

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A  
EXPRESSÃO DO SISTEMA DE ATIVAÇÃO DO  
PLASMINOGÊNIO E O PROGNÓSTICO EM CÂNCER  
DE MAMA FEMININO LOCALMENTE AVANÇADO**

**AGNALDO ANELLI**

**Tese de doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto  
Soares**

**São Paulo  
2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Anelli, Agnaldo

**Determinação da relação entre a expressão do sistema de ativação do plasminogênio e o prognóstico em câncer de mama feminino localmente avançado** / Agnaldo Anelli – São Paulo, 2009.

46p.

Tese (doutorado) Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:  
Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DE MAMA. 2. QUIMIOTERAPIA. 3. ATIVADORES DE PLASMINOGÊNIO. 4. PROGNÓSTICO. 5. TISSUE ARRAY

## RESUMO

Anelli A. **Determinação da relação entre a expressão do sistema de ativação do plasminogênio e o prognóstico em câncer de mama feminino localmente avançado.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

No Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde, cerca de 25% dos casos de câncer de mama são diagnosticados como tumores localmente avançados. Com o intuito de melhorar a possibilidade de ressecção da mama e diminuir na taxa de recaída local, bem como aumentar a sobrevida global, realiza-se neste grupo de mulheres quimioterapia pré-operatória. A invasão tumoral é um dos aspectos mais importantes no prognóstico em câncer de mama e uma característica comum a este processo é a degradação da matriz extracelular e do estroma intersticial. A matriz extracelular é formada por vários elementos, como colágeno, glicoproteínas (laminina, fibronectina e entactina), proteoglicanas e glicosaminoglicanas, sendo degradadas por enzimas específicas, denominadas de proteinases que incluem os ativadores do plasminogênio, que convertem o plasminogênio em plasmina que por sua vez pode degradar componentes da matriz extracelular. O termo ativadores de plasminogênio restringe-se a duas enzimas, o ativador de plasminogênio tipo uroquinase ou uPA (*“urokinase-type plasminogen activator”*), seu receptor uPAR (*“urokinase-type plasminogen activator receptor”*) e o ativador de plasminogênio tipo tecidual ou tPA (*“tissue-type plasminogen activator”*). Entre os inibidores das serino-proteinases (SERPINS) destacam-se o PAI-1 e PAI-2 no processo de inibição ou inativação dos ativadores de plasminogênio. Neste estudo o objetivo foi determinar a expressão e a relação prognóstica dos marcadores moleculares de invasão: uPA, uPAR e PAI-1 no câncer de mama feminino localmente avançado, pelo método imunohistoquímico em material parafinado através da técnica de *Tissue-Array*. Foram analisadas 128

pacientes. Os marcadores de ativação do plasminogênio foram assim distribuídos: 113 amostras foram classificadas como positivas para uPA (88,3% das pacientes), 71 amostras foram consideradas como positivas para uPAR (55,5%) e 54 amostras positivas para PAI-1 (42,2%). Dos marcadores de interesse, nenhum foi associado, estatisticamente, com as taxas de sobrevida livre de doença ou sobrevida global. Na análise múltipla, foram fatores independentes associados à sobrevida livre de doença não ter realizado quimioterapia adjuvante ( $p=0,002$ ), tumores com expressão negativa do receptor de estrógeno ( $p=0,001$ ), presença de invasão linfonodal ( $p=0,023$ ). Apesar de não encontrarmos correlação estatisticamente significativa entre o perfil de expressão dos ativadores de plasminogênio e a evolução clínica das pacientes com câncer de mama localmente avançado, nosso estudo conseguiu determinar uma proposta de regime pré-operatório de quimioterapia com impacto na sobrevida livre de doença (paclitaxel e doxorubicina), bem como do impacto positivo do tratamento quimioterápico e hormonioterápico adjuvantes nesta população.

## SUMMARY

Anelli A. **[Relationship between the expression of plasminogen activation system and prognosis in locally advanced female breast cancer]**. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Locally advanced breast cancer corresponds to about 25% of all breast cancers in Brazil according to the Brazilian Ministério da Saúde. In order to improve local control and overall survival these patients are submitted to preoperative chemotherapy. Tumor invasion plays a major role in breast cancer and extracellular matrix degradation is a common characteristic of this process. Extracellular matrix is composed of many elements like collagen, glycoproteins (laminina, fibronectina and entactin), proteoglycans and glycosaminoglycans. Those proteins are degraded by specific enzymes called proteases that include plasminogen activators. These enzymes transform plasminogen into plasmin, that degrades the extracellular matrix. The name plasminogen activator is restricted to two enzymes, the urokinase-type plasminogen activator or uPA and the tissue-type activator or tPA. There are two inhibitors, the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and the plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2). The objective of this study was to evaluate the relationship between uPA, its receptor (uPAR) and PAI-1 in locally advanced breast cancer using immunohistochemistry and Tissue-Array. We analyzed 128 female breast cancer patients. The results were as follows: 113 samples were positive for uPA (88,3%), 71 samples were positive for uPAR (55,5%) and 54 samples were positive for PAI-1 (42,2%). We found no statistical relationship between the expression of plasminogen activators and disease free survival or overall survival in this population. Multiple analyses demonstrated a statistically advantage for disease free survival among patients who did not receive adjuvant chemotherapy ( $p=0.002$ ), tumor negative for estrogen receptor ( $p=0,001$ ) and the presence of node invasion ( $p=0.023$ ). Despite the absence of statistically significance

between the expression of plasminogen activator and overall survival we confirmed a significant impact on disease free survival among patients receiving paclitaxel and doxorubicin as preoperative chemotherapy as well a positive impact of adjuvant hormonal and chemotherapy treatment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Microfotografia com expressão positiva de uPA.....	21
<b>Figura 2</b>	Microfotografia com expressão positiva de uPAR.....	22
<b>Figura 3</b>	Microfotografia com expressão positiva de PAI-1.....	23
<b>Figura 4</b>	Gráfico da sobrevida livre de doença ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a expressão de UPA.....	26
<b>Figura 5</b>	Gráfico da sobrevida livre de doença ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a expressão de UPAR.....	27
<b>Figura 6</b>	Gráfico da sobrevida livre de doença ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a expressão de PAI-1.....	28
<b>Figura 7</b>	Gráfico da sobrevida livre de doença ( <i>Kaplan Meier</i> ) para o regime de quimioterapia pré-operatória.....	29
<b>Figura 8</b>	Gráfico da sobrevida livre de doença ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a realização de quimioterapia adjuvante.....	29
<b>Figura 9</b>	Gráfico da sobrevida livre de doença ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a o tipo de hormonioterapia adjuvante.....	33
<b>Figura 10</b>	Gráfico da sobrevida global ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a expressão de UPA.....	33
<b>Figura 11</b>	Gráfico da sobrevida global ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a expressão de UPAR.....	34

<b>Figura 12</b>	Gráfico da sobrevida global ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a expressão de PAI-1.....	34
<b>Figura 13</b>	Gráfico da sobrevida global ( <i>Kaplan Meier</i> ) para o regime de quimioterapia pré-operatória.....	35
<b>Figura 14</b>	Gráfico da sobrevida global ( <i>Kaplan Meier</i> ) para o regime de quimioterapia adjuvante.....	35
<b>Figura 15</b>	Gráfico da sobrevida global ( <i>Kaplan Meier</i> ) para a realização de hormonioterapia adjuvante.....	36
<b>Figura 16</b>	Gráfico da sobrevida global ( <i>Kaplan Meier</i> ) para expressão de p53.....	

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Estudos de uPA, uPAR e PAI-1 em câncer de mama feminino.	4
<b>Tabela 2</b>	Lista dos anticorpos utilizados.....	12
<b>Tabela 3</b>	Microfotografia com expressão positiva de PAI-1.....	25
<b>Tabela 4</b>	Taxa de sobrevida, segundo características demográficas e clínicas.....	30
<b>Tabela 5</b>	Taxa de sobrevida global, segundo características demográficas e clínicas.....	32
<b>Tabela 6</b>	Análise múltipla do modelo de Cox para a SG.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>C.M.F.</b>	Ciclofosfamida, Metotrexate e 5-Fluorouracil
<b>E.C.</b>	Estádio Clínico
<b>HACC</b>	Hospital Antonio Candido Camargo
<b>HR</b>	Hazard ratio
<b>I.L.</b>	Invasão Linfática
<b>I.V.</b>	Invasão Venosa
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>Mw</b>	Microondas.
<b>PAI-1</b>	Inibidor do Ativador de Plasminogênio
<b>Pp</b>	Panela de pressão
<b>Q.T.</b>	Quimioterapia
<b>Q.T. adj.</b>	Quimioterapia adjuvante
<b>R.E.</b>	Receptor de Estrógeno
<b>R.P.</b>	Receptor de Progesterona
<b>RNA m</b>	Ácido Ribonucléico Mensageiro
<b>S.L.D.</b>	Sobrevida Livre de Doença
<b>tPA</b>	Ativador tissular do plasminogênio
<b>uPA</b>	Ativador de Plasminogênio tipo Uroquinase
<b>uPA R</b>	Receptor do Ativador de Plasminogênio tipo Uroquinase
<b>USA</b>	Estados Unidos da América

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>9</b>
3.1	Delineamento do estudo	9
3.2	População de estudo	9
3.3	Metodologia	10
3.3.1	Validação histopatológica das amostras	10
3.3.2	Construção do <i>tissue array</i>	11
3.3.3	Determinação da expressão dos antígenos	11
3.3.4	Método imunoistoquímico	12
3.3.5	Seguimento clínico	15
<b>4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>17</b>
4.1	Variáveis do Estudo	18
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
5.1	Caracterização da amostra	19
5.2	Análise da sobrevida livre de doença e seus fatores associados	24
5.3	Análise da sobrevida global e seus fatores prognósticos	30
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), cerca de 36 mil mulheres são diagnosticadas com câncer de mama anualmente, sendo que a taxa de mortalidade anual é de cerca de 18 mil casos. Dentre estas mulheres, cerca de 25% são diagnosticadas com tumores localmente avançados (T3/T4 e N1/N2 - EC III-A e EC III-B), fazendo com que o tratamento cirúrgico inicial seja tecnicamente mais difícil, aumentando assim as taxas de recidiva local. Com o intuito de melhorar a possibilidade de ressecção da mama e diminuir a taxa de recaída local, bem como aumentar a sobrevida global, realiza-se neste grupo de mulheres quimioterapia pré-operatória (Ministério da Saúde 2005).

Para determinar quais mulheres se beneficiarão desta terapia são utilizados fatores prognósticos considerados como convencionais, dentre os quais o *status* menstrual, a idade, a expressão dos receptores hormonais de estrógeno e progesterona (CARTER et al. 1989; FITZGIBBONS et al. 2000). Outros marcadores ainda não estabelecidos como padrão como por exemplo a expressão do p53 também foram pesquisados e demonstraram ser de importância na resposta clínica ao tratamento instituído (GASPARINI et al. 1993; ANELLI et al. 2003).

Mesmo com a determinação destes fatores prognósticos e com a realização de quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia adjuvantes a

maioria destas pacientes desenvolve doença metastática nos anos subseqüentes devido à disseminação vascular e linfática tumoral.

A invasão tumoral é um dos aspectos mais importantes no prognóstico em câncer de mama (SPYRATOS et al. 1992; JOHNSON et al. 1993; ARMAS et al. 1994). O termo invasão, descreve a habilidade celular em atravessar barreiras estruturais, como por exemplo a membrana basal e o estroma intersticial. Este fenômeno pode ocorrer em processos fisiológicos em qualquer fase de desenvolvimento de um indivíduo, desde o período embrionário até a fase adulta, como por exemplo, durante a implantação trofoblástica, e o processo de reparo dos tecidos. Outros processos ocorrem sob condições patológicas como por exemplo, na artrite reumatóide e nas neoplasias.

No início da proliferação neoplásica, as células são nutridas através da difusão de substâncias do microambiente circunscrito. Quando o tumor atinge um diâmetro entre 1 e 2 mm tem início o processo de angiogênese e conseqüente formação de novos vasos (neo-vascularização). Desta forma, as células tumorais que participarem do destacamento do tumor podem penetrar nos capilares linfáticos e venosos, entrando na circulação sangüínea, atingindo outras localidades e dando origem às metástases (FISHER et al. 2000).

Uma característica comum ao processo de invasão é a degradação da matriz extracelular e do estroma intersticial, estruturas que a célula em invasão precisa ultrapassar para alcançar tecidos vizinhos (DANO et al. 1985).

A matriz extracelular é formada por vários elementos como colágeno, glicoproteínas (laminina, fibronectina, entactina, nidogênio), proteoglicanas e glicosaminoglicanas, sendo degradadas por enzimas específicas, denominadas de proteinases (MIGNATTI e RIFKIN 1993).

As proteinases requeridas durante o processo de degradação da matriz extra-celular podem ser subdivididas em 3 classes: as serino-proteinases; as metalo-proteinases e as cisteíno-proteinases.

