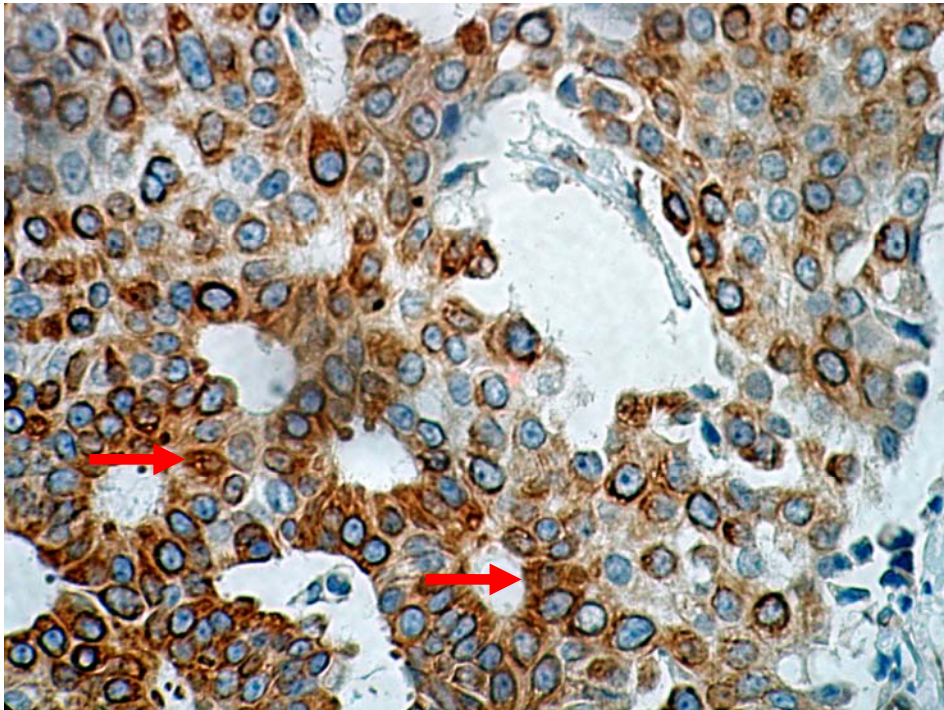


Figura 10. Expressão imunohistoquímica do inibidor tecidual de metaloproteínase 1 nas células neoplásicas do tumor mamário; Magnificação 400X. As setas mostram a imunorreacção forte no citoplasma das células neoplásicas.

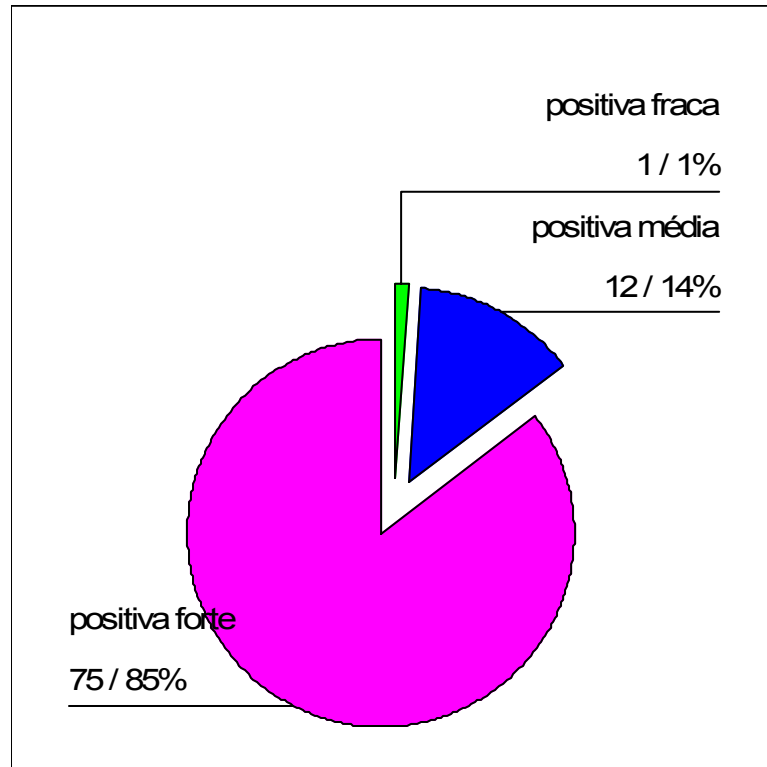


Figura 11. Distribuição da expressão do inibidor tecidual de metaloproteinase 1, segundo a intensidade da coloração do citoplasma nas células neoplásicas.

