

FLAVIO CABREIRA JOBIM¹

GILBERTO SCHWARTSMANN²

NILTON LEITE XAVIER³

DIEGO DE MENDONÇA UCHOA⁴

MARCIO SACILOTO⁵

NATÁLIA CHEMELLO⁶

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

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

Artigos originais

Palavras-chave

Neoplasias mamárias
Metaloproteínase 9 da matriz/análise
Fator A de crescimento do endotélio vascular/análise
Imunohistoquímica
Prognóstico

Keywords

Breast neoplasms
Matrix metalloproteinase 9/analysis
Vascular endothelial growth factor A/
analysis
Immunohistochemistry
Prognosis

Resumo

OBJETIVO: analisar a expressão da metaloproteínase da matriz 9 (MMP-9) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em um grupo de pacientes com câncer primário de mama, e correlacioná-los entre si e com outros indicadores de prognóstico. **MÉTODOS:** estudo transversal que analisou a expressão da MMP-9 e do VEGF em 88 casos consecutivos de tumores primários de mama. As amostras foram obtidas de pacientes portadoras de câncer primário de mama, submetidas a tratamento cirúrgico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2004. A técnica de imuno-histoquímica, usando o complexo avidina-biotina-peroxidase, foi aplicada para avaliar a imunoreação dos antígenos nos tumores. A expressão qualitativa das proteínas foi avaliada por meio da observação da intensidade da coloração acastanhada dos anticorpos no citoplasma das células malignas, considerando positiva quando pelo menos uma célula tumoral apresentava coloração nítida e inequívoca para cada um destes marcadores. Para a determinação do escore qualitativo (0=ausente, 1=fraca, 2=média e 3=forte), foi considerada a intensidade da coloração citoplasmática mais forte na lâmina, independente do número de células coradas. A expressão quantitativa foi determinada pela percentagem média de células coradas, observadas em pelo menos dez campos microscópicos. A quantificação final da expressão da MMP-9 e do VEGF foi feita por meio da aplicação do algoritmo HSCORE= $\sum[(I+1)] \times PC$, no qual I e PC representam a intensidade da coloração e a percentagem das células coradas, respectivamente. **RESULTADOS:** a MMP-9 e o VEGF apresentaram alto percentual de positividade nos tumores estudados. A expressão final mostrou escore mediano de 180 e 190, respectivamente. Quando se comparou a expressão da MMP-9 e do VEGF com as variáveis "idade", "diâmetro tumoral", "tipo histológico", "grau histológico", "linfonodo axilar" e "invasão vascular", não foi encontrada nenhuma correlação significativa. Comparadas entre si, a MMP-9 e o VEGF apresentaram uma correlação significativa ($\rho=0,23$; $p=0,03$). A positividade do linfonodo axilar apresentou uma correlação positiva com o maior diâmetro tumoral ($2,7 \pm 1,1$ cm; $p < 0,01$) e com a presença de invasão vascular (84,1%; $p < 0,01$). **CONCLUSÕES:** os resultados encontrados não mostraram correlação entre a expressão da MMP-9 e do VEGF com os indicadores de prognóstico selecionados, mas uma correlação significativa quando correlacionados entre si.

Abstract

PURPOSE: to analyze the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a group of patients with primary breast cancer, and correlate them to one another and with other prognostic indicators. **METHODS:** transversal study that has analyzed the expression of MMP-9 and of VEGF in 88 consecutive cases of primary breast tumors. The samples were obtained from patients with primary breast cancer, submitted to surgical treatment in the Clinical Hospital of Porto Alegre of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, from January 2000 to December 2004. An immunohistochemical technique has been applied, using the avidin-biotin-peroxidase complex to evaluate the antigen immunoreactions in the tumors. The qualitative expression of proteins has been assessed through the observation of the brownish stain intensity of antibodies in the cytoplasm of malignant cells, when at least one of the tumoral cells presented clear and unequivocal staining with each of those markers. To determine

Correspondência:

Flavio Cabreira Jobim
Avenida Nossa Senhora das Dores, 2.270/1.101
CEP 97050-530 – Santa Maria/RS
E-mail: jobim.f@gmail.com e 00140844@ufrgs.br

Recebido

30/4/2008

Aceito com modificações

25/6/2008

Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

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

¹ Pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre, Brasil; Professor Auxiliar do Curso de Medicina da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria (RS), Brasil.