As metalo-proteinases caracterizam-se por conterem um zinco em seu sítio ativo, serem inibidas por agentes quelantes; possuírem consistência em sua homologia; por serem secretadas em sua forma latente, tornando-se ativas pela clivagem proteolítica parcial.

A classe das cisteíno-proteinases inclui endo e exopeptidases cuja atividade catalítica depende do grupo *thiol* do resíduo *Cys* no sítio catalítico. Em todos os membros desta classe, os resíduos de aminoácidos ao redor dos sítios ativos *Cys* e de *His* são conservados. Em geral todas as cisteíno-proteinases são enzimas intracelulares verdadeiras, encontradas no citosol ou lisosomas. As catepsinas lisosomais estão presentes em todos os tipos de células dos mamíferos. São em geral glicoproteínas pequenas (20-42 kDa), com ativação em pH ácido e ativas contra uma grande variedade de substratos protéicos e peptídicos (SAKSELA e RIFKIN 1988).

As serino-proteinases incluem os ativadores do plasminogênio, elastase leucocitária e catepsina G.

Os ativadores de plasminogênio convertem o plasminogênio em plasmina que por sua vez pode degradar componentes da matriz

extracelular como as fibronectinas, laminina, e proteoglicanas, embora não possam degradar colágenos nativos e elastina.

O termo ativadores de plasminogênio restringe-se à duas enzimas, o ativador de plasminogênio tipo uroquinase ou **uPA** (“*urokinase-type plasminogen activator*”) e o ativador de plasminogênio tipo tecidual ou **tPA** (“*tissue-type plasminogen activator*”). A Tabela 1 reúne as principais publicações da expressão dos ativadores de plasminogênio, seu receptor e inibidor, com relação ao câncer de mama feminino.

**Tabela 1** - Estudos de UPA, UPAR e PAI-1 em câncer de mama feminino.

<b>AUTOR</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>PROTEASE</b>	<b>CORRELAÇÕES</b>
FOEKENS <i>et al.</i> 1992.	671	Elisa	↑ uPA	↓ sobrevida
DUFFY <i>et al.</i> 1998.	184	Elisa	↑ uPA	↓ sobrevida
JÄNICKE <i>et al.</i> 1994.	247	Elisa	↑ uPA	↓ sobrevida
CONSTANTINI <i>et al.</i> 1996.	18	imunohistoquímico	↑ uPA	Agressividade tumoral
GRØNDAHL-HANSEN <i>et al.</i> 1995b.	505	Elisa	↑ uPAR	↓ sobrevida
KNOOP <i>et al.</i> 1998.	429	Elisa	↑ PAI-1	↓ sobrevida
KIM <i>et al.</i> 1998.	130	Elisa	↑ tPA	↑ sobrevida

↑ = aumento; ↓ = diminuição

A proteína uPA possui 431 aminoácidos e tPA possui 562 aminoácidos. Ambas consistem de 2 cadeias polipeptídicas A e B, sendo que a cadeia B é similar e contém resíduos *His*, *Asp* e *Ser* característico do sítio ativo de toda serino proteinase. As cadeias A de uPA e tPA diferem

consideravelmente em tamanho, mas têm alto grau de homologia. A cadeia A do uPA contém uma estrutura “*kringle*”, enquanto tPa possui 2 destas regiões no terminal carboxila. O terminal amina de ambos os ativadores de plasminogênio contém um domínio rico em cisteína com alta homologia ao fator de crescimento epidermal (“*epidermal growth factor*”). O resíduo 43 do terminal amina de tPA não tem correspondência com o mesmo em uPA, mas notadamente tem alta homologia ao “*finger domain*” das fibronectinas. A seqüência de aminoácidos 13-30 do terminal amina de uPA liga-se ao seu receptor uPAR (SAKSELA e RIFKIN 1988).

O mecanismo de super-expressão de uPA no câncer de mama ainda não foi completamente elucidado. Sabe-se no entanto, que a amplificação do gene uPA não é o único fator implicado na produção da proteína (HUBBARD et al. 1995).

Embora o substrato mais importante para os ativadores de plasminogênio seja o plasminogênio, verifica-se que o tPA tem uma forte afinidade também pela fibrina. Na presença da fibrina o tPA é altamente efetivo na ativação do plasminogênio (que também pode estar ligado à fibrina) e pouco ativo em sua ausência. Enquanto o tPA está relacionado ao processo de coagulação, o uPa relaciona-se à remodelagem tecidual e processos tumorais (SAKSELA e RIFKIN 1988; HUBBARD et al. 1995).

A expressão de uPA é regulada por várias substâncias como oncogenes, fatores de crescimento, AMPc, retinóides, prostaglandinas e luz ultra-violeta, sendo que um dos mais importantes sistemas de modulação

dos ativadores de plasminogênio é obtido através da plasmina (PLOUG et al. 1993).

Os ativadores de plasminogênio são secretados como pró-enzimas de cadeia simples (pró-uPA ou sc-uPA e pró-tPA ou sc-tPA) e são convertidos à dupla cadeia em sua forma ativa (SAKSELA e RIFKIN 1988).

O receptor de uPA é um glicopeptídeo de cadeia simples com peso molecular de 50 à 60KDa , possuindo 3 domínios de aproximadamente 90 aminoácidos. O uPA liga-se ao terminal amina de seu receptor enquanto o domínio carboxila fica aderido à membrana basal pela ponte glicosilfosfatidilinositol (âncora GPI). A uroquinase dissocia-se muito lentamente de seu receptor, permanecendo ativa na membrana celular por várias horas (MIGNATTI e RIFKIN 1993).

Entre os inibidores das serino-proteinases (SERPINs) destacam-se o PAI-1 e PAI-2 no processo de inibição ou inativação dos ativadores de plasminogênio. O PAI-1 ("plasminogen activator inhibitor-1") é uma proteína de 402 aminoácidos, inibindo a ação de tPA, uPA e da proteína C. Age como principal controlador da fibrinólise via tPA. Esta glicoproteína pode ser encontrada no plasma, plaquetas, endotélio e em células tumorais, sendo que as células endoteliais parecem ser seu sítio de síntese (MIGNATTI e RIFKIN 1993). Embora a expressão de PAI-1 correlacione-se com a sobrevivência no câncer de mama feminino (Tabela. 2), a expressão de PAI-2 não tem o mesmo significado (HARBECK et al. 1999; LOOK et al. 2002).

A concentração sérica de uPA, uPAR e PAI-1 varia consideravelmente no período menstrual, durante a menopausa em

mulheres normais ou nas portadoras de câncer de mama (HANSEN et al. 1997b).

Embora tenham sido estudados como fatores prognósticos em câncer de mama com axila negativa (KIM et al. 1998; ZEMZOUUM et al. 2003; MINISINI et al. 2007), onde determinam mau prognóstico quando presentes, os ativadores de plasminogênio ainda não foram amplamente estudados em câncer de mama localmente avançado.

Considerando a necessidade da determinação de marcadores de resposta a quimioterapia pré-operatória em câncer de mama com a finalidade de seleção de grupos de pacientes sensíveis a determinados regimes de quimioterapia, decidimos avaliar a expressão destes marcadores em um grupo de mulheres portadoras de câncer de mama localmente avançado (IIIB) tratadas com quimioterapia neoadjuvante.

## 2 OBJETIVOS

1. Determinar a expressão dos marcadores moleculares de invasão: uPA, uPAR, tPA, PAI-1 no câncer de mama feminino localmente avançado, EC III-B pelo método imunohistoquímico em material parafinado;
2. Determinar a relação entre a expressão destes marcadores e os achados anatomopatológicos estabelecidos como prognóstico em câncer de mama (idade, tipo histológico, tamanho do tumor primário, status menstrual e expressão de receptores hormonais de estrógeno e progesterona e p53);
3. Determinar a relação entre a expressão dos marcadores de invasão e a sobrevida livre de recaída e a sobrevida global.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Este é um estudo de coorte de coleta retrospectiva.

#### **3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo incluindo exclusivamente pacientes do sexo feminino, diagnosticadas com câncer primário da mama localmente avançado, tratadas no Hospital do Câncer - A C Camargo em dois protocolos investigacionais distintos (Protocolo HACC - III-B 001 e Protocolo HACC - III-B 002). O protocolo HACC – III-B 001 era composto de três ciclos de doxorubicina ( $60 \text{ mg/m}^2$ ) e ciclofosfamida ( $600 \text{ mg/m}^2$ ) administrados a cada 21 dias, seguido de cirurgia. O protocolo HACC – III-B 002 era composto de três ciclos de doxorubicina ( $60 \text{ mg/m}^2$ ) e paclitaxel ( $175 \text{ mg/m}^2$ ) a cada 21 dias, seguido de cirurgia. Os resultados clínicos de resposta destes dois protocolos foram previamente publicados (ANELLI et al. 1996, 1999). As pacientes foram recrutadas nestes protocolos entre janeiro de 1989 e julho de 2000 e para avaliação no presente estudo, preencheram os seguintes critérios de inclusão:

- Confirmação histopatológica de carcinoma ductal infiltrante primário da mama e ausência de neoplasia prévia anterior, excluindo-se carcinoma basocelular de pele e carcinoma *in situ* do colo uterino;
- Tumor primário conservado em parafina;
- Registro de seguimento em prontuário médico.

Este grupo era inicialmente composto por 165 mulheres. Vinte e quatro pacientes não realizaram seguimento na instituição e foram excluídas da análise por falta de informações de seguimento clínico. Em treze pacientes não foi possível obter material biológico adequado para a realização de revisão histopatológica e para a realização de *Tissue Array* e foram excluídas da análise.

Após a eliminação deste grupo de pacientes o total de pacientes que preencheram todos os critérios de elegibilidade foi de cento e vinte e oito mulheres.

### **3.3 METODOLOGIA**

#### **3.3.1 Validação Histopatológica das Amostras**

Todo o material histológico analisado foi coletado anteriormente a realização de qualquer forma de terapia através de biópsia incisional das lesões mamárias.

Antes de serem processadas, todas as amostras foram submetidas à análise histológica, utilizando-se o material fixado. Esta validação visa não somente a confirmação do diagnóstico, mas também a avaliação da amostra

quanto à presença de necrose, infiltrado inflamatório, estroma e tecido adiposo. As amostras foram revistas através da coloração de hematoxilina-eosina para a confirmação do tipo histológico (carcinoma ductal infiltrante).

### **3.3.2 Construção do *Tissue array***

Biópsias cilíndricas com 1-2,0 mm de diâmetro, obtidas de regiões selecionadas dos tecidos descritos, foram dispostas em fileiras em um novo bloco de parafina. Cortes de 5 $\mu$ m do bloco de parafina contendo as amostras foram transferidos para lâminas de vidro e submetidos à análise do padrão de expressão de proteínas específicas por imunohistoquímica.

### **3.3.3 Determinação da expressão dos antígenos**

Os anticorpos utilizados na análise foram: anti-uPA, anti-uPAR e anti-PAI-1. Foram também determinadas as expressões de cerb-B2, p53 e receptores de estrógeno e progesterona. A característica dos anticorpos utilizados, bem como a sua procedência, encontram-se listados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Lista dos Anticorpos Utilizados.

ANTICORPO	ORIGEM/CLONE	TÍTULO DO ANTICORPO	DO RECUPERAÇÃO DO ANTÍGENO	FABRICANTE
Anti-uPAR	Mouse monoclonal	1:200	Mw	American Diagnostica Inc, USA 3936
Anti-uPA	Mouse monoclonal	1:100	Mw	American Diagnostica Inc, USA 3689
Anti-PAI-1	Mouse monoclonal	1:50	Pp	American Diagnostica Inc, USA 3785
Anti-p53	Mouse monoclonal	1:100	Mw	Dako, Carpinteria CA
Anti-ER	Mouse monoclonal	1:100	Mw	Santa Cruz Biotech Santa Cruz, CA
Anti-PR	Mouse Monoclonal	1:50	Mw	Santa Cruz Biotech Santa Cruz, CA
Anti-Cerb-B2	Mouse Monoclonal	1:100	Mw	Santa Cruz Biotech Santa Cruz, CA

Pp= panela de pressão; Mw= microondas.

### 3.3.4 Método imunoistoquímico

Todas as reações imunoistoquímicas foram realizadas por apenas um indivíduo pertencente ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo.

Abaixo, segue o protocolo completo das reações de imunoistoquímica utilizando os métodos de recuperação do antígeno por microondas e panela de pressão. Desparafinização dos cortes de 3 µm de espessura, do material

incluído em parafina, em lâminas previamente tratadas com *3-Aminopropyl-triethoxy-silane* (SIGMA<sup>®</sup> A-3648 USA) e deixadas por 24 horas em estufa à 60°C:

- Xilol à 60°C por 20 minutos;
- Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;
- Etanol 100% 3 vezes por 30 segundos cada passagem;
- Etanol 95% por 30 segundos;
- Etanol 80% por 30 segundos;
- Etanol 70% por 30 segundos.

Lavagem das lâminas em água destilada corrente, seguida por incubação em tampão citrato 10 mM pH 6.0 no microondas na potência máxima (1300 watts) por dois ciclos de 9 minutos cada.