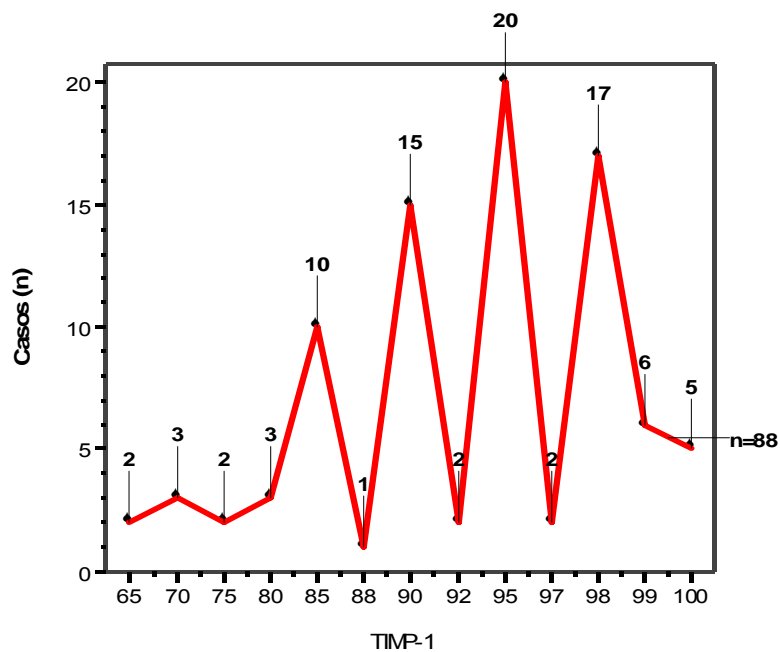


Figura 12. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade do inibidor tecidual de metaloproteinase 1 nas células neoplásicas.

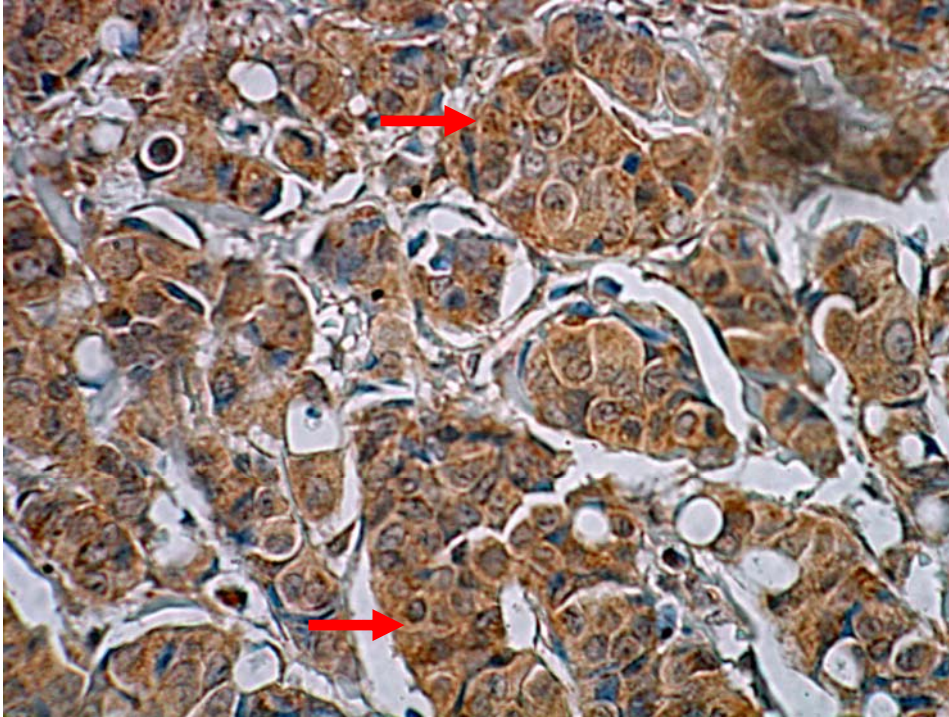


Figura 13. Expressão imunohistoquímica do inibidor tecidual de metaloproteinase 2 nas células neoplásicas do tumor mamário; Magnificação 400X. As setas mostram a imunorreação forte no citoplasma das células neoplásicas.