² Professor do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

³ Professor Pesquisador do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA – Porto Alegre (RS), Brasil; Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

⁴ Patologista do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA – Porto Alegre (RS), Brasil.

⁵ Residente do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM – Santa Maria (RS), Brasil.

⁶ Acadêmica do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

the qualitative score (0=absent, 1=weak, 2=average and 3=strong), the stronger cytoplasmatic staining intensity on the glass slide has been taken into consideration, independently of the stained cells. The quantitative expression was determined by the average percentage of stained cells, observed in at least ten microscopic fields. The MMP-9 and VEGF final quantification expression has been done by the application of the $HSCORE = \sum[(I+1)] \times PC$, where I and PC represent the staining intensity and the percentage of stained cells, respectively. **RESULTS:** MMP-9 and VEGF presented a significant correlation in the tumors studied. The final expression has shown a median score of 180 and 190, respectively. When MMP-9 and VEGF expression were compared with the variables "age", "tumoral diameter", "histological type", "histological grade", "axillary lymph node" and "vascular invasion", it was impossible to find any significant correlation. Compared to one another, MMP-9 and VEGF have presented a positive correlation ($\rho=0.23$; $p=0.03$). The axillary lymph node positivity has presented a positive correlation with the larger tumoral diameter (2.7 ± 1.1 cm; $p<0.01$) and with the presence of vascular invasion (84.1%; $p<0.01$). **CONCLUSIONS:** The present results do not show correlation between the MMP-9 and VEGF with the selected prognostic indicators, but shown a significant correlation between one another.

Introdução

A interação entre as células tumorais e o estroma é uma condição vital para o crescimento do tumor, invasão celular e metastatização. Este processo envolve fatores de crescimento, moléculas de adesão, estímulos angiogênicos, fatores de coagulação e proteínases. As metaloproteínases da matriz (MMPs), especialmente a MMP-2 e a MMP-9, são responsáveis pela degradação dos elementos constituintes da membrana basal e da matriz extracelular¹⁻³.

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

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

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

As MMPs são produzidas por vários tipos de células, incluindo os queratócitos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, algumas células sinoviais e uma variedade de células malignas^{2,7,8}. A expressão gênica das metaloproteínases pode ser estimulada pela interleucina-1, pelo fator de crescimento epidérmico, pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e pelo fator alfa de necrose tumoral³. As MMPs degradam a membrana basal e a maioria dos componentes da matriz extracelular, como colágeno, laminina, fibronectina e elastina, que são barreiras normais para a migração das células e invasão

vascular^{7,9}. Além disto, interagem com as moléculas de adesão celular, como a laminina-5 e a e-caderina, alterando a adesão entre as células tumorais e facilitando o movimento destas através da matriz extracelular².

A MMP-9 (92-kDa, gelatinase B) é uma importante colagenase que contribui para a digestão do colágeno tipo IV e dos componentes primários da membrana basal. O processo de proteólise é importante em todos os estágios do câncer de mama. As colagenases clivam o colágeno sob condições fisiológicas, cortando a hélice tripla em dois fragmentos desiguais, que são susceptíveis à digestão de outras proteínas⁹⁻¹¹.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um potente e seletivo fator mitogênico para o endotélio. Ele produz uma rápida e completa resposta angiogênica e um aumento da permeabilidade capilar. Produzido e secretado por uma série de células normais, ele tem expressão marcada em células tumorais, incluindo o câncer de mama^{12,13}. Pertence a uma família das glicoproteínas, que inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário. O principal mediador da angiogênese tumoral é o VEGF-A, usualmente referido como VEGF¹²⁻¹⁴.