Na recuperação do anticorpo pelo método por panela de pressão, as lâminas em tampão citrato foram mergulhadas na panela de pressão e mantidas sob pressurização por 5 minutos.

- Resfriamento por 20 minutos à temperatura ambiente.
- Limpeza das lâminas em água corrente destilada.
- Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 3% 10 vol com 4 trocas de 5 minutos cada.
- Limpeza das lâminas em água corrente destilada.
- Limpeza com solução salina tamponada com fosfatos (*PBS-phosphate buffered saline*) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos.
- Incubação das lâminas com o anticorpo diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (SIGMA<sup>®</sup> A9647 USA) e ácido

sódico 0,1%, durante 30 min. à 37°C seguido de 16 à 18 horas à 4°C em câmara úmida.

- Limpeza em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
- Incubação com o anticorpo secundário biotilado-reagente C (*Biotinylated goat anti-mouse/rabbit* 1g) do kit *StreptABComplex/HRP Duet<sup>®</sup>* (*mouse/rabbit.*) (DAKO<sup>®</sup> A/S K492 Denmark) no título estabelecido (1/500), diluído em PBS durante 30 minutos à 37°C.
- Limpeza em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
- Incubação com o complexo - reagente A (Streptavidin) no título estabelecido (1/500), e reagente B (*Biotinylated peroxydase*) no título estabelecido (1/500), diluído em PBS por 30 minutos à 37°C.
- Limpeza em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
- Incubação das lâminas em solução substrato: 3,3' *Diaminobenzidine Tetrahydrochloride* (DAS) 60 mg% (SIGMA<sup>®</sup> D-5637 USA; Dimetilsulfóxido (DMSO) 1 ml; 1 ml de água oxigenada à 6% 20 vol; PBS 100 ml por 5 minutos à 37°C. ao abrigo da luz.
- Limpeza das lâminas em água corrente destilada por 3 minutos.
- Coloração com Hematoxilina de *Harris* por 1 minutos.
- Limpeza das lâminas em água corrente destilada.
- Imersão por 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água destilada corrente.
- Desidratação das lâminas em:
  - Etanol 50% por 30 segundos;
  - Etanol 80% por 30 segundos;

- Etanol 95% por 30 segundos;
- Xilol 4 vezes por 30 segundos cada.

Montagem entre lamínula com *Permout*.

Como controle positivo para cada anticorpo foram utilizados rim e artéria humanos e para o controle negativo, um veículo inerte substituindo o anticorpo em estudo. Áreas de tecido normal nas lâminas do estudo foram utilizadas como controle interno da reação.

Dentre todos os núcleos considerados como imunoreativos, somente aqueles claramente corados foram registrados como positivos para p53. Os tumores foram classificados como positivos ( > 20% de núcleos positivos) ou negativos ( < 20% de núcleos positivos).

### **3.3.5 Seguimento Clínico**

O seguimento clínico das pacientes foi realizado utilizando-se o protocolo de atendimento do Departamento de Oncologia Clínica do Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo onde constam as seguintes informações de cada paciente:

- Identificação;
- Data do Diagnóstico;
- Estadiamento;
- Tratamentos Prévios;
- Tratamento Atual;
- Queixa e Duração;

- Exame Clínico Geral e Loco – Regional;
- Exames Laboratoriais;
- Exames Radiológicos;
- Impressão Clínica;
- Plano de Tratamento.

O resultado radiológico que evidenciava progressão de doença foi utilizado como determinante da data da recaída para fins de cálculo da sobrevida livre de doença. Pacientes com recaída local tiveram esta data determinada através da biópsia da área suspeita.

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente foi realizada a análise descritiva da amostra por meio de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e porcentagens.

O tempo de sobrevida livre de doença foi considerado como sendo o tempo entre a data do diagnóstico e a data da recidiva ou a data da última visita ao hospital. O tempo de sobrevida global foi considerado como sendo o tempo entre a data do diagnóstico e a data do óbito ou última visita ao hospital. Tanto o tempo de sobrevida livre de doença, quanto o tempo de sobrevida global foram truncados em 60 meses.

A análise tanto dos fatores associados à sobrevida livre de doença, quanto dos fatores prognósticos foi feita pelo estimador do produto limite de *Kaplan-Meier* e pelo modelo de riscos proporcionais de *Cox*. Inicialmente foram estimadas as curvas com as taxas de sobrevida e a sua comparação foi realizada pelo teste de *log-rank*. Todas as variáveis que obtiveram  $p < 0,200$  no teste de *log-rank* foram selecionadas para o processo de modelagem múltipla. A proporcionalidade dos riscos foi avaliada pela curva do  $\ln(-\ln(S(t)))$  e para todas as variáveis selecionadas esta suposição foi verificada. Foi realizada a ordenação das variáveis na ordem crescente do valor de  $p$  e o processo de modelagem foi o *stepwise forward*. Nos modelos finais, tanto da sobrevida livre de doença, quanto para a sobrevida global, permaneceram no modelo aquelas variáveis que foram estatisticamente

significativas ( $p < 0,050$ ) e/ou foram necessárias para ajustar o modelo (isto é, reduziram em pelo menos 10% do valor da *hazard ratio* (HR) de alguma variável que já estava no modelo). Para os marcadores uPA, uPAR e PAI-1, foram testadas, também suas interações (ambos positivos, um só positivo, ou ambos negativos).

#### 4.1 VARIÁVEIS DO ESTUDO

- Característica Demográfica: idade;
- Características Clínicas: tamanho do tumor, invasão vascular (I.V.), invasão linfática (I.L.), presença de tumor *in situ* residual, expressão de receptor de estrógeno (R.E.) e do receptor de progesterona (R.P.);
- Tratamentos: quimioterapia (Q.T.) pré-operatória, Q.T. adjuvante e hormonioterapia;
- Marcadores: p53, uPA, uPAR, PAI-1 e erbB2.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram analisadas 128 pacientes, com idade variando de 28 a 70 anos (média de 50,2 anos e mediana de 49 anos). Todas foram submetidas a cirurgia, sendo que na maioria foi realizada mastectomia radical (101 pacientes - 78,9%) e em 27 pacientes foi realizada quadrantectomia. Em 99 pacientes (77,3%) não foi realizada a reconstrução imediata e em 24 mulheres (18,8%) este procedimento foi adotado. Todas as pacientes receberam radioterapia adjuvante.

Os resultados clínicos referentes ao padrão de resposta ao protocolo de quimioterapia instituído (resposta clínica parcial, resposta clínica completa, doença estável ou progressão de doença), bem como o resultado de resposta anátomo-patológicas já foram previamente descritos (ANELLI et al. 1996, 1999).

O padrão de resposta clínica não foi associado a expressão de UPA, UPAR ou PAI-1.

Cento e quinze pacientes (89,8%) foram submetidas a quimioterapia adjuvante, com os seguintes regimes: antraciclina isolada (61 pacientes), antraciclina associada com taxano (47 pacientes), taxano isolado (2 pacientes), C.M.F. (3 pacientes) e outras drogas em 2 pacientes. Treze pacientes (10,2%) não receberam quimioterapia adjuvante. Todas estas

pacientes foram tratadas no primeiro protocolo (HACC IIIB-01) com doxorubicina e ciclofosfamida. Todas as pacientes negaram-se a continuar tratamento sistêmico em virtude das toxicidades apresentadas no regime neo-adjuvante.

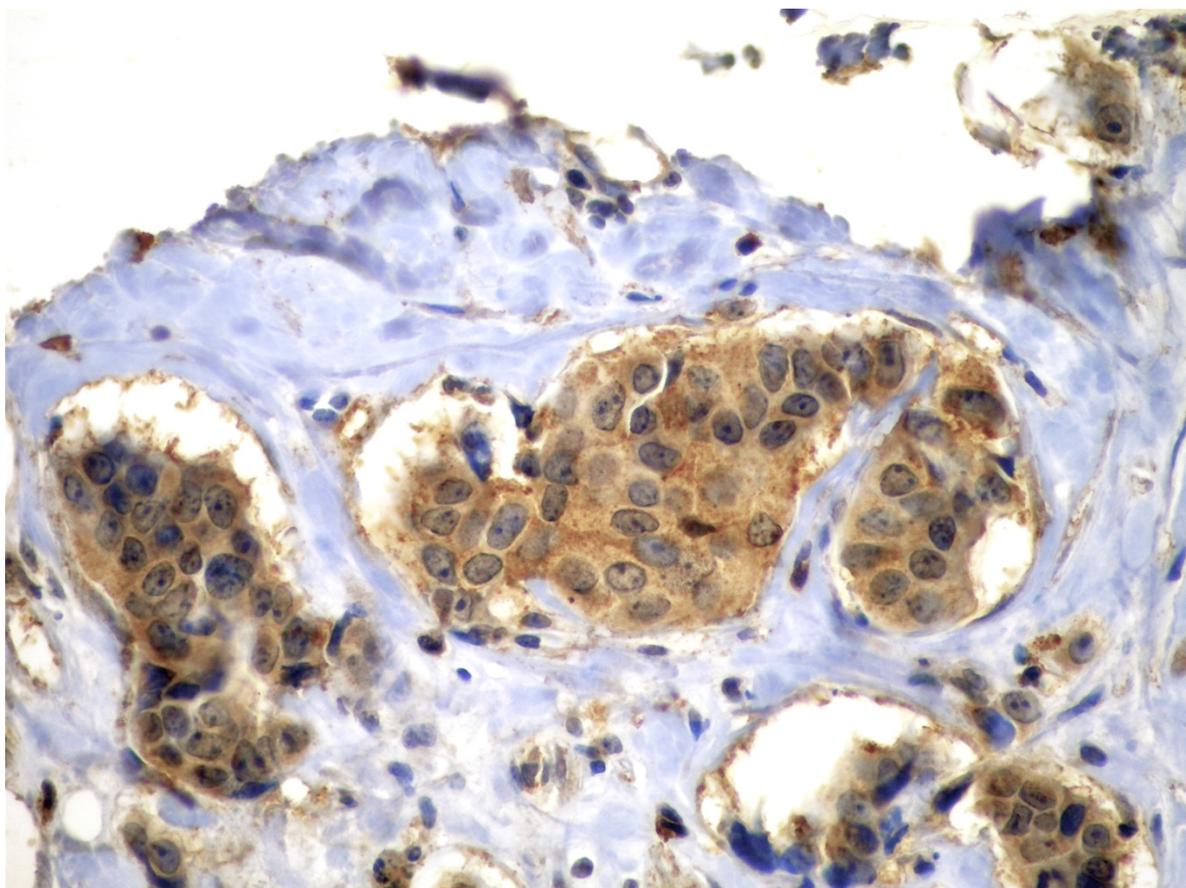
Em 71 pacientes (55,5%) foi realizada hormonioterapia adjuvante, sendo utilizado o citrato de tamoxifeno em 58 pacientes (81%) e inibidor de aromatase em 13 (19%) pacientes. A indicação da medicação para a realização de hormonioterapia adjuvante não fazia parte dos protocolos de quimioterapia pré-operatória e foram indicados de acordo com a preferência individual do oncologista responsável pela paciente.

A Tabela 1 apresenta as características das neoplasias avaliadas. A avaliação do tamanho das lesões residuais demonstrou que a maioria das pacientes apresentava tumores residuais entre 2,1 e 5,0 cm (52,3%), invasão linfática estava presente em 59,4% das pacientes, mas não invasão vascular (86,7%) ou presença de tumor *in situ* residual (82,8%). O receptor de estrógeno foi positivo para 59 pacientes (46,1%) e o de progesterona em 53 pacientes (41,4%).

