ANNA VALÉRIA GERVÁSIO DE BRITTO

A imunoexpressão de VEGF-A, a densidade microvascular e linfática determinadas pelo CD34 e D2-40, podem não ser fatores indicativos de recidiva de carcinoma invasivo inicial da mama.

CAMPINAS

Unicamp

2007

ANNA VALÉRIA GERVÁSIO DE BRITTO

A imunoexpressão de VEGF-A, a densidade microvascular e linfática determinadas pelo CD34 e D2-40, podem não ser fatores indicativos de recidiva de carcinoma invasivo inicial da mama.

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de título de doutorado em Clínica Médica, área de concentração em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

CAMPINAS

Unicamp

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B777i

Britto, Anna Valéria Gervásio de
A imunoexpressão de VEGF-A, a densidade microvascular e linfática determinadas pelo CD34 e D2-40, podem não ser fatores indicativos de recidiva de carcinoma invasivo inicial da mama / Anna Valéria Gervásio de Britto. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Laura Sterian Ward, André Almeida Schenka
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. VEGF. 2. Mama - Doenças. 3. Câncer. 4. Linfonodos. 5. Mamas – Câncer. I. Ward, Laura Sterian. II. Schenka, André Almeida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: VEGF-A expression, microvessel and lymphatic vessel density may not be predicting factors of early breast cancer agressiveness

Keywords:
- VEGF
- Breast - Disease
- Neoplasm
- Lymph Nodes
- Breast, neoplasm

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Profa. Dra. Laura Sterian Ward
Prof. Dr. Fernando Augusto Soares
Prof. Dr. Júlio César Narciso Gomes
Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino
Profa. Dra. Carmem Silvia Passos Lima

Data da defesa: 11 - 12 - 2007

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): ***Prf^{a}. Dr^{a}. LAURA STERIAN WARD***

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) .Fernando Augusto Soares
2. Prof(a). Dr(a). Julio César Narciso Gomes
3. Prof(a). Dr(a). Luiz Carlos Zeferino
4. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Passos Lima
5. Prof.(a). Dr(a). Laura Sterian Ward

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas, da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/12/2007

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Darcy Lourenço de Britto, Anna G. de Britto, ao meu marido, Prof. Dr. Fábio Bucaretchi e aos meus filhos, Yuri e Caio, pela participação diária e construtiva na minha vida. Com eles aprendo a ser uma pessoa melhor.

A Profa. Dra. Laura Sterian Ward, por ter me aceito como aluna do doutorado e por ter tido sempre uma participação estimuladora diante de todos os obstáculos que surgiram para viabilização de minha titulação.

Ao Prof. Dr. José Vassallo, um dos mentores desse trabalho, meus sinceros agradecimentos pela participação em todas as etapas desse projeto com extrema competência técnica e dedicação.

Ao Prof. Dr. André A. Schenka e a Dra. Natália Guimarães de Moraes Schenka, que participaram intensamente desse trabalho, orientando-o com profissionalismo e dedicação, sem os quais ele não se concretizaria.

A todos os funcionários, médicos contratados e docentes do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A todos os funcionários do Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Assistência Integral a Saúde da Mulher (Caism), da Universidade de Campinas, em especial a Dra. Glauce Aparecida Pinto**,** ao estagiário Bruno Henrique Pereira e ao funcionário Paulo Latuf Filho, que tiveram participação decisiva em etapas importantes do trabalho no Laboratório de Patologia Experimental, durante a realização desse projeto.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	*xi*
ABSTRACT.....	*xiii*
1- INTRODUÇÃO.....	15
2- OBJETIVOS.....	26
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1- Seleção de pacientes.....	29
3.2- Preparo do material.....	29
3.3-Técnica Imunoistoquímica.....	30
3.4- Avaliação de MVD, LVD, VEGF e invasão vascular.....	32
3.5- Pesquisa do Linfonodo-negativo.....	34
3.6- Análise Estatística.....	34
4- RESULTADOS.....	36
5- DISCUSSÃO.....	48
6- CONCLUSÕES.....	56
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8- ANEXOS.....	67
Anexo 1- Classificação do TNM, 6ª. Edição (UICC).....	68
Anexo 2- Classificação por estágio clínico (6ª. Edição,UICC).....	71
Anexo 3- Cálculos estatísticos.....	72
Anexo 4- Metodologia de Pesquisa do Linfonodo-Sentinela.....	94

CM	Câncer de mama
HE	hematoxilina –eosina
LVD	densidade de vasos linfáticos (do inglês, *lymphatic vascular density*)
LS	linfonodo-sentinela
MVD	densidade microvascular (do inglês, *microvessel density*)
TNM	classificação internacional de estagiamento clínico-patológico de neoplasias malignas sólidas, baseada no tamanho do tumor primário (T), envolvimento linfonodal (N) e presença de metástases a distância da origem da neoplasia primária.
VEGF-A ou VEGF	fator estimulador do crescimento do endotélio de vasos (do inglês, *vascular endothelial growth factor*)
RE	receptor de estrógeno
RP	receptor de progesterona

PÁG.

Tabela 1- Distribuição dos casos segundo a expressão do anti-VEGF-A... 38

Tabela 2- Distribuição dos casos com invasão vascular pela HE e com D2-40, segundo o acometimento do LS..... 41

Tabela 3- Distribuição dos casos segundo grupo de risco..... 43

PÁG.

Figura 1- Padrão de correlação entre os anticorpos CD34, D2-40 e VEGF.. 42

Figura 2- Fotomicrografia mostrando a ausência de expressão do marcador VEGF-A. Imunoperoxidase (sistema Novolink, Novocastra, New Castle, UK), 20X..... 44

Figura 3- Fotomicrografia mostrando a expressão positiva intensa do marcador VEGF-A. Imunoperoxidase (sistema Novolink, Novocastra, New Castle, UK), 20X..... 45

Figura 4- Fotomicrografia ilustrativa da expressão do marcador CD34 em estruturas vasculares do estroma tumoral. Imunoperoxidase (sistema Novolink, Novocastra, New Castle, UK), 20X..... 46

Figura 5- Fotomicrografia da expressão do marcador D2-40 em estruturas vasculares linfáticas do estroma tumoral. Imunoperoxidase (sistema Novolink, Novocastra, New Castle, UK), 20X..... 47

PÁG.

Quadro 1- Fatores estimuladores e inibidores da angiogênese..... 20

Quadro 2- Classificação atual de risco de recidiva de carcinomas invasivos da mama..... 24

Quadro 3 Avaliação semi-quantitativa da expressão do anti-VEGF-A..... 33

Quadro 4- Distribuição dos 92 casos segundo idade, estado menopausal, estágio clínico e tamanho tumoral, de acordo com acometimento do LS..... 38

Quadro 5- Distribuição dos 92 casos segundo tipo e grau histológico, receptores hormonais e amplificação do cerb-B2, de acordo com acometimento do LS..... 39

Quadro 6- Distribuição dos 92 casos segundo a expressão dos anticorpos e acometimento do LS..... 40

Quadro 7- Análise descritiva do número de linfonodos nos 31 casos com LS positivo..... 40

Quadro 8- Distribuição dos oito casos classificados como estágio clínico III, segundo idade, receptores hormonais, expressão de Cerb-B2, CD34, D2-40, VEGF, número de linfonodos acometidos e invasão de vasos da pele..... 40

Quadro 9- Expressão do anti-CD34 e anti-D2-40, segundo as categorias de classificação da expressão do anticorpo VEGF-A..... 43

RESUMO

Objetivo: Avaliar a relação da angiogênese em carcinomas invasivos iniciais da mama com fatores clínico-patológicos indicativos de recorrência. **Casuística e Métodos**: Em 92 casos de pacientes com neoplasia maligna invasiva e inicial da mama e submetidas à pesquisa de comprometimento do linfonodo-sentinela (LS) pesquisou-se a imunoexpressão de VEGF-A, CD34 e D2-40 nos cortes dos tecidos tumorais previamente fixados e incluídos em parafina. Esta expressão foi analisada em relação ao estado do LS e às características clínico-patológicas, incluindo a classificação atual de risco para recidiva. **Resultados**: Não houve associação entre a imunoexpressão do VEGF-A e a avaliação da angiogênese com o estado do LS, nem tampouco com as demais características clínico-patológicas, incluindo grupos de risco para recidivas. Apenas o tamanho do tumor primário e a idade da paciente foram indicadores de acometimento linfonodal. O coeficiente linear de Spearman não indicou correlação da imunoexpressão dos marcadores entre si. A deteccção de linfáticos pela imunocoloração com anti-D2-40 possibilitou a alteração da classificação de risco em quatro pacientes. **Conclusões**: Não houve associação entre microdensidade de vasos sanguíneos (CD34) e linfáticos (D-2-40) ou da imunoexpressão de VEGF-A, com variáveis clínico-patológicas clássicas indicativas de maior recidiva, nos carcinomas analisados nesse estudo. Porém, a imunocoloração com anti-D2-40 aprimorou a determinação de invasão linfática, considerada fator de maior risco de recidiva em neoplasias malignas da mama com LS negativo.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the relationship between early breast cancer angiogenesis and clinicopathological factors indicative of recurrence.

Methods: Immunoexpression of VEGF-A, CD34 and D-2-40 was assessed in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of primary breast cancer specimens from 92 patients submitted to sentinel lymph node (SN) investigation. The expression of these markers was confronted to SN status, clinicopathological features and the current risk groups classification.

Results: No association between the immunoexpression of the three markers and SN status, clinicopathological features or risk assessment was detected. Only tumor´s size and patient's age were predictors of SN status. There was no correlation among the three markers by the Spearman's linear correlation coefficient. The use of D2-40 as a marker of lymphatic vessels improved vascular invasion detection, changing the current risk groups classification in four patients.

Conclusions: There was no association between tumoral microvascular (MVD) and lymphatic density (LVD), or immunoexpression of VEGF-A, with classical clinicopathological variables of tumour recurrence in this study. However, immunostaining for D2-40 proved to be useful in improving assessment of vascular invasion, an adverse feature in early breast cancer without node involvement.

1- INTRODUÇÃO

O carcinoma invasivo da mama (CM) é uma das neoplasias malignas mais freqüentes na maior parte dos países. No Brasil, a incidência bruta para o ano de 2006 foi de 75,4 por cem mil mulheres e a mortalidade proporcional por CM, no período de 1995-99 foi de 15,5%. Esses dados colocam o CM como a neoplasia maligna mais incidente e a que causa mais óbitos nas mulheres brasileiras (Brasil, 2006)[1].

Nas últimas décadas, com a evolução das técnicas diagnósticas por imagem e a possibilidade de triagem das mulheres através destas, há cada vez mais diagnóstico de CM feito em estágios iniciais, ou seja, estágios clínico-patológicos I e II, segundo a classificação do TNM vigente (6ª. edição da Classificação Internacional da UICC, anexo 1), inclusive no Brasil.

No estudo de Menke et al. (2007), entre 1972-2002, o tamanho médio em centímetros, dos carcinomas invasivos primários da mama detectados na macro-região de Porto Alegre, diminuiu de 3,5 cm para 2,8 cm, o que fez com que o número de casos de CM em estágio clínico I, dobrasse no período, sem qualquer campanha pública coordenada com esse intuito.

O diagnóstico precoce melhora o prognóstico e a sobrevida das pacientes, no entanto, estima-se que cerca de 30% dessas neoplasias, ainda evoluem de modo adverso, com recidivas à distância e morte, apesar dos parâmetros de bom prognóstico. O tratamento adjuvante com quimioterapia (e/ou hormonioterapia) e radioterapia em CM inicial diminui o risco de recidiva e morte, mas, ainda assim, a sobrevida livre de recidivas em 5 anos é [1]http://www.inca.gov.br de cerca de 72%, com tratamento adjuvante (Adjuvant Breast Cancer Trials Collaborative Group, 2007). São necessários marcadores de risco mais potentes para a detecção de casos com maior probabilidade de recidiva e morte nesse grupo de mulheres com CM inicial, especialmente nos casos sem acometimento linfonodal.

Hayes (2005), afirma que mais de cem fatores prognósticos de carcinomas de mama vêm sendo avaliados nos últimos 10-15 anos, no entanto, apenas três são considerados promissores:

1. Detecção de metástases na medula óssea ao diagnóstico ou em 2-4 anos de seguimento.

2. Expressão de *urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1* (UPA/PAI-1) no tumor primário.

3. Padrão de expressão de múltiplos genes ou "assinatura genética" de neoplasias malignas primárias.

A detecção de metástases na medula óssea ao diagnóstico ou em 2-4 anos de seguimento, parece associar-se a pior prognóstico, mas não é claro como isso poderia orientar a conduta quanto a tratamento adjuvante, no caso da detecção ao diagnóstico. Os estudos avaliando a quimioterapia adjuvante em altas doses, que poderia destruir as células neoplásicas na medula óssea, vêm mostrando pouco impacto em termos de ganho de sobrevida global (Farquhar et al.,2005)

Quanto a expressão de UPA/PAI-1, a dificuldade de se obter material fresco congelado em quantidade suficiente para essa avaliação, faz dela uma estratégia pouco factível para a utilização na prática clínica.

As "assinaturas ou perfis genéticos" vêm ressaltando o que já era perceptível na prática: carcinomas invasivos da mama são grosseiramente classificados quando utilizamos apenas características clínico-patológicas (Perou et al., 2000; Van der Vijver et al, 2002; Sorlie et al., 2003).

As "assinaturas ou perfis genéticos" são fatores preditivos e prognósticos bastante promissores. No entanto, há a necessidade de validá-los através de estudos bem desenhados, randomizados de fase III, em grandes populações, de preferência multicêntricos. Estudos desse tipo estão em andamento e são fundamentais para o estabelecimento da utilização desses fatores na prática clínica (Bogaerts et al., 2006).

Vários estudos vêm apontando a avaliação de angiogênese como um fator prognóstico adverso em carcinomas de mama (Weidner et al., 1991; Ogawa et al., 1995; Toi et al., 1995; Heimann et al., 1998; Kumar et al., 1999; Hansen et al., 2000;

Schoppmann et al., 2004; Mohammed et al., 2007), mas há outros nos quais essa associação não pôde ser confirmada (Axelson et al., 1995, Fridman et al., 2000; Medri et al., 2000**;** Vincent-Salomon et al., 2001; Guidi et al., 2002).

Angiogênese é definida como o surgimento de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais maduras, constituintes de um leito vascular já existente (Folkman,1971; Folkman,1990). Ela ocorre durante condições fisiológicas, por exemplo, na osteogênese, no processo de cicatrização, no desenvolvimento do embrião, na luteinização, e também em situações patológicas, como a inflamação crônica não auto-limitada, certas reações imunes e em neoplasias (Zetter, 1980).

Existem evidências suficientes para afirmar que as neoplasias malignas em geral, e as de mama em particular, são dependentes da angiogênese. Durante o início do crescimento das neoplasias malignas, estas utilizam os vasos já existentes para se desenvolverem, mas essa condição passa a ser insuficiente em tumores de $1mm^3$ ou mais (Folkman,1971). A formação de novos vasos através do processo de angiogênese inicia e segue uma seqüência ordenada de eventos que incluem lise da membrana basal de uma vênula já formada, migração das células endoteliais em direção aos estímulos angiogênicos produzidos pelo tumor ou por células do hospedeiro (por exemplo, macrófagos), proliferação de células endoteliais que se organizam na forma de brotos vasculares, formação de lúmen e desenvolvimento de ramificações e anastomoses dessas estruturas umas às outras para formação de alças vasculares (Zetter, 1980; Folkman, 1982).

Os vasos neoformados nas neoplasias malignas, segundo as etapas acima, são bastante distintos da rede vascular madura normal de hospedeiro. Eles são tortuosos, com paredes finas, com falhas de preenchimento ou fenestrações e sem a camada de pericitos; a rede vascular assim formada, não apresenta a hierarquia vista normalmente entre arteríolas, capilares e vênulas.

Existem hoje identificados, fatores pró e anti-angiogênicos, sistematizados no quadro I, mas o processo completo da formação de novos vasos é apenas parcialmente conhecido. O protótipo da família de fatores estimuladores do crescimento do endotélio (*vascular endothelial growth factor-VEGF*), o VEGF-A, aqui referido como VEGF, tem

importante papel durante as etapas de formação de novos vasos acima descritas (Ferrara et al, 2003; Byrne et al, 2005), em especial nas fases iniciais do desenvolvimento das neoplasias malignas. (Yoshiji et al., 1997; Benjamin et al., 1999).