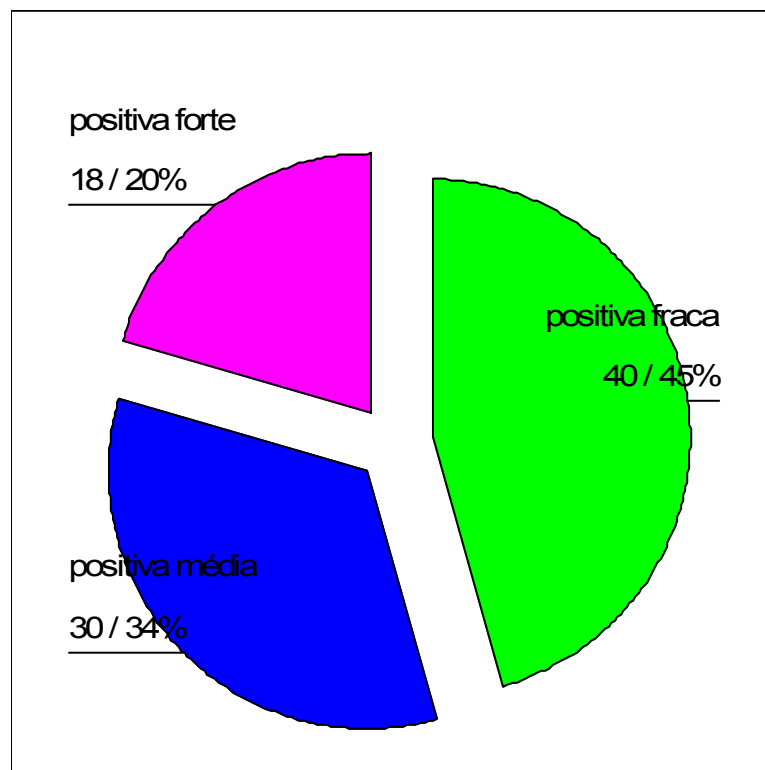


Figura 14. Distribuição da expressão do inibidor de metaloproteinase 2, segundo a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas.

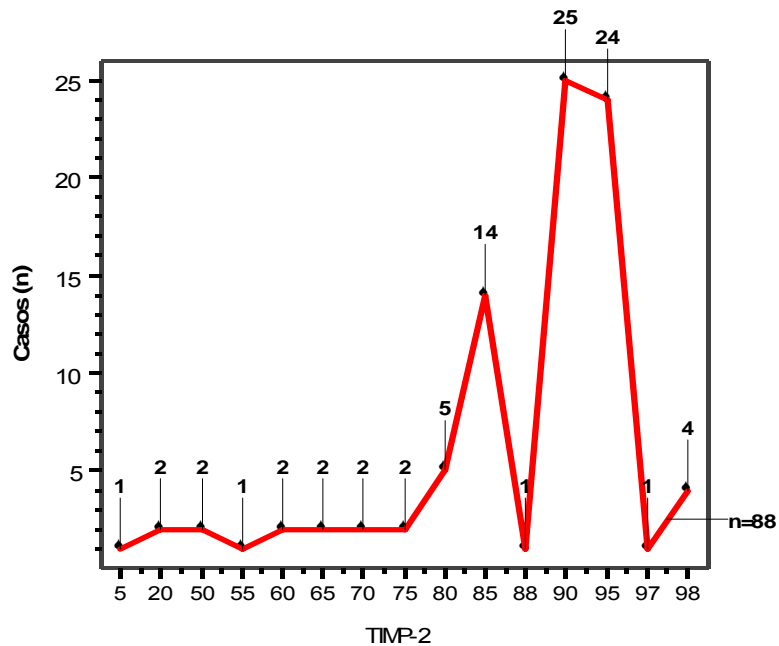


Figura 15. Distribuição numérica dos casos segundo a expressão percentual de positividade do inibidor tecidual de metaloproteinase 2 nas células neoplásicas.

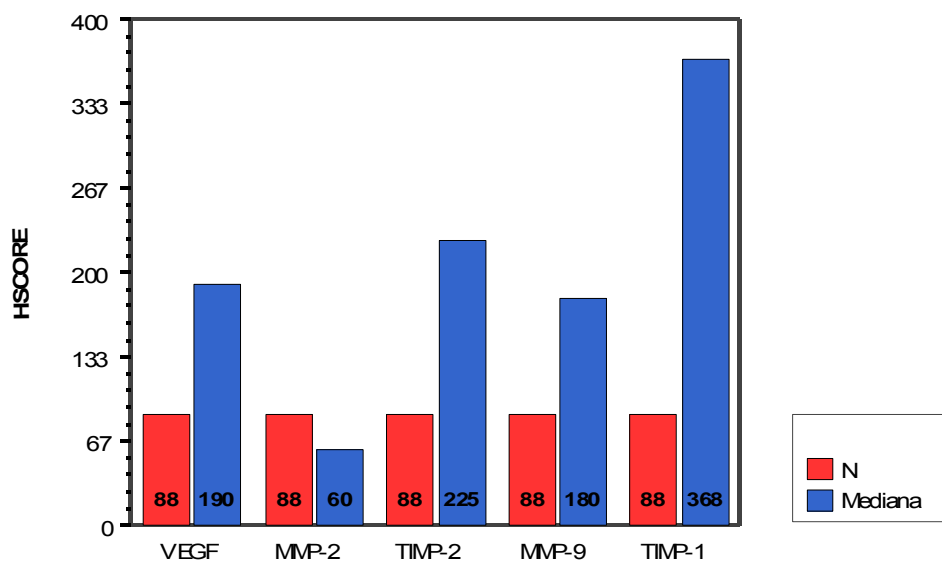


Figura 16. Expressão mediana do fator de crescimento endotelial vascular, metaloproteinases 2 e 9, e dos inibidores teciduais de metaloproteinases 1 e 2 nas células neoplásicas mamárias, determinada pelo algoritmo $HSCORE = \sum[(I + 1)] \times PC$.
Abreviaturas: I= intensidade da coloração; PC= percentual de células neoplásicas coradas.