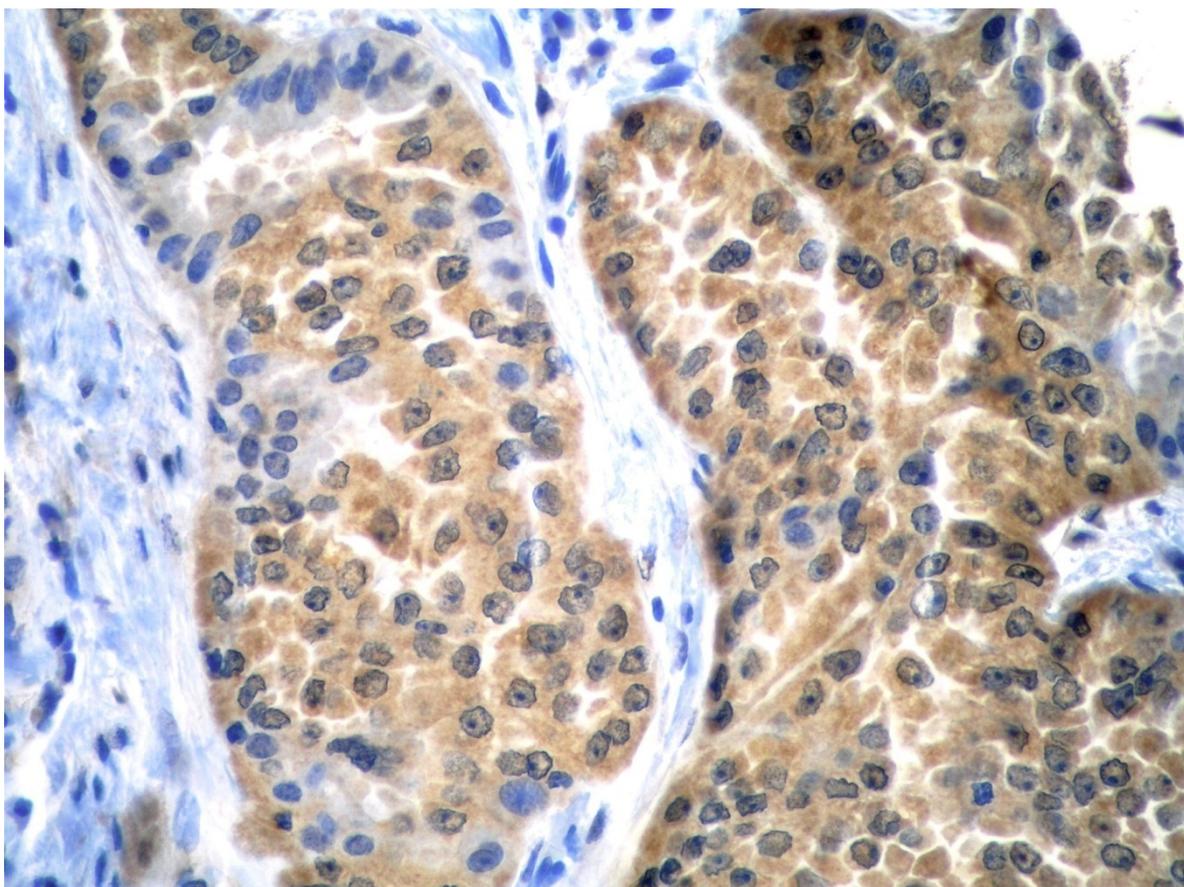
Em 23 pacientes (18,0%) as amostras eram positivas para p53 e a expressão de erbB2 foi positiva em 71 mulheres (55,5%).

Os marcadores de ativação do plasminogênio foram assim distribuídos: 113 amostras foram classificadas como positivas para uPA conforme exemplificado na Figura 1 (88,3% das pacientes). Setenta e uma amostras foram consideradas como positivas para uPAR como

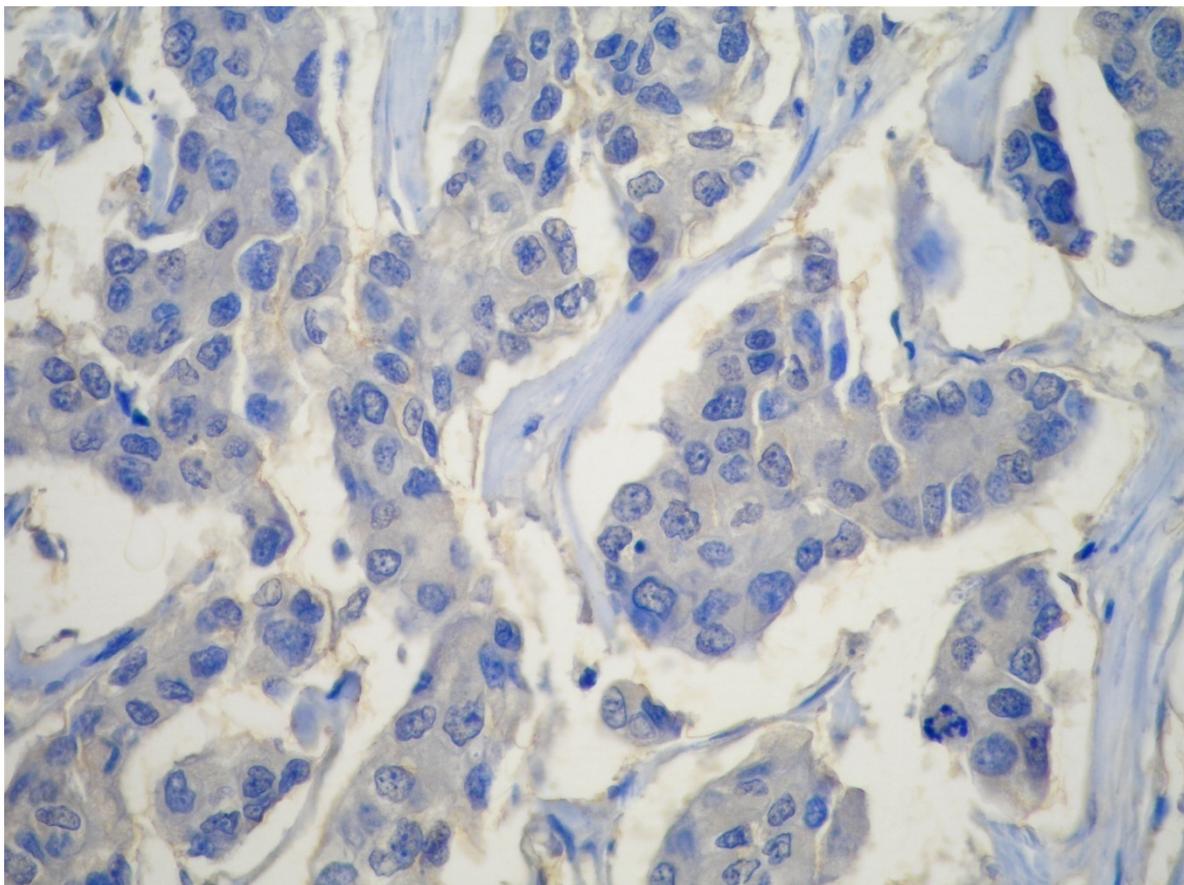
exemplificado na Figura 2 (55,5%) e 54 amostras positivas para PAI-1 (42,2%), representada pela Figura 3.



**Figura 1** - Microfotografia com expressão positiva de uPA.



**Figura 2** - Microfotografia com expressão positiva de uPAR.



**Figura 3** - Microfotografia com expressão positiva de PAI-1.

## 5.2 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA E SEUS FATORES ASSOCIADOS

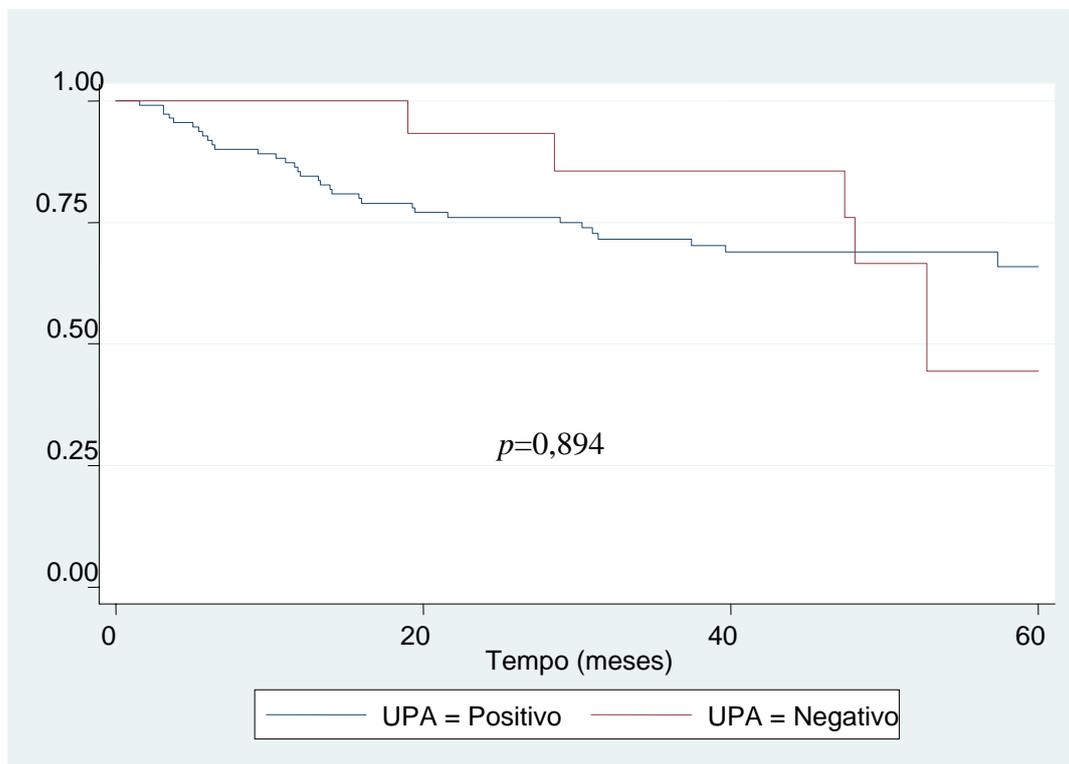
O tempo de sobrevida livre de doença foi truncado aos 60 meses. Após este período trinta e nove mulheres (30,5%) apresentaram recidiva da doença. Recidiva local exclusiva foi detectada em somente duas pacientes (5,12%). A maioria das mulheres (20 pacientes- 51,3%) apresentou recidivas viscerais (fígado e pulmões) e ósseas simultaneamente. Recidiva exclusivamente visceral ocorreu em oito (20,5%) pacientes e recidiva óssea exclusiva em nove (23%) pacientes.

A Tabela 3 apresenta a análise das taxas de sobrevida livre de doença. As probabilidades de S.L.D. foram de 86,5%, 77,3% e 62,4%, respectivamente após 12, 24 e 60 meses.

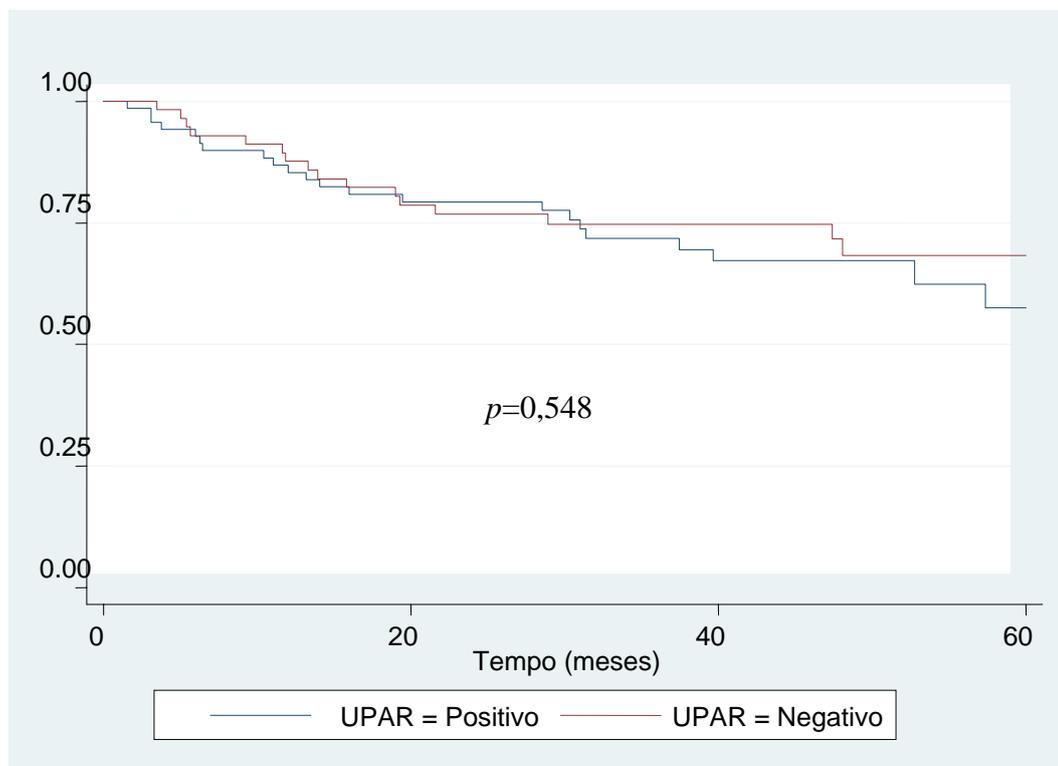
Dos marcadores de interesse, nenhum foi associado, estatisticamente, com as taxas de S.L.D. As Figuras 4, 5 e 6 representam a relação da expressão destes marcadores e a sobrevida livre de doença estimada por *Kaplan-Meier* para a expressão de uPA, uPAR e PAI-1.