A formação de novos vasos em neoplasias malignas não ocorre exclusivamente segundo as etapas acima descritas. Existem outros processos de formação de novos vasos em diferentes neoplasias malignas, descritos em experimentos "in vivo" e "in vitro" (Pezzella et al., 1997; Holash et al., 1999; Mariotis et al., 1999), mas nos CM, o processo de angiogênese descrito acima é preponderante.

Quadro 1- Fatores estimuladores e inibidores da angiogênese

ANGIOGENINA	ANGIOSTATINA
ANGIOPOETINA-1	ANTITROMBINA II
FATOR DE CRESCIMENTO DE CÉLULA ENDOTELIAL DERIVADO DE PLAQUETA-TIMIDINA FOSFORILASE	ENDOSTATINA
FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETA	FATOR DE CRESCIMENTO DE TRANSFORMAÇÃO BETA
FATORES DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR A,B,C e D	FATOR INIBIDOR DE LEUCEMIA
FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO ÁCIDO E BÁSICO	FATOR PLAQUETÁRIO 4
FATOR DE CRESCIMENTO HEPATOCÍTICO	FRAGMENTO DE FIBRONECTINA
FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO	FRAGMENTO DO COMPLEMENTO DE CD59
FATORES DE CRESCIMENTO DE TRANSFORMAÇÃO ALFA E BETA	GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA
FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA GRANULOCÍTICA	HEPARINASES
FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA	INIBIDOR DO ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO
FOLISTATINA	INIBIDORES DE METALOPROTEINASES
PLEIOTROFINA	INTERFERONS ALFA, BETA E GAMA
INTERLEUCINA-8	INTERLEUCINA 12
MIDICINA	RETINÓIDES
	TROMBOSPONDINA-1V
	VASOSTATINA

Adaptado de Rasila et al., 2005.

Vários métodos para avaliar a angiogênese em neoplasias malignas são citados: a determinação da densidade microvascular (MVD) é uma delas e consiste em avaliar a quantidade de microvasos em tecidos corados por imunoistoquímica, com marcadores específicos que destacam estruturas vasculares. Microvaso é, por definição, uma célula, ou um conjunto de células endoteliais presente dentro da área invasora de um tumor, mas não em áreas necróticas ou escleróticas, separadas claramente dos vasos adjacentes e de outras estruturas do estroma (Weidner, 1995; Sharma et al., 2005). A densidade de vasos linfáticos (LVD) pode ser obtida com a utilização de marcadores específicos que destacam essas estruturas.

A determinação de marcadores solúveis séricos de angiogênese, por exemplo, o VEGF, detectados por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e a quantificação deste em extratos tumorais, por ensaio imunoenzimático colorimétrico, são outras possibilidades. Alguns exames de imagem, como a ressonância magnética, *positron emission tomography* (PET-CT) e *Dynamic Optical Breast Imaging System* (DOBI), vêm sendo citados como potenciais metodologias, ainda em fase de validação (Pollitt et al., 2005; Bertolini et al., 2006). Todas as metodologias acima têm limitações e nenhuma é considerada padrão para a determinação de angiogênese de neoplasias malignas (Gasparini, 2000).

Uzzan et al. (2004), em uma metanálise, onde a determinação de MVD nos estudos selecionados foi feita por imunoistoquímica, estabelecem uma relação positiva e estatisticamente significativa, embora fraca, entre MVD e sobrevida global, inclusive para a população de mulheres com CM sem linfonodo acometido. Na maior parte dos estudos incluídos nessa metanálise, anticorpos chamados de "pan-endoteliais" foram utilizados. Eles são considerados menos sensíveis na detecção de microvasos, sejam linfáticos ou sanguíneos (Hasan et al., 2002).

Como citado anteriormente, o VEGF é de fundamental importância no processo de angiogênese tumoral. Ele está relacionado aos estímulos para o crescimento de vasos linfáticos e sanguíneos em condições normais e patológicas e também interfere com a permeabilidade vascular, permitindo o escape de fatores de crescimento, proteínas e outras macromoléculas do plasma, participando da estruturação do estroma (Dvorak et al., 1995;

Yoshiji et al., 1997). Além disso, resultados de estudos em linhagem de células de neoplasias malignas de mama que expressam certos receptores para VEGF, evidenciam que elas respondem à ação autócrina deste, resultando em ativação de vias que impedem a apoptose celular e promovem a migração de células tumorais (Price et al., 2001; Mercurio et al., 2005).

A expressão do VEGF pode ser induzida por uma série de fatores, mas o mais importante é a hipóxia. O termo VEGF relaciona-se a uma família que inclui o fator de crescimento placentário (PLGF), VEGF A, B, C e D. O protótipo do grupo, VEGF-A, aqui referido como VEGF, é um regulador chave do crescimento de vasos sanguíneos "in vivo" .Tem sido mostrado que há grande dependência dele para o crescimento de novas células endoteliais em uma neoplasia maligna em formação (Benjamin et al., 1999).

O VEGF humano é sintetizado por um gene situado no lócus 21.3 do braço curto do cromossomo 6. Seu gene é formado por oito exons separados por sete introns; junções diferentes de exons dão origem a seis diferentes isoformas de VEFG: 121, 145, 165, 183, 189 e 206 (Ferrara et al., 2003). O VEGF 165 é a isoforma predominante em tecidos e células normais e é um potente estimulador da angiogênese (Byrne et al., 2005).

Nas reações imunoistoquímicas com o anticorpo anti-VEGF, há coloração citoplasmática e membranosa em todas as células que expressam o gene do VEGF. Os estudos que utilizam esse anticorpo estabelecem critérios próprios para a definição de imunocoloração, geralmente qualitativa, e não há um critério padrão para essa determinação.

Na prática oncológica atual, há a possibilidade de utilizar drogas anti-angiogênicas, já disponíveis comercialmente. Essas medicações demonstraram aumento de sobrevida global quando associadas à quimioterapia, em neoplasias malignas avançadas de mama, pulmão, cólon e reto, dentre outras e vêm sendo testadas na adjuvância. Não há marcadores moleculares específicos capazes de discriminar grupos de pacientes que se beneficiariam mais desse tratamento de alto custo e não isento de efeitos colaterais.

Considerando que o VEGF tem funções que vão além do estímulo mitótico sobre as células endoteliais, que o torna um "promotor" do desenvolvimento de neoplasias malignas, foi aventada a hipótese de que ele poderia se relacionar com a MVD, LVD, invasão vascular determinada com anticorpos com alta sensibilidade e especificidade para vasos linfáticos, como o D2-40, e com variáveis anátomo-clínicas que traduzem maior risco de recidiva e morte por CM, rotineiramente determinadas ao diagnóstico dessas neoplasias.

Dessa forma, nesse estudo foi escolhido o anticorpo CD34, indicado como referência para os estudos de angiogênese em neoplasias sólidas, pelo consenso de 2002 (Vermeullen et al., 2002); o anti-D2-40, com alta sensibilidade e especificidade para detecção de vasos linfáticos e que evidencia invasão desses por células das neoplasias malignas, e o anti-VEGF-A (isoformas 121, 165 e 189), para estudar a relação da imuno-expressão desses, com variáveis clínico-patológicas clássicas de neoplasias malignas precoces da mama.

O CD34 é uma glicoproteína transmembranar de cadeia única com peso molecular de 116 kDa. É expresso em células imaturas progenitoras, linfóides e mielóides do tecido hematopoético, células endoteliais capilares, fibroblastos embrionários e raras células gliais do sistema nervoso. Sua função é desconhecida. Ele tem maior capacidade de destacar vasos sanguíneos e praticamente não detecta os linfáticos, sendo expresso tanto em pequenos como em grandes vasos, com a mesma intensidade em tecidos normais e neoplásicos (Hasan et al., 2002). O CD34 apresenta alta especificidade, apesar de ter alguma coloração linfática e estromal (Hasan, 2002).

Outro anticorpo utilizado nesse trabalho, o D2-40, identifica uma sialoglicoproteína O-ligada, de 40 kDa, presente em uma variedade de tecidos, incluindo testículo fetal e tumores de células germinativas testiculares (Marks et al.,1999). Ele reage com endotélio de vasos linfáticos, mas não sanguíneos. Em neoplasias, ele auxilia na identificação de invasão linfática intra-tumoral (Kahn e Marks, 2002a; Kahn e Marks, 2002b). É descrito como de alta sensibilidade e especificidade na detecção de vasos linfáticos, sendo portanto, ideal para a quantificação destes em estudos de avaliação da LVD. No estudo de Van der Auwera et al. (2005), o D2-40 foi considerado o melhor marcador para determinação de vasos linfáticos dentre outros três utilizados.

Evangelou et al. (2005), determinaram altas sensibilidade, (97,3, intervalo de confiança entre 94,9 e 99,2) e especificidade (98,8, intervalo de confiança entre 98,3 e 99,5), para detecção de vasos linfáticos pelo D2-40.

Pelo Consenso do Colégio Americano de Patologia (Fitzgibbons et al., 2000), os fatores de valor prognóstico estabelecido e que são importantes para as decisões na clínica quanto à conduta terapêutica, ou seja, os classificados na categoria I de evidência, são: tamanho do tumor primário, acometimento linfonodal, número de linfonodos acometidos pela neoplasia maligna, grau histológico, tipo histológico, contagem de figuras de mitose e estado dos receptores de estrógeno e progesterona. Esses fatores são ainda hoje, os pilares de sustentação do modelo de definição de risco de recidiva e morte por CM e são rotineiramente determinados ao diagnóstico dessas neoplasias.

No Consenso Internacional de Tratamento de CM Precoce ocorrido em St. Gallen em 2005, houve importantes mudanças no paradigma de avaliação de fatores de risco para recidiva de CM (Goldhirsch et al., 2005). Consideram-se fatores adversos das neoplasias precoces da mama atualmente, o tamanho tumoral, o grau histológico, a idade, a positividade para a proteína cerb-B2, a presença de disseminação linfonodal e a invasão vascular peritumoral, nos casos sem acometimento de linfonodos (quadro 2).

Quadro 2- Classificação atual de risco de recidiva de carcinomas invasivos da mama.

CATEGORIA DE RISCO	CRITÉRIOS
BAIXO	linfonodo negativo e todas as seguintes características: pT≤ 2cm, grau histológico I, cerb-B2 negativo, ausência de invasão peritumoral vascular, idade superior a 35 anos
INTERMEDIÁRIO	linfonodo negativo e no mínimo, uma das seguintes características: pT>2 cm ou grau histológico 2 ou 3, ou presença de invasão vascular peritumoral ou cerb-B2 positivo ou idade inferior a 35 anos. linfonodo positivo (1-3) e cerb-B2 negativo
ALTO	linfonodo positivo (1 a 3) e cerb-B2 positivo ou mais de 4 linfonodos positivos

Adaptado de Goldhirsh et al., 2005

A invasão vascular peritumoral nos casos sem disseminação linfonodal e a expressão do cerb-B2, foram os dois critérios adicionados às categorias de risco na atual classificação. A presença de receptores hormonais de estrógeno e/ou progesterona, passou a ser fator preditivo de resposta ao tratamento hormonioterápico e a presença de linfonodos acometidos, por sua vez, continua sendo um dos piores fatores adversos em neoplasias malignas da mama.

Considerando que a determinação da expressão do VEGF é mais factível do que as determinações de MVD/LVD, se houvesse correlação entre essas e a expressão do VEGF, com parâmetros anátomo-clínicos indicativos de pior evolução do CM inicial determinados rotineiramente e citados acima, seria possível caracterizar grupos de pacientes suscetíveis a tratamento adjuvante com drogas anti-angiogênicas, cujo alvo é o VEGF.

2- OBJETIVOS

Sistematizando, os objetivos desse estudo foram:

A. Objetivo Geral

Avaliar o impacto da determinação de marcadores de angiogênese como indicadores de recidiva em pacientes com carcinoma mamário operável, com e sem metástase em linfonodos-sentinela.

B. Objetivos Específicos:

1. avaliar a relação da MVD e LVD determinadas com os anticorpos CD34 e D2-40, e da imuno-expressão do VEGF-A, com a presença ou ausência de acometimento do linfonodo sentinela (LS) e outras variáveis clínico-patológicas indicativas de maior risco de recidiva de neoplasias malignas invasivas da mama.

2. avaliar uma possível correlação entre a expressão de anti-VEGF-A, anti- D2-40 e anti-CD34.

3. avaliar se a imunocoloração para o D2-40, aumenta a possibilidade de detecção de invasão vascular em relação à detectada exclusivamente com hematoxilina-eosina.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Seleção de pacientes

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (Parecer CEP/FCM/UNICAMP #06/06/03- 072/98).

Foram incluídos 92 casos de carcinomas invasivos da mama, dentre o total de 126 dos selecionados para a pesquisa de LS, no Centro de Assistência Integral a Saúde da Mulher (CAISM), da Universidade Estadual de Campinas, entre julho de 2004 a fevereiro de 2006.

Dentre os casos excluídos, 30 se caracterizaram como neoplasias de mama "in situ", três casos foram considerados micro-invasivos e um foi caracterizado como Doença de Paget do mamilo associada a carcinoma "in situ". Os prontuários de todas as pacientes foram consultados para o levantamento dos dados clínicos.

3.2- Preparo do material

Para cada caso foram revisadas todas as lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina (HE), de biópsias diagnósticas e da peça cirúrgica das neoplasias primárias correspondentes, por um patologista especializado em patologia mamária. Foram separados os blocos de parafina mais representativos do tumor primário e desses, escolhido um, do qual foram feitos 6 cortes histológicos de 4µm. Esses cortes foram colocados em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e tratadas com solução de organosilano a 25% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma-Chemical Co, St. Louis, MO, Estados Unidos; cód A3648). As lâminas com os cortes foram conservadas em temperatura adequada no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher (Caism), da Universidade Estadual de Campinas, até a realização das reações.

3.3- Técnica Imunoistoquímica

1ª Etapa : desparafinização:

As secções foram desparafinizadas em banho de xilol previamente aquecido em estufa de 110°C por 30 minutos e, a seguir, em 2 banhos subseqüentes de xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por meio de três banhos de H_2O_2 a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS.

Para a recuperação antigênica, foi utilizada uma panela a vapor T-Fall, com o objetivo de desmascarar os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, em pH 6,0, durante trinta minutos a 95 °C e, a seguir, lavadas em água corrente.

2ª. Etapa: incubação com anticorpo primário

Os anticorpos utilizados, suas respectivas especificações técnicas e diluições são descritos abaixo:

- Anti-CD34: clone QBend 10, diluição 1:50, Dakocytomation (Dako), Carpenteria, CA, EUA.
- Anti-D2-40: clone D2-40, diluição 1:50, Dako, Carpenteria, CA, EUA.
- Anti-VEGF-A: clone VG1, diluição 1:100, Dako, Carpenteria, CA, EUA.
- Anti-cerb B2: clone PN2A, diluição 1:450, Dako, Carpenteria, CA, EUA.
- Anti-RE: clone 1D5, diluição 1:300, Dako, Carpenteria, CA, EUA.
- Anti-RP: NCL-PGR-312d/1, clone 16, diluição 1:100, Novocastra, New Castle, UK.

O anticorpo primário foi gotejado sobre o preparado histológico na diluição adequada e incubado durante a noite (*overnight*), à temperatura ambiente.

3ª. Etapa: coloração (revelação da reação):

Após a incubação com anticorpo primário, as lâminas foram submetidas a 3 lavagens no agitador, em PBS, por cinco minutos cada, em temperatura ambiente. Após secagem, foram incubadas por 30 minutos em estufa a 37 ^{o}C com o sistema de detecção baseado em polímero Novolink (Novocastra, Newcastle, UK), exceto no caso dos receptores hormonais.

Terminada esta incubação, foram realizadas três lavagens em PBS, sob agitação.

Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico, a solução DAB (tetraidrocloreto de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, Estados Unidos da América), na proporção de 0,06g para 100mL de PBS, 500µl de H_2O_2 a 20 volumes e 1 mL de DMSO (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, Estados Unidos da América), por cinco minutos a 37 ^{o}C.

O material foi lavado em água corrente e contra-corado com hematoxilina de Mayer durante 30-60 segundos. As lâminas foram desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e encaminhadas a três banhos de xilol, para em seguida serem montadas em lamínulas e resina Entellan ® (Merck, Dermstad, Alemanha). Todas as reações foram feitas com controles negativos e positivos apropriados.