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

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

O câncer de mama é uma doença biologicamente heterogênea e, no seu curso clínico, pode se apresentar de forma indolente, com evolução lenta, ou de forma rápida, agressiva, com metástases precoces¹⁸. Fatores como o diâmetro tumoral, estado dos linfonodos axilares e receptores hormonais são bem conhecidos e usados para determinar o fenótipo dos tumores e estabelecer um perfil prognóstico para o tratamento. Entretanto, é importante estabelecer fatores prognósticos e preditivos, especialmente nos casos com linfonodos negativos, que possam selecionar pacientes com prognóstico diferente, aos quais é possível oferecer uma terapia mais específica e eficaz.

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

Métodos

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

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

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

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

O objetivo primário foi analisar a expressão da metaloproteinase da MMP-9 e do fator de VEGF em um grupo de pacientes com câncer primário de mama, e correlacioná-los entre si e com as seguintes variáveis: metástases em linfonodos

axilares, categorizado em positivos ou negativos; idade em anos, como variável contínua ou categorizada em duas faixas (<50 e ≥50); diâmetro tumoral em cm, como variável contínua ou categorizada em 1: ≤2,0 e 2: >2,0 e 3: ≤5,0; tipo histológico, 1: ductal e 2: lobular; grau histológico, classificado em G1: grau 1; G2: grau 2 e G3: grau 3; invasão vascular, categorizada em presente e ausente.

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

Para avaliar a expressão da MMP-9, foi empregado o anticorpo monoclonal de rato (NCL-MMP9-439, clone 15W2) da Novocastra Laboratories Ltd.™ (Benton Lane, UK), na diluição de 1:40, usando como controle externo positivo tecido normal de fígado. Para avaliar a expressão do VEGF, foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho anti-fator de crescimento endotelial vascular humano da Signet's USA™ Ultra Streptavidin Detection, na diluição 1:30, usando como controle externo amostra de tumor de mama positivo para a expressão do VEGF.

Os cortes de parafina foram seccionados na espessura de 3 µ e dispostos em lâminas previamente tratadas com o aderente poli-D-lisina. A seguir, foi feita desparafinização em xilol e rehidratação em álcool 100%. Para realizar o bloqueio da peroxidase endógena, foram lavadas em água corrente e destilada e incubadas em PBS por três vezes durante cinco minutos. A recuperação antigênica foi realizada com tampão de citrato pH6 em forno de microondas por 20 minutos, a 90°C, com descanso das lâminas por mais 20 minutos dentro do forno. Retiradas do forno, as lâminas foram deixadas por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas novamente em água corrente e destilada, e incubadas em PBS. Após aplicação de peróxido de hidrogênio 5%, foram outra vez lavadas e incubadas em PBS. Os cortes foram circulados com caneta Dako Pen (Dako Lab. Inc. ®, New York, NY, USA) e adicionado o anticorpo primário, deixando em câmara úmida (EasyPath®, Erviagas) durante a noite, na geladeira. As lâminas foram retiradas da geladeira, lavadas com água destilada e foi adicionado o anticorpo secundário LSAB (avidina biotina, frasco 1, amarelo, DakoCytomation™), e colocado em câmara úmida por 30 minutos. Após incubação

no PBS, repetiu-se o procedimento, adicionando o LSAB (estreptavidina peroxidase, DakoCytomation™). A reação foi revelada com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™), até os cortes ficarem escuros (± 30 segundos) e contra-corada com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após lavagem em água corrente e aplicação de amônia a 2%, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente, álcool 100% e xilol para serem montadas.

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

A definição de positividade para os marcadores VEGF e MMP-9 foi determinada pela presença de pelo menos

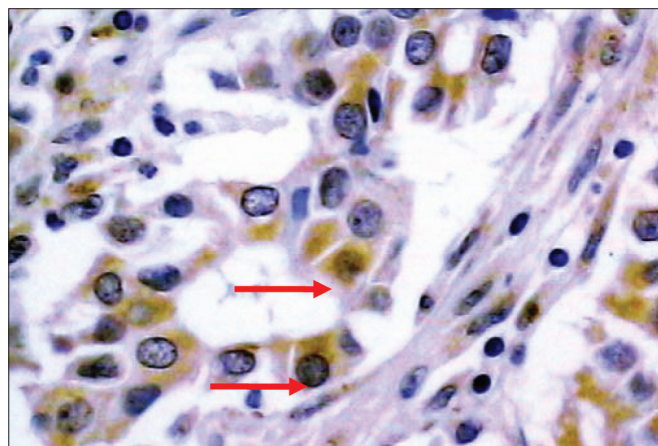


Figura 1 - Imuno-histoquímica para metaloproteinase 9 em carcinoma ductal da mama; Magnificação 400X. As setas mostram a imunoreação positiva no citoplasma das células neoplásicas.

