

Fabiana Ribeiro do Vale

Fatores reguladores da angiogênese e infiltração
tumoral nos carcinomas mamários positivos para a
citoqueratina 5

Mestrado

Ribeirão Preto

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

**Fatores reguladores da angiogênese e
infiltração tumoral nos carcinomas mamários
positivos para a citoqueratina 5**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Departamento de Patologia da Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Patologia Humana

Fabiana Ribeiro do Vale

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva

Ribeirão Preto

2006

Quando você se lança numa jornada e o fim
parece cada vez mais distante, então você
percebe que o verdadeiro fim é o percurso

Emile Durkheim

Aos meus pais, **Silvia Ivani Pedrosa Ribeiro do Vale e Esmerino Joaquim Ribeiro do Vale**, pelo desprendimento, integridade e apoio que possibilitaram o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Às minhas irmãs **Adriana, Márcia, Heloisa e Marina** pelo incentivo e carinho constantes.

Ao meu amigo e namorado **Gustavo do Vale Elias** pelo incentivo em todos os momentos, pela compreensão e pelo amor compartilhado.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho

Agradeço ao meu Orientador, **Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva**, por ter acreditado no meu potencial;

Agradeço aos **Médicos Assistentes** do Serviço de Patologia os quais, através do convívio semanal, transformaram a rotina do trabalho em algo especial, estimulante e prazeroso;

Agradeço ao Prof. Dr. **Sérgio Zucoloto**, Chefe do Departamento de Patologia da FMRP/USP, ao Prof. Dr. **Roberto Silva Costa**, Coordenador do Serviço de Patologia do HCFMRP/USP, e ao Dr. **Daniel Ferracioli Brandão**, Diretor Técnico do Serviço de Patologia do HCFMRP/USP, por terem fornecido as condições necessárias para a realização do projeto;

Agradeço à histotécnica **Deisy Mara da Silva** pelo suporte técnico na realização do método imuno-histoquímico;

Agradeço aos arquivistas do Serviço de Patologia do HCFMRP/USP, **Décio Antônio Barrionovo Filho e César Alberto Brigato Júnior**, pela presteza em separar dos arquivos as lâminas e blocos de parafina utilizados no projeto;

Agradeço ao Prof. Dr. **Sérgio Britto Garcia**, coordenador do Programa de pós-graduação do Departamento de Patologia da FMRP/USP, e à secretária de pós-graduação do Departamento de Patologia da FMRP/USP, **Lucyara Tanasia Santana**, pelo apoio em todas as atividades acadêmicas relacionadas à pós-graduação;

Agradeço às secretárias do Departamento de Patologia da FMRP/USP, **Neide Terezinha Gonçalves e Rosângela Mazzucoto Castania de Paiva**, pela solicitude.

Este trabalho contou com apoio financeiro da

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP- Processo 03/02532-8)

Este trabalho foi premiado no

XXV Congresso Brasileiro de Patologia

realizado em Natal - RN, de 12 a 15 de outubro de 2005.

Este trabalho resultou na seguinte publicação

**Vascular endothelial growth factor expression
in the basal subtype of breast carcinoma**

Am J Clin Pathol. 2006; 125:512-8

Sumário

Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas	
Resumo	
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	
2.1 Subdivisão dos Carcinomas mamários	4
2.2 Carcinomas mamários positivos para a citoqueratina 5	7
2.3 Angiogênese tumoral	10
2.4 Fatores reguladores da infiltração tumoral	17
3. Objetivo	23
4. Material e método	
4.1 Casuística	26
4.2 Método imunoistoquímico	26
4.3 Análise estatística	29
5. Resultados	
5.1 Achados clínicos	31
5.2 Achados imunoistoquímicos	31
5.3 Carcinomas CK5-positivos	32
6. Discussão	42
7. Conclusões	48
8. Referências bibliográficas	50
9. Anexos	
A Protocolo de imunoistoquímica	57
B Soluções e tampões utilizados	60
Summary	

Lista de tabelas

Tab. 1	Porcentagem de tumor que expressam o VEGF e a sua correlação com fatores prognósticos.	13
--------	--	----

Tab. 2	Especificidade dos receptores ao ligante VEGF e seus efeitos biológicos.	15
Tab. 3	Anticorpos primários.	27
Tab. 4	Correlação entre a expressão de citoqueratina 5 com dados clínicos e patológicos.	35
Tab. 5	Correlação entre a expressão de citoqueratina 5 com a micro vasculatura peri-tumoral e os fatores reguladores da angiogênese e infiltração tumoral .	37

Lista de abreviaturas

BRCA-1: gene BRCA-1 responsável pela reparação do DNA;

CD34: marcador de células endoteliais;

C-erbB-2: produto do oncogene HER-2/neu;

CK5: citoqueratina 5;

CK7: citoqueratina 7;

CK8/18: citoqueratinas 8 e 18;

CK14: citoqueratina 14;

DAB: Diamino-benzidina;

DNA: Ácido desoxirribonucléico;

EGFR: Receptor do fator de crescimento epitelial;

EMMPRIN: Indutor das metaloproteinases;

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;

HCFMRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;

Ki-67: indicador de proliferação celular;

PAI: Inibidor do ativador do plasminogênio;

P53: gene supressor tumoral;

RE: Receptor de estrógeno;

RNA: Ácido ribonucléico;

RP: Receptor de progesterona;

TIMPs: Inibidores das metaloproteinases;

TIMP-1: Inibidor da metaloproteinase tipo 1;

TIMP-2: Inibidor da metaloproteinase tipo 2;

USP: Universidade de São Paulo;

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular;

VEGFR: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular.

Resumo

O reconhecimento de subtipos de carcinomas mamários baseados em suas características moleculares trouxe novas perspectivas na investigação do câncer de mama. Algumas proteínas chaves reguladoras da angiogênese e da infiltração tumoral foram avaliadas em carcinomas de mama de fenótipo basal (CK5+). Foi realizado estudo Imunoistoquímico com 14 anticorpos primários em 100 casos de carcinoma ductal. A positividade para citoqueratina 5 correlacionou-se com indicadores de mau prognóstico, incluindo idade precoce, alto grau histológico, linfonodos positivos, estágio patológico avançado, negatividade para receptores hormonais, e uma alta taxa de proliferação celular, avaliado pelo Ki67. A positividade para a CK5 também se correlacionou com a expressão do VEGF, mas não com a densidade da microvascularização. Considerando que a superexpressão de VEGF pelas células neoplásicas da mama leva a um aumento da atividade proliferativa *in vitro* independente de seu efeito angiogênico, a expressão diferencial do VEGF pode contribuir para o comportamento mais agressivo da neoplasia. Houve correlação do CK5 com TIMP1, mas não com MMP1, MMP2, EMMPRIN, TIMP2 and PAI, indicando que o estímulo antiproteolítico pode ser preponderante nesta neoplasia.

Summary

The recognition of subtypes of breast carcinomas based on their molecular features has brought new perspectives in breast cancer investigation. Some key regulators of angiogenesis and tumor infiltration were evaluated in breast carcinomas of basal-phenotype (CK5+). Immunohistochemistry with 14 primary antibodies was performed in 100 formalin-fixed paraffin-embedded samples of invasive ductal carcinomas. Cytokeratin 5 correlated with indicators of poor outcome, including precocious age, high histological grade, lymph node positivity, advanced pathological stage, negativity for hormonal receptors, and a high proliferative rate (Ki67 labeled index). CK5 also correlated with VEGF expression but not with the microvessel density. Considering that VEGF overexpressing neoplastic mammary cells display increased proliferative activity *in vitro* regardless its angiogenic effect, the differential expression of VEGF may contribute for the more aggressive behavior of these neoplasms. CK5 correlated with TIMP1, but not MMP1, MMP2, EMMPRIN, TIMP2 and PAI, indicating that anti-proteolytic stimuli may be preponderant in these neoplasms.

1 Introdução

De acordo com o perfil molecular, os carcinomas mamários esporádicos podem ser categorizados em pelo menos cinco subtipos: luminal A, luminal B, normal símile, basal e positivo para o ERBB2 (Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003; Nielsen et al., 2004). Há uma diferença altamente significativa na taxa de sobrevida total e sobrevida livre de doença entre estes subtipos, sendo que os subtipos basal e ERBB2+ estão associados a um pior prognóstico (Sorlie et al., 2001). O subtipo basal é caracterizado pela expressão de citoqueratinas de alto peso-molecular, como as citoqueratinas 5 e 17 (CK5 e CK17) (Sorlie 2001). De acordo com a literatura, cerca de 17 a 37% dos carcinomas mamários apresentam este fenótipo (West et al., 2001; vant Veer, 2002; Foulkes et al., 2004; Sorlie et al., 2003; Nielsen et al., 2004). O significado biológico da expressão de citoqueratinas de alto peso nos carcinomas mamários ainda não está totalmente bem estabelecido (Gusterson et al., 2005).

A progressão tumoral, caracterizada pela capacidade invasiva e pela propriedade de metastatizar, ocorre devido a uma interação complexa entre vários fatores produzidos pelo tumor e a resposta do hospedeiro. Este processo depende da formação de novos vasos (angiogênese tumoral) (Sauer e Deissler, 2003). O principal estímulo para a angiogênese é a interação entre o fator de crescimento endotelial (VEGF) e seu receptor (Jin et al., 2005).