A pesquisa de amplificação do cerb-B2, foi feita por método imunoistoquímico, com o anticorpo anti-cerb-B2 acima descrito, em todos os casos. Em 19 casos, considerados indefinidos pela imunoistoquímica (escore 2+), a presença da amplificação do cerb-B2 foi determinada por CISH (hibridização "in situ" cromógena), com o kit Zymed´s SpoT-Light^{R} HER2CISH^{TM} (Invitrogen, San Francisco, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura destes casos seguiu a normatização descrita por Tanner et al, 2000. Em resumo, a amplificação foi diagnosticada mediante a identificação de um grande "cluster"

de cópias gênicas em mais de 50% das células do carcinoma invasivo ou mediante a observação de 10 cópias gênicas distintas e separadas.

Os receptores de estrógeno e progesterona foram determinados ao diagnóstico da neoplasia maligna, através de técnica imunoistoquímica feita segundo as mesmas etapas acima descritas, exceto pela utilização do sistema Envision Plus®, ao invés do Novolink. A positividade foi definida quando foram vistas 10% ou mais de células com expressão nuclear do marcador (receptor de estrógeno ou progesterona), independentemente da intensidade da coloração.

3.4- Avaliação de MVD, LVD, VEGF E invasão vascular

MVD e LVD foram estimadas por meio dos anticorpos CD34 e D2-40, segundo a padronização descrita por Weidner,1995, por um pesquisador em todos os casos e por dois pesquisadores, um deles, patologista, em uma amostra aleatória de 30 casos. Qualquer célula endotelial ou grupo de células endoteliais de coloração marrom, independentemente do tamanho, claramente separada(o) dos vasos adjacentes, das células tumorais e de outros elementos imunocorados, mesmo sem lúmen, foi considerado um microvaso. A presença de hemácias no interior do lúmen, não foi usada como critério para defini-lo, quando encontrada (Weidner,1995). Vasos com estrutura muscular na parede não foram considerados.

1. Captura e armazenamento de dados

Os preparados imunoistoquímicos foram avaliados utilizando um microscópio trinocular Zeiss Axiophot de campo claro, equipado com objetivas de 2,5X, 5X, 10X, 20X, 40X e 100X (Zeiss, Frankfurt, Alemanha) e acoplado a uma câmera digital (sensor CCD) Canon PowerShot G5, colorida, de alta definição (5 Mpixels). Inicialmente, todo o corte histológico foi avaliado por varredura, utilizando a objetiva de 4X (panorâmica), com o intuito de identificar as três áreas de maior densidade vascular (*hotspots*). Através da câmera digital acima referida, imagens destas áreas foram então capturadas e armazenadas em formato JPEG, utilizando a objetiva de 20X. Posteriormente, estas imagens foram

devidamente identificadas e transferidas para mídia de estocagem permanente (DVD ou CD), com o objetivo de realizar *backup* e facilitar o transporte dos dados brutos para outras estações de trabalho, se necessário.

2. Análise semi-quantitativa

As imagens representativas das áreas de maior quantidade de vasos (*hotspots)*, foram avaliadas no programa de análise de imagens Imagelab® [programa de computador], versão 2.4. Ele permite a contagem manual de microestruturas vasculares e a determinação de MVD e LVD. Para fins de análise, foi considerada em cada caso, o valor máximo de MVD/LVD obtido a partir de contagens realizadas em cada um dos 3 *hotspots.*

Quanto ao anticorpo VEGF, sua imunoexpressão foi inicialmente classificada segundo a extensão da área de positividade no componente invasivo da neoplasia em cinco categorias, e quanto a intensidade de coloração, em quatro categorias (quadro3).

Quadro 3- Avaliação semi-quantitativa da expressão do anti-VEGF-A

ÁREA TUMORAL COM EXPRESSÃO DO MARCADOR	**INTENSIDADE DA COLORAÇÃO**
0- negativo	0 – negativo
1 - < 25%	1- fraca
2 - 25-50%	2- moderada
3 - > 50-75%	3 intensa
4 –maior que 75%	

Posteriormente, ambas as escalas foram combinadas em um escore único através da soma do valor obtido em cada escala (área e intensidade). Os resultados possíveis neste escore são 0,2,3,4,5,6 ou 7. A expressão do anti-VEGF foi, então, re-classificada em três grupos: fraca (0-2); moderada (3-5), intensa (6-7), para a análise final.

A invasão vascular foi pesquisada nas lâminas onde foi realizada a reação com anti-D2-40 e foi considerada presente quando, no mínimo, um conjunto de células foi claramente visível dentro do vaso linfático. Ela foi comparada com a determinada pela rotina, apenas ao HE, à época do diagnóstico da neoplasia maligna primária.

3.5- Pesquisa do linfonodo sentinela

O conceito de LS baseia-se no fenômeno da progressão ordenada e seqüencial da neoplasia maligna ao longo do sistema linfático. Ele recebe a drenagem da região do tumor e é o primeiro a ser acometido pela doença.

Os LS foram pesquisados com corante vital e linfocintilografia realizada com a aplicação de 0,2 ml de Dextran-^{99m}Tc, com atividade de 0,4 mCi (7,4 MBq), via intra-dérmica, na região peri-areolar ou peri-tumoral, nos tumores palpáveis (anexo 4).

A análise anátomo-patológica do(s) LS foi realizada segundo a padronização do serviço. Brevemente, em linfonodos de até 1 cm, é feito 1 corte no maior eixo e "imprint" de cada metade para avaliação. Caso haja suspeita na macroscopia, é feita a análise em cortes congelados. Se a pesquisa de células neoplásicas é negativa, são feitos cortes de 3-4 µm de todo o material incluído em um bloco de parafina (um bloco para cada linfonodo), com aprofundamento dos cortes. Em uma das lâminas obtidas com esses cortes, é feita a avaliação imunoistoquímica com anticorpos AE1/AE3 (anti-pancitoqueratinas). Em linfonodos com mais de 1 cm, é realizado um corte no menor eixo e as mesmas etapas descritas acima são realizadas. Há inclusão de todo o material em ambos os casos.

Foram considerados como linfonodos positivos, todos os casos com lesões infiltrativas com tamanho de 0,2cm ou mais.

3.6- Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas com o programa *SAS for Windows* versão 9.1.3. Os testes exatos de Fisher ou Qui-quadrado foram usados para comparar a relação entre a expressão do anti-VEGF e grupos de risco, estágio, expressão de cerb-B2 e presença

ou ausência do linfonodo, assim como para comparar as variáveis clínico-patológicas (grau histológico, receptores de estrógeno e progesterona, Her2/neu ou cerb-B2, estado menopausal, tipo histológico, estágio, invasão vascular através da análise em HE e com D2-40) com presença ou ausência do linfonodo. Regressão logística múltipla ajustada para idade e tamanho do tumor primário foi feita para essas análises. Os testes exatos de Fisher ou Qui-quadrado foram usados também para comparar risco com grau histológico, receptores de estrógeno e progesterona, tipo histológico, estágio e invasão vascular com D2-40.

Coeficiente linear de Spearman foi calculado para avaliar a correlação entre a expressão dos anticorpos VEGF-A, CD34 e D2-40.

Os testes não paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskall-Wallis foram usados para comparar variáveis contínuas organizadas em dois ou três grupos quando apropriados. Invasão vascular pela HE e D2-40, foram comparadas através do teste de McNemar. Regressão logística múltipla foi aplicada para identificar anticorpos que pudessem interferir com risco.

O teste de Kappa foi aplicado para avaliar o índice de concordância entre dois observadores, um deles, patologista, em uma amostra de trinta casos escolhidos aleatoriamente, quanto à expressão do VEGF-A. O mesmo ocorreu na determinação dos coeficientes de correlação intra-classe, calculados para avaliar o nível de concordância entre os mesmos dois observadores, nas análises com anti-CD34 e D2-40. Um valor de p inferior ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significante para todos os cálculos.

4- RESULTADOS

Foram analisados noventa e dois casos com os anticorpos CD34, D2-40 e VEGF-A, cujas características clínico-patológicas são descritas no texto e sistematizadas nos quadros IV, V e VI. Nesses quadros, todos os valores de *p* foram ajustados por idade e tamanho do tumor primário.

Houve trinta e um casos com linfonodos positivos e sessenta e um casos com linfonodos negativos. Não houve nenhum caso cujo acometimento do LS foi caracterizado apenas com a pesquisa com os anticorpos AE1/AE3. Dos trinta e um casos com LS positivo, houve envolvimento apenas do(s) LS em vinte (64,5%). O número total de LS variou de um a quatro. Em 58% dos casos, foi encontrado apenas um LS. A análise descritiva do número de linfonodos está no quadro 7.

A idade mediana de todos os casos foi cinqüenta e cinco anos. Vinte e três mulheres eram pré-menopausadas e sessenta e nove pós-menopausadas. Quanto à distribuição por tipo histológico, oitenta casos foram classificados como ductais, cinco como lobulares e os demais foram classificados como "outros" (tubulares, colóides e medulares clássicos). Quanto ao grau histológico, nove casos foram classificados como III, quarenta e sete casos como II e em trinta e seis casos, o grau histológico foi I. Houve setenta e sete casos com receptor de estrógeno positivo e quatorze negativo. Quanto ao receptor de progesterona, em setenta e seis casos ele foi positivo e em quinze, negativo. Em um caso, não houve classificação segundo os receptores hormonais. Quanto à expressão de Cerb-B2, em vinte e nove casos ela foi positiva e em sessenta e um casos, negativa. Não foi possível determinar a expressão do Cerb-B2 em dois casos, pela falta de neoplasia invasiva no bloco de parafina contendo o material utilizado para diagnóstico e no da peça cirúrgica. Apesar disso, esses casos puderam ser classificados em grupos de risco. Em dezenove casos, a expressão do Cerb-B2 determinada pela imunoistoquímica foi inconclusiva, sendo portanto necessário utilizar a técnica da hibridização "in situ" cromógena (CISH) para classificá-los quanto àquela expressão.

Houve cinqüenta e oito casos classificados como estágio clínico I, vinte e seis como estágio clínico II e oito como estágio clínico III. Dos oito casos que foram classificados como estágio clínico III, cinco deles foram IIIA e três casos IIIB. Desses últimos, dois apresentaram invasão de pele focal na análise da peça cirúrgica, não

detectável clinicamente, sendo classificados como T4a. No outro caso cujo estágio clínico foi IIIB, essa classificação ocorreu pela presença de dezesseis linfonodos positivos, sem invasão de pele. O grau histológico de todos os casos com esse estágio foi três. O resumo das principais características desses oito casos pode ser visto no quadro 8.

A variação do número de vasos por campo marcados para anti-CD34, foi de quinze a cento e sessenta e dois e para o anti-D2-40, de zero a vinte e dois. A variação do maior número de vasos por campo, marcados com o anticorpo para CD34 foi de vinte e quatro a cento e sessenta e dois.

A distribuição da imuno-expressão do VEGF está representada na tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos casos segundo a expressão do anti-VEGF-A

PADRÃO	*NÚMERO DE CASOS (%)*
Fraco	37 (40,2%)
Moderado	25 (27,1%)
Intenso	30 (32,6%)
TOTAL	**92 (100%)**

Quadro 4- Distribuição dos 92 casos segundo idade, estado menopausal, estágio clínico e tamanho tumoral, de acordo com acometimento do LS.

VARIÁVEIS	**TOTAL**	**LS POSITIVO**	**LS NEGATIVO**	**P***
IDADE	55(32-77)	53(33-68)	57(32-77)	**0,013**
MENOPAUSA				
Pré	23	12	19	**0,03**
Pós	69	11	50	
ESTÁGIO				
I	58	0	58	**0,85**
II	26	24	2	
III	8	7	1	

* valores de *p* ajustados para idade e tamanho tumoral.

† Estágio clínico-patológico segundo a Classificação do TNM, da União Internacional de Combate ao Câncer /UICC, 6ª. edição (anexo 1)

Entre parênteses: valor mínimo e máximo de cada variável expressa pela mediana.

Quadro 5- Distribuição dos 92 casos segundo tipo e grau histológico, receptores hormonais e amplificação do cerb-B2, de acordo com acometimento do LS.

VARIÁVEIS	TOTAL	LS POSITIVO	LS NEGATIVO	P*
TIPO HISTOLOGICO				
Ductal	80	29	51	0,97
Lobular	5	2	3	
Outros	7	0	7	
GRAU HISTOLÓGICO†				
I	36	8	28	
II	47	19	28	0,38
III	9	4	5	
RECEPTOR ESTRÓGENO				
Positivo	77	28	49	
Negativo	14	3	11	0,21
Desconhecido	1	-	-	
RECEPTOR PROGESTERONA				
Positivo	76	26	50	
Negativo	15	5	10	0,47
Desconhecido	1	-	-	
CERB-B2				
Positivo	29	11	18	0,95
Negativo	61	20	41	
Desconhecido	2	-	-	

* Valores de *p* ajustados para idade e tamanho tumoral

†Grau Histológico segundo a classificação de Scarff-Bloom-Richardson modificada por Elston-Ellis

Quadro 6- Distribuição dos 92 casos segundo a expressão dos anticorpos e acometimento do LS.

VARIÁVEIS	TOTAL	LS POSITIVO	LS NEGATIVO	P*
VEGF-A				
Fraco	37	13	24	0,32
Moderado	25	12	13	
Intenso	30	6	24	
CD34	79(24-162)	79(30-160)	81(24-162)	0,78
D2-40	7(0-22)	8(0-22)	7(1-20)	0,73

* valores de *p* ajustados para idade e tamanho tumoral.

Entre parênteses: valor mínimo e máximo de cada variável expressa pela mediana

Quadro 7- Análise descritiva do número de linfonodos nos 31 casos com LS positivo.

No. Total de casos	Média	Desvio Padrão	No. Mínimo	No. Máximo	Mediana
n=31	2,5	3,0	1	16	1

Quadro 8- Distribuição dos oito casos classificados como estágio clínico III, segundo idade, receptores hormonais, expressão de Cerb-B2, CD34, D2-40, VEGF, número de linfonodos acometidos e invasão de vasos da pele.

EC	IDADE	T	RE	RP	CerbB2	CD34	D240	VEGF	LINF	IP
IIIA	33	1,7	N	N	P	103	9	2	7	N
IIIA	60	2,5	P	P	P	30	11	3	6	N
IIIB	37	1,5	P	P	N	84	22	0	1	P
IIIA	43	2,2	P	P	P	83	0	3	5	N
IIIB	65	1,0	P	P	N	68	1	5	16	N
IIIA	53	5	P	N	N	132	3	0	5	N
IIIA	36	3	P	P	P	74	8	5	5	N
IIIB	64	1,5	P	P	N	101	7	7	0	P

T=tamanho do tumor primário; LINF=número total de linfonodos acometidos; CD34 e D2-40 expressos pelo maior número de vasos de uma das três áreas de maior vascularização; IP=invasão da pele da mama; P=positivo;N=negativo.

A invasão vascular vista nas lâminas coradas apenas com HE, ocorreu em seis casos, sendo que em cinco, não houve acometimento linfonodal. Em vinte e sete casos (29,3%), a invasão vascular foi detectada com anti-D2-40 e essa informação mudou o grupo de risco em quatro deles, de baixo para moderado risco. Houve diferença estatisticamente significativa entre invasão vascular com HE e com anti-D2-40 (p<0,001), mas não entre a determinada pelo anticorpo D2-40 e LS positivo (p=0,73) (tabela 2).

Tabela 2- Distribuição dos casos com invasão vascular pela HE e com D2-40, segundo o acometimento do LS.

	Invasão com HE	**Invasão com D2-40**	**p***
LS positivo	5	10	
LS negativo	1	17	
Total	6	27	<0,001

Valor de *p* calculado pelo teste de McNemar.

A distribuição dos grupos de risco está sistematizada na tabela 3. Houve uma preponderância de grupo de risco intermediário. Grupo de risco se correlacionou com grau e tipo histológico ductal (p<0,0001; p<0,001, respectivamente), e com estágio clínico-patológico (p<0,0001), mas não com MVD, LVD e expressão de anti-VEGF.

A regressão logística múltipla revelou correlação entre tamanho tumoral e idade, com linfonodo sentinela positivo (p=0,0012 e 0,013, respectivamente). Não ocorreu o mesmo em relação a todas as outras variáveis clínico-patológicas, inclusive invasão vascular com HE e com anti-D2-40, quando ajustadas por idade e tamanho tumoral (quadro IV). Não foi vista correlação entre os anticorpos D2-40 e CD34 (r=0,16; p=0,12). Considerando as categorias de anti-VEGF, fraco, moderado, intenso, e os outros anticorpos, também não se evidenciou correlação entre eles (r=0,23; p=0,15; r=0,23;p=0,21; r=0,32; p=0,11, respectivamente). Na figura 1 pode ser vista a representação gráfica do padrão de correlação entre os anticorpos.