**Tabela 3** - Taxa de sobrevida, segundo características demográficas e clínicas.

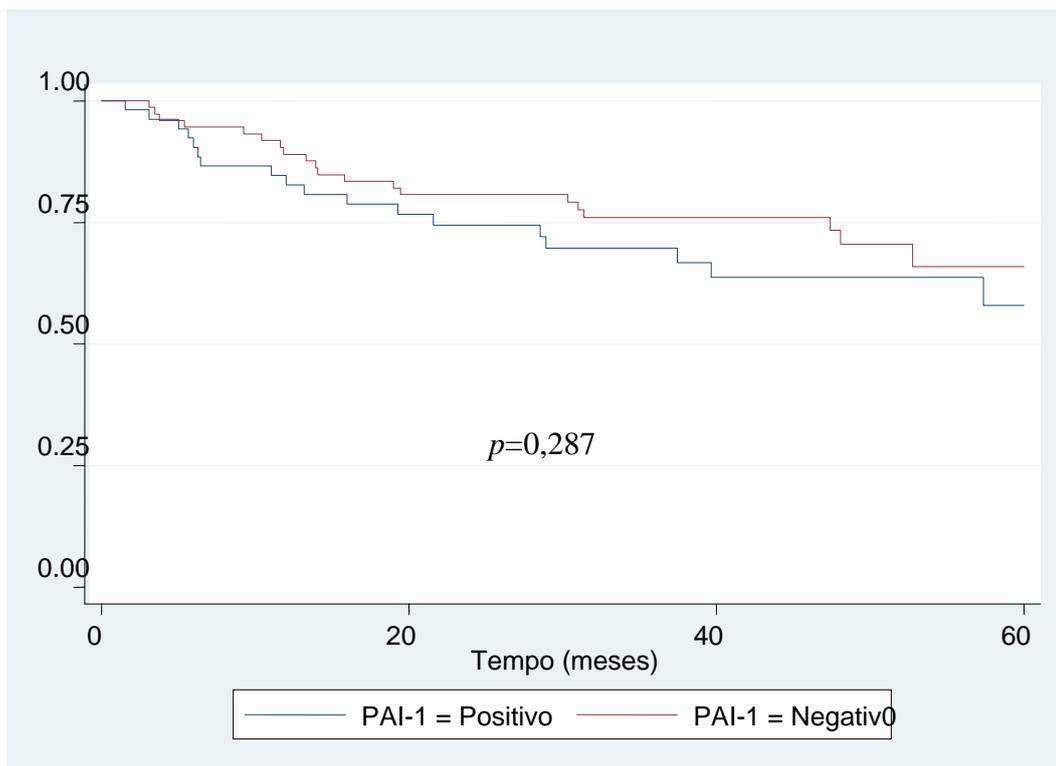
Variável	Categoria	Total	Recidiva		Taxa de sobrevida (%)			p (K-M)
		nº	nº	%	12 m	24 m	60 m	
Idade (anos) *	< 50	68	18	26,5	82,2	74,3	70,0	0,404
	>50	60	21	35,0	91,5	80,8	55,9	
UPA	Positivo	113	34	30,1	84,7	75,2	65,2	0,894
	Negativo	15	5	33,3	100,0	92,9	51,1	
UPAR	Positivo	71	23	32,4	85,6	78,0	57,4	0,548
	Negativo	57	16	28,1	87,6	76,5	67,7	
PAI-1	Positivo	54	19	35,2	83,0	73,0	56,3	0,287
	Negativo	74	20	27,0	89,0	80,4	66,5	
Regime QT	Doxo e ciclof.	63	32	50,8	82,4	66,2	47,1	<0,001
	Doxo e paclitax.	65	7	10,8	90,6	88,8	88,8	
QT adjuvante	Sim	115	28	24,4	87,6	79,2	71,8	<0,001
	Não	13	11	84,6	76,9	61,5	15,4	
Hormonioterapia	Tamoxifeno	58	10	17,2	89,6	85,9	80,4	0,005
	Inib. Aromatase	13	9	69,2	76,9	61,5	27,7	
Tamanho (cm)	0,1 – 2,0	26	4	15,4	88,0	83,7	83,7	0,036
	2,1 – 5,0	67	22	32,8	84,9	78,5	61,0	
	>5,0	19	11	57,9	79,0	57,2	29,0	
RE	Positivo	59	11	18,6	98,3	90,9	69,6	0,008
	Negativo	69	40	40,6	76,5	65,8	55,1	
RP	Positivo	53	12	22,6	94,2	84,2	67,0	0,141
	Negativo	75	27	36,0	81,1	72,5	57,9	
P53	Positivo	23	1	4,4	100,0	95,4	95,4	0,009
	Negativo	105	38	36,2	83,4	73,4	57,3	
ERB-B2	Positivo	71	22	31,0	87,2	81,3	57,1	0,863
	Negativo	57	17	30,0	85,6	72,3	68,0	
Inv. Vascular	Presente	17	9	52,9	76,5	52,9	35,3	0,040
	Ausente	111	30	27,0	88,1	81,3	66,4	
Inv. Linfática	Presente	76	30	39,5	79,9	68,5	52,1	0,010
	Ausente	52	9	17,3	96,1	90,0	79,1	
UPA/PAI-1	Ambos positivos	53	18	34,0	82,7	72,5	57,8	0,691
	Positivo único	61	17	27,9	86,7	78,0	70,3	
	Ambos negativos	14	4	28,6	100,0	92,3	55,4	
UPA/UPAR	Ambos positivos	69	21	30,4	85,2	77,3	61,7	0,721
	Positivo único	46	15	32,6	84,6	73,3	63,2	
	Ambos negativos	13	3	23,1	100,0	91,7	65,2	
UPAR/PAI-1	Ambos positivos	44	14	31,8	83,7	76,2	58,1	0,338
	Positivo único	37	14	37,8	86,3	75,0	54,4	
	Ambos negativos	47	11	23,4	89,3	80,2	71,9	
<b>TOTAL</b>		<b>128</b>	<b>39</b>	<b>30,5</b>	<b>86,5</b>	<b>77,3</b>	<b>62,4</b>	



**Figura 4** - Gráfico da sobrevida livre de doença (*Kaplan Meier*) para a expressão de UPA.



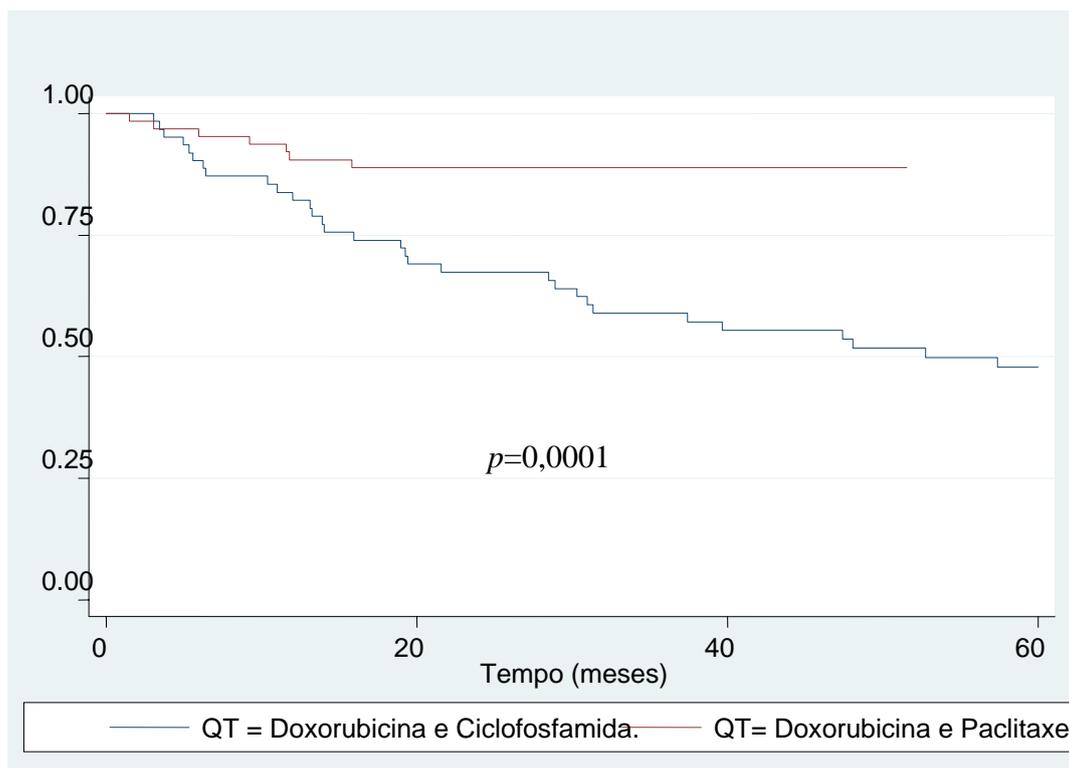
**Figura 5** - Gráfico da sobrevida livre de doença (*Kaplan Meier*) para a expressão de UPAR.



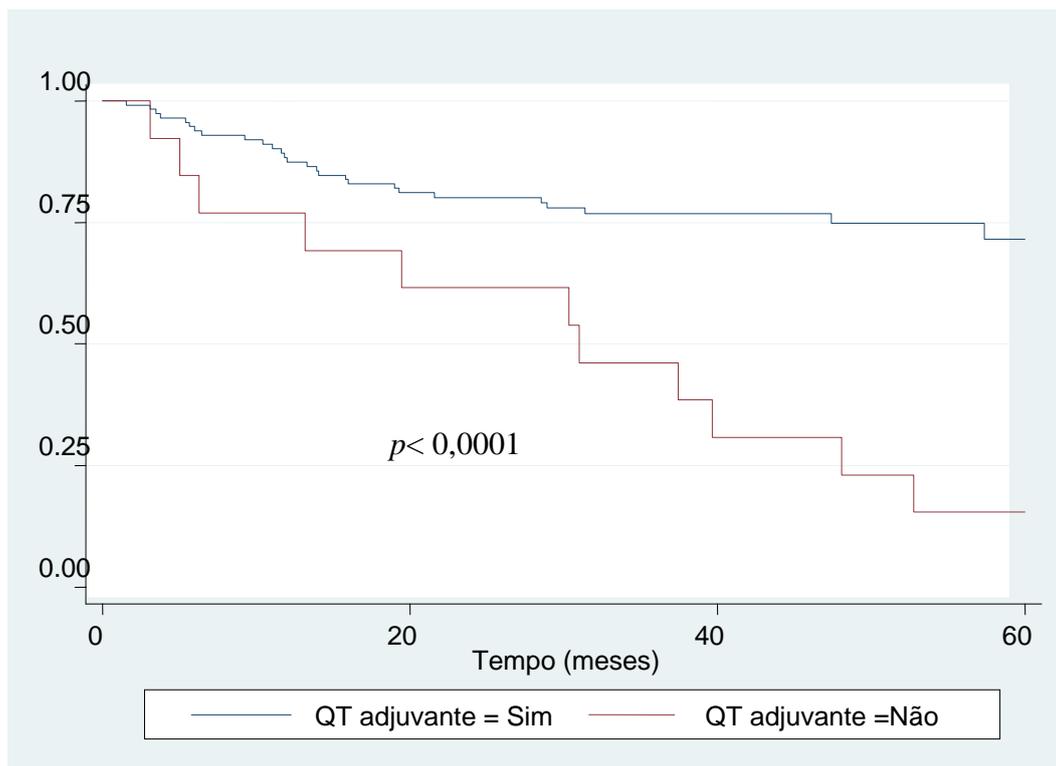
**Figura 6** - Gráfico da sobrevida livre de doença (*Kaplan Meier*) para a expressão de PAI-1.

Nesta análise, apresentaram piores taxas de S.L.D. as pacientes que utilizaram o regime de quimioterapia pré-operatória composto por doxorubicina e ciclofosfamida ( $p<0,001$ ) em comparação com aquelas tratadas com paclitaxel e doxorubicina. Esta análise é representada no Figura 7. As pacientes que não realizaram quimioterapia adjuvante também apresentaram pior sobrevida livre de doença quando comparadas aquelas que receberam tratamento ( $p<0,001$ ). Esta análise é representada no Figura 8. Também apresentaram uma piora na sobrevida livre de doença as pacientes que utilizaram inibidor de aromatase ( $p=0,005$ ) como hormonioterapia adjuvante. Esta análise é representada no Figura 9. Também apresentaram uma pior sobrevida livre de doença as pacientes

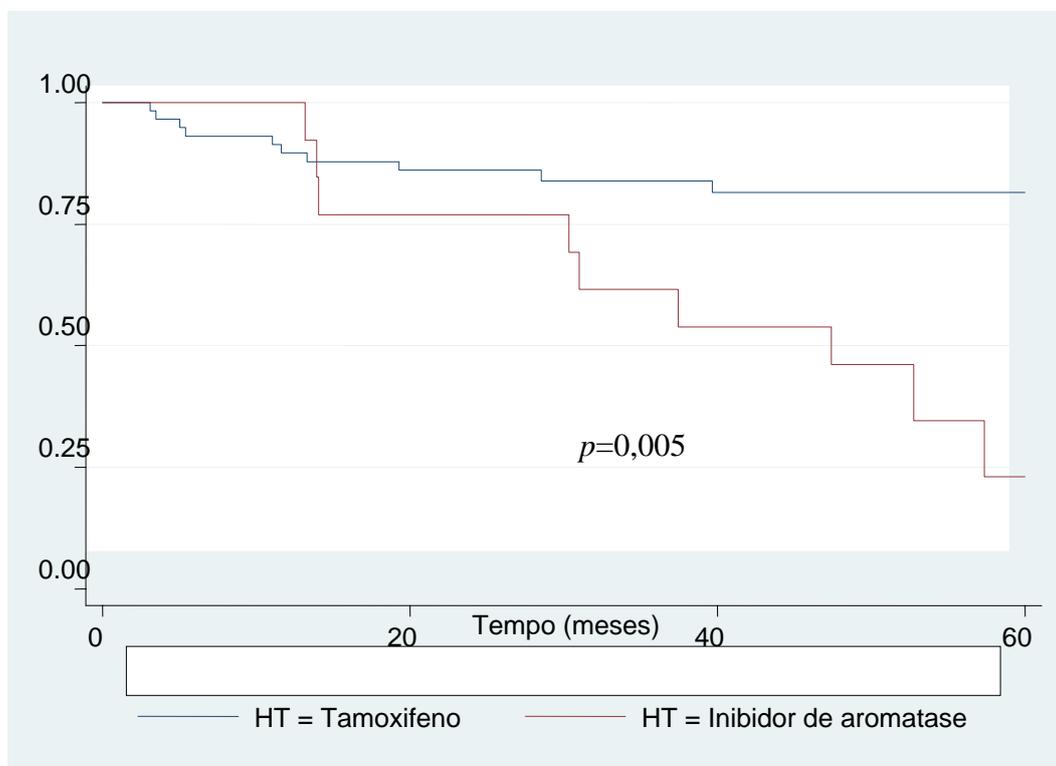
com tumores residuais maiores que 5 cm ( $p=0,036$ ), com expressão negativa de receptor de estrógeno ( $p=0,008$ ), com expressão negativa de p53 ( $p=0,009$ ) ou com invasão vascular ( $p=0,040$ ) ou linfonodal ( $p=0,010$ ) presentes.