Para que os vasos neoformados infiltrem o estroma, as células tumorais devem produzir algumas proteinases, nas quais distingui-se a cathepsina D, o fator ativador do plasminogênio e as metaloproteinases 1, 2, 3 e 9 (Baker et al., 2002). Além disso, há evidências que estas proteinases são ativadas por uma glicoproteína de superfície celular conhecida como indutor da metaloproteinase da matriz extracelular (EMMPRIN) (Caudroy et al., 2002; Yan et al., 2005). Em adição a estas proteinases,

células tumorais também podem produzir proteínas inibidoras, incluindo os inibidores das metaloproteinases (TIMPs) e o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI) (Schneider et al., 2003). A habilidade dos vasos neoformados infiltrarem os tecidos depende do predomínio das proteinases ou seus inibidores.

O papel da angiogênese e sua interação com as proteinases e seus inibidores nos carcinomas mamários positivos para a citoqueratina cinco (CK5) ainda é desconhecida. Assim, o presente estudo tem por finalidade investigar a relação entre a expressão da citoqueratina 5 com os principais fatores reguladores da angiogênese e infiltração tumoral nos carcinomas mamários humanos, e comparar estes dados com características clínico-patológicas de significado prognóstico.

2 Revisão da Literatura

2.1 Subdivisão dos Carcinomas mamários

Os tumores mamários humanos apresentam uma grande diversidade em sua história natural, em seu fenótipo e na sua resposta aos tratamentos. Esta diversidade pode ser mais bem compreendida na medida em que os fatores prognósticos atualmente identificados e utilizados não permitem prever efetivamente o curso clínico de cada indivíduo. Embora muitos esforços têm sido empregados na tentativa de melhor elucidar a diversidade destes tumores, bem como alcançar novos fatores prognósticos, a biologia dos carcinomas mamários permanece pouco compreendida. Em 2000, Perou e colaboradores propuseram que a diversidade fenotípica se correlacionava com a diversidade da expressão genética. Baseado neste princípio, o estudo inicial contando com 65 espécimes de neoplasias mamárias de 42 diferentes pacientes utilizou a técnica de micro-arranjos de DNA (“DNA microarrays”) a fim de avaliar a expressão gênica destas neoplasias. Através desta técnica, foram analisados simultaneamente 8.102 genes humanos. Os resultados apontaram similaridades e diferenças entre os tumores, levando a subclassificação dos carcinomas mamários humanos em subgrupos (Perou et al., 2000). Posteriormente, o estudo foi ampliado e a classificação baseada no padrão de expressão gênica foi estabelecida em: tumores luminal A, tumores luminal B, tumores de fenótipo basal, tumores ERBB2 positivos e tumores semelhantes ao tecido mamário normal (Sorlie et al., 2001).

Os tumores do tipo epitelial luminal A compõem o maior subgrupo. Este grupo demonstra alta expressão de receptores de estrógeno (RE), e genes considerados luminais como a proteína reguladora de estrógeno LIV-1, fatores de transcrição nuclear, alfa-HNF3A, fator hepatocitário, XBP1 e GATA3.

O segundo subgrupo do subtipo luminal B mostra de baixa a moderada expressão desses genes luminais incluindo os RE, diferindo do subtipo A pela alta expressão de um novo conjunto de genes tais como GCH, LAPTMB4, NSEP1 e CCNE1, cujas funções são desconhecidas. Embora os subtipos luminal A e luminal B expressem RE, eles apresentam comportamentos diferentes. O subgrupo B representa um grupo distinto do ponto de vista clínico porque pode apresentar comportamento mais agressivo e pior prognóstico. Mais importante ainda, este subtipo representa um grupo de pacientes que não irão se beneficiar com o tratamento adjuvante com tamoxifeno mesmo quando o tumor for positivo para RE. Este comportamento adverso do subgrupo B pode ser devido a expressão de alguns genes que também são expressos nos subgrupos de pior prognóstico, ERBB2+ e basal (Sorlie, T, 2003).

O subtipo basal é caracterizado pela alta expressão de KRT5 e KRT17, annexin 8, CX3CL1 e TRIM29. Geralmente são negativos para genes luminais e não expressam RE. O subtipo ERBB2+ foi caracterizado pela alta expressão de vários genes amplificados, incluindo ERBB2, GRB7 e TRAP100. O subgrupo de tecido mamário normal símile mostrou a mais alta expressão de muitos genes que são expressos no tecido adiposo e outros tipos de células não epiteliais. Estes tumores também mostraram forte expressão de genes epiteliais basais e baixa expressão de genes epiteliais luminais (Sorlie et al., 2003).

Os diferentes grupos apresentam diferenças estatisticamente significantes quanto à taxa de sobrevida. Especialmente os subtipos basal e ERBB2+, que estão associados com um menor tempo de sobrevida (Sorlie et al., 2004).

Quanto à expressão de genes responsáveis pela proliferação celular nos diferentes subgrupos, foram pesquisados vários genes, inclusive aqueles que codificam proteínas rotineiramente identificadas pelo exame de imunohistoquímico, como o Ki-67 e o PCNA. Os subgrupos que mais expressam genes associados à proliferação são o basal e o luminal B. Os subgrupos luminal A e mama normal símile expressam taxas similares desses genes. Paradoxalmente, o subgrupo ERBB2+ geralmente é negativo para este grupo de genes (Sorlie et al., 2004).

Outro fator importante é a expressão do gene TP53, cujo significado é direcionar a resposta celular aos danos genotóxicos e induzir apoptose, quando a reparação do dano não é possível. Mutações no TP53 estão relacionados a pior prognóstico e má resposta à terapia sistêmica. Comparativamente, há maior número de tumores com mutações do TP53 nos subgrupos luminal B, ERBB2+ e basal em relação ao subgrupo luminal A (Sorlie et al., 2003).

Através destes estudos, foi possível concluir que a principal distinção entre os tumores do ponto de vista da expressão gênica foi a expressão ou não de genes característicos das células epiteliais luminais. Dentre estes genes destacam-se os receptores de estrógeno. É possível concluir também que cada tumor é singular e tem uma distinta expressão genética, ou seja, seu perfil genético, e que através de um número relativamente pequeno de genes pode-se verificar a variação de expressão entre os tumores e então classificá-los e identifica-los para melhor conduta terapêutica.

2.2 Carcinomas mamários positivos para a citoqueratina 5

O conhecimento do tecido mamário normal pode ajudar no entendimento do desenvolvimento da sua contra partida maligna. O desenvolvimento da glândula mamária ocorre de forma organizada e hierarquicamente controlada através de uma única célula indiferenciada que se torna progressivamente mais restrita em sua habilidade proliferativa e em suas opções de diferenciação para diferentes linhagens. Esta célula mãe é denominada “célula tronco” porque sustenta as outras linhagens celulares por ela derivada. Esta definição é aplicável a todas as células tronco, porém o papel de cada célula tronco depende do seu tecido de origem, do estágio da morfogênese (embriogênese, puberdade ou pós-puberdade) e o tipo de dinâmica requerido para manter a funcionalidade do tecido. Assim, na mama, a função da célula tronco é manter a estrutura ducto-alveolar conforme o estágio de vida do indivíduo (Chepko et al., 1999).

Basicamente três tipos de células epiteliais mamárias progenitoras oriundas de células tronco podem ser identificadas no tecido mamário (Sting et al., 2005). A primeira célula progenitora está restrita à linhagem luminal. Assim, estas células produzem clones de células que mostram positividade apenas para marcadores de células luminiais, como as citoqueratinas 8/18 e 19; a molécula de adesão de célula epitelial (EpCAM) e a MUC1. O segundo tipo é um progenitor capaz de produzir colônias mistas. Estas colônias contêm um eixo central de células expressando marcadores luminiais envoltas por células com morfologia e expressão de marcadores característicos de células mioepiteliais (citoqueratina 14). O terceiro tipo é restrito às células mioepiteliais, pois somente produzem células com características de células

mioepiteliais. O papel destas células progenitoras é gerar e manter a estrutura tridimensional túbulo-alveolar da glândula mamária (Sting et al., 2005).

Com o advento do método imunistoquímico, anticorpos específicos para diferentes tipos de citoqueratina (CK) foram desenvolvidos e observou-se que as células basais de vários epitélios glandulares são positivas para as citoqueratinas 5 e 14 (citoqueratinas de alto peso molecular). Assim, na maioria dos tecidos, a nomenclatura de células basais é definida com a posição basal celular e expressão de citoqueratinas “basais”. O termo basal então se tornou sinônimo de expressão para as citoqueratinas 5 e 14. Em 1982, Moll e colaboradores, passaram a denominar como células basais a uma população de células que expressavam citoqueratina de alto peso molecular (Moll et al., 1982).

Na glândula mamária a expressão das CKs 5 e 14 não está limitada às células mioepiteliais. Portanto, na mama, a expressão destas citoqueratinas pode definir uma população de células mioepiteliais ou uma subpopulação específica de células que apresentam estes filamentos intermediários intracitoplasmáticos estando localizadas tanto na porção luminal como mioepitelial.

A partir da 28ª semana de vida intra-uterina é possível identificar dois tipos de população celular no tecido mamário: células luminais e células basais. Esta distribuição ocorre por toda a glândula mamária, desde o mamilo até o alvéolo terminal (Gusterson, et al., 2005). As células basais apresentam um padrão morfológico variável de acordo com sua disposição na estrutura ramificada dos ductos, bem como pelo status hormonal do tecido. Podem ser fusiformes ou cuboidais, conforme a ação hormonal. Estas células são caracterizadas pela expressão de actina de músculo liso, miosina e CD10. Apresentam características

tanto de células epiteliais quanto de célula mioepiteliais, inclusive com atividade contráctil (Gusterson, et al., 2005).