Não foi vista correlação entre os resultados da expressão de anti-VEGF, anti-CD34 e anti-D2-40, com a do Cerb-B2 (p=0,19; p=0,17; p=0,39, respectivamente). No quadro 9, pode ser vista a distribuição da mediana do número de vasos sanguíneos e linfáticos, segundo as categorias de classificação da expressão do anticorpo VEGF-A.

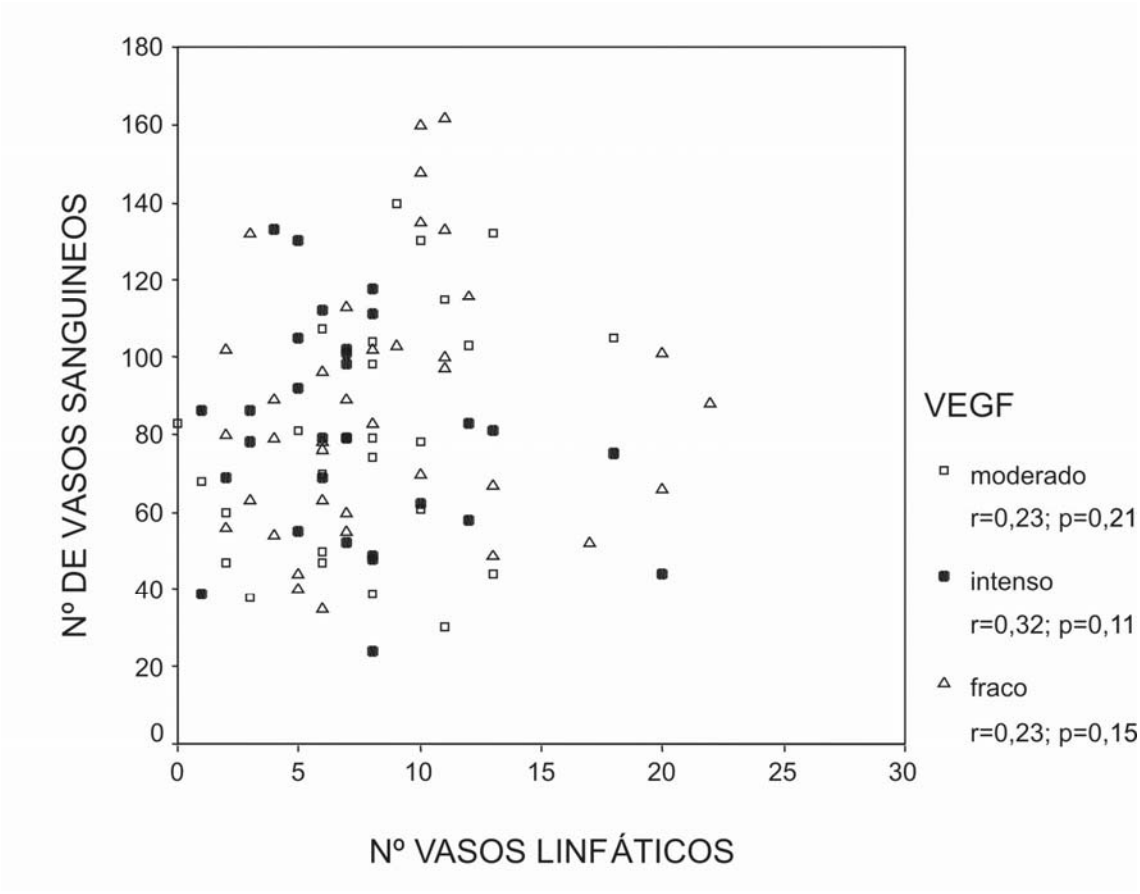


Figura 1- Distribuição do número de vasos sanguíneos e linfáticos, segundo a expressão do VEGF-A.

Tabela 3- Distribuição dos casos segundo grupo de risco.

GRUPO DE RISCO	*NÚMERO DE CASOS (%)*
Baixo	24 (26%)
Intermediário	55 (59.7%)
Alto	13 (14.1%)
TOTAL	**92(100%)**

Quadro 9- Expressão do anti-CD34 e anti-D2-40, segundo as categorias de classificação da expressão do anticorpo VEGF-A.

	VEGF fraco	**VEGF moderado**	**VEGF intenso**	**p***
CD34	83 (35-162)	78 (30-140)	79 (24-133)	0,65
D2-40	7 (2-22)	8 (0-18)	7 (1-20)	0,54

*valor de p determinado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Entre parênteses, valores mínimo e máximo de cada variável expressa pela mediana.

Quando considerados apenas os casos classificados como estágio clínico I e II, que totalizaram oitenta e quatro casos, as únicas variáveis associadas a LS foram tamanho do tumor primário (p=0,018) e idade (p=0,059). A invasão vascular pela HE e pelo D2-40, também foi distinta nesses casos, havendo diferença estatisticamente significativa (p<0,0001) pelo teste de McNemar. Os demais resultados, que foram analisados para todo o grupo de noventa e dois casos, não foram diferentes quando excluídos os oito casos classificados como estágio clínico III (anexo 3, relatório 5).

O coeficiente de Kappa calculado para avaliar a concordância entre dois observadores quanto a expressão de anti-VEGF-A, foi de 0,7154 (IC95%=0,48-0,95). O coeficiente de correlação intra-classe, calculado para avaliar a concordância entre dois observadores quanto a expressão dos anticorpos D2-40 e CD34, foi, respectivamente, 0,87 (IC95%=0,633-0,903) e 0,99 (IC95%=0,989-0,997).

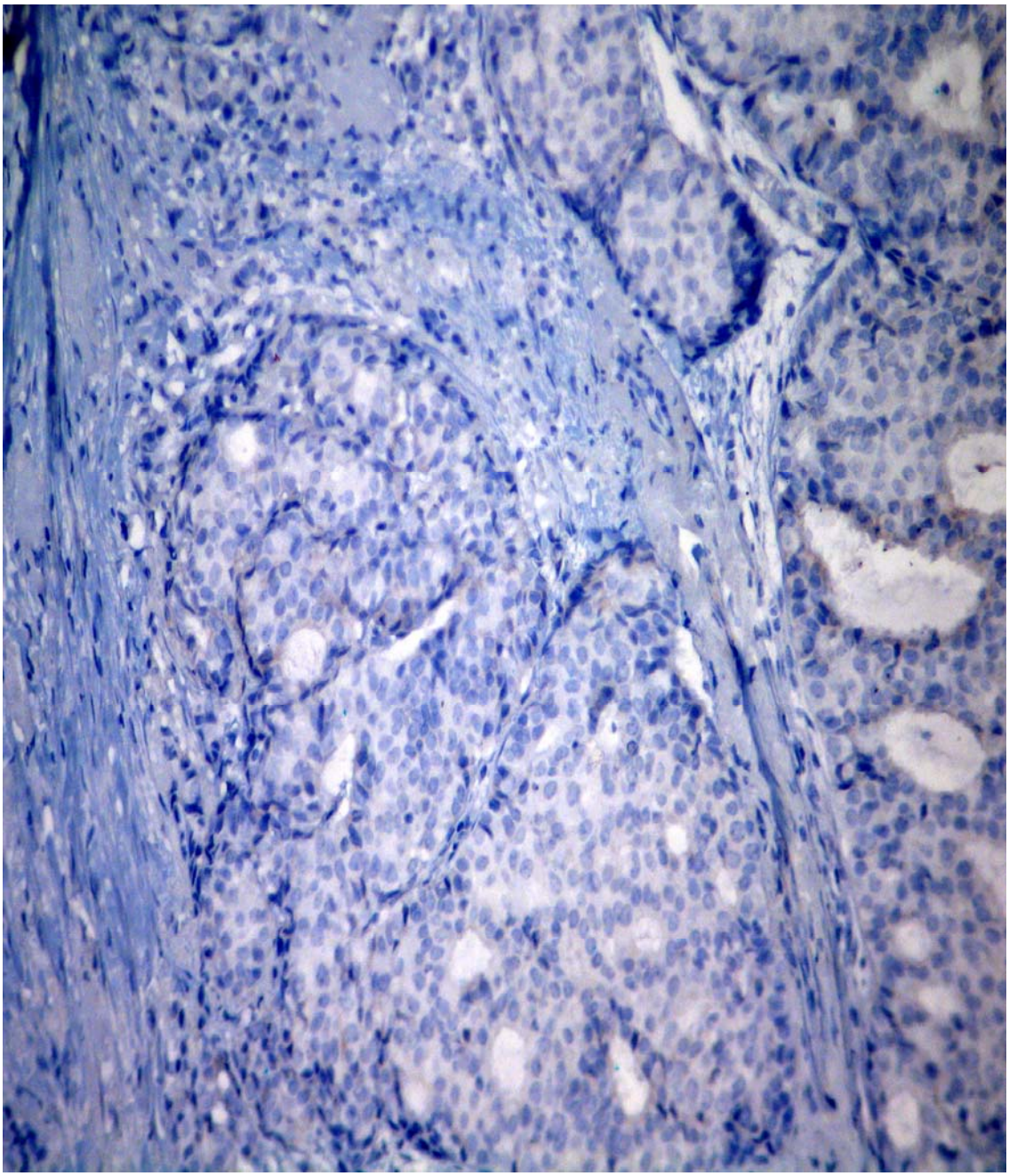


Figura 2- Fotomicrografia mostrando a ausência de expressão do marcador VEGF-A. Imunoperoxidase (sistema Novolink, Novocastra, New Castle, UK), 20X

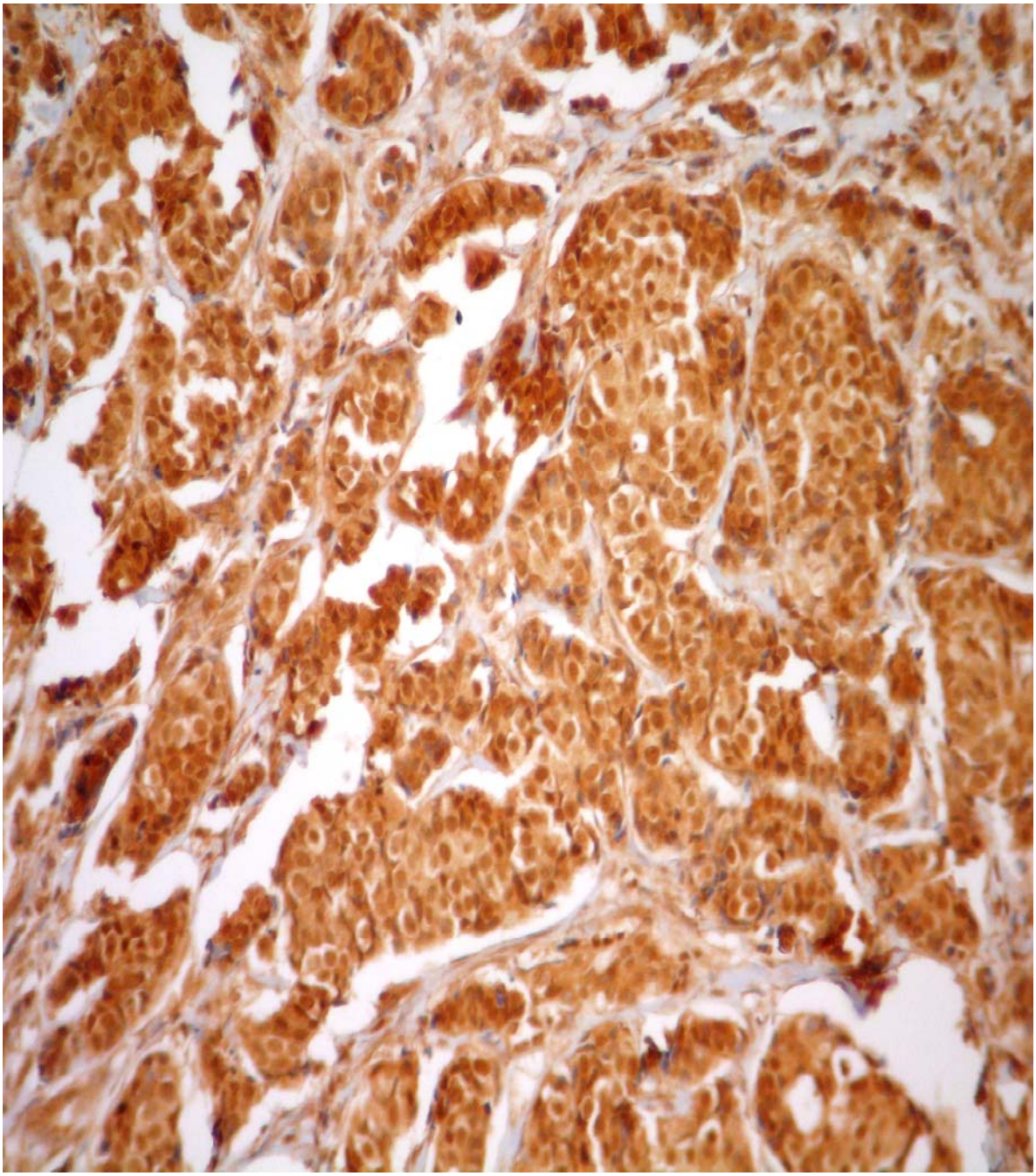


Figura 3- Fotomicrografia mostrando expressão intensa do marcador VEGF-A. Imunoperoxidase (sistema Novolink, Novocastra, New Castle, UK), 20X

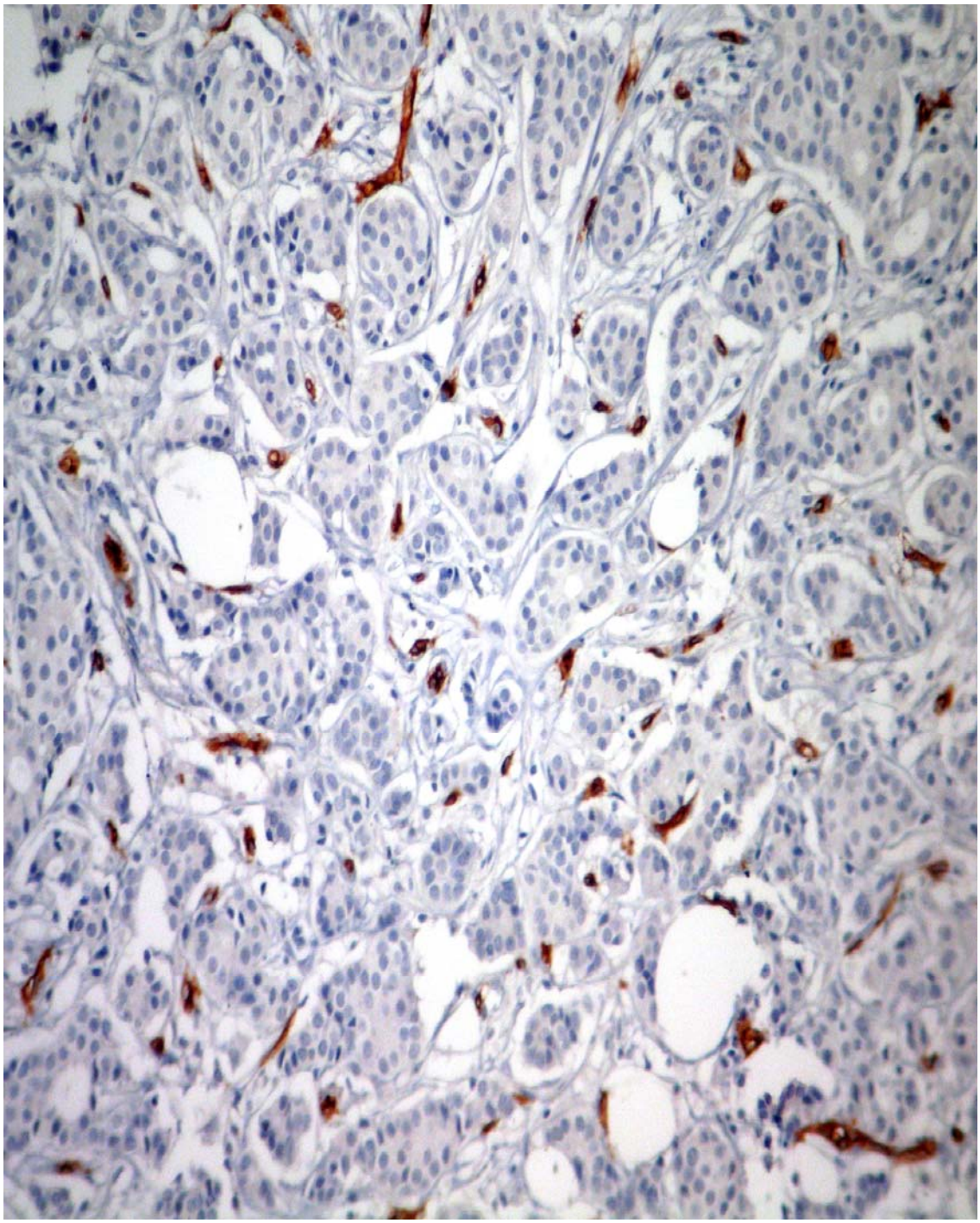


Figura 4- Fotomicrografia ilustrativa da expressão do marcador CD34 em estruturas vasculares do estroma tumoral. Imunoperoxidase (sistema Novolink, Novocastra, New Castle, UK), 20X