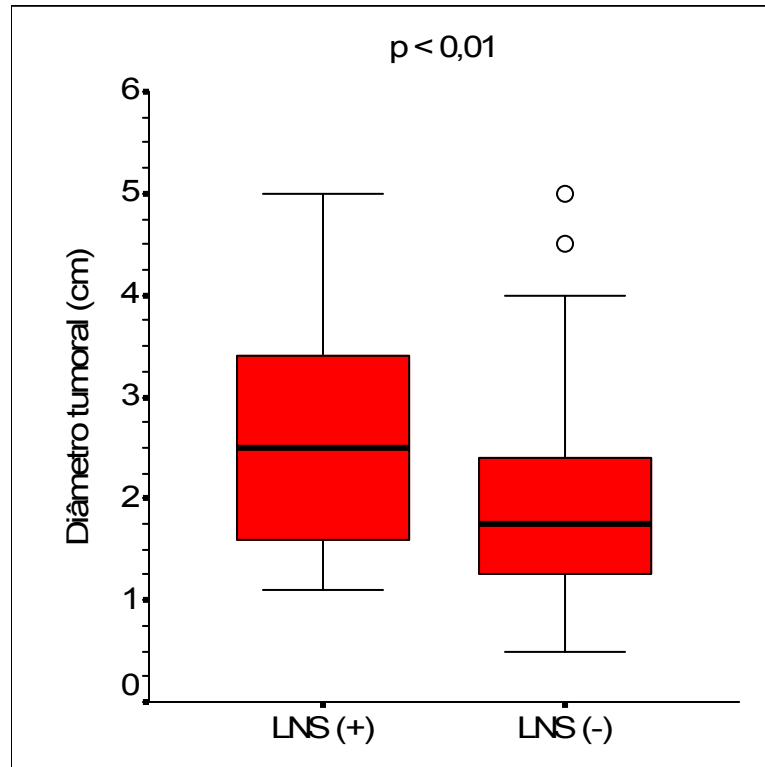


Figura 17: Correlação entre o status do linfonodo sentinela (LNS) e o diâmetro tumoral. Uma correlação positiva foi observada entre o diâmetro tumoral e o LSN (+); $p < 0,01$.

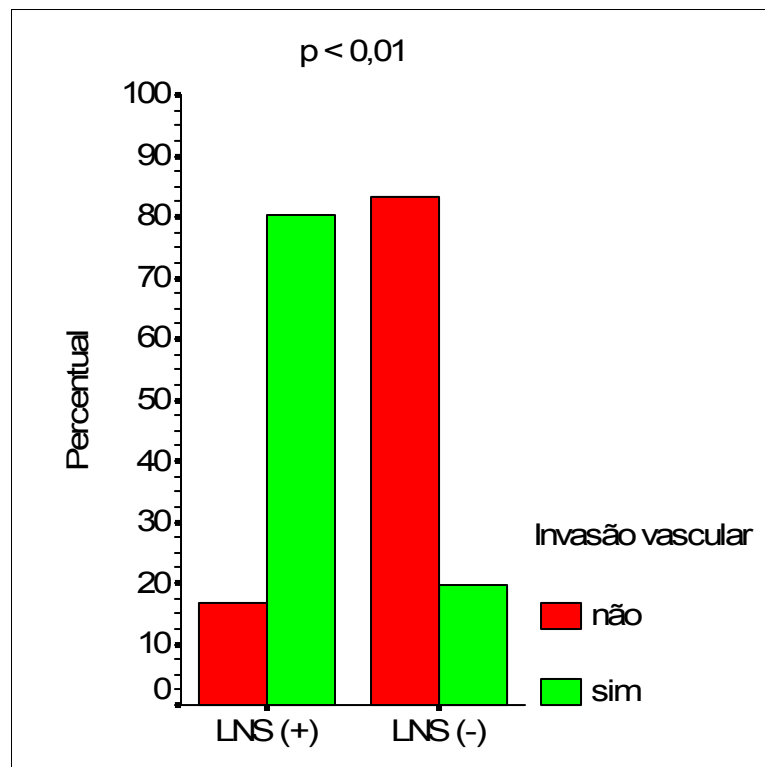


Figura 18: Correlação entre o status do linfonodo sentinela (LNS) e a presença de invasão vascular. Uma correlação positiva foi observada entre a invasão vascular e a ocorrência de LSN (+); $p < 0,01$.