Em 2002, Böcker e colaboradores verificaram a existência de uma população de células na glândula mamária que são positivas para citoqueratina 5 (CK5) e negativas para actina de músculo liso e para as citoqueratinas 6, 18 e 19 (Böcker et al., 2002). Estas células positivas para CK5 se diferenciam tanto para células CK8/18/19 positivas quanto para células actina muscular-positivas, ambas negativas para CK5. Nesse processo de diferenciação, existe um estágio intermediário em que as células co-expressam CK5 com actina muscular e CK8/18/19. Estes dados sugerem que as células CK5 positivas representem uma população de células tronca do tecido mamário (Böcker et al., 2002).

Da mesma forma que a glândula mamária normal exhibe células positivas para CK5, notou-se a presença de um subgrupo de carcinomas mamários que apresentam positividade para citoqueratina de alto peso molecular incluindo as citoqueratinas 5, 14 e 17, embora, a grande maioria dos carcinomas mamária é positiva para CK 8/18/19, demonstrando um fenótipo puramente luminal. O pequeno grupo de carcinomas que expressa citoceratina 5 corresponde a cerca de 4 a 16% dos casos (Abd El-Rehim et al., 2004).

Estes carcinomas CK5 positivos apresentam comportamento mais agressivo, menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença do que os carcinomas que expressam as CKs 8/18/19. Tal fato pode ser decorrente de uma maior indiferenciação celular (Korsching et al., 2002; Van de Rijn et al., 2002). Caracteristicamente, são tumores que exibem negatividade para receptor de

estrógeno, progesterona e HER2. Estes tumores também estão relacionados a um maior acometimento linfonodal.

Para reconhecimento deste grupo de tumores, podem-se utilizar alguns marcadores imunoistoquímicos. Nielsen e colaboradores observaram que, utilizando o método imunoistoquímico, estes tumores são negativos para receptor de estrógeno, progesterona e HER-2, e positivos para citoqueratinas 5/6 e EGFR. Este método tem sensibilidade de 76% e especificidade de 100% para o reconhecimento de carcinomas do subgrupo basal (Nielsen et al., 2004).

Os mecanismos genéticos e moleculares que fazem com que as células tronco CK5 positivas sofram transformação neoplásica ao invés de se diferenciarem para células ductais ainda permanecem desconhecidos.

2.3 Angiogênese tumoral

A progressão tumoral seguida de invasão das estruturas adjacentes e formação de metástases ocorre devido a uma complexa interação entre fatores produzidos pelo tumor e a resposta do hospedeiro, em um processo dependente da formação de novos vasos sanguíneos (neovascularização) (Sauer e Deissler, 2003). A neovascularização é, portanto, definida como a formação de novos vasos sanguíneos oriundos de uma vascularização pré-existente. Este fenômeno está relacionado tanto a processos fisiológicos quanto neoplásicos (angiogênese tumoral) (Ludovini et al., 2003).

A angiogênese tumoral é um fenômeno complexo e indispensável para o crescimento e invasão tumoral e se desenvolve através de uma cascata biológica de eventos que envolvem tanto fatores inibidores como estimuladores. A angiogênese

tem, como agente estimulador e iniciador, algumas citocinas que são produzidas por diferentes tipos celulares incluindo células tumorais, células estromais e células inflamatórias. Dentre estes fatores, o VEGF (fator de crescimento endotelial) é o principal estimulador da angiogênese (Ludovini et al., 2003).

O VEGF, também chamado de VEGF-A ou vasculotropina, é uma proteína básica dimérica glicosilada que pesa de 34 a 42kDa e que é codificada por um gene localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.1) (Ludovini et al., 2003). O VEGF tem múltiplas isoformas, as quais possuem propriedades distintas e que afetam a disponibilidade e função sinalizadora da angiogênese diferentemente. As principais isoformas incluem o VEGF-B, o VEGF-C, o VEGF-D e o VEGF-E. Estas isoformas são denominadas de acordo com o número de aminoácidos da proteína secretada. Por exemplo, o VEGF₁₆₅ humano consiste de uma proteína com 165 aminoácidos (Yin-Shan et al., 2005).

O VEGF pertence a uma família de fatores de crescimento com atividade mitogênica específica para a célula endotelial com conseqüente estimulação da angiogênese “in vivo”. O VEGF também estimula a permeabilidade vascular, com um efeito 50.000 vezes maior do que a da histamina (Yin-Shan et al., 2005). De fato, a observação que o crescimento tumoral está associado com aumento da permeabilidade microvascular foi a base para a descoberta do VEGF, que, devido a este achado, foi inicialmente denominado “Fator de Permeabilidade Vascular” (VPF) por Senger e colaboradores em 1983 (Senger et al., 1983).

A expressão do VEGF também se correlaciona com maior densidade da microvascularização tumoral. Considerando que os vasos neoformados são imaturos e estruturalmente anômalos, o VEGF é fundamental na prevenção da apoptose das

células endoteliais vasculares desses vasos sanguíneos imaturos, mantendo, assim, sua viabilidade. Contrariamente, os vasos sanguíneos maduros que formam a vascularização do adulto já não são mais dependentes do VEGF para sobreviver e não são afetados pela inibição do VEGF (Kerbel, 2002).

A secreção de VEGF pelos tumores também desempenha papel importante na supressão de resposta imunológica anticâncer. Tal fato se dá devido ao desenvolvimento de diversos mecanismos pelos tumores a fim de evitar respostas imunológicas do hospedeiro. Uma dessas respostas envolve a inibição de células dendríticas, células apresentadora de antígeno e células estimuladoras de células B e T pela ação do VEGF e outros progenitores hematopoiéticos (Ferrara, 1999).

Na embriogênese, o VEGF e seus receptores são expressos em regiões de crescimento de vasos sanguíneos e a sua inativação leva as injúrias embrionárias precoces e a danos letais devido ao seu importante papel na vasculogênese (Ferrara, 2004). Em outras situações fisiológicas, o VEGF tem papel importante no desenvolvimento esquelético e na formação do osso endocondral. Nos ovários, é responsável pelo crescimento folicular e desenvolvimento do corpo lúteo (Ferrara, 2004).

Em situações patológicas, a expressão do VEGF é elevada em uma ampla variedade de tumores humanos. Estudos utilizando o método da hibridização “in situ” demonstraram expressão do RNAm do VEGF em vários tumores, incluindo carcinoma de pulmão, mama, gastrintestinal, endométrio, rins, ovários e neoplasias do sistema nervoso (Ferrara, 2004). A porcentagem de tumores que expressa o VEGF está especificada na tabela 1, assim como a importância prognóstica da expressão do VEGF nesses tumores.

Tabela 1. Porcentagem de tumores que expressam o VEGF e sua correlação com fatores prognósticos.

Tipo de Tumor	Tumores superexpressos(%)	Correlação
Colorretal	40-60	Recorrência, sobrevida
Mama	30-60	Densidade vascular, sobrevida.
Célula renal	30-100	Densidade vascular, estágio do tumor, grau do tumor
Pancreático	75-90	Sobrevida
Glioblastoma Multiforme	65-85	Sobrevida
Próstata	30-80	Densidade vascular, sobrevida sem recidiva.

Adaptado de Ferrara e cols, 1999.

O VEGF se liga a uma variedade de receptores protéicos da superfície celular, incluindo o receptor da tirosino-quinase (VEGFR), o neuropilin (Np-1) e o HSPG. Os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, também conhecidos como flt-1 e Flk-1 ou KDR, respectivamente, são receptores transmembrana com alta afinidade para o VEGF. Através desta ligação, o VEGF exerce seus efeitos sobre o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e na sobrevida de vasos sanguíneos imaturos (manutenção vascular). O VEGFR-1 e o VEGFR-2 apresentam uma porção extracelular constituída por sete domínios com padrão imunoglobulina símile, uma porção trans-membrana e um componente intracelular com uma seqüência de

tirosino-quinase. Inicialmente, os sítios de ligação do VEGF foram identificados na superfície celular de células endoteliais “in vitro” e “in vivo”. Subsequentemente, os VEGFR também foram encontrados nas células derivadas da medula óssea. Além do VEGFR-1 e do VEGFR-2, há também o VEGFR-3, conhecido como Flt-4, que é um receptor para o VEGF-C e VEGF-D, mas não para VEGF (Ferrara, 2004).

O VEGFR-1 e o VEGFR-2 são expressos na superfície celular da maioria das células endoteliais. Em contraste, o VEGFR-3 é restrito às células endoteliais linfáticas. O VEGF-A se liga tanto no VEGFR-1 e quanto no VEGFR-2. Em contraste, o Fator de crescimento placentário (PlGF) e o VEGF-B interagem somente com VEGFR-1. O VEGF-C and o VEGF-D ligam-se tanto ao VEGFR-2 quanto ao VEGFR-3. Há evidências que o VEGFR-2 seja o principal mediador de mitogênese, sobrevivência e permeabilidade das células endoteliais. Em contraste, o VEGFR-1 não é mediador de nenhum sinal mitogênico efetivo nas células endoteliais e pode, especialmente durante o desenvolvimento embrionário inicial, realizando um papel inibitório, seqüestrando o VEGF e prevenindo sua interação com VEGFR-2. A Tabela 2 especifica a relação dos membros da família do VEGF com os diversos receptores, assim como sua repercussão funcional.

Tabela 2. Especificidade dos receptores ao ligante VEGF e seus efeitos biológicos.

Membro da família VEGF	Receptor	Função
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1	Angiogênese, manutenção vascular.

VEGF-B	VEGFR-1	Não estabelecida
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	Linfangiogênese
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	Linfangiogênese
VEGF-E (fator viral)	VEGFR-2	Angiogênese
PlGF	VEGFR-1, neuropilina-1	Angiogênese

Legenda: VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial, VEGFR – Receptor do Fator de crescimento vascular endotelial, PlGF - Fator de crescimento placentário.