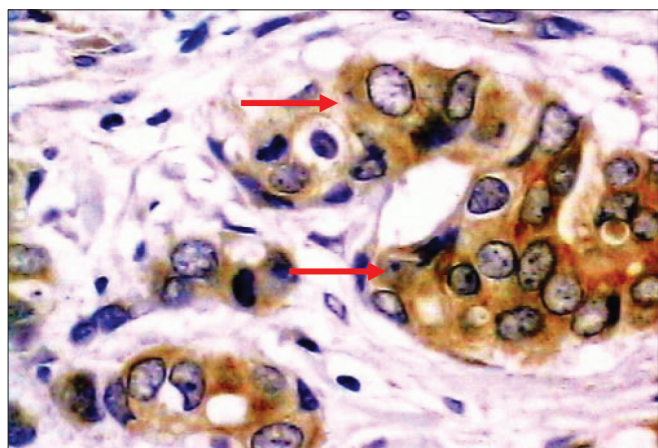


Figura 2 - Imuno-histoquímica do fator de crescimento endotelial vascular em tumor da mama. Magnificação 400X. As setas mostram a imunoreação positiva no citoplasma das células neoplásicas.

uma célula tumoral com coloração citoplasmática acastanhada nítida e inequívoca para cada um destes marcadores, independente da intensidade da coloração.

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

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

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

A análise estatística dos dados coletados foi feita por meio do programa estatístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 11. As variáveis contínuas com distribuição simétrica, idade e diâmetro tumoral, foram analisadas pelo teste *t*, e os dados apresentados como média \pm desvio padrão (dp). O teste do χ^2 de Pearson foi usado para analisar as variáveis categóricas: tipo histológico, grau histológico e invasão vascular. A expressão do VEGF e da MMP-9, por ter distribuição assimétrica, foi analisada pelos testes não paramétricos U de Mann-Whitney e H de Kruskal-Wallis, e os dados apresentados como mediana e amplitude interquartil (p25 a p75). O intervalo de confiança foi fixado em 95% (IC95%) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

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

Resultados

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

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

Analisando a intensidade da coloração no citoplasma das células neoplásicas, a expressão qualitativa da MMP-9 ficou assim distribuída: a coloração fraca estava

presente em 60 casos (68,2%); a coloração média, em 14 (15,9%); a coloração forte, em três (3,4%); e 11 (25%) casos não apresentaram nenhuma coloração. O VEGF apresentou coloração fraca em 60 casos (68,2%), coloração média em 22 (25%) casos, coloração forte em cinco (5,7%) e apenas um caso não apresentou nenhuma coloração.

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

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

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

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

Testes estatísticos: ^ateste t; ^bχ² de Pearson; ^cteste U de Mann-Whitney.

p<0,05.

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

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

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

Testes estatísticos: ^ateste U de Mann-Whitney e ^bteste H de Kruskal-Wallis.

p<0,05.

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

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

Discussão

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

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

Quando se comparou a expressão dos fatores MMP-9 e VEGF nos tumores de mama com os linfonodos axilares negativos e positivos, não foi encontrada nenhuma correlação entre eles. Entretanto, outros autores mostraram correlação positiva significativa entre estes fatores e a presença de metástases nos linfonodos axilares^{25,27}. Estes dados, considerando apenas a MMP-9, estão de acordo com os encontrados em um estudo de 210 casos de câncer de mama, usando a mesma técnica empregada neste estudo²⁰.