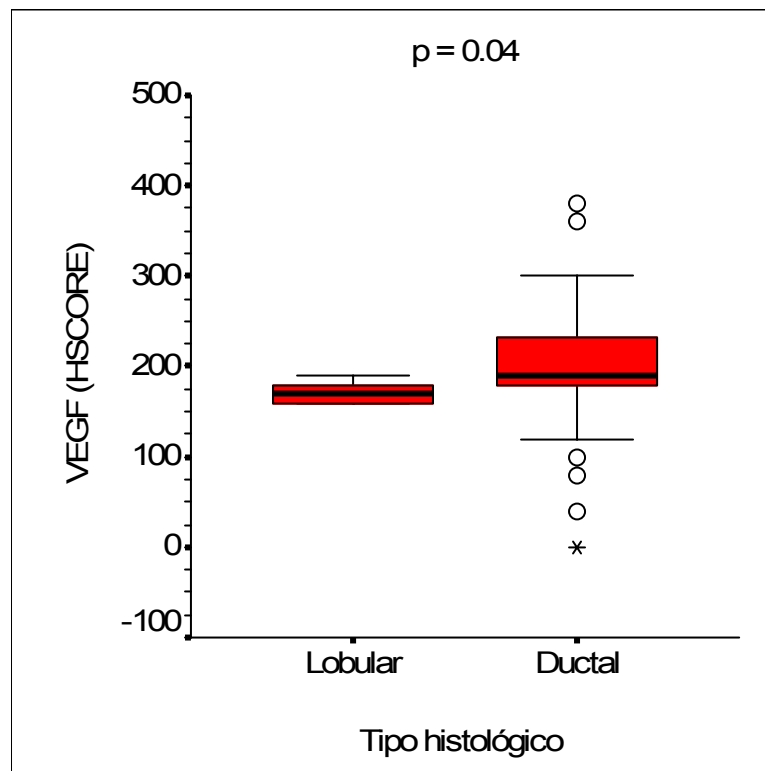


Figura 19: Correlação entre a expressão do VEGF e o tipo histológico do tumor. O tipo histológico ductal apresentou alta expressão do VEGF; $p = 0,04$.

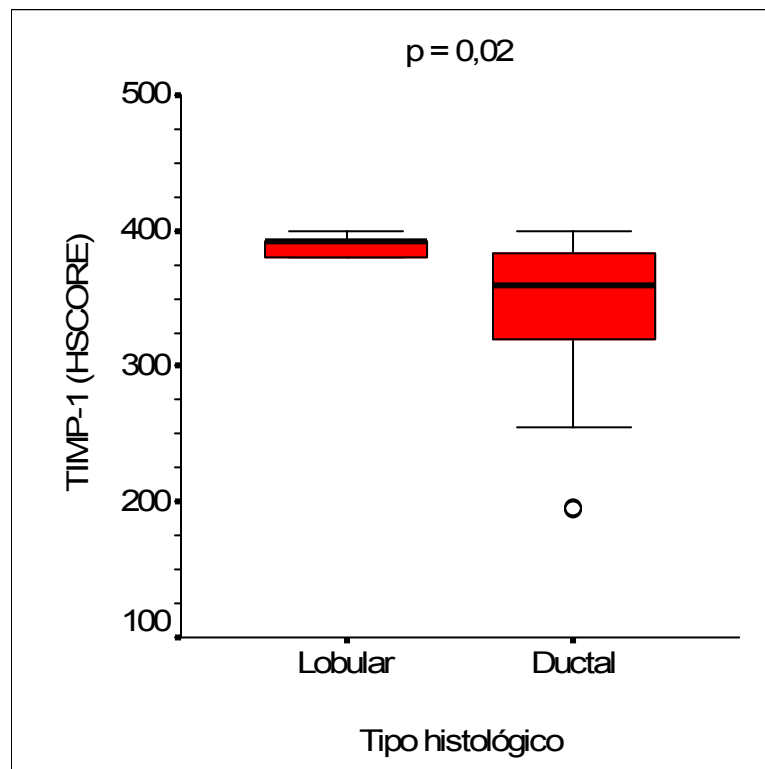


Figura 20: Correlação entre a expressão do TIMP-1 e o tipo histológico do tumor. O tipo histológico ductal apresentou baixa expressão do TIMP-1; $p = 0,02$.