**Figura 7** - Gráfico da sobrevida livre de doença (*Kaplan Meier*) para o regime de quimioterapia pré-operatória.



**Figura 8** - Gráfico da sobrevivência livre de doença (*Kaplan Meier*) para a realização de quimioterapia adjuvante.



**Figura 9** - Gráfico da sobrevivência livre de doença (*Kaplan Meier*) para o tipo de hormonioterapia adjuvante.

Na análise múltipla (Tabela 4), foram fatores independentes associados à sobrevida livre de doença não ter realizado quimioterapia adjuvante (HRaj=3,2;  $p=0,002$ ), tumores com expressão negativa do receptor de estrógeno (HRaj=3,2;  $p=0,001$ ), presença de invasão linfonodal (HRaj=2,4;  $p=0,023$ ) e, no limite da significância estatística, tumores que apresentavam p53 negativo (HRaj=6,9;  $p=0,058$ ).

**Tabela 4** - Análise múltipla do modelo de Cox para a S.L.D.

<i>Variável</i>	<i>Categoria</i>	<i>HRaj</i>	<i>IC<sub>95%</sub> (HRaj)</i>	<i>p</i>
QT adjuvante	Sim	1,0		
	Não	3,2	1,5 – 6,5	0,002
R.E.	Positivo	1,0		
	Negativo	3,2	1,6 – 6,6	0,001
p53	Positivo	1,0		
	Negativo	6,9	0,9 – 51,2	0,058
Invasão Linfonodal	Presente	2,4	1,1 – 5,1	0,023
	Ausente	1,0		

### 5.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL E SEUS FATORES PROGNÓSTICOS

Após 60 meses houve 70 óbitos no grupo avaliado. Todas as pacientes faleceram em decorrência de câncer de mama metastático e por suas complicações. Nenhuma paciente faleceu em virtude dos tratamentos realizados.

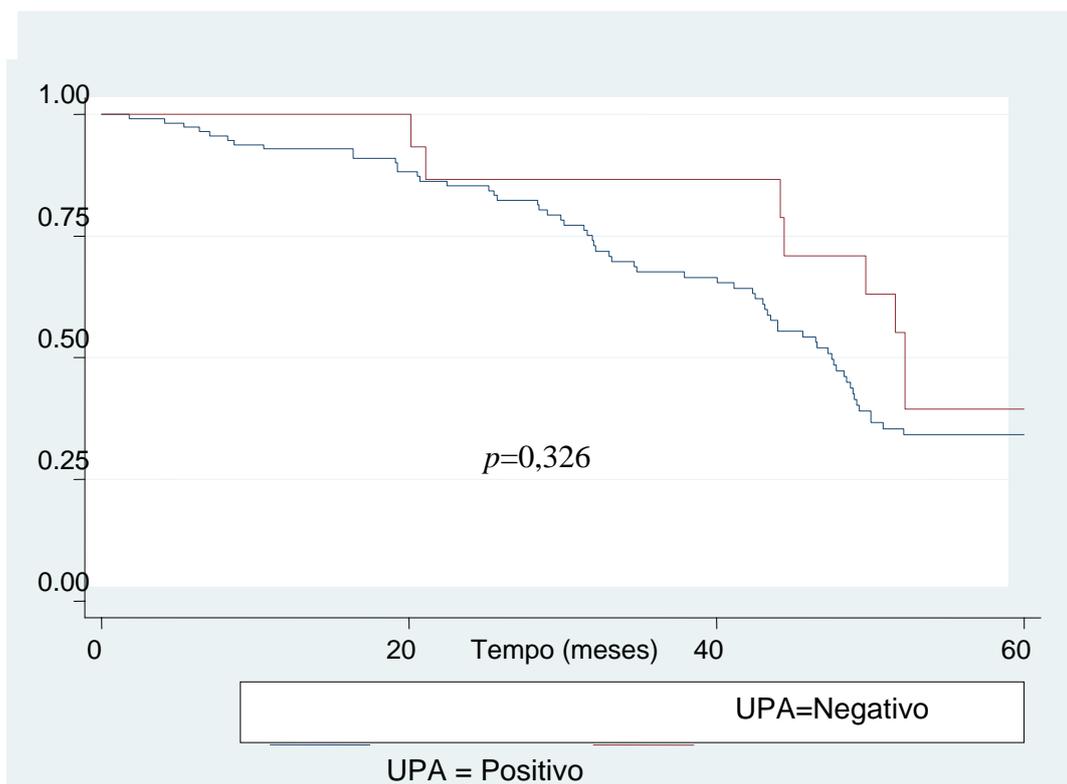
A Tabela 5 apresenta a análise dos fatores prognósticos analisados pelo método de *Kaplan-Meier*. As probabilidades de sobrevida global foram de 93,7%, 85,4%, 34,1%, respectivamente após 12, 24 e 60 meses. Nenhum dos marcadores de interesse foi fator prognóstico estatisticamente significativo. As Figura 10, 11 e 12 representam a relação da expressão dos marcadores e a sobrevida global estimada por *Kaplan-Meier* para a expressão de uPA, uPAR e PAI-1.

As menores taxas de sobrevida global foram as de pacientes que receberam doxorubicina e paclitaxel como regime de quimioterapia pré-operatória ( $p < 0,001$ ). Esta análise é representada na Figura 13. Aquelas pacientes que não realizaram quimioterapia adjuvante também apresentaram pior sobrevida global ( $p = 0,020$ ). Esta análise é representada na Figura 14. As pacientes que receberam tamoxifeno como hormonioterapia adjuvante ( $p < 0,001$ ) também apresentaram pior sobrevida global, bem como aquelas com p53 positivo ( $p = 0,019$ ). Estas análises são representadas nas Figuras 15 e 16.

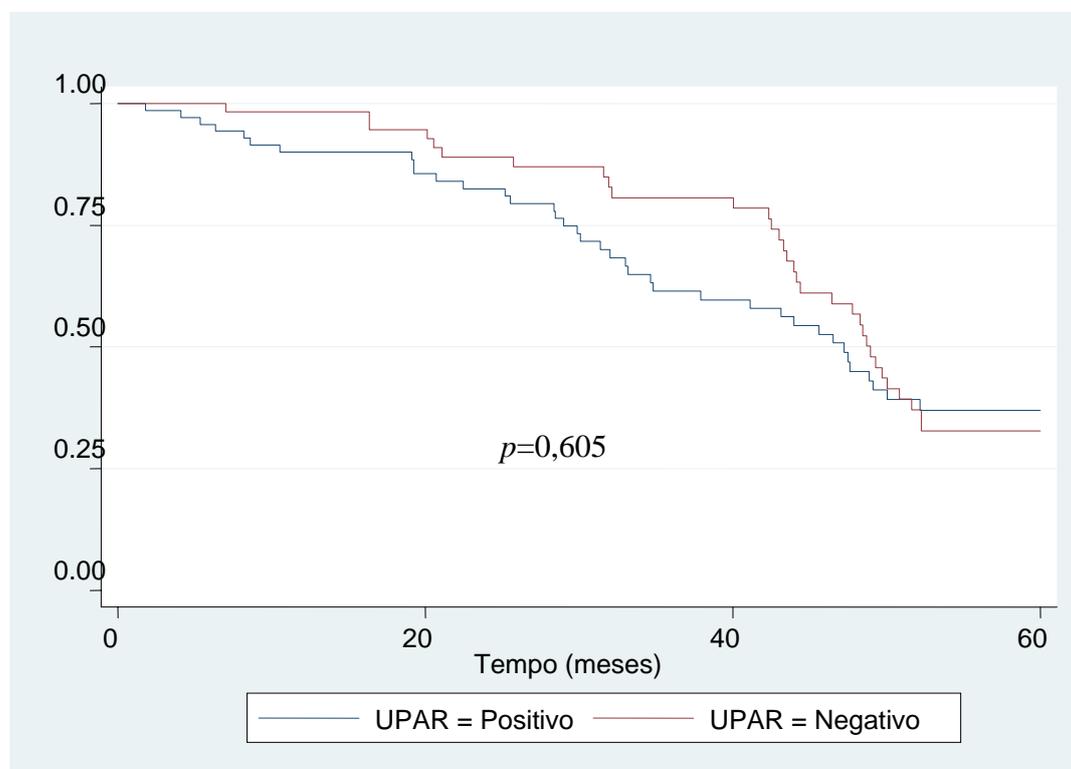
Na análise múltipla (Tabela 6), foram fatores prognósticos independentes não ter realizado QT adjuvante ( $HR_{aj} = 4,1$ ;  $p = 0,051$ ) e p53 positivo ( $HR_{aj} = 1,7$ ;  $p = 0,055$ ).