Adaptado de Ferrara e cols, 1999.

Muitos fatores de crescimento, além do pH baixo e baixos níveis de oxigênio encontrados nos tumores, estimulam a expressão do VEGF, além de ativar a expressão de outros fatores envolvidos na angiogênese, como as metaloproteinases (MMPs) e moléculas de adesão celular. A hipóxia é considerada o principal indutor da transcrição do gene de VEGF. (Ferrara, 2004).

A maior expressão do VEGF se correlaciona com pior prognóstico, incluindo crescimento tumoral agressivo, recorrência tumoral, metástase tumoral e menor sobrevida, em muitos tipos de tumor (Ferrara, 1999).

Nos carcinomas mamários, a expressão do VEGF correlaciona-se com mau prognóstico (Linderholm et al., 2001). Há indícios de que o VEGF produzido pelas células neoplásicas da mama atuem de uma maneira parácrina nas células endoteliais e de forma autócrina nas células do carcinoma. As células neoplásicas da mama expressam VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e seus receptores VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e neuropilin (NP-1/NP-2). O VEGF-A sinaliza um fenótipo invasivo da neoplasia da mama e influencia a sobrevida das células. Além disso, o VEGF-A leva a um aumento da fosforilação do ERK1/2 e Akt, indicando que a estimulação do VEGF-A tem um papel crucial na regulação do crescimento celular,

sobrevida e diferenciação. A produção de VEGF-A e a ativação de VEGFR-2 na superfície das células do câncer de mama indicam a presença de sinal autócrino que possibilita às células do câncer de mama promover seu próprio crescimento e sobrevida pós-fosforilação e ativação do VEGFR-2 (Weigand et al., 2005).

Devido a importância da angiogênese na progressão tumoral, a inibição desta etapa fundamental é um importante alvo nas terapias de cânceres experimentais (Weigand et al., 2005). Entretanto, embora a neoformação de vasos neoplásicos seja um passo fundamental para a progressão tumoral, ela não é suficiente para que as células tumorais infiltrem o estroma adjacente. Para que isto ocorra, é necessária a degradação da matriz extracelular circunvizinha afim de que os vasos neoformados penetrem por entre as fibras degradadas.

2.3 Fatores reguladores da infiltração tumoral

A progressão tumoral envolve múltiplos estágios e um destes é a quebra organizada da matriz extracelular pelas proteinases. A degradação da matriz extracelular é mediada por um balanço entre as proteinases e seus inibidores (Baker et al., 2002).

As metaloproteinases são proteinases capazes de degradar a matriz extracelular promovendo a invasão das células neoplásicas, favorecendo metástases, além de propiciar a angiogênese. Estas proteínas pertencem a uma família de endopeptídeos zinco-dependente. O sistema de metaloproteinases consiste de pelo menos 20 proteínas humanas subdivididas em cinco subclasses baseadas em seu substrato específico: colagenases, gelatinases, estromelina, metaloproteinases tipo-membrana e outras metaloproteinases (Leppa et al., 2004).

Uma grande variedade de células derivadas do hospedeiro expressam metaloproteinases (MMPs) nos tumores humanos. Entre estas, há as células endoteliais que expressam a MMP-2, a MMP-9 e a MT-MMP. Os pericitos expressam particularmente a MMP-9 e constituem uma proeminente fonte destas proteases nos tumores de mama. Os fibroblastos e os miofibroblastos são a grande fonte de MMPs em muitos tumores, em particular nos tumores de mama, onde os miofibroblastos adjacentes ao tumor expressam MMP-MT1 e MMP-13. As células inflamatórias como monócitos, macrófagos, mastócitos e neutrófilos expressam MMP e MMP-9 (Jodele et al., 2006).

As MMPs derivadas do estroma contribuem para a formação da vascularização tumoral. Um dos mecanismos de ativação é através da solubilidade de fatores angiogênicos, em particular o VEGF. Por exemplo, a MMP-9 quebra isoformas do VEGF (165 e 121) que tem um sítio heparina-ligante. A eliminação deste sítio pela MMP diminui a ligação do VEGF às proteoglicanas presentes na matriz extracelular ao redor do tumor e aumenta a potência do VEGF. Semelhante mecanismo de solubilidade é também responsável pelo recrutamento de osteoclastos. A solubilidade do VEGF é um passo necessário para iniciar a angiogênese. A expressão da MMP-9 pelo estroma pode por esta razão ser um regulador crítico no controle da latência tumoral (Jodele et al., 2006).

As MMPs derivadas do estroma também contribuem para a angiogênese na estabilização do tumor, pois são críticas na migração de células endoteliais e formação de “tubos” vasculares “*in vitro*”. Ratos deficientes em uma MMP específica, como a MMP-2 ou a MMP-9, desenvolvem tumores menores que crescem em menor velocidade, exibem maior taxa de apoptose e diminuição da

densidade vascular e tamanho dos vasos. O mecanismo é complexo e envolve inibição do recrutamento de pericitos por células endoteliais. As MMPs também contribuem para a vasculogênese tumoral. Em contraste com a angiogênese, a qual consiste na invasão de um tumor por células endoteliais maduras adjacentes, a vasculogênese envolve o recrutamento pelo tumor de células precursoras endoteliais liberadas da medula óssea na circulação sanguínea e que se torna parte da vascularização do tumor. As células endoteliais precursoras circulantes são recrutadas no sítio primário tumoral por citocinas como o fator derivado de estroma 1 (SDF-1/CXCL12) ou a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1/CCL2), que são secretados pelas células tumorais. Uma pequena porcentagem destas células (2–5%) contribui para a vasculogênese tumoral. O SDF-1 induz a expressão de MMP-9. Interessantemente, há evidências recentes sugerindo que MMP-9 tem um papel crítico na mobilização de precursores de células hematopoiéticas da medula óssea. (Jodele et al., 2006)

A MMP-9 fornecido pelas células inflamatórias no sítio do tumor envolve o recrutamento de pericitos, uma população heterogênea compreendendo células que envolvem vasos sanguíneos. Estas células estabilizam os novos capilares neoformados, sustentam o fluxo sanguíneo, modulam a permeabilidade vascular e regulam muitas funções das células endoteliais. Defeito no desenvolvimento da vasculatura tumoral é acompanhado por correspondente deficiência de células inflamatórias (Deryugina e Quigley, 2006).

O fator estimulador da collagenase das células tumorais foi isolado primariamente no carcinoma pulmonar humano. Posteriormente este fator foi clonado e caracterizado e nomeado como indutor da metaloproteinase da matriz

extracelular (EMMPRIN), também conhecido como CD147. Este é um membro da família de imunoglobulinas que está presente na superfície de várias células tumorais e que tem potente atividade estimuladora da expressão das MMPs localizados adjacentes às células tumorais. Nos tumores, o EMMPRIN estimula a expressão das MMPs tanto nos fibroblastos e nas células endoteliais quanto nas células tumorais, por um mecanismo envolvendo interação entre moléculas de EMMPRIN (Jodele et al., 2006).

O EMMPRIN estimula a expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-3 nas células endoteliais e induz a expressão de MMPs e MT1-MMP nos fibroblastos. Em cultura de células tumorais a expressão do EMMPRIN induz a expressão de MMPs e do VEGF nos fibroblastos. No câncer de mama humano, a expressão de EMMPRIN correlaciona-se significativamente com vários fatores de risco histopatológico de pior prognóstico e está associado com a diminuição da sobrevivência tumor-específico. O EMMPRIN é expresso também em aproximadamente 90% de células de micro metástase em amostras de medula óssea de pacientes com câncer de mama. Os mecanismos por que EMMPRIN estimula a expressão de MMP não estão elucidados completamente. De qualquer maneira, dados recentes mostram que o EMMPRIN regula as MMPs por um mecanismo dependente da atividade da tirosinoquinase. A indução de MMP-2 pelo EMMPRIN produzido pelas células neoplásicas da mama envolvem a ativação de fosfolipase A e lipooxigenase-5, ligando seus produtos a prostaglandinas e a produtos de leucotrienos (Jodele et al., 2006).

Além do EMMPRIN, vários outros fatores solúveis de crescimento e citocinas produzidas pelo tumor são potentes indutores da expressão de MMPs pelas células estromais. Entre estes, há a Interleucina-6 (Il-6) e seu receptor, que estimulam

a expressão de MMP-1 e MMP-2 na medula óssea. A expressão de MMP-9 nos fibroblastos também é induzida por TNF-alfa e TGF-beta (Jodele et al., 2006).

As metaloproteinases têm a habilidade para quebrar todos os componentes da matriz extracelular. A regulação ocorre em vários níveis incluindo ativação e transcrição. A gelatinase MMP-2 é a metaloproteinase mais consistentemente associada ao carcinoma de mama. O significado da expressão e do prognóstico da MMP-2 não está completamente esclarecido, mas estudos recentes indicam que o aumento da expressão da MMP-2 no tumor primário está associado com doença agressiva e prognóstico desfavorável. A MMP-2 foi detectada no soro de pacientes com neoplasia de mama, mas o valor prognóstico dos níveis de MMP-2 neste pacientes não está totalmente esclarecido (Leppa et al., 2004).

O ativador de Plasminogênio (PA) ativa o plasminogênio em uma enzima ativa, plasmina, que degrada diretamente os componentes da matriz ou indiretamente através da ativação de outras proteinases, tais como as metaloproteinases. O sistema ativador de plasminogênio é constituído por duas enzimas: o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (PAu) e o ativador do plasminogênio tipo tecidual (PA_t). (Leppa et al., 2004).