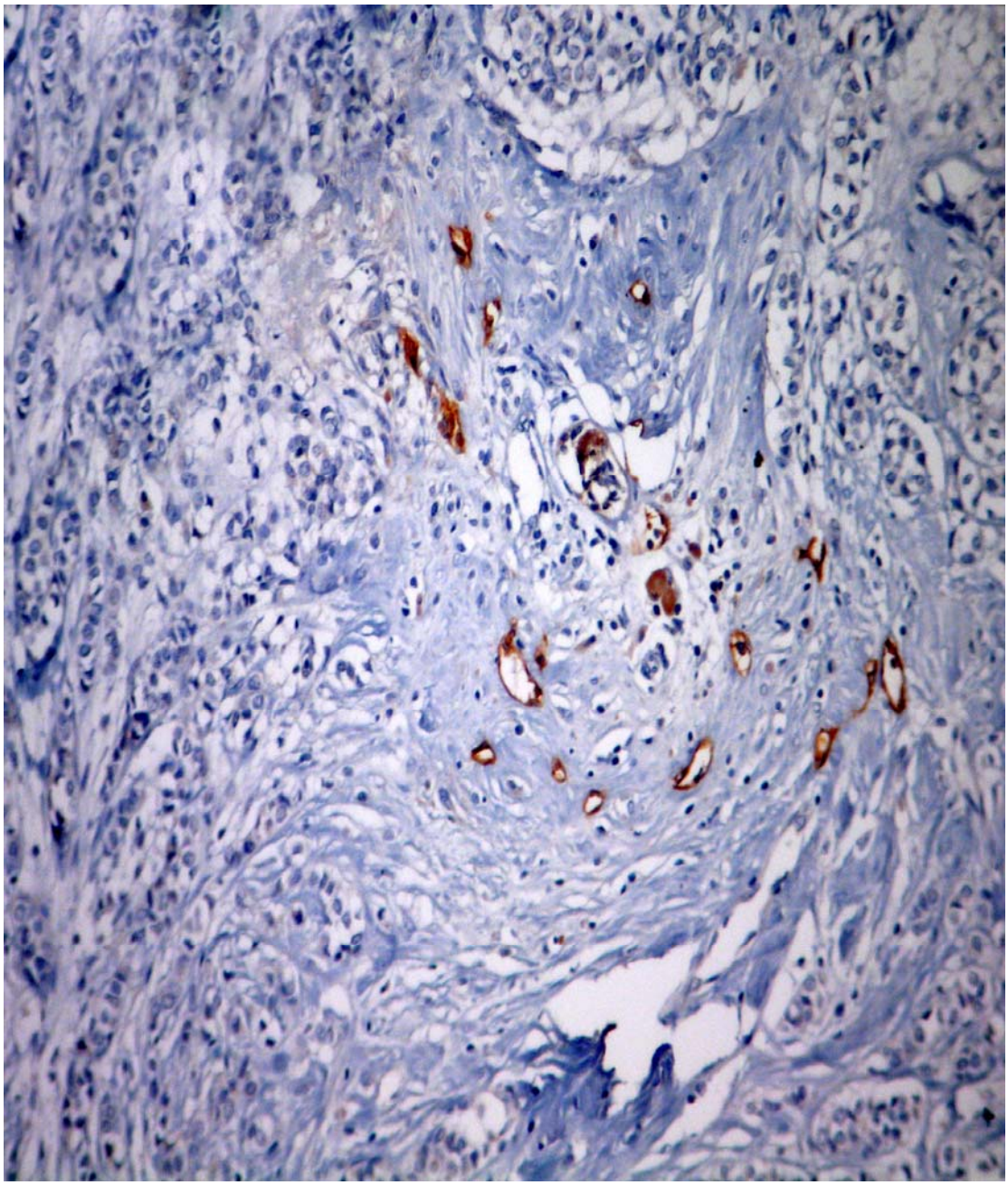


Figura 5- Fotomicrografia da expressão do marcador D2-40 em estruturas vasculares linfáticas do estroma tumoral. Imunoperoxidase (sistema Novolink, Novocastra, New Castle, UK), 20X

5- DISCUSSÃO

Com a possibilidade de detecção dos CM iniciais com exames de imagem, a proporção de casos com acometimento linfonodal ao diagnóstico vem diminuindo, assim como a dissecção ampla da axila. A aplicação da técnica de pesquisa de LS nos casos de CM é hoje rotineira nos serviços de referência de tratamento dessa doença. Fatores preditores de acometimento dos linfonodos que não os sentinela, estão sendo estudados, no sentido de se realizar, cada vez mais, cirurgias conservadoras, com menor morbidade. Dentre os fatores apontados, metástase no LS maior que 2mm na pesquisa por HE, tumor primário com mais de 2 cm, mais de um LS positivo, extensão extra-nodal e invasão vascular linfática, são fatores preditores de acometimento de linfonodos não-sentinela (Degnim et al., 2003; Patani et al., 2007). No estudo de Viale et al (2005), tamanho tumoral e invasão vascular peri-tumoral, foram os mais potentes preditores de acometimento de linfonodos-não sentinela.

No presente estudo, apenas idade e tamanho tumoral foram associados à disseminação da neoplasia ao LS, o que não é surpreendente, pois são fatores adversos de CM já bem estabelecidos (Carter et al.,1989). A expressão de nenhum dos anticorpos, nem mesmo a do D2-40, foi preditiva de acometimento linfonodal nesse estudo. Poderíamos supor que o VEGF-C, apontado inicialmente como o fator de estimulação de crescimento de vasos linfáticos e não o A, poderia estar relacionado a linfonodo positivo. No entanto, estudos mais recentes mostram que o VEGF-C, não se correlaciona exclusivamente a estímulos para a formação de vasos linfáticos (Partanen et al., 1999; Longatto-Filho et al., 2005). No estudo de Mohammed et al. (2007), tanto o VEGF-A quanto o C, mas não o D, estiveram associados a LVD e a linfonodo positivo em 177 casos de CM.

As determinações de invasão vascular na rotina são feitas exclusivamente pela análise da morfologia com coloração pela HE na maior parte dos laboratórios de anatomia-patológica. Invasão vascular ocorre em taxas que variam de 19 a 22,5% dos casos de neoplasias malignas da mama. Lee et al., 2006, detectaram uma taxa de 19% entre 2760 casos de pacientes com linfonodo negativo usando exclusivamente HE. Eles notaram que ela associa-se a tumores maiores, com maior grau histológico e com idade mais precoce. Pinder et al. (1994) descreveram taxa de detecção de 22,8% em uma série de 1704 casos e a associação foi forte com acometimento linfonodal, tamanho do tumor, grau e tipo

histológico. De Mascarel et al. (1998), acharam taxa de 19,5% de invasão vascular em uma série de 1320 tumores com linfonodo negativo e também observaram correlação desse parâmetro com tamanho do tumor e grau histológico em análise univariada. Em todos esses estudos, na análise multivariada, invasão vascular esteve relacionada à sobrevida global e livre de eventos nessas populações.

Nesse estudo, não houve relação entre invasão vascular, determinada somente pela HE, ou pelo anti-D2-40, com estado do linfonodo sentinela, mas houve diferença estatisticamente significante entre a invasão vista com HE e D2-40. Schoppmann et al. (2004), puderam detectar invasão linfática vascular com anti-D2-40 em 28,1% dos casos de carcinomas da mama testados e houve corrrelação desse parâmetro com linfonodo e LVD, no entanto, apenas a invasão vascular esteve relacionada a pior sobrevida. Arnaout-Alakarian et al. (2007), determinaram em seu estudo, que somente a invasão de vasos linfáticos foi um preditor significativo de recorrência a distância em casos com linfonodo negativo em análise multivariada. Tezuka et al. (2007), puderam confirmar que invasão linfática pelo anti-D2-40, mas não pela HE, foi um preditor de sobrevida livre de eventos. Van den Eynden et al. (2006), compararam a MVD com os anticorpos CD34 e D2-40 e observaram que apenas a invasão peritumoral *linfática* relacionou-se a gânglios com metástases. Na análise multivariada esse fator foi o único independente para metástases ganglionares nesse estudo. Além disso, houve perda na detecção de invasão vascular acessada apenas por HE, de 20%, quando peri-tumoral e 65%, quando intra-tumoral (Van den Eynden et al., 2006).

Dessa forma, invasão linfática vascular (mas não MVD ou LVD), hoje considerada fator prognóstico adverso em neoplasias malignas da mama sem acometimento linfonodal, parece ser mais bem determinada pelo anti-D2-40 e poderia complementar a avaliação desse subgrupo de tumores para melhor definição de risco de recidiva.

Nesse estudo não houve correlação entre a expressão dos anticorpos CD34, D2-40 e VEGF-A, com cerb-B2. No estudo de Viale et al., 2005, a expressão de cerb-B2 não foi preditora de acometimento do LS em 4351 pacientes com CM. Sabemos que pode não haver correlação entre extensão linfonodal, tamanho tumoral e expressão de cerb-B2, nos casos de CM com amplificação do BRCA1 (chamados “genéticos”), mas tanto na

população do estudo de Viale (2005) como na desse estudo, não há indícios de seleção dessa população específica. Talvez a expressão de cerb-B2 esteja fortemente associada à extensão de acometimento axilar, mas não ao estado do LS, caso seja ele o único acometido.

A falta de correlação entre variáveis clínico-patológicas e marcadores de angiogênese é citada em vários estudos (Gasparini et al.,1997; Fridman et al., 2000; Ludovini et al., 2003; Nicolini et al., 2004; Mylona et al., 2007). Fridman et al. (2000), não conseguiram evidenciar relação entre MVD determinada por anticorpo pan-endotelial, o anti-fator-VIII e tamanho tumoral, grau histológico, estado do linfonodo, sobrevida global e livre de eventos, em 216 carcinomas da mama. Gasparini et al., (1997) também não observaram correlação de variáveis clinico-patológicas, com níveis citosólicos de VEGF em extratos de tumores de mama, apesar de terem encontrado relação desses níveis com sobrevida livre de eventos e global. Ludovini et al. (2003), não acharam relação entre VEGF e MVD com anti-CD34 e entre esses e idade, tamanho tumoral, grau histológico e estado do linfonodo. Nicolini et al. (2004) concluíram que o VEGF não parece ser um candidato para substituir as variáveis clinico-patológicas clássicas, como fator prognóstico adverso. Mylona et al. (2007), conseguiram achar relação inversa entre VEGFR-1 (receptor 1 de VEGF A e B) e receptor de progesterona e uma relação direta entre VEGF-B e cerb-B2, mas o mesmo não ocorreu com outras variáveis clássicas. Gasparini (2000), em estudo de revisão, confirma que a maior parte dos estudos de angiogênese avaliada pela MVD, não evidencia correlação dessa com variáveis clinico-patológicas habituais.

Não foi encontrada correlação entre os anticorpos CD34, D2-40 e VEGF. Esse resultado corrobora estudos que não confirmaram relação entre MVD e índices de proliferação de células endoteliais e tumorais em uma mesma neoplasia (Fox et al., 1993; Vartanian e Weidner, 1994). No estudo de Fox et al., (1993), as células endoteliais proliferativas estavam restritas à margem do infiltrado tumoral, ao contrário das áreas de maior densidade vascular vistas principalmente no interior da neoplasia. Não houve correlação entre os índices de proliferação de células tumorais e o das células endoteliais. No estudo de Vartanian e Weidner, nas áreas de maior MVD avaliada com anti-CD34, não houve, como esperado, maiores índices de divisão celular das células endoteliais

(Vartanian e Weidner, 1994). Nesses estudos concluiu-se que fatores que controlam o crescimento de células tumorais, não são os mesmos envolvidos com o desenvolvimento de vasos no interior de uma neoplasia invasiva.

Hlatky et al. (2002) relatam que, embora a MVD seja útil como indicadora de pior prognóstico, ela é o resultado da inter-relação de fatores pró e anti-angiogênicos no micro-ambiente tumoral e não retrata a atividade angiogênica, nem a dependência do tumor de fatores angiogênicos, não sendo útil, portanto, para discriminar grupos de risco suscetíveis a tratamento com drogas anti-angiogênicas, nem acompanhar a evolução desse.

Com base nessa premissa, seria esperado não encontrar relação entre MVD determinada pelo anti-CD34, LVD, determinada pelo anti-D2-40 e a expressão do VEGF para a neoplasia como um todo. Em alguns estudos há alta variação intra-tumoral da contagem de vasos em diferentes secções do tumor no mesmo bloco e em diferentes blocos do mesmo tumor (Axelson et al., 1995; Fridman et al., 2000).

A relação da MVD e LVD com prognóstico adverso em câncer da mama ainda é controverso. A diversidade de resultados na literatura se deve em parte a várias limitações metodológicas desses estudos, tais como diferenças nos critérios de seleção dos pacientes, no tipo de tratamento a que são submetidos, ao tempo de seguimento, número de pacientes selecionados e outros. Além disso, há grande variação metodológica na determinação de MVD/LVD, como:

1. tipo de anticorpo (especificidade e sensibilidade) ;
2. tipo e tempo de fixação usado.
3. método imunoistoquímico adotado;
4. método de contagem de vasos (número de “hot spots”, campos de magnificação, definição de microvaso);
5. variabilidade entre observadores;
6. valores de corte utilizados para definição de alta e baixa vascularização, que não são padronizados e que muitas vezes são definidos após a determinação daquela.

Schor et al. (1998), comparando a vascularização como índice de angiogênese em áreas tumorais e tecido da mama normal, notaram que a MVD dessas áreas não foi diferente em média. Os autores concluíram que a MVD não necessariamente representa área de maior angiogênese induzida pelo tumor. No mesmo estudo também foi visto que a etapa que mais influi na variação da contagem de vasos em estudos de angiogênese é a do pré- tratamento das secções tumorais antes das reações imunoistoquímicas (digestão enzimática ou calor).

Alguns estudos mostram que a determinação de angiogênese pelo método de Chalkley, mas não pela MVD, na mesma casuística, relacionou-se a prognóstico adverso em neoplasias malignas, inclusive as de mama (Fox et al., 1995; Offersen et al., 2003; Hansen et al., 2004). Essa técnica estima a área vascular, portanto é diferente da técnica de MVD, que determina o número de vasos. Ela consiste em aplicar nas áreas de maior aglomerado vascular determinadas como descrito anteriormente, um gradil de 25 pontos, o gradil de Chalkley, que corresponde a uma área de 0,196 mm^2, com magnificação de 250x. A determinação do número de vasos se dá com a contagem dos pontos de intersecção do gradil com as estruturas consideradas microvasos naquela área. A média desses números determina o valor de Chalkley. A causa dos diferentes resultados com essa metodologia, quando comparada a MVD, é atribuída ao poder que ela teria de suplantar algumas das dificuldades, particularmente a da técnica de contagem, por ser mais objetiva e, portanto, menos observador dependente. No entanto, a seleção das áreas onde se aplica o gradil, como na determinação de MVD, também é escolhida pelo pesquisador, com a mesma subjetividade. Apesar de no estudo de Offersen et al., 2003, ter sido detectado que em 455 casos de neoplasias de mama, apenas a técnica de Chalkley mostrou correlação com pior prognóstico nos casos sem comprometimento do linfonodo, os próprios autores admitem que essa diferença se deveu menos à técnica de determinação de angiogênese e mais aos problemas inerentes a essas determinações, que fazem com que elas não sejam suficientemente confiáveis na detecção de pior prognóstico em neoplasias malignas.

A pouca reprodutibilidade e as limitações metodológicas da determinação de MVD, fazem com que ela seja considerada uma técnica com nível de evidência III para determinação de prognóstico, portanto, ainda não suficientemente estudada e padronizada

para ser estabelecida na prática (Vermeulen et al., 2002). Além disso, ela é cara, demanda tempo e tem baixa aplicabilidade na rotina de um laboratório de diagnóstico anatomopatológico.