**Tabela 5** - Taxa de sobrevida global, segundo característica demográfica e clínicas.

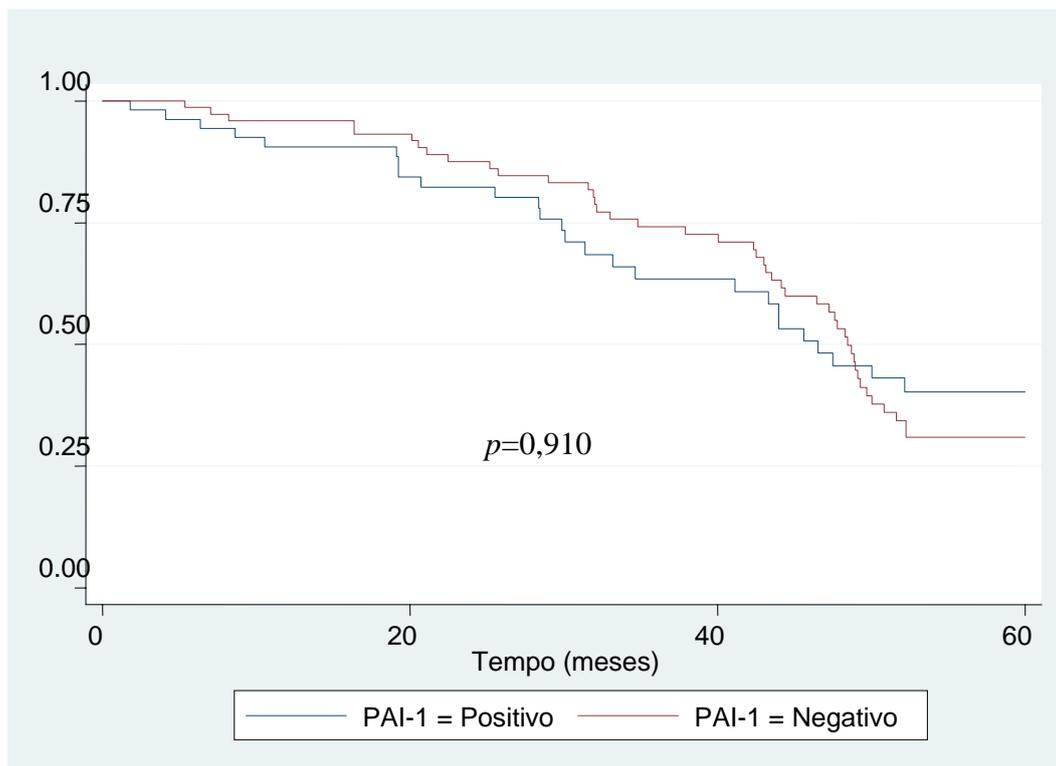
variável	categoria	total	Óbito		Taxa de sobrevida (%)			p (K-M)
		nº	nº	%	12 m	24 m	60 m	
Idade (anos) *	< 50	68	41	60,3	92,5	83,1	24,9	0,130
	>50	60	29	48,3	95,0	88,0	44,0	
UPA	Positivo	113	62	54,9	92,8	85,3	33,7	0,326
	Negativo	15	8	53,3	100,0	86,7	37,5	
UPAR	Positivo	71	38	53,5	90,1	82,7	36,7	0,605
	Negativo	57	32	56,1	98,2	88,9	32,0	
PAI-1	Positivo	54	26	48,2	90,5	82,3	40,5	0,910
	Negativo	74	44	59,5	96,0	87,6	30,2	
Regime QT	Doxo e ciclof.	63	11	17,5	93,6	90,1	79,0	<0,001
	Doxo e paclitax.	65	59	90,8	93,8	81,2	0,0	
QT adjuvante	Sim	115	68	59,1	94,7	85,6	29,6	0,020
	Não	13	2	15,4	84,0	84,0	84,0	
HT adjuvante	Tamoxifeno	58	44	75,9	96,5	84,0	14,5	<0,001
	Inib. Aromatase	13	2	15,4	100,0	100,0	78,4	
Tamanho (cm) Tumor residual	0,1 – 2,0	26	19	73,1	92,0	87,8	14,9	0,082
	2,1 – 5,0	67	36	53,7	91,0	84,7	34,3	
	>5,0	19	7	36,8	83,8	63,7	54,6	
R.E.	Positivo	59	39	66,1	94,9	86,4	27,0	0,296
	Negativo	69	31	44,9	92,6	84,6	42,2	
R.P.	Positivo	53	34	64,2	94,3	90,4	23,9	0,449
	Negativo	75	36	48,0	93,2	81,8	42,2	
p53	Positivo	23	18	78,3	95,7	91,3	11,8	0,019
	Negativo	105	52	49,5	93,2	84,1	39,6	
ERB-b2	Positivo	71	41	57,8	97,1	85,5	32,1	0,714
	Negativo	57	29	50,9	89,4	85,6	36,8	
Inv. Vascular	Presente	17	10	58,8	88,2	75,2	24,2	0,205
	Ausente	111	60	54,1	94,5	87,0	35,5	
Inv. Linfática	Presente	76	38	50,0	90,6	81,9	36,6	0,749
	Ausente	52	32	61,5	98,1	90,4	31,4	
UPA/PAI-1	Ambos positivos	53	26	49,1	90,3	82,0	40,2	0,615
	Positivo único	61	36	59,0	95,1	88,3	28,6	
	Ambos negativos	14	8	57,1	85,7	85,7	37,1	
UPA/UPAR	Ambos positivos	69	38	55,1	89,8	82,2	35,3	0,683
	Positivo único	46	24	52,2	97,8	90,7	34,2	
	Ambos negativos	13	8	61,5	100,0	84,6	31,6	
UPAR/PAI	Ambos positivos	44	24	54,6	88,5	78,8	36,9	0,678
	Positivo único	37	16	43,2	94,4	91,5	40,6	
	Ambos negativos	47	30	63,8	97,9	86,9	28,7	
<b>TOTAL</b>		<b>128</b>	<b>70</b>	<b>54,7</b>	<b>93,7</b>	<b>85,4</b>	<b>34,1</b>	



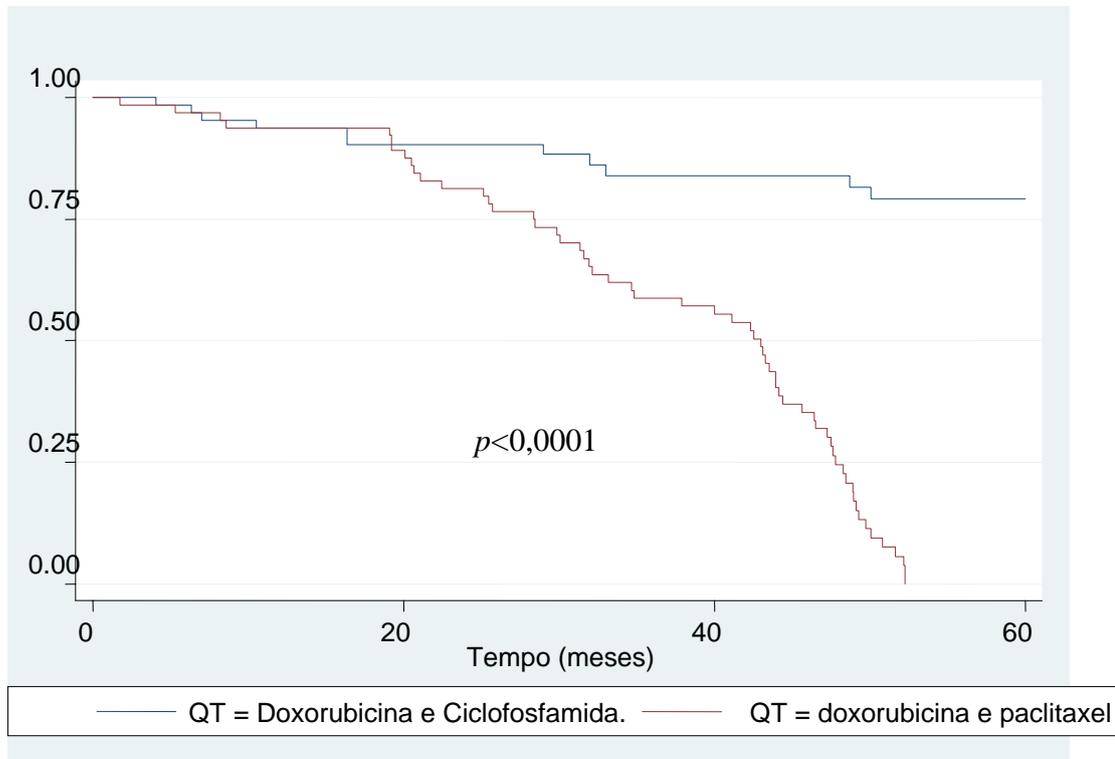
**Figura 10** - Gráfico da sobrevida global (*Kaplan Meier*) para a expressão de UPA.



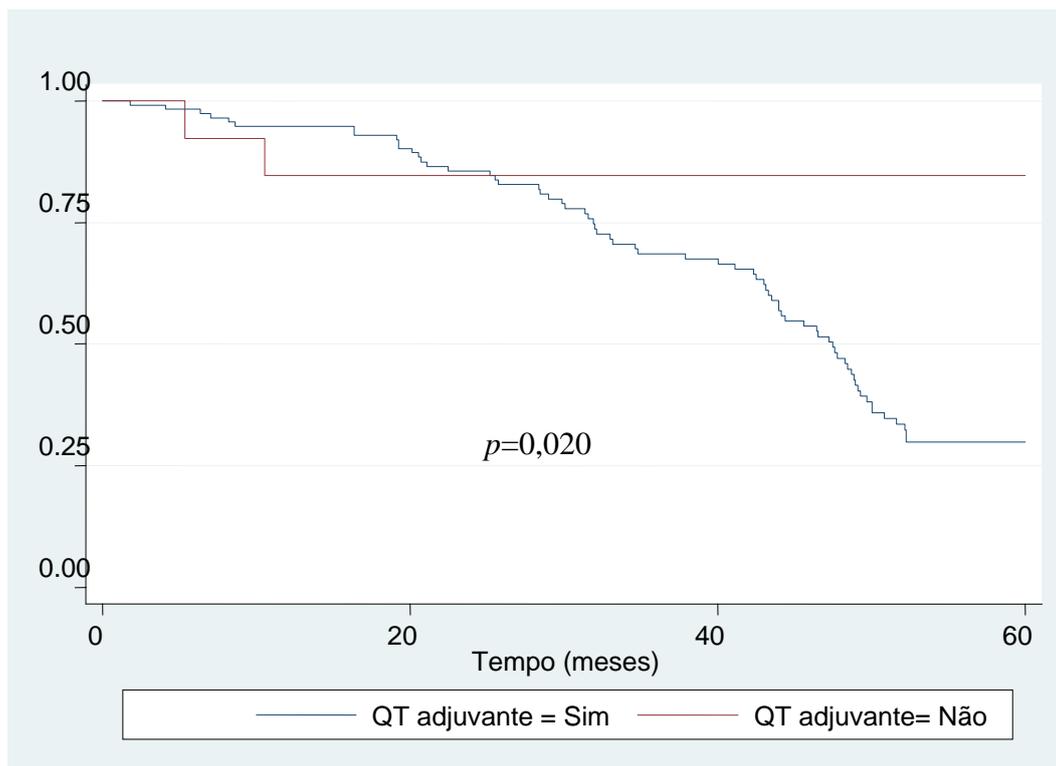
**Figura 11** - Gráfico da sobrevida global (*Kaplan Meier*) para a expressão de UPAR.



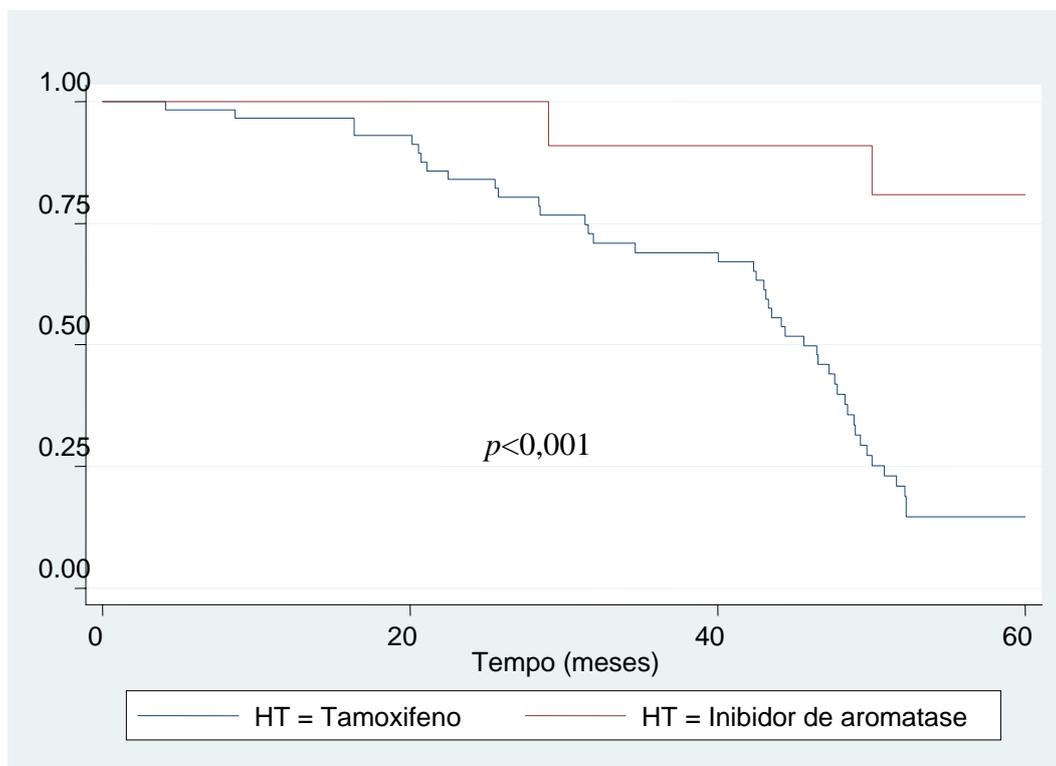
**Figura 12** - Gráfico da sobrevida global (*Kaplan Meier*) para a expressão de PAI-1.



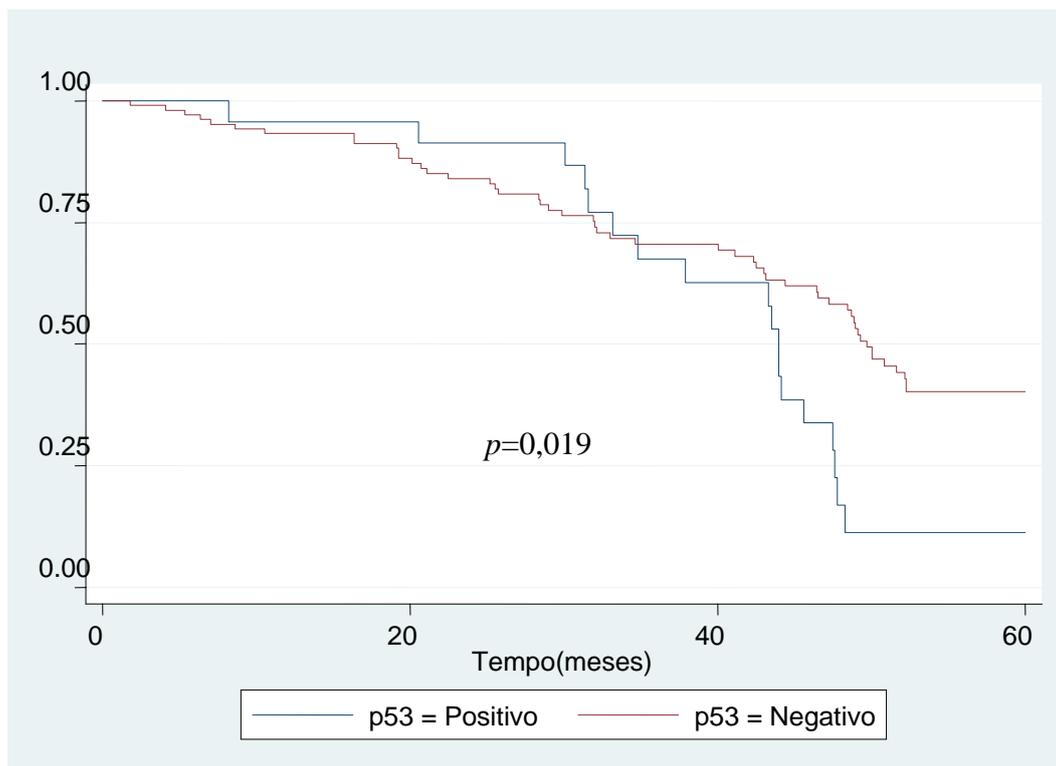
**Figura 13** - Gráfico da sobrevida global (*Kaplan Meier*) para o regime de quimioterapia pré-operatória.