Dentre os inibidores da infiltração tumoral, são conhecidas as proteínas inibidoras das metaloproteinases, denominadas TIMP-1 e TIMP-2 e um inibidor do ativador do plasminogênio, denominado PAI-1 (Schneider et al., 2003). Da predominância entre as proteinases ou seus inibidores dependerá a capacidade da infiltração de vasos neoformados, e conseqüentemente, células neoplásicas, nos tecidos adjacentes ao tumor.

O desenvolvimento de neoplasias é o resultado do acúmulo de alterações genéticas. Nas neoplasias de mama, grande esforço é realizado a fim de solucionar estas alterações genéticas e encontrar associações entre alterações genéticas específicas e as características clínicas e patológicas do tumor.

3 Objetivos

O presente projeto tem por objetivo:

- Verificar a correlação entre a expressão da citoqueratina 5 e fatores reguladores da angiogênese e infiltração tumoral em carcinomas mamários humanos;
- Comparar a expressão da citoqueratina 5 em carcinomas mamários com parâmetros clínico-patológicos de importância prognóstica.

Objetivos específicos:

- Verificar a expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários.
- Correlacionar a expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários com idade, menopausa, grau histológico, estadiamento patológico, tamanho do nódulo e acometimento linfonodal.
- Correlacionar a expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários com a expressão de receptores de estrógeno, receptores de progesterona, p53, c-erbB-2 e Ki67.
- Correlacionar a expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários com o VEGFR.
- Correlacionar a expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários com a microvasculatura peritumoral.
- Correlacionar a expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários com o EMMPRIN e com as metaloproteinases 1 e 2.
- Correlacionar a expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários com o PAI e com os inibidores das metaloproteinases 1 e 2.

4 Material e Métodos

4.1 Casuística

Dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP/USP) foram revisados todos os laudos anátomo-patológicos de carcinomas mamários correspondentes aos anos de 1988 a 1992. Baseado nas lâminas arquivadas coradas pela hematoxilina e eosina, esses carcinomas foram classificados segundo a graduação de Scarff-Bloom&Richardson modificada por Elston & Ellis (Fitzgibbons et al., 2000). Após a análise histológica, foram selecionados aleatoriamente 32 carcinomas ductais de grau I (bem

diferenciado), 39 carcinomas ductais de grau II (moderadamente diferenciado) e 29 carcinomas ductais de grau III (pouco diferenciado). A casuística total do trabalho foi, portanto, de 100 casos. Neste estudo, foram consideradas apenas biópsias de pacientes sem qualquer esquema de tratamento prévio. Nos casos em que a paciente foi submetida a mais de um procedimento diagnóstico, foi considerada apenas a biópsia mais representativa da lesão em estudo. Para controle do trabalho, foram utilizadas 10 amostras de tecido mamário normal oriundas de pacientes submetidas a mastoplastia redutora durante o mesmo período.

Dos prontuários médicos das pacientes foram obtidos os seguintes dados: idade, menopausa, estadiamento patológico, tamanho do nódulo e acometimento linfonodal, Todas as pacientes são do sexo feminino.

4.2 Método imuno-histoquímico

A seleção foi feita através da análise de lâminas arquivadas coradas pela hematoxilina e eosina. A partir dos blocos de parafina correspondentes aos fragmentos mais representativos de cada lesão foram feitos cortes histológicos de 3 μ m (micrótomo Spencer, modelo 820, série n° 17.797) que foram colocados em lâminas de vidro silanizadas a 8%. Esses fragmentos foram submetidos à técnica imuno-histoquímica utilizando o Kit Universal da Novocastra® (Novostain Super ABC kit Universal), segundo protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Patologia Ginecológica e Mamária do Departamento de Patologia da FMRP/USP (Anexo A). Após a reação, as lâminas foram cobertas por lamínula, com auxílio de Permount (Fischer®). Os anticorpos utilizados estão especificados na tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos primários

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição
CD34	QBEnd/10	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:100
c-erbB-2	CB11	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:300
CK5	XM-26	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:200
EMMPRIN	8D6	Santa Cruz, Palo Alto, CA	1:50
Receptor de estrógeno (RE)	6F11	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:100
Ki67	MM1	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:150
Matrix metaloproteinase 1 (MMP1)	3B6	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:50
Matrix metaloproteinase 2 (MMP2)	8B4	Santa Cruz, Palo Alto, CA	1:50
p53	DO-7	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:100
Plasminogen activator inhibitor (PAI)	TJA6	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:50
Receptor de progesterona (RP)	16	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:150
Tissue inhibitor of matrix metaloproteinase 1 (TIMP1)	6F6a	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:100
Tissue inhibitor of matrix metaloproteinase 2 (TIMP2)	3A4	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	1:100
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	A-20	Santa Cruz, Palo Alto, CA	1:200

Para revelação das reações foi utilizado o diamino-benzidina (DAB). Para todos os marcadores foram utilizados controles externos positivos e negativos.

Casos de carcinoma ductal invasivo sabidamente positivos para c-erbB-2, RE, p53, PAI, RP e VEGF foram usados como controles positivos, e uma tonsila normal foi usada como o controle positivo para o Ki67. Amostras de intestino grosso foram usadas como controles positivos para o TIMP1. Amostras de adenocarcinoma colônico foram usadas como controles positivos para EMMPRIN, MMP1, MMP2 and TIMP2. Fragmentos de pele foram usados como controle positivo para CK5. Controles negativos para imuno-reação foram preparados pela omissão do anticorpo primário.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional. Foram examinados todos os campos em pequeno aumento (4X) que continham tumor, sendo consideradas células positivas aquelas coradas de marrom escuro após as reações.

Para a análise dos receptores hormonais foram considerados positivos os casos com 10% ou mais de positividade nas células neoplásicas para os receptores de estrógeno e progesterona (Ferrero-Poüs et al., 2001). Para a análise do produto do gene *p53*

foram considerados positivos aqueles casos com 10% ou mais de células marcadas (Rudolph et al., 2001). A análise do c-erbB-2 e Ki67 foi feita conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas (Fitzgibbons et al., 2000).

De acordo com a literatura, a intensidade da marcação citoplasmática para MMP1, MMP2, TIMP1, TIMP2, PAI e EMMPRIN foi classificada de acordo com a proporção de células fortemente marcadas, seguindo o escore: 1, 0-25%; 2, 25-50%; 3, 50-75%; e 4, 75-100% (Baker et al., 2002.)

A imunoreatividade para o VEGF foi considerada como positiva quando a marcação citoplasmática estava presente em mais de 1% das células neoplásicas (Ludovini et al., 2003).

A densidade de microvascularização peri-tumoral foi definida como a marcação das células endoteliais pelo CD34 (marcação citoplasmática) que estavam separadas dos vasos adjacentes às células tumorais. Foram evidenciadas as áreas mais vascularizadas no menor aumento (100x) e em campo de médio aumento (250x) foram feitas as contagens de três campos. A média da contagem destes 03 campos selecionados foi o valor registrado (Ludovini et al., 2003).

4.3 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o software Graph Pad Prism 4.0 (San Diego, Califórnia). Para verificar a correlação entre os parâmetros avaliados foi utilizado o teste exato de Fisher quando havia apenas 2 grupos de dados a serem analisados e o teste qui-quadrado quando haviam 3 ou mais grupos. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes para $\alpha=5\%$.

5 Resultados

5.1 Achados clínicos

A idade média das pacientes (n = 100) deste estudo foi de 54,2 anos (25 a 85 anos). Trinta e quatro mulheres apresentavam-se no período pré-menopausa e 64 eram menopausadas. Apenas duas mulheres eram histerectomizadas. O tamanho médio das lesões foi de 4,1 cm (0,5 a 14,0 cm). Dezenove pacientes apresentavam tumores medindo menos de 2,0 cm, enquanto 81 pacientes tinham tumores maiores que 2,0 cm. Vinte e nove pacientes não apresentavam envolvimento de linfonodos. Vinte e oito casos apresentaram de 1 a 3 linfonodos acometidos, enquanto 43 tinham mais de 3 linfonodos envolvidos por neoplasia metastática. Em relação ao grau histológico, trinta e dois casos apresentaram grau I, 39 casos apresentaram grau II e 29 casos apresentaram grau III. O estadiamento anátomo-patológico variou de I a IV. Dos cem casos analisados, 8, 44, 41 e 7 casos foram classificados como estágio I, II, III e IV, respectivamente.

5.2 Achados imunoistoquímicos

A positividade para os receptores de estrógeno e progesterona foi observada em 52 e 46% dos carcinomas mamários, respectivamente. Vinte e sete foram positivos para c-erbB-2 (scores 2 e 3). Cinquenta e três carcinomas marcaram para Ki67 em menos de 10% das células neoplásicas. Trinta carcinomas foram positivos para Ki67 em 10 a 50% de células neoplásicas e 17 mostraram marcação em mais de 50% de células neoplásicas. Trinta e cinco carcinomas foram positivos para p53.

5.3 Carcinomas CK5-positivos

A CK5 foi positiva em 15 carcinomas pouco diferenciados, em 3 carcinomas moderadamente diferenciados e em apenas 1 carcinoma bem diferenciado. Nas áreas de hiperplasia e carcinoma intraductal adjacentes aos carcinomas invasores, assim como nos fragmentos de mama normal, a CK5 marcou as células mioepiteliais. Entretanto, também houve marcação focal de células luminais nos focos de hiperplasia e carcinoma intraductal. A correlação entre a expressão da CK5 com os dados clínicos e as características do tumor encontra-se especificada na tabela 2. A tabela 3 mostra a correlação entre a expressão da CK5 com a microvasculatura peritumoral (CD34) e os fatores reguladores da angiogênese e infiltração tumoral (VEGF, MMP1, MMP2, TIMP1, TIMP2, PAI e EMMPRIN).