O mesmo pode ser visto nos estudos que consideram fatores ligados à angiogênese. Além das limitações acima pontuadas, são poucos os estudos prospectivos, baseados em uma grande e adequada população, que possam determinar a importância da angiogênese como fator prognóstico adverso, quando avaliada pela MVD/LVD. Considerando, além disso, a dificuldade de implementar sua determinação na rotina da avaliação anatomopatológica padrão, talvez ela não seja um marcador factível e útil na prática. É importante lembrar que há outras formas de avaliar angiogênese e parece que os exames de imagem terão um papel promissor nesse caso (Pollitt et al., 2005; Bertolini et al., 2006).

Nesse estudo, todos os casos foram submetidos aos mesmos procedimentos diagnósticos e não houve avaliação após tratamentos que poderiam ser distintos. Além disso, foi utilizado na maior parte dos casos, material de biópsia, cuja conservação é melhor. A mesma técnica imunoistoquímica foi aplicada a todos os casos e as reações foram feitas sempre pelos mesmos pesquisadores. A determinação de MVD e LVD foi feita segundo a sistematização padrão descrita por Weidner (1995) por um pesquisador e houve boa concordância entre dois observadores em uma amostra de casos. Mesmo assim, não conseguimos relacionar MVD, LVD e expressão de anti-VEGF com fatores prognósticos clássicos de neoplasias malignas iniciais da mama. Essa correlação pode ter sido prejudicada na análise de grupos de risco, pela distribuição não balanceada dos casos entre esses grupos. No entanto, o mesmo não ocorreu com a condição do linfonodo, ainda um dos mais importantes fatores adversos em carcinomas invasivos da mama.

A determinação da quantidade de vasos neoformados e imaturos em uma neoplasia maligna talvez pudesse ser um melhor preditor de resposta à terapia anti-angiogênica, pois sabemos que algumas drogas anti-angiogênicas atuam predominantemente sobre esses vasos, impedindo a ligação do VEGF-A e B nos seus receptores, o que ocasiona a regressão e destruição dessa rede vascular anômala e imatura.

Considerando que as neoplasias malignas são dependentes do VEGF, particularmente nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, quando há grande número de vasos neoformados, imaturos, não estabilizados pelo desenvolvimento da camada de pericitos (Benjamin et al., 1999), é possível considerar que em neoplasias iniciais, como as analisadas nesse estudo, a expressão do VEGF-A não seja discriminatória de maior agressividade tumoral nessa etapa.

6- CONCLUSÕES

Com base nos dados desse estudo:

- Não se pode indicar a MVD e LVD para determinação de maior agressividade e, portanto, maior risco de recidiva dos carcinomas invasivos iniciais da mama.

- Não há correlação da imuno-expressão dos anticorpos CD34, D2-40 e VEGF entre si.

- A utilização do D2-40 pode aumentar a detecção de invasão vascular peri-tumoral linfática, hoje considerado um fator prognóstico adverso em carcinomas invasivos da mama com axila negativa, aprimorando a classificação de risco desses casos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adjuvant Breast Cancer Trialinfo Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: results from the International Adjuvant Breast cancer Chemotherapy Randomized Trial. J Natl Cancer Inst 2007;99(7):506-15.

Arnaout-Alkarain A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. Mod Pathol 2007;20(2):183-91.

Axelson K, Ljung BM, Moore DH 2nd, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast cancer.J Natl Cancer Inst, 1995;87(13):997-1008.

Benjamin LE, Golijamin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J Clin Invest 1999; 103(2):159-165.

Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. Nat Rev Cancer 2006;6(11):835-45.

Bogaerts J, Cardoso F, Buyse M, Braga S, Loi S, Harrison JA et al. Gene signature evaluation as a prognostic tool: challenges in the design of the MINDACT trial. Nat Clin Practice Oncol, 2006;3(10):540-51.

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). J Cell Mol Med 2005; 9(4):777-794

Carter CL, Allen C, Hanson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 1989;63(1): 181-7.

Degnim AC, Griffith KA, Sabel MS, Hayes D, Cimmino VM, Diehl KM. Clinicopathologic features of metastasis in nonsentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. A metaanalysis. Cancer 2003;98(11):2307-15.

Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L, Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation.Int Arch Allergy Immunol 1995;107 (1-3):233-5.

Evangelou E, Kyzas PA,Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. Mod Pathol, 2005;18(11):1490-7.

Farquhar C, Marjoribanks J, Basser R, Lethaby A. High dose chemotherapy and autologous bone marrow or stem cell transplantation versus conventional chemotherapy for women with early poor prognosis breast cancer. Cochrane Database Syst Rev 2003;(1):CD003139

Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors, Nature Medicine 2003; 9(6): 669-676.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Alfred DC, Clark GM et al. Prognostic factors in breast cancer. Arch Pathol Lab Med, 2000;124(7):966-978

Fox SB, Leek RD, Weekes MP. Quantification and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, chalkley count and computer image analysis. Journal Pathol, 1995; 177(3):275-283.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med, 1971; 285(21):1182-6

Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. Ann N Y Acad Sci 1982; 401:212-27.

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990; 82(1):4-7.

Fox SB, Gatter CK, Bicknell R, Going J, Stanton P, Cooke TG et al. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. Cancer Research 1993; 53(15): 4161-4163.

Fox SB, Russel LD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KG, Harris A. Quantification and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count and computer image analysis. J Pathol 1995;177(3):275-83

Fridman V, Humblet C, Bonjean K, Boniver J. Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors. Virchows Arch 2000;437(6):611-7

Gasparini G, Toi M, Gion M , Verderio P, Dittadi R, Hanatani M et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst 1997; 89(2):139-147.

Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. Oncologist 2000;5(suppl 1):37-44.

Goldhirsch A,Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ et al. Meeting Highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. Annals of Oncology 2005; (7):1-16

Guidi AJ, Berry DA, Broadwaterg G, Helmchen B, Bleiweiss B, Budman DR. Association of angiogenesis and disease outcome in node-positive breast cancer patients treated with adjuvant cyclophosphamide, doxorubicin and fluorouracil: a cancer and leukemia group B correlative science study from protocols8541/8869. J Clin Oncol 2002;20:732-42

Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. Vascular grading of angiogenesis:prognostic significance in breast cancer. Br J Cancer 2000; 82(2):339-47.

Hansen S, Sorensen FB, Vach W, Grabau DA, Bak M, Rose C. Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients. Histopathology 2004;44(5):428-36.

Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoral microvessel density in human solid tumors. Br J Cancer 2002;86(10):1566-77

Hayes D.Prognostic and predictive factors revisited. The Breast 2005;14:493-99

Heimman R, Ferguson D, Gray S, Hellman S.Assessment of intratumoral vascularization(angiogenesis) in breast cancer prognosis. Breast Cancer Res Treat 1998;52(1-3):147-58.

Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. J Natl Cancer Institute, 2002; 94(12): 883-893.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoetins and VEGF. Oncogene,1999;18(38):5356-62.

Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. Lab Invest, 2002. 82(9): 1255-7.

Kahn HJ, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi´s sarcoma and a subset of angiosarcomas. Mod Pathol, 2002;15(4): 434-40.

Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM et al. Breast carcinoma:vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. Cancer Res 1999;59(4):856-61

Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast cancer.Eur J Cancer 2006; 42(3): 357-62

Longatto-Filho A, Martins A, Costa SM. VEGFR-3 expression in breast cancer tissue is not restricted to lymphatic vessels. Pathol Res Pract, 2005; 201(2):93-9.

Ludovini V, Sidoni A, Pistola L, Bellezza G, de Angelis V, Gori S 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(2):159-68.

Mariotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Peér J et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. Am J Pathol 1990;155(3): 739-52.

Marks A, Sutherland DR, Bailey D et al. Characterization and distribution of an oncofetal antogen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. Br J Cancer 1999; 80 (3-4):569-78

Mascarel I, Bonichon F,Durand M, Mauriac L, MacGrogan G, Soubeyran I et al. Obvious peritumoral emboli : an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers. Eur J Cancer 1998; 34(1):58-65

Medri L, Nanni O, Volpi A, Scarpi E, Dubini A, Riccobon A. Tumor microvessel and prognosis in node-negative breast cancer. Int J Cancer 2000;89(1):139-46

Menke CH, Pohlmann PR, Backes A, Cericatto R, Oliveira M, Bittelbrunn A. Tumor size as a surrogate end point for the detection of early breast cancer: a 30-year (1972-2002), single-center experience in southern Brazil. Breast J, 2007;13(5): 448-456.

Mercurio Am,Lipscomb EA, Bachelder RE. Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2005;10(4):283-90.

Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors-A, C and D in breast cancer and their relationship with angio and lymphangiogenesis. Br J Cancer 2007; 96(7):1092-100

Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. Gynecol Oncol 2007;104(3):557-63

Nicolini A, Campani D, Miccoli P, Spinelli C, Capri A, Menicagli M 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(4):275-81.

Offersen BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. Eur J Cancer 2003;39(7): 881-90.

Ogawa Y, Chung YS, Nakata B, Takatsuba S, Maeda K, Sawada T et al. Microvessel quantification in invasive breast cancer by staining for factor VIII-related antigen. Br J Cancer 1995;71(6):1297-301.

Partanen TA, Alitalo K,,Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. Cancer,1999; 86(11):2406-12

Patani NR, Dwek MV, Douek M. Predictors of axillary lymph node metastasis in breast cancer: a systematic review. Eur J Sur Oncol 2007;33(4):409-19.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406(6797):747-52.

Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G et al. Non-small cell carcinoma tumur growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. Am J Pathl 1997; 151(5):1417-23.

Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rouke S, Blamery RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer.Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. Histopathology 1994;24(1):41-7.

Pollitt MJK, Hanby AM, Horgan K, Jones PF K, Murphy CE, Speirs V. Angiogenesis in breast cancer: how shoul we measure this? Oncology Reports 2005; 13(5):931-36.

Price D, Miralem T, Jiang S, Steiberg R, Avrahan H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. Cell Growth and Differentiation 2001; (12):129-135.

Rasila KK, Burger Ra, Smith H, LeeFC, Verschraegen C. Angiogenesis in gynecological oncology-mechanism of tumor progression an therapeutic targets. Int J Gynecol Cancer 2005;15(5):710-726

Schoppmann FS, Bayer G, Aumayer K, Taucher S, Geleff S, Rudas M et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. Annals Surg 2004;240(2):306-12.

Schor Am, Pendleton N, Pazouki S, Smither RL, Morris J, Lessan K et al. Assessment of vascularity in histological sections:effects of methodology and value as an index of angiogenesis in breast cancer tumours. Histochem J 1998;30(12):849-56

Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. Histopathology 2005; (46):481-489

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron J, Nobel A et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc. Natl. Acad. Sci 2003;100(4):8418-23.

Tanner M, Gancberg D, ba Di Leo A. Chromogenic in situ Hybridization. A practical alternative for fluorescence in situ hibridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples.Am J Pathol 2000; 157(5):1467-72.

Tezuka K, Onoda N, Takashima T, Takagaki K, Ishikawa T, Wakasa T. Prognostic significance of lymphovascular invasion diagnosed by lymphatic endothelium immunostaining in breast cancer patients. Oncol Rep,2007;17(5):997-1003

Toi M, Inada K, Suzuki H. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. Breast Cancer Res Treat 1995;36(2):193-204

Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. Cancer Res 2004;64(9):2941-55

Vartanian RK and Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumour angiogenesis) and tumour cell proliferation in breast carcinoma. Am J Pathol, 1994; 144(6): 1188-1194

Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, Van Dam P, Dirix LY et al. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. Br J Cancer 2006; 94(11):1643-49.

Van der Auwera I, Van den Eynden GG, Colpaert CG, Van Laere SJ, van Dam P, Van Marck EA. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. Clin Cancer Res 2005;11(21):7637-42.

Van der Vijver M, He YD, Van´t Veer L, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med 2002;347(25):1999-09.

Vermeullen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M. et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid tumours. Eur J Cancer 2002;38(12):1564-79.

Viale G, Zurrida S, Maiorano E, Mazzarol G, Pruneri G, Maisonneuves P et al. Predicting the status of axillary sentinel lymph nodes in 4351 patients with invasive breast carcinoma treated in a single institution. Cancer 2005;103(3):492-500.

Vincent-Salomon A, Carton M, Zafrani B, Freneaux P, Nicolas A, Massemin B. Long-term outcome of small size invasive breast carcinomas independent from angiogenesis in a series of 685 cases. Cancer 2001; 92(2): 249-56.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. N Engl J Med 1991;324(1):1-8

Weidner N**.** Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. Breast Cancer Research and Treatment 1995; 36: 169-180.

Yoshiji H, Harris S, Thorgeirsson Up. Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. Cancer Res 1997; 57(18):3924-3928

Zetter BR. Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumor-derived factors. Nature 1980;285(5759):41-43.

8- ANEXOS

ANEXO 1- Classificação do TNM, 6ª. Edição (UICC).

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (cTNM)

cT - Tumor primário

Tx - Tumor primário não pode ser avaliado

T0 - Não há evidência de tumor primário

Tis - Carcinoma "in situ"

Carcinoma ductal "in situ"

Carcinoma lobular "in situ"

Doença de Paget da papila s/ tumor associado

T1 - Tumor menor ou igual a 2 cm.

T1mic - Carcinoma microinvasor

T1a - Tu maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm

T1b - Tu maior que 0,5 e menor ou igual a 1 cm

T1c - Tu maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm

T2 - Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm.

T3 - Tumor maior que 5 cm.

T4 - Tumor de qualquer tamanho com extensão para

T4a - Parede torácica

T4b - Edema ou ulceração da pele

T4c - 4a+4b

T4d - Carcinoma inflamatório

Obs.

Parede torácica inclui arcos costais, músculos intercostais e músculo serrátio anterior, mas não o músculo peitoral.

Doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor.

cN - Linfonodos regionais

Nx - Linfonodos regionais não podem ser avaliados.

N0 - Ausência de metástases para linfonodos regionais.

N1 - Metástase p/ linfonodos axilares ipsilaterais móveis.

N2

N2a - Metástase p/ linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes.

N2b - Metástase clinicamente aparente na mamária interna na ausência de metástase axilar.

N3

N3a - Metástase p/ lifonodo infraclavicular.

N3b - Metástase p/ linfonodos da mamária interna e axilar.

N3c - Metástase p/ linfonodo supra-clavicular.

cM - Metástases à distância

Mx - Metástase à distância não pode ser avaliada

M0 - Ausência de metástase à distância

M1 - Presença de metástase à distância

CLASSIFICAÇÃO PATOLÓGICA (pTNM)

pT - Tumor primário

pTx - Tumor primário não pode ser avaliado

pT0 - Não há evidência de tumor primário

pTis - Carcinoma "in situ"

Carcinoma ductal "in situ"

Carcinoma lobular "in situ"

Doença de Paget do mamilo s/ tumor associado*

pT1 - Tumor menor ou igual a 2 cm

pT1mic - Carcinoma microinvasor

pT1a - Tu maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm

pT1b - Tu maior que 0,5 e menor ou igual a 1 cm

pT1c - Tu maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm

pT2 - Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm

pT3 - Tumor maior que 5 cm

pT4 - Tumor de qualquer tamanho com extensão para

pT4a - Parede torácica

pT4b - Edema ou ulceração da pele

pT4c - 4a+4b

pT4d - Carcinoma inflamatório

Obs.

* Doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho da lesão.

pN - Linfonodos regionais

pNx - Linfonodos regionais não podem ser avaliados

pN0 - Ausência de metástases para linfonodos regionais

pN0 - (i-/+)**

pN0 - (MOL -/+)**

pN1

pN1mi - Micrometástases (maior que 0,2mm e menor ou igual a 2mm) em axila

ou CMI.

pN1a - 1 a 3 linfonodos axilares ipsilaterais comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2mm.

pN1b - Linfonodos da mamária interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela mas não clinicamente aparente.

pN1c - 1 a 3 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2mm e linfonodos da mamária interna com metástases microscópicas em linfonodo sentinela mas não clinicamente aparente.

5

pN2

pN2a - 4 a 9 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2mm.

pN2b - Linfonodos da mamária interna clinicamente aparentes na ausência de comprometimento axilar.

pN3

pN3a - 10 ou mais linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2mm.

ou

- Linfonodo infra-clavicular ipsilateral comprometido.

pN3b - Linfonodos da mamária interna clinicamente comprometidos na presença de comprometimento de linfonodos axilares.

ou

- Mais de 3 linfonodos axilares comprometidos e linfonodos da mamária interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela mas não clinicamente aparente.

pN3c - Linfonodo(s) supra-clavicular ipsilateral comprometido.