**Figura 14** - Gráfico da sobrevida global (*Kaplan Meier*) para o regime de quimioterapia adjuvante.



**Figura 15** - Gráfico da sobrevida global (*Kaplan Meier*) para a realização de hormonioterapia adjuvante.



**Figura 16** - Gráfico da sobrevida global (*Kaplan Meier*) para expressão de p53.

**Tabela 6** - Análise múltipla do modelo de Cox para a S.G.

Variável	Categoria	HRaj	IC <sub>95%</sub> (HRaj)	p
QT adj	Sim	4,1	1,0 – 16,9	0,051
	Não	1,0		
p53	Positivo	1,7	1,0 – 2,3	0,055
	Negativo	1,0		

## 6 DISCUSSÃO

No tratamento do câncer de mama, existe uma grande necessidade em se distinguir entre pacientes de alto e baixo risco. Esta definição de risco tem como intenção, selecionar pacientes para tratamentos pré-operatórios (neo-adjuvantes) ou pós-operatórios (adjuvantes) (MEIJER-VAN GELDER et al. 1999; HARBECK et al. 2001). Além da indicação de terapias, em câncer de mama, é desejável e necessário o estabelecimento de marcadores de resposta ao tratamento, de maneira a se determinar populações que se beneficiariam de determinadas abordagens mais agressivas e poupando as pacientes que não se beneficiariam de tais procedimentos (HARBECK et al. 2002).

O marcador de resposta mais desejável seria aquele que identificasse moléculas específicas de progressão tumoral, ao contrário de marcadores que não são relacionados ao potencial agressivo dos tumores, como por exemplo a expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona). A identificação destes marcadores traria então a seleção correta de procedimentos terapêuticos a serem adotados.

O processo de crescimento e invasão tumoral pode ser mais precisamente descrito como um processo contínuo de remodelagem tecidual envolvendo células tumorais e células normais recrutadas pelas neoplásicas para fornecerem suporte ao seu crescimento.

No centro deste processo, encontra-se um complexo arranjo de proteases degradadoras de matriz extracelular. Neste arranjo, inclui-se o sistema ativador do plasminogênio uroquinase, as colagenases e estromelinas e as cisteíno proteases como a catepsina D (DANO et al. 1985).

O sistema ativador do plasminogênio uroquinase desempenha papel fundamental neste complexo de atividade enzimática e inclui a plasminogênio uroquinase (uPA), seu receptor de superfície celular (uPAR) e seus inibidores de ativação (PAI-1 e PAI-2).

Nos últimos anos, dados de pesquisa básica e de ensaios clínicos tem demonstrado que altos níveis de uPA e de seu inibidor PAI – 1 indicam mau prognóstico em algumas populações de mulheres com câncer de mama, especialmente naquelas com axila negativa.

Enquanto o uPA facilita o processo metastático através da degradação da matriz extracelular, PAI-1 desempenha um papel importante não apenas como inibidor de uPA. Após a ligação de PAI-1 ao receptor uPA, este complexo terciário é internalizado na célula, iniciando o processo de transdução de sinal e proliferação celular. Além disso, PAI-1 pode agir como um inibidor de adesão celular interferindo com a ancoragem da célula tumoral a ligantes de matriz extracelular. A ligação de UPA ao PAI-1 pode reverter este processo e facilitar novamente a adesão celular, portanto promovendo a migração celular pela ancoragem seletiva a matriz extracelular (MIGNATTI e RIFKIN 1993).

Em nosso estudo foram inicialmente consideradas 165 mulheres portadoras de câncer de mama localmente avançado. No entanto, trinta e sete mulheres foram excluídas da análise por falta de seguimento clínico adequado ou pela ausência de material biológico suficiente para a confecção dos *Tissue Arrays*.

A maioria dos estudos que analisam o papel dos ativadores de plasminogênio em câncer de mama utilizam a técnica de ELISA ou através da avaliação de RNA mensageiro e portanto material biológico fresco (HANSEN et al. 1997a; URBAN et al. 2006). Em nosso estudo pela ausência deste tipo de material biológico, optamos pela utilização da técnica de *Tissue-Array*, que apresenta a vantagem de analisar um grande número de amostras utilizando quantidades menores de anticorpos específicos.

Este estudo avaliou cento e vinte e oito mulheres portadoras de câncer de mama localmente avançado e submetidas a tratamento pré-operatório em dois protocolos investigacionais distintos conduzidos no Departamento de Oncologia Clínica do Hospital A.C. Camargo. No primeiro protocolo, as pacientes receberam três ciclos de quimioterapia contendo doxorubicina e ciclofosfamida e no segundo estudo a ciclofosfamida foi substituída por paclitaxel. A intenção desta substituição era a de aumentar a taxa de resposta e favorecer a taxa de cirurgia conservadora nesta população de alto risco (CORTE et al. 2005). Os dados destas abordagens clínicas foram favoráveis a troca de paclitaxel e encontram-se publicadas (ANELLI et al. 2003).

Na análise de sobrevida livre de doença, a expressão dos marcadores em estudo (uPA, uPAR e PAI-1) não apresentou significado estatístico. Este dado é contrário aos achados em pacientes em estágio inicial da doença, especialmente em câncer de mama com axila negativa, onde tem um forte papel prognóstico (KIM et al. 1998; ZEMZOUM et al. 2003).

Em pacientes com câncer de mama localmente avançado esta via pode ser menos significativa no processo de crescimento do que em sua fase inicial. Talvez, a inclusão de um maior número de pacientes através de um estudo cooperativo multicêntrico pudesse modificar este cenário, conforme já realizado em pacientes em fase inicial de câncer de mama (JANICKE et al. 2001).

No entanto pudemos constatar que houve um impacto estatisticamente significativo na sobrevida livre de doença na população tratada com paclitaxel e doxorubicina e comparação com o grupo tratado com ciclofosfamida e doxorubicina ( $p < 0,001$ ). Este dado fortalece a indicação deste regime quimioterápico em pacientes de alto risco, que necessitam de citoredução máxima para a indicação de cirurgia conservadora (ANELLI et al. 2003).

Da mesma maneira, pudemos estabelecer um impacto estatisticamente significativo na sobrevida livre de doença para as pacientes que receberam tratamento adjuvante, quer seja quimioterápico ou hormonioterápico ( $p < 0,001$ ). Quando a sobrevida global foi analisada, as pacientes que utilizaram paclitaxel e doxorubicina como quimioterapia pré-operatória apresentaram pior sobrevida.

Apesar de não termos encontrado grande correlação entre a evolução clínica e o perfil de expressão dos ativadores de plasminogênio em mulheres com câncer de mama localmente avançado, acreditamos que este estudo tenha sido relevante por ter criado um banco de dados de pacientes com neoplasia mamária localmente avançada que futuramente poderá ser avaliado quanto a expressão de outros marcadores de resposta à terapia.

Este estudo também confirmou a abordagem pré-operatória de um regime quimioterápico específico com impacto positivo na sobrevida livre de doença desta população de alto risco.

Acreditamos que o acréscimo de um maior número de casos com coleta prospectiva de material biológico e com seguimento clínico adequado, será possível contribuir para a realização de novos ensaios clínicos, abrindo possíveis perspectivas para o tratamento do câncer de mama.

## 7 CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado, podemos concluir que:

- 1 1 Foi possível a criação de um banco de dados de pacientes portadoras de câncer de mama localmente avançado com 128 pacientes. Neste banco estão coletados os dados clínicos e demográficos das pacientes, informações histopatológicas das neoplasias, dados dos tratamentos instituídos, informações clínicas e finalmente as informações obtidas através de imunohistoquímica por *Tissue Array* referentes à expressão de uPA, uPAR, PAI-1, Receptor de estrógeno, Receptor de Progesterona e p53.
  
- 2 A correlação entre a evolução clínica e a expressão dos ativadores de plasminogênio não demonstrou-se estatisticamente significativa na população estudada em relação a sobrevida livre de doença e sobrevida global.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anelli A, Gimenes DL, Tabacof J, et al. Neoadjuvant chemotherapy in stage III-B breast cancer: a single institution experience [abstract]. **Breast Cancer Res Treat** 1996; 41:a536. [Presented at 19<sup>th</sup> Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; 1996 December 11-14; San Antonio; Texas (USA)]

Anelli A, Gadelha AP, Albuquerque AA, et al. High response rate of paclitaxel and doxorubicin as neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer (IIIB) is associated with p53 status [abstract]. **Proc Ann Meet Am Soc Clin Oncol** 1999; 18:a302.

Anelli A, Brentani RR, Gadelha AP, Albuquerque AA, Soares F. Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using paclitaxel and doxorubicin in stage III B breast cancer. **Ann Oncol** 2003; 14:428-32.

Armas AO, Gerald WI, Lesse ML. Immunohistochemical detection of cathepsin D in T2N0M0 breast carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1994; 18:158-62.

Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. **Cancer** 1989; 63:181-7.

Corte MD, Verez P, Rodriguez JC, et al. Tissue-type plasminogen activator (tPA) in breast cancer: relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 90:33-40.

Dano K, Andreasen J, Grondahl HJ, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. **Adv Cancer Res** 1985; 44:139-266.

Fisher JL, Field CL, Zhou H, et al. Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases. **Breast Cancer Res Treat** 2000; 61:1-12.

Fitzgibbons PA, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124:996-1078.

Gasparini G, Pozza F, Harris AL. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node negative breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:1206-14.

Hansen JG, Christensen IJ, Briand P, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 in cytosolic tumor extracts predicts prognosis in low-risk breast cancer patients. **Clin Cancer Res** 1997a; 3:233-9.

Hansen JG, Hilsenbeck SG, Christensen IJ, et al. Prognostic significance of PAI-1 and uPA in cytosolic extracts obtained from node-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 1997b; 43:153-63.

Harbeck N, Thomssen C, Berger U, et al. Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. **Breast Cancer Res Treat** 1999; 54:147-57.

Harbeck N, Alt U, Berger U, et al. Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsins B, D, and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2757-64.

Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. **J Clin Oncol** 2002; 20: 1000-7.

Hubbard AL, Lauder J, Hawkin RA, et al. Disregulation of urokinase plasminogen activator gene in breast cancer. **Eur J Cancer** 1995; 31:103-7.

Janicke F, Prechtl A, Thomssen C, et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:913-20.

Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, et al. The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. **Cancer Res** 1993; 52:6101-7.

Kim SJ, Shiba E, Kobayashi T, et al. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (PA), PA inhibitor type-1, and tissue-type PA antigen levels in node-negative breast cancer: A prospective study on multicenter basis. **Clin Cancer Res** 1998; 4:177-82.

Look MP, Van Putten WL, Duffy MJ, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:116-28.

Meijer-van Gelder ME, Look MP, Bolt-de Vries J, Peters HA, Klijn JG, Foekens JA. Breast-conserving therapy: proteases as risk factors in relation to survival after local relapse. **J Clin Oncol** 1999; 17: 1449-57.

Mignatti P, Rifkin D. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. **Physiol Rev** 1993; 73:161-95.

Minisini AM, Fabbro D, Di Loreto C, et al. Markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer. **Am J Clin Pathol** 2007; 128:112-7.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2006 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Ploug M, Kjalke M, Ronne E, Weidle U, Hoyer-Hansen G, Dano K. Localization of disulfide bonds in the NH<sub>2</sub>-terminal domain of the cellular receptor for human urokinase-type plasminogen activator. **J Biol Chem** 1993; 268:17539-46.

Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. **Ann Res Cell Biol** 1988; 4:93-126.

Spyratos F, Marin PM, Hacene K, et al. Multiparametric prognostic evaluation of biologic factors in primary breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:1266-72.

Urban P, Vuaroqueaux V, Labuhn M, et al. Increased expression of urokinase-type plasminogen activator mRNA determines adverse prognosis in erbB2-positive primary breast cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24: 4245-53.

Zemzoum I, Kates RE, Ross JS, et al. Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:1022-1028.