Dos dezenove casos de carcinoma CK5-positivo, 3 mulheres apresentavam menos de trinta anos, 7 tinham idades entre 30 e 50 anos, 6 tinham entre 50 e 70 anos e 3 mulheres tinham mais de 70 anos. Houve correlação entre idade e positividade

para CK5 ($p = 0,0022$). Sete carcinomas CK5-positivos ocorreram em mulheres em período pré-menopausa e 12 em mulheres pós-menopausa. Treze carcinoma CK5-positivo mediam entre 2,0 a 5,0 cm no maior eixo e 6 carcinomas mediam mais de 5,0 cm. Apenas 3 carcinomas apresentavam metástases em 1 a 3 linfonodos axilares ressecados e 16 casos mostravam metástases em mais de três linfonodos. Houve correlação entre status linfonodal e positividade para CK5 ($p = 0,0002$). Oito carcinomas CK5-positivo apresentaram estadiamento patológico II, 7 apresentaram estadiamento III e 4 apresentaram estadiamento IV. Houve correlação entre a positividade para CK5 e receptores hormonais, sendo que apenas 2 carcinomas CK5-positivos foram positivos para receptor de estrógeno ($p < 0,0001$) e 1 foi positivo para receptor de progesterona ($p < 0,0001$). Sete carcinoma CK5-positivos foram positivos para p53. Oito apresentaram positividade para o oncogene Her-2/neu (score 2+ e score 3+). Houve correlação entre a porcentagem de expressão do Ki67 e a positividade para a CK5 ($p = 0,0011$). Entre os carcinomas CK5-positivos, quatro marcaram para Ki67 em menos de 10% das células neoplásicas, sete foram positivos para Ki67 em 10 a 50% de células neoplásicas e 8 mostraram marcação em mais de 50% de células neoplásicas. Dezesete carcinomas CK5-positivos apresentaram de 20 a 50 vasos peri-tumorais e 2 carcinomas mostraram mais de 50 vasos peri-tumorais. Houve correlação entre a expressão do VEGF e positividade para CK5 ($p = 0,0207$). Quinze carcinomas CK5-positivos também foram positivos para o VEGF. Sete carcinomas CK5-positivos marcaram para MMP1 em menos de 20% das células neoplásicas, 2 carcinomas foram positivos para MMP1 em 21 a 50% de células neoplásicas e 1 mostrou marcação em mais de 50% de células neoplásicas. Dois carcinomas CK5-positivos marcaram para MMP2 em menos de 20% das células

neoplásicas. Houve correlação entre a expressão de TIMP1 e CK5 ($p = 0,0135$). Quatro casos CK5-positivos mostraram positividade para TIMP1 em menos de 20% das células neoplásicas, 7 mostraram positividade em 21 a 50% das células neoplásicas e 8 mostraram positividade em mais de 50% das células neoplásicas. Cinco carcinomas CK5-positivos marcaram para TIMP2 em menos de 20% das células neoplásicas, quatro foram positivos para TIMP2 em 21 a 50% de células neoplásicas e 2 mostraram marcação em mais de 50% de células neoplásicas. Um carcinoma CK5-positivo marcou para PAI em menos de 20% das células neoplásicas e 1 marcou em mais de 50% das células neoplásicas. Um carcinoma CK5-positivos foi positivo para EMMPRIN em menos de 20% das células e 1 marcou positivo em 21 a 50 % das células neoplásicas.

O estudo imunoistoquímico encontra-se representado na Figura 3.

Tabela 4. Correlação entre a expressão da citoqueratina 5 com dados clínicos e patológicos.

Característica	CK5-	CK5+	p
	81	19	
Idade (anos)			.0022
<30	0	3	
30-50	23	7	
50-70	42	6	
>70	16	3	
Menstruação			.7682
Pré-menopausa	27	7	
Pós-menopausa	52	12	
Histerectomia	2	0	
Tamanho tumoral (cm)			.1069
<2	16	0	
2-5	44	13	
>5	21	6	
Grau histológico (Bloom & Richardson)			<.0001
I	31	1	
II	36	3	
III	14	15	
Linfonodos			.0002
Negativo	29	0	
1-3	25	3	
>3	27	16	
Tabela 4 – cont.			
Estadiamento patológico			.0349
I	8	0	
II	36	8	
III	34	7	
IV	3	4	
Receptor de estrógeno			<.0001
Negativo	31	17	
Positivo	50	2	
Receptor de progesterona			<.0001
Negativo	36	18	
Positivo	45	1	
p53			1
Negativo	53	12	
Positivo	28	7	
c-erbB-2			.1147
0	47	9	
1+	15	2	
2+	4	4	
3+	15	4	
Ki67			.0011
<10%	49	4	
11-50%	23	7	
>51%	9	8	

Tabela 5. Correlação entre a expressão da citoqueratina 5 com a microvasculatura peri-tumoral e os fatores reguladores da angiogênese e infiltração tumoral.

Marcador		CK5-	CK5+	p
		81	19	
CD34 (número de vasos peri-tumoral)				.4586
	<10	2	0	
	10-20	12	0	
	21-30	27	7	
	31-40	22	5	
	41-50	13	5	
	>50	5	2	
Vascular endothelial growth factor (VEGF)				.0207
	Negativo	42	4	
	Positivo	39	15	
Matrix metalloproteinase 1 (MMP1)				.8491
	0	45	9	
	<20%	28	7	
	21-50%	6	2	
	>50%	2	1	
Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)				.7291
	0	65	17	
	<20%	12	2	
	21-50%	2	0	
	>50%	2	0	
Tabela 5 – cont.				
Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1)				.0135
	0	22	0	
	<20%	10	4	
	21-50%	11	7	
	>50%	38	8	
Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 (TIMP2)				.1395
	0	35	8	
	<20%	8	5	
	21-50%	14	4	
	>50%	24	2	
Plasminogen activator inhibitor (PAI)				.4408
	0	68	17	
	<20%	7	1	
	21-50%	5	0	
	>50%	1	1	
EMMPRIN				1

	0	73	17
	<20%	7	1
	21-50%	1	1
	>50%	0	0

Figura 3. Fotomicrografias.

- A) Células neoplásicas positivas para a citoqueratina 5 (CK5) (imunoistoquímica, marcação citoplasmática, x400);
- B) Células neoplásicas positivas para receptores de estrógeno (RE). O mesmo padrão foi observado para os receptores de progesterona (RP) e para o p53 (imunoistoquímica, marcação nuclear, x400);
- C) Células neoplásicas positivas para c-erbB-2 (imunoistoquímica, marcação de membrana, x400);
- D) Células neoplásicas positivas para Ki67 (imunoistoquímica, marcação nuclear, x200);
- E) Células neoplásicas positivas para o Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (imunoistoquímica, marcação citoplasmática, x400);
- F) Vasos sanguíneos corados pelo CD34 (imunoistoquímica, marcação citoplasmática, x400);
- G) Células neoplásicas positivas para a Metaloproteinase de matriz 1 (MMP1) (imunoistoquímica, marcação citoplasmática, x400);
- H) Células neoplásicas positivas para a Metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) (imunoistoquímica, marcação citoplasmática, x400);

- I) Células neoplásicas positivas para o Indutor da metaloproteinase da matriz extracelular (EMMPRIN) (imunistoquímica, marcação citoplasmática, x400);
- J) Células neoplásicas positivas para o Inibidor tecidual da metaloproteinase de Matriz 1 (TIMP1) (imunistoquímica, marcação citoplasmática, x400);
- K) Células neoplásicas positivas para o Inibidor tecidual da metaloproteinase de Matriz 2 (TIMP2) (imunistoquímica, marcação citoplasmática, x400);
- L) Células neoplásicas positivas para o Inibidor do ativador do plasminogênio (PAI) (imunistoquímica, marcação citoplasmática, x400).

6 Discussão

O reconhecimento de subtipos do carcinoma mamário baseado em seu perfil molecular abriu um novo e amplo campo de pesquisa e investigação. Os carcinomas mamários foram caracterizados em cinco diferentes subgrupos relacionados a diferentes comportamentos clínicos. Um destes grupos é designado como carcinoma mamário basal símile ou de subtipo basal devido ao seu perfil de expressão gênica similar ao da célula basal da mama. Estes tumores representam 15 a 20% dos carcinomas mamários. São tumores tipicamente negativos para receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e também não estão associados a superexpressão do oncogene HER-2/neu. Clinicamente, este subgrupo correlaciona-se com o menor tempo livre de recidiva, refletindo em um pior prognóstico (Sorlie et al., 2003). Morfologicamente, este subgrupo apresenta-se como carcinomas invasivos de alto grau (Grau III de Bloom & Rirchadson) e freqüentemente associados à necrose tumoral (Abd El-Rehim et al., 2004). Os carcinoma mamários de subtipo basal são reconhecidos através da expressão de marcadores imunoistoquímicos como

citoqueratina 5, citoqueratina 14, citoqueratina 17 e EGFR (HER-1). Segundo Nielsen e colaboradores, estes critérios imunoistoquímicos podem identificar os carcinomas do subtipo basal com 76% de sensibilidade e 100% de especificidade (Nielsen et al., 2004). Outra observação feita pelos mesmos autores foi a expressão de c-kit (CD117) por este subgrupo de carcinomas. Este fato tem relevância clínica na medida em que pacientes podem ser beneficiados com a droga “imatinib meylate” (Gleevec).