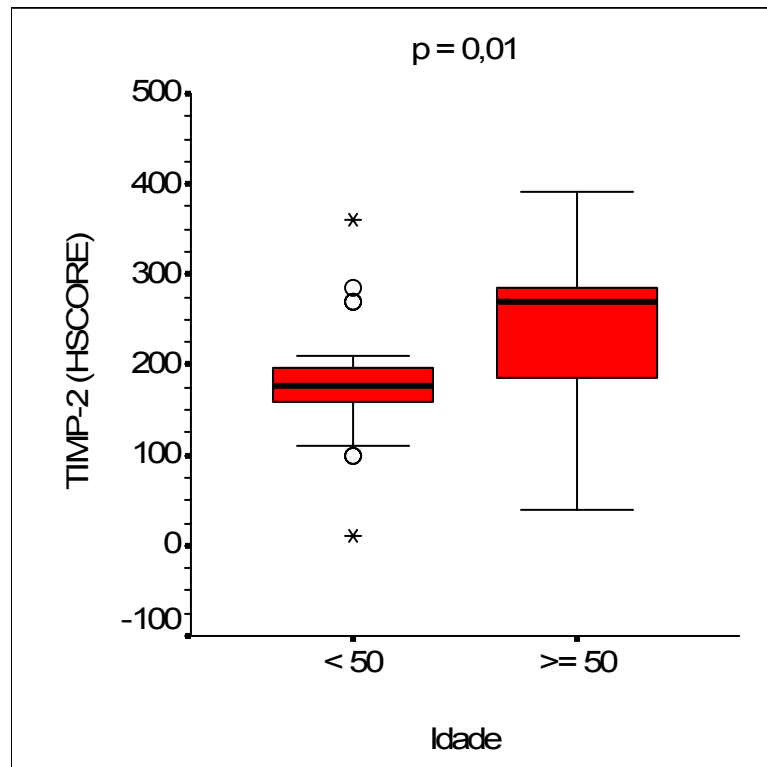


Figura 21: Correlação entre a expressão do TIMP-2 e a idade da mulher. Pacientes com idade de 50 anos ou mais apresentaram alta expressão do TIMP-2; $p = 0,01$.

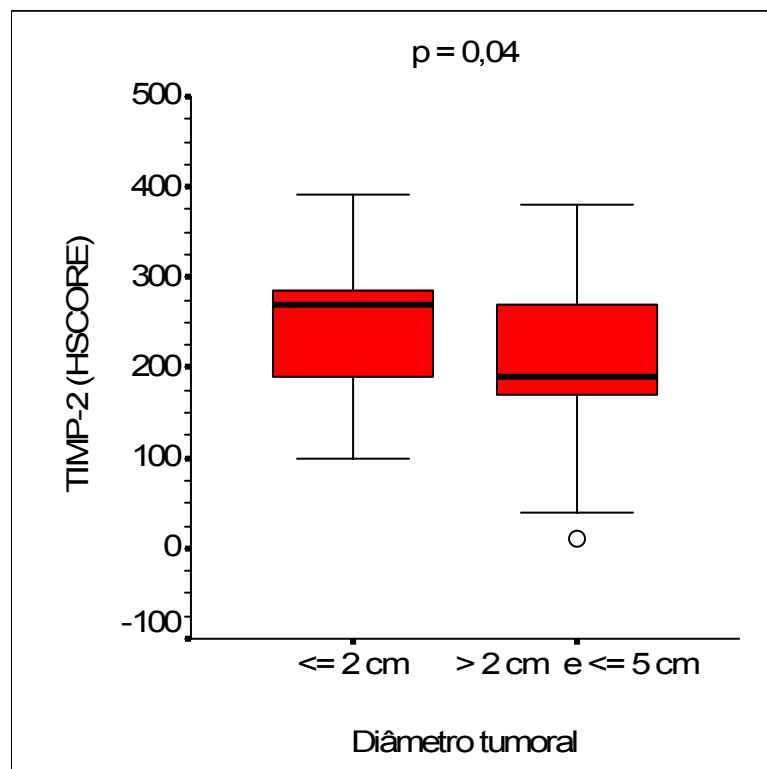


Figura 22: Correlação entre a expressão do TIMP-2 e o diâmetro tumoral. Tumores com diâmetro de 2 cm ou menos apresentaram correlação positiva com a alta expressão do TIMP-2; $p = 0,04$.