Obs: ** Casos em que a metástase linfonodal consiste de apenas células tumorais isoladas ou formando agrupamentos menores que 0,2mm, que, em sua maioria, são detectados pela imunoistoquímica (i) ou por biologia molecular (MOL), são classificados como pN0, pois tipicamente não mostram evidência de atividade metastática.

pM - Metástases à distância

pMx - Metástase à distância não pode ser avaliada

pM0 - Ausência de metástase à distância

pM1 - Presença de metástase à distância

ANEXO 2- Classificação por estágios

Estádio 0 Tis N0 M0

Estádio I T1* N0 M0

Estádio IIA T0 N1 M0
T1* N1 M0
T2 N0 M0

Estádio IIB T2 N1 M0
T3 N0 M0

Estádio IIIA T0 N2 M0
T1* N2 M0
T2 N2 M0
T3 N1, N2 M0

Estádio IIIB T4 N0, N1, N2 M0

Estádio IIIC Qualquer T N3 M0

Estádio IV Qualquer T Qualquer N M1

Nota: *T1 inclui T1 mic.

ANEXO 3- Cálculos estatísticos

Relatório 1

Quadro 1 – Análise descritiva geral.

Linfonodo sentinela

LS	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	61	66.30	61
P	31	33.70	92

Tamanho do tumor

N	média	dp	mínimo	mediana	máximo
92	1.3	0.7	0.2	1.2	5.0

Grau histológico

GH	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
1	12	13.04	12
2	16	17.39	28
3	64	69.57	92

Idade

N	média	dp	mínimo	mediana	máximo
92	54.9	10.0	32.0	55.0	77.0

Receptor de estrógeno

RE	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	14	15.38	14
P	77	84.62	91

Frequency Missing = 1

Receptor de progesterona

RP	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	15	16.48	15
P	76	83.52	91

Frequency Missing = 1

Menopausa

DUM	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
M	69	75.00	69
PRE	23	25.00	92

Histologia do tumor

HIST	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
D	80	86.96	80
L	5	5.43	85
O	7	7.61	92

CERB

CERB	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	49	54.44	49
P	22	24.44	71
P/2	19	21.11	90

Frequency Missing = 2

Estagio clínico

EC	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
1	58	63.04	58
2A	22	23.91	80
2B	4	4.35	84
3A	5	5.43	89
3B	3	3.26	92

CD34 max

N	média	dp	mínimo	mediana	máximo
92	82.8	30.9	24.0	79.0	162.0

D2-40 max

N	média	dp	mínimo	mediana	máximo
92	7.9	4.6	0.0	7.0	22.0

VEGF

VEGF	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
0	31	33.70	31
2	6	6.52	37
3	4	4.35	41
4	5	5.43	46
5	16	17.39	62
6	16	17.39	78
7	14	15.22	92

VEGF classificado

vegfc	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
fraco	37	40.22	37
intenso	30	32.61	67
mod	25	27.17	92

Invasão pelo anátomo

INVAP	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	86	93.48	86
P	6	6.52	92

Invasão pelo D2-40

INVIH	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	65	70.65	65
P	27	29.35	92

Quadro 2 - Relação entre os marcadores.

Coeficiente de correlação linear de Spearman entre CD34 e D2-40
r=0.16126 (p-valor=0.1246)

Coeficientes de correlação linear de Spearman entre CD34 e D2-40, em cada categoria do VEGF.

VEGF	CD34 x D2-40
fraco	r=0.2389 (p-valor=0.1544)
moderado	r=-0.2343 (p-valor=0.2127)
intenso	r=0.32314 (p-valor=0.1151

Análise descritiva e comparação dos marcadores CD34 e D2-40 entre as categorias de VEGF.

vegfc	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Kruskal-Wallis)
fraco	CD34MAX	37	87.5	33.2	35.0	83.0	162.0	0.6525
	D2MAX	37	8.6	5.1	2.0	7.0	22.0	0.5406
intenso	CD34MAX	30	79.9	27.2	24.0	79.0	133.0	
	D2MAX	30	7.3	4.3	1.0	7.0	20.0	
mod	CD34MAX	25	79.3	31.7	30.0	78.0	140.0	
	D2MAX	25	7.8	4.2	0.0	8.0	18.0	

Quadro 3 - Análise descritiva e comparação das variáveis entre presença ou não de linfonodo sentinela.

LS	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
N	T	61	1.1	0.5	0.2	1.0	2.5	**0.0012**
	IDADE	61	56.9	9.6	32.0	57.0	77.0	**0.0137**
	CD34MAX	61	83.1	30.8	24.0	81.0	162.0	0.8170*
	D2MAX	61	7.8	4.3	1.0	7.0	20.0	0.7875**
P	T	31	1.7	0.9	0.6	1.5	5.0	
	IDADE	31	51.1	9.8	33.0	53.0	68.0	

CD34MAX	31	82.2	31.5	30.0	79.0	160.0
D2MAX	31	8.2	5.2	0.0	8.0	22.0

*p-valor=0.7801 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor
**p-valor=0.7385 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS GH p-valor=0.3651 (Qui-quadrado)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	1	2	3	Total
N	10	11	40	61
	10.87	11.96	43.48	66.30
	16.39	18.03	65.57	
	83.33	68.75	62.50	
P	2	5	24	31
	2.17	5.43	26.09	33.70
	6.45	16.13	77.42	
	16.67	31.25	37.50	
Total	12	16	64	92
	13.04	17.39	69.57	100.00

p-valor=0.3651 (Qui-quadrado)
p-valor=0.5878 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS RE

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
N	11	49	60
	12.09	53.85	65.93
	18.33	81.67	
	78.57	63.64	
P	3	28	31
	3.30	30.77	34.07
	9.68	90.32	
	21.43	36.36	
Total	14	77	91
	15.38	84.62	100.00

Frequency Missing = 1

p-valor=0.3664 (Fisher)
p-valor=0.2168 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS RP

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
N	10	50	60
	10.99	54.95	65.93
	16.67	83.33	
	66.67	65.79	
P	5	26	31
	5.49	28.57	34.07
	16.13	83.87	
	33.33	34.21	
Total	15	76	91
	16.48	83.52	100.00

Frequency Missing = 1

p-valor=0.9478 (Qui-quadrado)
p-valor=0.4729 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS DUM p-valor=**0.0304** (Qui-quadrado)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	M	PRE	Total
N	50	11	61
	54.35	11.96	66.30
	81.97	18.03	
	72.46	47.83	
P	19	12	31
	20.65	13.04	33.70
	61.29	38.71	
	27.54	**52.17**	
Total	69	23	92
	75.00	25.00	100.00

LS HIST

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	D	L	O	Total
N	51	3	7	61
	55.43	3.26	7.61	66.30
	83.61	4.92	11.48	

LS vegfc

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	fraco	intenso	mod	Total
N	24	24	13	61
	26.09	26.09	14.13	66.30
	39.34	39.34	21.31	

	63.75	60.00	100.00	
P	29	2	0	31
	31.52	2.17	0.00	33.70
	93.55	6.45	0.00	
	36.25	40.00	0.00	
Total	80	5	7	92
	86.96	5.43	7.61	100.00

p-valor=0.1292 (Fisher)
p-valor=0.9748 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

	64.86	80.00	52.00	
P	13	6	12	31
	14.13	6.52	13.04	33.70
	41.94	19.35	38.71	
	35.14	20.00	48.00	
Total	37	30	25	92
	40.22	32.61	27.17	100.00

p-valor=0.0888 (Qui-quadrado)
p-valor=0.3242 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS INVAP

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
N	57	4	61
	61.96	4.35	66.30
	93.44	6.56	
	66.28	66.67	
P	29	2	31
	31.52	2.17	33.70
	93.55	6.45	
	33.72	33.33	
Total	86	6	92
	93.48	6.52	100.00

p-valor=1.0000 (Fisher)
p-valor=0.6915 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS INVIH

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
N	44	17	61
	47.83	18.48	66.30
	72.13	27.87	
	67.69	62.96	
P	21	10	31
	22.83	10.87	33.70
	67.74	32.26	
	32.31	37.04	
Total	65	27	92
	70.65	29.35	100.00

p-valor=0.6621 (Qui-quadrado)
p-valor=0.7364 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

Quadro 4 – Comparação dos resultados de invasão.

INVIH INVAP

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
N	64	1	65
	69.57	1.09	70.65
	98.46	1.54	
	74.42	16.67	
P	22	5	27
	23.91	5.43	**29.35**
	81.48	18.52	
	25.58	83.33	
Total	86	6	92
	93.48	**6.52**	100.00

p-valor<**0.0001** (teste de McNemar) – houve mudança significativa entre os resultados dos exames

Relatório 2

Quadro 1 – Análise descritiva geral.

CERB

CERB	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	61	67.78	61
P	29	32.22	90

Frequency Missing = 2

Estagio clínico agrupado

estagio	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
I	58	63.04	58
II	26	28.26	84
III	8	8.70	92

Risco

RISCO	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
A	13	14.13	13
B	6	6.52	19
M	73	79.35	92

Quadro 2 – Análise descritiva e comparação das variáveis entre presença ou não de linfonodo sentinela.

LS Frequency | Percent | Row Pct | Col Pct — estagio

	I	II	III	Total
N	58 63.04 95.08 100.00	2 2.17 3.28 7.69	1 1.09 1.64 12.50	61 66.30
P	0 0.00 0.00 0.00	24 26.09 77.42 92.31	7 7.61 22.58 87.50	31 33.70
Total	58 63.04	26 28.26	8 8.70	92 100.00

p-valor<0.0001 (Qui-quadrado)
p-valor=0.8529 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS Frequency | Percent | Row Pct | Col Pct — CERB

	N	P	Total
N	41 45.56 69.49 67.21	18 20.00 30.51 62.07	59 65.56
P	20 22.22 64.52 32.79	11 12.22 35.48 37.93	31 34.44
Total	61 67.78	29 32.22	90 100.00

Frequency Missing = 2

p-valor=0.6313 (Qui-quadrado)
p-valor=0.9512 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

Quadro 3 – Análise descritiva e comparação das variáveis entre grupos de risco.

RISCO GH p-valor<**0.0001** (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	1	2	3	Total
A	0 0.00 0.00 0.00	0 0.00 0.00 0.00	13 14.13 100.00 20.31	13 14.13
B	6 6.52 100.00 50.00	0 0.00 0.00 0.00	0 0.00 0.00 0.00	6 6.52
M	6 6.52 8.22 50.00	16 17.39 21.92 100.00	51 55.43 69.86 79.69	73 79.35
Total	12 13.04	16 17.39	64 69.57	92 100.00

RISCO RE p-valor=0.8676 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
A	2 2.20 15.38 14.29	11 12.09 84.62 14.29	13 14.29
B	0 0.00 0.00 0.00	6 6.59 100.00 7.79	6 6.59
M	12 13.19 16.67 85.71	60 65.93 83.33 77.92	72 79.12
Total	14 15.38	77 84.62	91 100.00

Frequency Missing = 1

RISCO RP p-valor=0.6672 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
A	3 3.30 23.08 20.00	10 10.99 76.92 13.16	13 14.29
B	1 1.10 16.67 6.67	5 5.49 83.33 6.58	6 6.59
M	11 12.09 15.28 73.33	61 67.03 84.72 80.26	72 79.12
Total	15 16.48	76 83.52	91 100.00

Frequency Missing = 1

RISCO HIST p-valor<**0.0001** (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	D	L	O	Total
A	13 14.13 100.00 16.25	0 0.00 0.00 0.00	0 0.00 0.00 0.00	13 14.13
B	0 0.00 0.00 0.00	2 2.17 33.33 40.00	4 4.35 66.67 57.14	6 6.52
M	67 72.83 91.78 83.75	3 3.26 4.11 60.00	3 3.26 4.11 42.86	73 79.35
Total	80 86.96	5 5.43	7 7.61	92 100.00

RISCO estagio p-valor<**0.0001** (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	I	II	III	Total
A	0 0.00 0.00 0.00	7 7.61 53.85 26.92	6 6.52 46.15 75.00	13 14.13
B	6 6.52 100.00 10.34	0 0.00 0.00 0.00	0 0.00 0.00 0.00	6 6.52
M	52 56.52	19 20.65	2 2.17	73 79.35

RISCO INVIH p-valor=0.2398 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
A	10 10.87 76.92 15.38	3 3.26 23.08 11.11	13 14.13
B	6 6.52 100.00 9.23	0 0.00 0.00 0.00	6 6.52
M	49 53.26	24 26.09	73 79.35

	71.23	26.03	2.74	
	89.66	73.08	25.00	
Total	58	26	8	92
	63.04	28.26	8.70	100.00

	67.12	32.88	
	75.38	88.89	
Total	65	27	92
	70.65	29.35	100.00

RISCO vegfc p-valor=**0.0185** (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	fraco	intenso	mod	Total
A	4	2	7	13
	4.35	2.17	7.61	14.13
	30.77	15.38	53.85	
	10.81	6.67	**28.00**	
B	0	3	3	6
	0.00	3.26	3.26	6.52
	0.00	50.00	50.00	
	0.00	10.00	12.00	
M	33	25	15	73
	35.87	27.17	16.30	79.35
	45.21	34.25	20.55	
	89.19	83.33	**60.00**	
Total	37	30	25	92
	40.22	32.61	27.17	100.00

RISCO vegfc p-valor=0.0546 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	fraco	intenso	mod	Total
A	4	2	7	13
	4.65	2.33	8.14	15.12
	30.77	15.38	53.85	
	10.81	7.41	31.82	
M	33	25	15	73
	38.37	29.07	17.44	84.88
	45.21	34.25	20.55	
	89.19	92.59	68.18	
Total	37	27	22	86
	43.02	31.40	25.58	100.00

RISCO vegfc p-valor=0.0760 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	fraco	intenso	mod	Total
A	4	2	7	13
	4.35	2.17	7.61	14.13
	30.77	15.38	53.85	
	10.81	6.67	28.00	
M + B	33	28	18	79
	35.87	30.43	19.57	85.87
	41.77	35.44	22.78	
	89.19	93.33	72.00	
Total	37	30	25	92
	40.22	32.61	27.17	100.00

Risco (Kruskal-Wallis)	Variável	n	média	dp	mínimo	mediana	máximo	p-valor
A	CD34MAX	13	79.9	29.5	30.0	79.0	132.0	0.6493
	D2MAX	13	5.8	3.7	0.0	6.0	11.0	0.1048
B	CD34MAX	6	74.2	40.2	38.0	62.5	140.0	
	D2MAX	6	10.8	5.9	3.0	11.0	20.0	
M	CD34MAX	73	84.0	30.6	24.0	79.0	162.0	
	D2MAX	73	8.1	4.5	1.0	7.0	22.0	

Quadro 4 – Resultados da análise de regressão logística múltipla para identificar anticorpos que influenciam nos grupos de risco.