No presente estudo, a expressão da CK5 correlacionou-se com vários indicadores de agressividade tumoral, como idade precoce, alto grau histológico, acometimento linfonodal, estadiamento patológico avançado, alta expressão do Ki67 e negatividade para receptores hormonais. Estes dados estão de acordo com a literatura de que os carcinomas mamários CK5-positivos são neoplasias agressivas (Gusterson et al., 2005; Abd El-Rehim et al., 2004; Korsching et al., 2002).

Korschine e colaboradores (2002) encontraram forte correlação entre este grupo de carcinoma com o aumento da expressão de p53 (Korsching et al, 2002). Em nosso estudo, não encontramos relação estatisticamente significativa entre a expressão da CK5 e do p53 nos carcinomas mamários.

Em um estudo prévio, verificamos que existe co-expressão do p63 nas células neoplásicas CK5-positivas indicando que, assim como a CK5, o p63 também possa ser considerado um marcador do fenótipo basal dos carcinomas mamários (Ribeiro-Silva et al., 2005). Como já se sabia que a expressão da CK5 era freqüente nos carcinomas mamários associados ao BRCA-1, nesse mesmo trabalho também avaliamos tanto a correlação da CK5 quanto do p63 com o BRCA-1 e a CK8/18 (Foulkes et al., 2004; Ribeiro-Silva et al., 2005). Verificamos que existe uma forte

correlação entre uma expressão imunohistoquímica reduzida do BRCA-1 com a expressão tanto do p63 quanto da CK5 nos carcinomas mamários, assim como há uma relação inversa entre a expressão do p63 e CK8/18 (Ribeiro-Silva et al., 2005). Esses dados sugerem que a perda da expressão do p63 é necessária para a transição do fenótipo basal (CK5+) para o luminal (CK8/18+). Considerando que o p63 é considerado um marcador de células tronco e pode atuar como um oncogene, esses resultados favorecem a hipótese de Foulkes e cols (2004) de que o BRCA-1 atua como um regulador de células-tronco.

Apenas em raras situações a mutação de um único gene leva ao aparecimento e progressão da neoplasia. A tendência atual é considerar o câncer como uma doença de múltiplas etapas, envolvendo instabilidade genômica e múltiplas alterações gênicas que levarão ao crescimento celular descontrolado (Bartek et al., 1999). O entendimento dessas alterações nos carcinomas positivos para a CK5 pode trazer novos avanços no entendimento e no manejo desses tumores.

Neste estudo, além da expressão do VEGF e da contagem da microvasculatura peritumoral, verificamos a expressão de proteinases e seus inibidores nos carcinomas mamários, correlacionando-os com a subclassificação baseada na expressão ou não da CK5. Na carcinogênese, o balanço anormal da expressão de proteinases e seus inibidores determinam a degradação da matriz extracelular. O aumento da degradação desta matriz é proporcional às chances de invasão e metástases (Baker et al., 2002).

As metaloproteinases são enzimas proteolíticas dependentes do zinco, capazes de degradar a membrana basal, assim como a maioria dos componentes da matriz extracelular. Estas enzimas têm papel fundamental na progressão da neoplasia

e na promoção da angiogênese. As metaloproteinases são estimuladas parcialmente pelo indutor da matriz metaloproteinase extracelular (EMMPRIN) (Tang et al., 2005) e inibidas pelos inibidores das MMPs (TIMPs) e inibidores do ativador de plasminogênio (PAIs). A soma de vetores em sentidos opostos determina como se comportará a ação das MMPs e conseqüentemente a degradação da matriz.

Baker e colaboradores investigaram a expressão das proteinases e seus inibidores no câncer mamário e correlacionaram com a progressão e sobrevida (2002). Neste estudo, Baker e colaboradores verificaram que não há correlação entre a expressão celular de proteinases e inibidores nem com a doença e nem a taxa de sobrevida (Baker et al., 2002). No presente estudo verificamos que a expressão da CK5 correlacionou-se somente com a expressão de TIMP-1, um inibidor da metaloproteinase 1. Estes dados podem indicar que estímulos anti-proteolíticos são preponderantes nos carcinomas CK5 positivos. Considerando a agressividade dos carcinomas CK5 positivos, este achado é um aparente paradoxo. No entanto, esta discrepância pode estar relacionada à diferença de expressão de proteinases e seus inibidores em diferentes estágios da evolução da neoplasia, dependente dos componentes da matriz extracelular (Baker et al., 2002). De acordo com este ponto de vista, o balanço na concentração de proteinases e seus inibidores pode mudar em cada estágio da cascata neoplásica. Desde modo, um único fator não poderia ser responsável pela progressão neoplásica “in vivo”. Nosso estudo confirma os achados de Baker e colaboradores no qual a marcação para os inibidores TMP1 e TMP2 é mais intensa em relação às demais proteinases e seus inibidores. A correlação do TIMP-1 com os carcinomas expressando CK 5 demonstrado neste estudo pode estar correlacionado com o que foi previamente interpretado por Baker: “a evolução

tumoral é um fenômeno complexo que se desenvolve em fenômeno de “cascata”, onde somente um fator individual não se sobressai em relação ao prognóstico do tumor mamário, mas sim um balanço entre as proteinases ativadas e seus inibidores” (Baker et al., 2002).

Assim como a interação entre as metaloproteinases e seus inibidores, a angiogênese também é um processo complexo e multifatorial. Segundo estudos recentes, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o principal fator regulador desse processo. No presente estudo nós também verificamos a expressão do VEGF nos carcinoma mamários, correlacionado-os à expressão da CK5.

A expressão para o VEGF foi elevada nos carcinomas mamários positivos para a CK5, sendo essa correlação estatisticamente significativa ($p=0,0207$). Como o VEGF é o principal regulador da angiogênese (Hicklin and Ellis, 2005) e a angiogênese é uma etapa fundamental para a infiltração dos carcinomas, esse achado sugere que o VEGF possa ser um dos fatores que justifique o comportamento clínico mais agressivo dos carcinomas que expressam a CK5.

Os carcinomas CK5-positivos não apresentaram aumento da densidade vascular apesar do aumento da expressão do principal fator de responsável pela angiogênese, o VEGF. Estes dados sugerem que outros fatores além do VEGF possam ser importantes na angiogênese, já que há evidências de que a angiogênese é determinada pelo balanço entre moléculas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas (Hanahan and Folkman, 1996). Dessa forma, nem todos os tumores que expressam VEGF são altamente angiogênicos (Viacava et al., 2004). Embora o significado da expressão do VEGF nos tumores de mama é ainda assunto de controvérsia (Nicolini et al., 2004; Bando et al., 2005; Jin et al., 2005), a superexpressão do VEGF pelas

células neoplásicas da mama expõem as células a um aumento da atividade proliferativa “*in vitro*”, sugerindo que o VEGF pode agir como um fator de crescimento autócrino independente do seu efeito angiogênico (Akahane et al., 2005).

7 Conclusões

No presente trabalho:

- A citoqueratina 5 foi expressa em 19% dos carcinomas mamários.
- A expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários correlacionou-se com vários indicadores clinico-patológicos de agressividade, incluindo idade precoce, alto grau histológico, estadiamento patológico avançado, acometimento linfonodal, negatividade para receptores hormonais, e elevada expressão de Ki67.
- A expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários correlacionou-se com a expressão do VEGF, mas não com a microvasculatura peritumoral. Considerando que a superexpressão de VEGF pelas células neoplásicas da mama leva a um aumento da atividade proliferativa *in vitro*, independente de seu efeito angiogênico, a expressão diferencial do VEGF pode contribuir para o comportamento mais agressivo dos carcinomas mamários positivos para a citoqueratina 5.

- A expressão da citoqueratina 5 nos carcinomas mamários correlacionou-se com o TIMP1, mas não com a MMP1, a MMP2, o TIMP2, o PAI e o EMMPRIN. Esses dados sugerem que estímulos antiproteolíticos podem ser preponderantes nos carcinomas positivos para a citoqueratina 5.

8 Referências Bibliográficas

Normatizado de acordo com o Sistema Vancouver

Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals.
International Committee of Medical Journal Editors. JAMA 1993;269:2282-6.

Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI, Ellis IO. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. J Pathol 2004; 203:661-71.

Akahane M, Akahane T, Shah A, et al. A potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine growth factor for human breast carcinoma cells. Anticancer Res 2005; 25:701-7.

Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. Mol Pathol 2002; 55:300-4.

Bando H, Weich HA, Brokelmann M, et al. Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 92:553-61.

Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol* 1999; 187:95-9.

Böcker W, Moll R, Poremba C, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* 2002; 82:737-45.

Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, et al. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumors and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:697-702.

Chepko G and Smith G H. Mammary epithelial stem cells: our current understanding. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4:35-52.

Deryugina E I, Quigley J P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 9–34

Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77:527-43

Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25:581–611.

Ferrero-Poüs M, Trassard M, Le Doussal V, et al. Comparison of enzyme immunoassay and immunohistochemical measurements of estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. *Appl Immunohistochem* 2001; 9:267-75.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000; 124:966-78.

Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. Cancer Res 2004; 64:830-5.

Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. Breast Cancer Res 2005; 7:143-8.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996; 86:353-64.

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 2005; 23:1011-27.

Jin Q, Hemminki K, Enquist K, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. Clin Cancer Res 2005; 11:3647-53.

Jodele S, Blavier L, Yoon J M, DeClerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. Cancer Metastasis Rev 2006; 25:35-43.

Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nac Rev Cancer 2002; 2:727-39.

Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 2002; 82:1525-33.

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; 10:1057-63.

Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, et al. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61:2256-60.

Ludovini V, Sidoni A, Pistola L, et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 81:159-68.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11-24.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5367-74.

Nicolini A, Campani D, Miccoli P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and other common tissue prognostic indicators in breast cancer: a case-control study. *Int J Biol Markers* 2004;19:275-81.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406; 747-52.

Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandao DF, Chahud F, Zucoloto S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology* 2005; 47:458-66.

Rudolph P, Alm P, Olsson H, et al. Concurrent overexpression of p53 and c-erbB-2 correlates with accelerated cycling and concomitant poor prognosis in node-negative breast cancer. *Hum Pathol* 2001; 32:311-9.

Sauer G, Deissler H. Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecologic and breast malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15:45-9.

Schneider J, Pollan M, Tejerina A, et al. Accumulation of uPA - PAI-1 complexes inside the tumour cells is associated with axillary nodal invasion in progesterone-receptor-positive early breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:96-101.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219:983-5.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10869-74.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8418-23.

Sting J, Raouf A, Emermen J T, Eaves C J. Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10:49-59.

Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2005; 65:3193-9.

van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002; 161:1991-6.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415:530-6.

Viacava P, Naccarato AG, Bocci G, et al. Angiogenesis and VEGF expression in pre-invasive lesions of the human breast. *J Pathol.* 2004; 204:140-6.

Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. *Angiogenesis* 2005; 8:197-204.

West M, Blanchette C, Dressman H, et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:11462-7.

Yan L, Zucker S, Toole BP. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost* 2005; 93:199-204.

Yin-Shan Ng, Krilleke D, Shima D T. VEGF function in vascular pathogenesis.

Experimental Cell Research 2006; 312:527-37.

9 Anexos

ANEXO A

PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA

1. Cortes de parafina com 3 μm em lâminas silanizadas a 8%.

Nota: Se cortar o bloco de parafina pela manhã, colocar em estufa a 60°C até às 20 horas. Se cortar o tecido a tarde, os cortes deverão permanecer na estufa até o dia seguinte. No decorrer da noite, a temperatura da estufa não deve ultrapassar os 60°C, caso contrário os cortes ficam ressecados.

2. Desparafinizar em xilol I, II e III por 5 minutos cada (ou xilol I e II por 10 minutos cada).
3. Passar em álcoois decrescentes (3 minutos em álcool absoluto I, 3 minutos em álcool absoluto II, 1 minuto em álcool a 95% e 1 minuto em álcool a 70%).
4. Lavar em água corrente.
5. Colocar as lâminas em suporte com tampão citrato pH 6,0 (volume de 200ml para 20 lâminas).
6. Recuperação antigênica em panela de vapor: Mergulhar as lâminas em recipiente plástico com 400 ml de tampão citrato pH 6,0 por 40 minutos.

Nota: Se o tampão citrato estiver previamente armazenado na geladeira, pré-aquecer no forno de microondas por 8 minutos (potência máxima) antes da recuperação.

7. Deixar esfriar por 30 a 40 minutos.

8. Separar os anticorpos, resfriados a 4°C.

Nota: Os anticorpos são armazenados em geladeira a 4°C.

9. Secar as lâminas ao redor dos cortes, formando “janelas”.

10. Lavar em tampão PBS (0,1 M pH 7,4) por 3 vezes, aspirando a cada lavagem.

11. Pingar H₂O₂ a 3% (Peróxido de Hidrogênio). Deixar por 20 minutos.

12. Pingar uma gota de soro normal em cada fragmento (fornecido pelo Kit Universal Novocastro[®]). Deixar por 20 minutos.

13. Não lavar. Aspirar o soro normal.

Incubar as lâminas com o anticorpo primário correspondente a cada corte.

Homogeneizar através de movimentos pendulares com a mão. Colocar H₂O para formar uma camada úmida. Tampar e cobrir com compressa, protegendo os fragmentos da luz. Incubar por 2 horas.

Nota: Os anticorpos são previamente diluídos em BSA e conservados em geladeira a 4 °C.

14. Lavar em tampão PBS (0,1M pH 7,4) por 2 vezes, aspirando a cada lavagem.

Lavar 1 vez com TBST. Aspirar.

15. Incubar no anticorpo secundário universal por 15 minutos (fornecido pelo Kit Universal Novocastro[®]). Homogeneizar.

16. Lavar em PBS por 2 vezes, aspirando a cada lavagem. Lavar 1 vez com TBST.
17. Incubar em Estreptavidina, uma gota por corte, por 10 minutos. (fornecido pelo Kit Universal Novocastra[®]). Homogeneizar.
18. Lavar em PBS por 3 vezes, aspirando a cada lavagem.
19. Deixar as lâminas em PBS 0,1M pH 7,4.
20. Preparar o DAB: Misturar 0,16 ml ou 160µl da solução B na solução A. No momento do uso, não filtrar.
21. Aspirar as lâminas e colocar o DAB. Marcar 5 minutos. Observar os cortes. Se corar com menos de 5 minutos, lavar com PBS para inibir a continuação da reação.
22. Lavar em água corrente.
23. Contracorar com hematoxilina de Harris sem ácido por 30 segundos.
24. Lavar em água corrente.

Azular com água amoniacal. Lavar. Desidratar em álcoois. Diafanizar. Montar em Permaunt (Fischer[®]).

ANEXO B

SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS

SOLUÇÃO PBS 0,1M pH 7,4 e NaCl 0,15 M

<i>NaCl</i>	16,34 g
Fosfato de Sódio Monobásico	0,72 g
Fosfato de Sódio Dibásico	2,1 g
H ₂ O Destilada	2000ml
Acertar o pH com Hidróxido de Sódio	

SOLUÇÃO ALBUMINA BOVINA (BSA)

Albumina bovina utilizada para diluição de anticorpos primários

SOLUÇÃO A

BSA	H ₂ O Destilada
5000,00 mg=5.0g	100,00 ml
500,00 mg=0.5g	10,00 ml
1000,00 mg=1.0g	20,00 ml
62,50 mg=0.0625g	2,50 ml

SOLUÇÃO B (guardar na geladeira)

NaN ₃ (Azida Sódica)	H ₂ O Destilada
1000,00 mg=1,0g	20,0 ml
500,00 mg=0.5	10,0 ml
125,0mg=0,125g	2,50 ml

SOLUÇÃO DE USO:

Solução A (BSA)	1,25 ml	
<i>Solução B (NaN₃)</i>		<i>2,50 ml</i>
PBS 0,1 M pH 7,4	59,00 ml	

Conservar em geladeira a 4°C.

SOLUÇÃO MÃE DE ÁCIDO CÍTRICO PM210.148C₆H₈O₇.H₂O

<i>Ácido Cítrico</i>		<i>2,1 g</i>
H ₂ O Destilada	1000 ml	

TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO pH 6,0

<i>Solução Mãe de Ácido Cítrico</i>		<i>90,00 ml</i>
H ₂ O Destilada		810,00 ml

Acertar o pH a 6,0 com NaOH.

H₂O₂ a 3% (PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO)

<i>H₂O₂ (30 vol. MERCK®)</i>		<i>10 ml</i>
PBS 0,1 M pH 7,4		90 ml

Conservar em geladeira a 4°C.

DAB

SOLUÇÃO A

<i>DAB</i>		<i>5,00 mg=0.005g</i>
PBS 0,1 M pH 7,4	8,00 ml	

SOLUÇÃO B

PBS 0,1 M pH 7,4		H ₂ O ₂ (30 vol. Synth®)
0,75 ml		0,08 ml
750 µl ou 375 µl		80 µl ou 40 µl

Misturar 0,16 ou 160 µl da solução B na solução A.

No momento de uso, não filtrar.

ÁGUA AMONIACAL

<i>Hidróxido de amônio PA</i>	<i>4 gotas</i>
Água Corrente	400,00 ml

TAMPÃO Tris – Hcl 1N

Tris- HCL (Synth [®])	157,6g – 7,88g
H ₂ O Destilada q.s.p.	1 litro – 50ml

TAMPÃO TBST (Tris – Hcl 0.05 M pH 7,4)

Tris – HCl 1M	50ml
Cloreto de Sódio	5.84g
H ₂ O Destilada	850ml

Completar com água destilada até 1000ml. Acertar o pH para 7,4 com ácido clorídrico 2 N. Acrescentar 3ml de Tween 20 ou Triton X- 100.

Summary

The recognition of subtypes of breast carcinomas based on their molecular features has brought new perspectives in breast cancer investigation. Some key regulators of angiogenesis and tumor infiltration were evaluated in breast carcinomas of basal-phenotype (CK5+). Immunohistochemistry with 14 primary antibodies was performed in 100 formalin-fixed paraffin-embedded samples of invasive ductal carcinomas. Cytokeratin 5 correlated with indicators of poor outcome, including precocious age, high histological grade, lymph node positivity, advanced pathological stage, negativity for hormonal receptors, and a high proliferative rate (Ki67 labeled index). CK5 also correlated with VEGF expression but not with the microvessel density. Considering that VEGF overexpressing neoplastic mammary cells display increased proliferative activity *in vitro* regardless its angiogenic effect, the differential expression of VEGF may contribute for the more aggressive behavior of these neoplasms. CK5 correlated with TIMP1, but not MMP1, MMP2, EMMPRIN, TIMP2 and PAI, indicating that anti-proteolytic stimuli may be preponderant in these neoplasms.

Key words: 1. Cytokeratin 5, 2. Angiogenesis, 3. Metalloproteinases, 4. Breast Carcinoma.