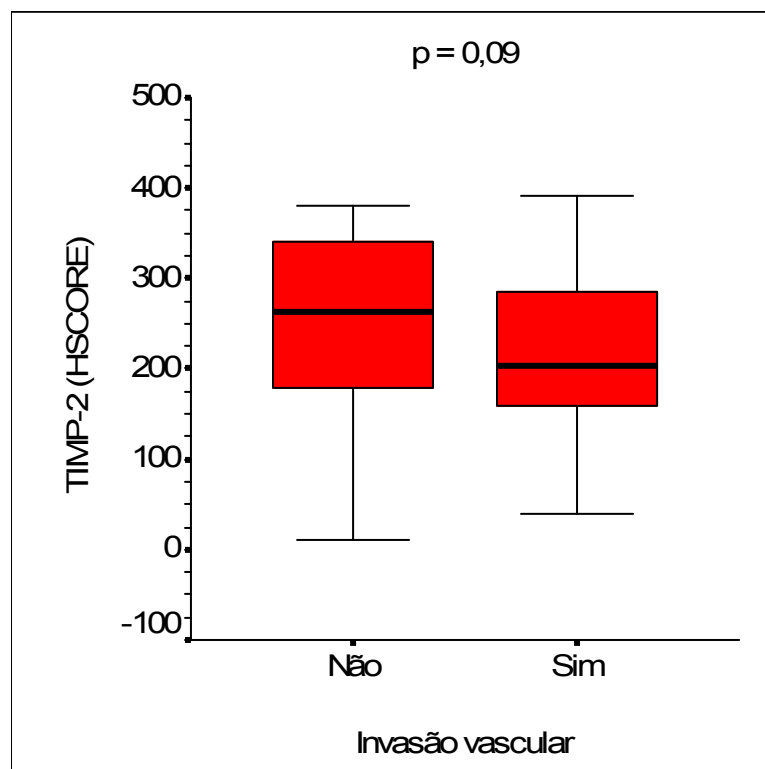


Figura 23: Correlação entre a expressão do TIMP-2 e a presença de invasão vascular. A baixa expressão do TIMP-2 apresentou uma tendência de correlação com presença de invasão vascular; $p= 0,09$.

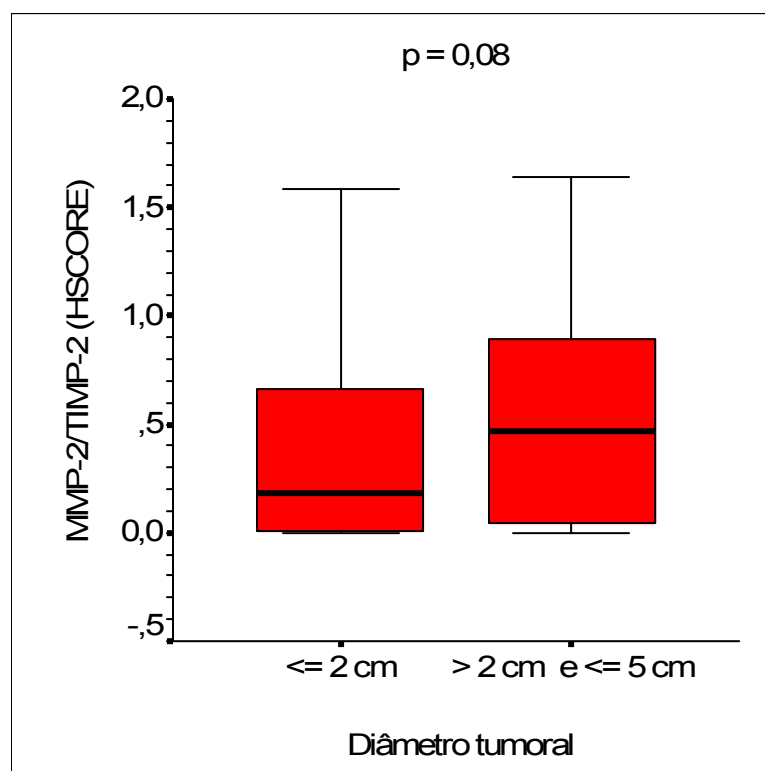


Figura 24: Correlação entre a razão MMP-2/TIMP-2 e o diâmetro tumoral. Maior razão MMP-2/TIMP-2 apresentou uma tendência de correlação com tumores maiores; $p= 0,08$.