Um estudo com técnicas de imuno-histoquímica em 76 amostras de tumor invasivo de mama mostrou que a co-expressão do VEGF e MMP-9 estava associada à positividade do linfonodo axilar. Isto pode ser devido à estimulação do VEGF pela MMP-9, facilitando a migração e a proliferação das células endoteliais, resultando em angiogênese²⁵.

Em relação às demais variáveis, como idade, diâmetro tumoral, grau histológico e invasão vascular, também não foi encontrada nenhuma correlação destas

com a expressão da MMP-9 e do VEGF. Estes resultados estão de acordo com outras publicações que também não encontraram correlação destas variáveis com a expressão dos fatores em estudo^{25,26}.

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

Outros estudos usando a técnica de imuno-histoquímica em câncer de mama, também mostraram associação do VEGF e da MMP-9 com o alto grau histológico²⁴ e da MMP-9 com o grau histológico, diâmetro tumoral e a sobrevida livre de doença. Não houve associação significativa com a sobrevida global²⁷.

Publicações usando a técnica de ELISA (do inglês Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) também revelam dados discordantes, desde nenhuma associação entre a MMP-9 e os linfonodos axilares, diâmetro tumoral e grau histológico²⁸, até alto nível de associações com pior sobrevida²⁹, ou, finalmente, apenas correlação positiva entre MMP-9 e o diâmetro tumoral¹⁹.

Encontrou-se correlação significativa dos fatores MMP-9 e VEGF quando comparados entre si ($\rho=0,23$ e $p=0,03$). Na literatura há relato³⁰ da atividade proteolítica das metaloproteinases e a capacidade de ativarem os fatores angiogênicos, entre eles o VEGF, envolvidos no crescimento tumoral, angiogênese e metástases. Outros¹² sugerem que o VEGF pode ter sua produção influenciada por altos níveis de metaloproteinases, sendo que a MMP-9 merece mais atenção. Entretanto, os fatores angiogênicos podem induzir a expressão das MMPs no endotélio e no estroma celular³ e, por outro lado, as MMPs podem aumentar a biodisponibilidade destes fatores para seus receptores, o que foi confirmado em estudo de carcinogênese em ilhotas pancreáticas de ratos transgênicos^{31,32}.

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

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

Referências

1. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*. 1993;71(4):1368-83.
2. 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.
3. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005;9(2):267-85.
4. Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg*. 2007;42(1):1-11.
5. Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;50(2):97-116.
6. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist*. 2001;6(5):415-27.
7. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
8. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999;13(8):781-92.
9. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*. 2000;2(4):252-7.
10. Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res*. 2005;65(8):3193-9.
11. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
12. Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2003;5(3):140-6.
13. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(4):309-14.
14. Lococo N, Fanelli M, Gasparini G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):159-73.
15. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*. 2000;5 Suppl 1:37-44.
16. Giannelli G, Erriquez R, Fransvea E, Daniele A, Trerotoli P, Schiattulli F, et al. Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2004;109(5):782-5.
17. Bartsch JE, Staren ED, Appert HE. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res*. 2003;110(2):383-92.
18. Byers S, Park M, Sommers C, Seslar S. Breast carcinoma: a collective disorder. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;31(2-3):203-15.
19. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):499-510.
20. Scorilas A, Karameris A, Arngiannaki 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.
21. Garbett EA, Reed MW, Stephenson TJ, Brown NJ. Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol*. 2000;53(2):99-106.
22. Mylona E, Nomikos A, Magkou C, Kamberou M, Papassideri I, Keramopoulos A, et al. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. *Histopathology*. 2007;50(3):338-47.
23. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004;10(22):7621-8.
24. Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol*. 2002;55(5):300-4.
25. Hao L, Zhang C, Qiu Y, Wang L, Luo Y, Jin M, et al. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Lett*. 2007;253(1):34-42.
26. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol*. 2005;18(1):143-52.
27. Kim HJ, Park CI, Park BW, Lee HD, Jung WH. Expression of MT1-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.
28. Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;88(1):75-85.
29. 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.
30. Zhao J, Yan F, Ju H, Tang J, Qin J. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett*. 2004;204(1):87-95.
31. Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(2):87-100.
32. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000;2(10):737-44.