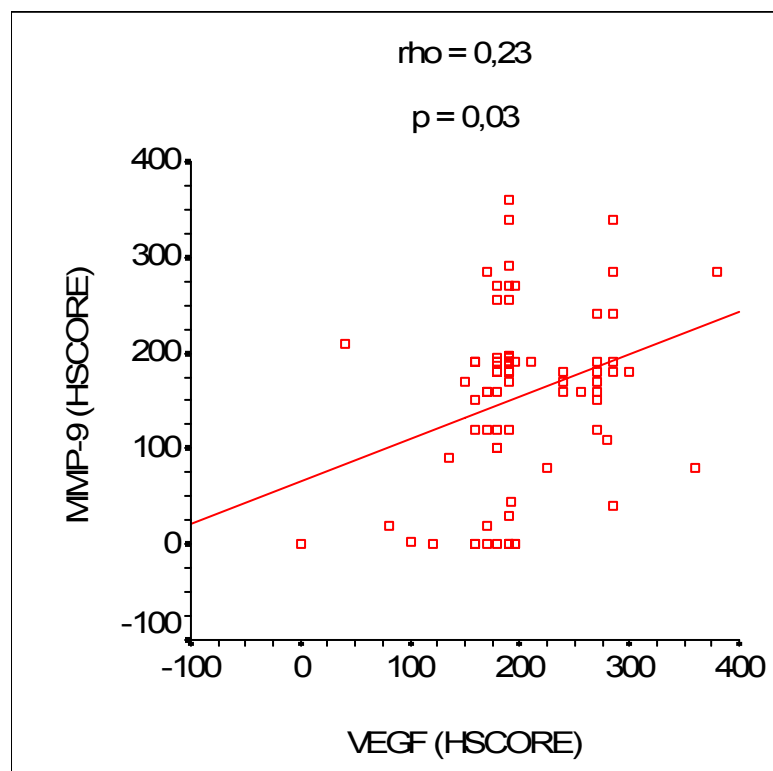


Figura 25: Correlação entre a expressão do VEGF e da MMP-9. Altas taxas de VEGF apresentaram uma correlação positiva com o aumento da expressão da MMP-9; $p = 0,03$.

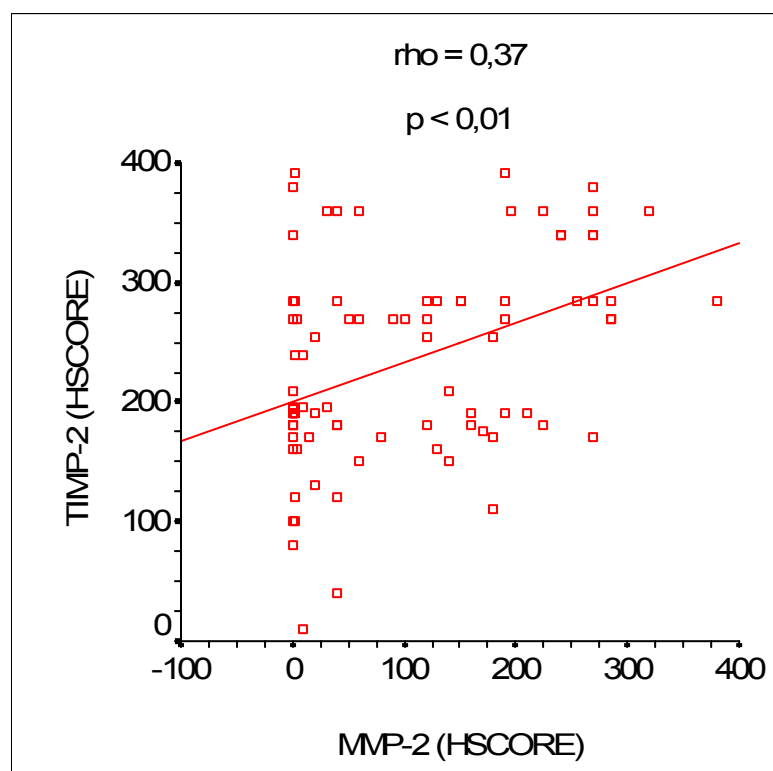


Figura 26: Correlação entre a expressão da MMP-2 e do TIMP-2. Altas taxas de MMP-2 apresentaram uma correlação positiva com o aumento da expressão do TIMP-2; $p < 0,01$.

ANEXO III - PROTOCOLOS DE COLETA DE DADOS

PROTOCOLO 1. Coleta de dados gerais.....	90
PROTOCOLO 2. Coleta de dados da análise imunohistoquímica.....	91

PROTOCOLO 1. Coleta de dados gerais

Nome:.....

N° 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:.....	N° 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	4: outros	////////////////////
Expressão Her-2	1: +/-neg.	2: ++/pos.	3: +++/pos.	4. indisponível	////////////////////
Expressão Ki-67	1: ≤ 10%	2: <10 ≤25%	3: > 25%	4. indisponível	////////////////////
Expressão p53	1: neg.	2: fraco +	3: forte +	4. indisponível	////////////////////
Receptor estrogênio	0: neg.	1: +	2: ++	3:+++	4: indisponível
Receptor progesterona	0: neg.	1: +	2: ++	3: +++	4: indisponível

PROTOCOLO 2. Coleta de dados da análise imunohistoquímica

	Número Prontuário	Nome Paciente	Registro Patologia	VEGF exp. %	VEGF cor (+)	MMP-2 exp. %	MMP-2 cor (+)	MMP-9 exp. %	MMP-9 cor (+)	TIMP-1 exp. %	TIMP-1 cor (+)	TIMP-2 exp. %	TIMP-2 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.