1° – não trabalhando com risco Baixo

Modelo: risco alto (n=13) x risco moderado (n=73)

Variável		parâmetro	erro padrão	p-valor	OR	IC95%
Intercepto		-1.0495	1.1407	0.3576		
CD34MAX		0.00261	0.0118	0.8248	1.003	0.980; 1.026
D2MAX		-0.1781	0.0975	0.0677	0.837	0.691; 1.013
vegfc	intenso x fraco	-0.6542	0.9232	0.4786	0.520	0.085; 3.175
vegfc	mod x fraco	1.3626	0.7334	0.0632	3.906	0.928;16.446

nenhuma variável foi significativa ao nível de 5%

2° – agrupando risco baixo com risco moderado

Modelo: risco alto (n=13) x risco moderado ou baixo (n=79)

Variável		parâmetro	erro padrão	p-valor	OR	IC95%
Intercepto		-1.0851	1.0982	0.3231	-	
CD34MAX		0.00317	0.0111	0.7760	1.003	0.982; 1.025
D2MAX		-0.1802	0.0950	0.0579	0.835	0.693; 1.006
vegfc	intenso x fraco	-0.7034	0.9199	0.4444	0.495	0.082; 3.003
vegfc	mod x fraco	1.1822	0.7236	0.1023	3.261	0.790;13.469

nenhuma variável foi significativa ao nível de 5%

Quadro 5 – Análise descritiva e comparação dos anticorpos entre estagio e CERB.

estagio vegfc p-valor=0.4460 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	fraco	intenso	mod	Total
I	23	22	13	58
	25.00	23.91	14.13	63.04
	39.66	37.93	22.41	
	62.16	73.33	52.00	
II	11	7	8	26
	11.96	7.61	8.70	28.26
	42.31	26.92	30.77	
	29.73	23.33	32.00	
III	3	1	4	8
	3.26	1.09	4.35	8.70
	37.50	12.50	50.00	
	8.11	3.33	16.00	
Total	37	30	25	92
	40.22	32.61	27.17	100.00

CERB vegfc p-valor=0.1917 (Qui-quadrado)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	fraco	intenso	mod	Total
N	28	19	14	61
	31.11	21.11	15.56	67.78
	45.90	31.15	22.95	
	77.78	65.52	56.00	
P	8	10	11	29
	8.89	11.11	12.22	32.22
	27.59	34.48	37.93	
	22.22	34.48	44.00	
Total	36	29	25	90
	40.00	32.22	27.78	100.00

Frequency Missing = 2

estagio	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Kruskal-Wallis)
I	CD34MAX	58	84.1	30.6	24.0	81.0	162.0	0.6390
	D2MAX	58	7.9	4.4	1.0	7.0	20.0	0.9103
II	CD34MAX	26	79.2	32.6	35.0	77.0	160.0	
	D2MAX	26	8.2	4.4	1.0	6.5	20.0	
III	CD34MAX	8	84.9	29.8	30.0	85.5	132.0	

	D2MAX	8	7.6	7.0	0.0	7.5	22.0	
CERB	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
N	CD34MAX	61	85.5	30.0	38.0	81.0	160.0	0.1724
	D2MAX	61	8.2	4.8	1.0	7.0	22.0	0.3980
P	CD34MAX	29	75.1	30.6	24.0	74.0	162.0	
	D2MAX	29	7.0	3.7	0.0	6.0	18.0	

Quadro 6 – Análise descritiva e comparação das variáveis entre presença ou não de linfonodo sentinela, somente para risco moderado.

LS	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
N	IDADE	55	56.5	9.7	32.0	57.0	77.0	**0.0285**
	T	55	1.1	0.5	0.2	1.0	2.5	**0.0496**
	CD34MAX	55	84.1	29.9	24.0	81.0	162.0	0.7489*
	D2MAX	55	7.5	4.0	1.0	7.0	20.0	0.0861**
P	IDADE	18	50.3	9.7	33.0	50.5	68.0	
	T	18	1.4	0.4	0.6	1.4	2.0	
	CD34MAX	18	83.8	33.5	39.0	77.5	160.0	
	D2MAX	18	10.0	5.5	2.0	9.0	22.0	

*p-valor=0.6148 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor
**p-valor=0.1469 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS Frequency Percent Row Pct Col Pct	vegfc fraco	intenso	mod	Total
N	24	21	10	55
	32.88	28.77	13.70	75.34
	43.64	38.18	18.18	
	72.73	84.00	66.67	
P	9	4	5	18
	12.33	5.48	6.85	24.66
	50.00	22.22	27.78	
	27.27	16.00	33.33	
Total	33	25	15	73
	45.21	34.25	20.55	100.00

p-valor=0.4194 (Qui-quadrado)
p-valor=0.5322 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

Relatório 3

Quadro 1 – Coeficientes de correlação de Spearman entre marcadores, idade e tamanho do tumor (n=92)

	D2MAX	VEGF	IDADE	T	
CD34MAX	0.16126	-0.08830	0.01954	-0.10292	coeficiente
	0.1246	0.4026	0.8533	0.3289	p-valor
D2MAX		-0.11649	-0.18797	-0.06449	coeficiente
		0.2688	0.0728	0.5414	p-valor
VEGF			0.19512	0.17630	coeficiente
			0.0623	0.0928	p-valor
IDADE				-0.14621	coeficiente
				0.1643	p-valor

Não houve evidência de correlação entre as variáveis.

Quadro 2 – Análise descritiva e comparação da idade e do tamanho do tumor entre as categorias de VEGF.

vegfc	Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Median	Maximum	p-valor(Kruskal-Wallis)
fraco	IDADE	37	53.8	10.2	32.0	55.0	77.0	
mod	IDADE	25	52.3	8.2	36.0	54.0	65.0	
intenso	IDADE	30	58.6	10.4	36.0	58.5	77.0	0.0611
fraco	T	37	1.2	0.8	0.2	1.0	5.0	
mod	T	25	1.5	0.8	0.3	1.5	3.0	
intenso	T	30	1.3	0.5	0.2	1.3	2.5	0.0697

Não houve diferença significativa.

Bibliografia

Conover, W.J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque.

Tabachnick, B.G. e Fidell,L.S. (2001). Using Multivariate Statistics. 4ª ed. Allyn&Bacon. Needham Heights. MA. USA.

Programa Computacional

SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.1.3 Service Pack 3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA.

Relatório 4: Coeficientes de concordância

Para avaliar a consistência inter-observadores foram utilizados o coeficiente de correlação intraclasse e o coeficiente Kappa ponderado.
Em estudos de confiança, coeficiente de correlação intraclasse acima de 0.7 é comumente considerado como substancial confiabilidade.
A interpretação da magnitude do coeficiente Kappa é definida como: valores maiores ou iguais a 0.75 indicam excelente concordância, valores entre 0.75 e 0.40 indicam boa concordância e valores menores ou iguais a 0.40 não indicam concordância.

Resultados

Quadro 1 – Coeficientes de correlação intraclasse (ICC) e coeficiente Kappa para avaliação da consistência interobservadores.

CD342 x CD341 ICC=0.995 IC95%(0.989;0.997)

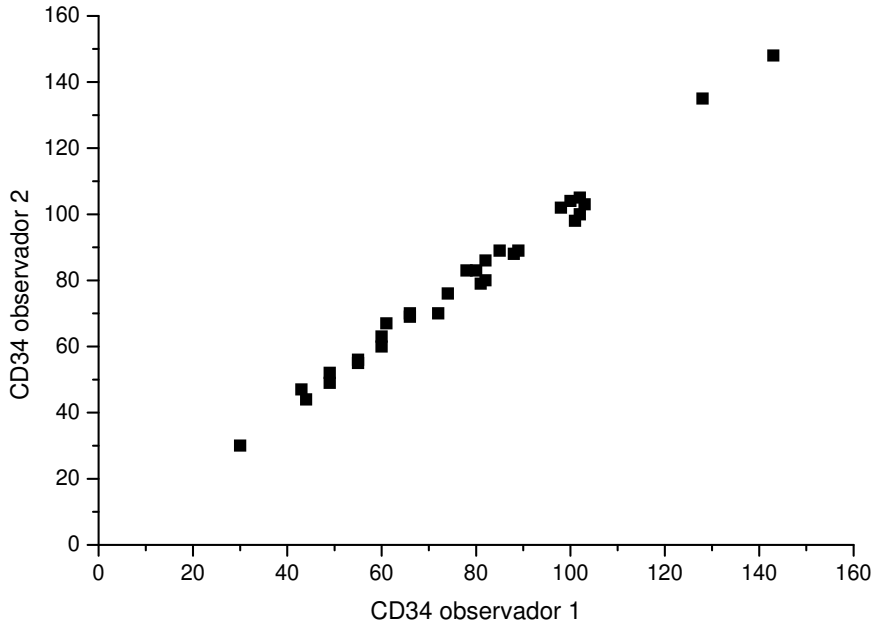


Figura 1 – Dispersão das medidas de CD34 segundo os 2 observadores.

D2 2 x D2 1 ICC=0.807 IC95%(0.633;0.903)

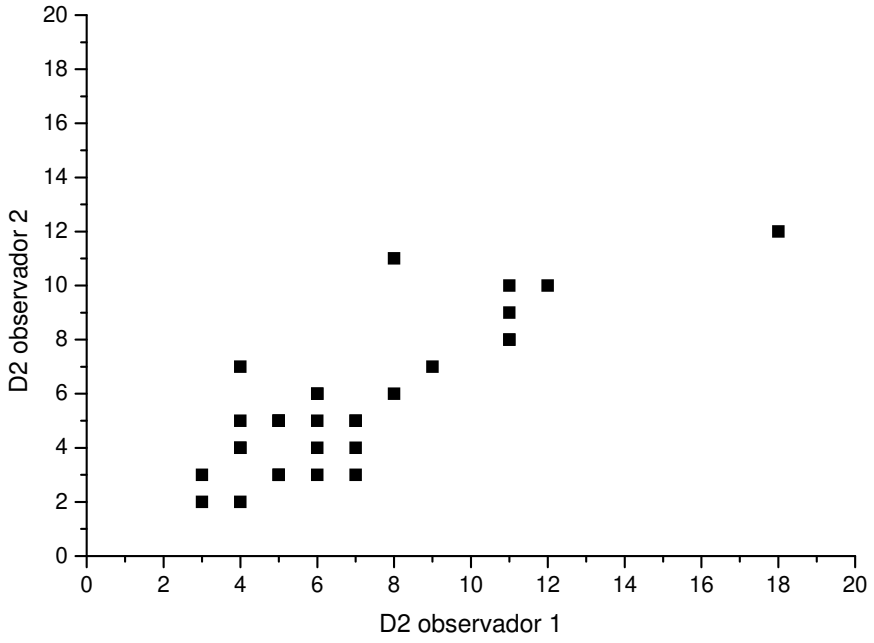


Figura 2 - Dispersão das medidas de D2 segundo os 2 observadores.

VEGF2 x VEGF1 ICC=0.920 IC95%(0.838;0.961)

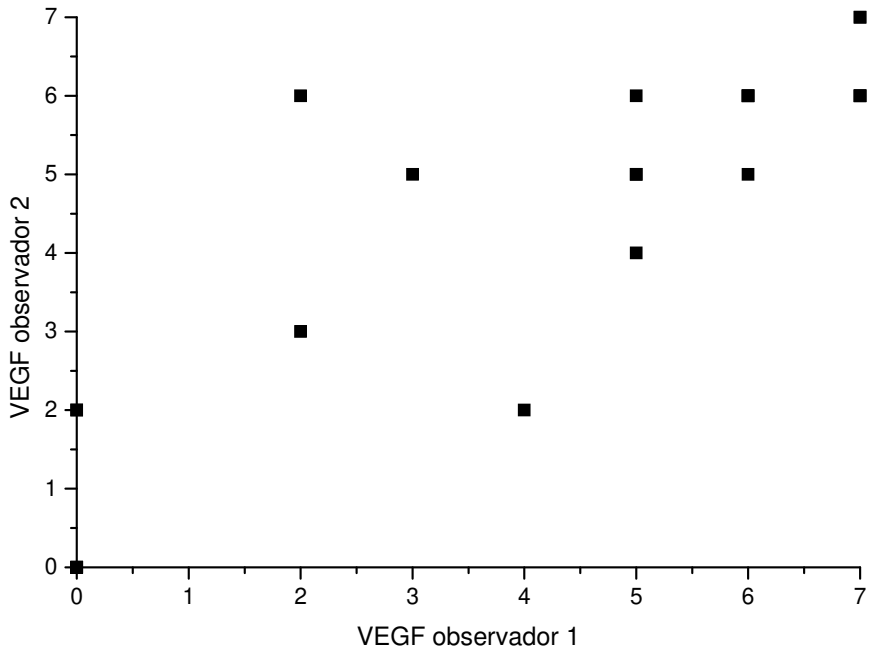


Figura 3 - Dispersão das medidas de VEGF segundo os 2 observadores.

```
VEGF classificado

vegf1c     vegf2c
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |fraco   |intenso |mod     |  Total
---------+--------+--------+--------+
fraco    |     13 |      1 |      1 |     15
         |  43.33 |   3.33 |   3.33 |  50.00
         |  86.67 |   6.67 |   6.67 |
         |  92.86 |  10.00 |  16.67 |
---------+--------+--------+--------+
intenso  |      0 |      8 |      1 |      9
         |   0.00 |  26.67 |   3.33 |  30.00
         |   0.00 |  88.89 |  11.11 |
         |   0.00 |  80.00 |  16.67 |
---------+--------+--------+--------+
mod      |      1 |      1 |      4 |      6
         |   3.33 |   3.33 |  13.33 |  20.00
         |  16.67 |  16.67 |  66.67 |
         |   7.14 |  10.00 |  66.67 |
---------+--------+--------+--------+
Total          14       10        6       30
            46.67    33.33    20.00   100.00

Coeficiente Kappa ponderado = 0.7154  IC95% (0.4804; 0.9505) - boa concordância
```

Bibliografia

Fleiss, J.L. (1981). *Statistical Methods for Rates and Proportions*.2ª ed. John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque.

Hripcsak G, Heitjan DF. Measuring agreement in medical informatics reliability studies. J Biomed Inform. 2002;35(2):99-110.

Relatório 5: Análise dos dados considerando apenas os casos classificados como estágio I e II.

Quadro 2 - Análise descritiva, n=84.

Linfonodo sentinela

LS	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	60	71.43	60
P	24	28.57	84

Tamanho do tumor

N	média	dp	mínimo	mediana	máximo
84	1.2	0.6	0.2	1.1	3.0

Grau histológico

GH	Frequency	Percent	Cumulative Frequency

Idade

N	média	dp	mínimo	mediana

1	35	41.67	35
2	41	48.81	76
3	8	9.52	84

máximo
84 55.5 9.5 32.0 55.0
77.0

Receptor de estrógeno

RE	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	13	15.66	13
P	70	84.34	83

Frequency Missing = 1

Receptor de progesterona

RP	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	13	15.66	13
P	70	84.34	83

Frequency Missing = 1

Menopausa

DUM	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
M	65	77.38	65
PRE	19	22.62	84

Histologia do tumor

HIST	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
D	72	85.71	72
L	5	5.95	77
O	7	8.33	84

CERB

CERB	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	55	67.07	55
P	27	32.93	82

Frequency Missing = 2

Estagio clínico

EC	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
1	58	69.05	58
2	26	30.95	84

CD34 max

N média dp mínimo mediana
máximo
84 82.6 31.1 24.0 79.0
162.0

D2-40 max

N média dp mínimo mediana
máximo
84 8.0 4.4 1.0 7.0
20.0

VEGF

VEGF	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
0	29	34.52	29
2	5	5.95	34
3	2	2.38	36
4	5	5.95	41
5	14	16.67	55
6	16	19.05	71
7	13	15.48	84

VEGF classificado

vegfc	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
fraco	34	40.48	34
mod	21	25.00	55
intenso	29	34.52	84

Invasão pelo anátomo

INVAP	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	78	92.86	78
P	6	7.14	84

Invasão pelo D2-40

INVIH	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
N	58	69.05	58
P	26	30.95	84

Risco

RISCO	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
A	7	8.33	7
B	24	28.57	31
M	53	63.10	84

Quadro 3 – Relações entre os marcadores.

Coeficiente de correlação linear de Spearman entre CD34 e D2-40
r=0.20226 (p-valor=0.0650)

Coeficientes de correlação linear de Spearman entre CD34 e D2-40, em cada categoria do VEGF.

VEGF	CD34 x D2-40
fraco	r=0.28837 (p-valor=0.0981)
moderado	r=**0.47889** (p-valor=0.0281)
intenso	r=-0.24029 (p-valor=0.2093)

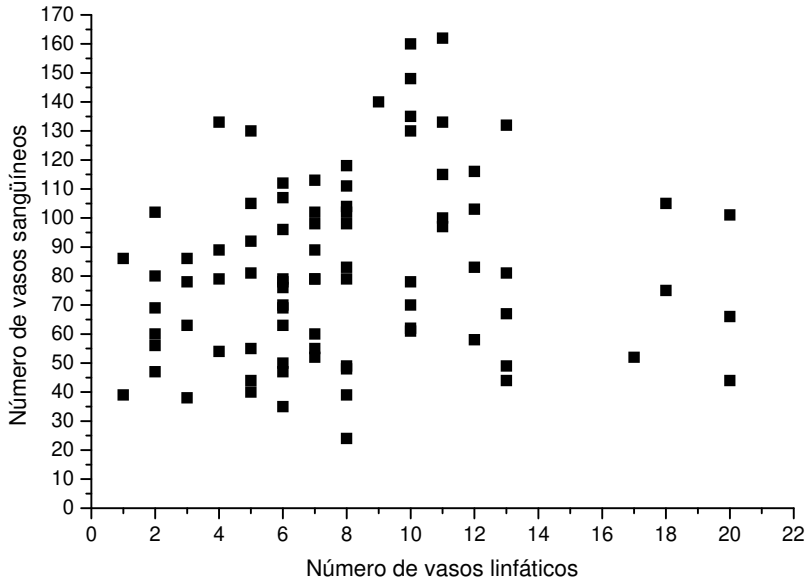
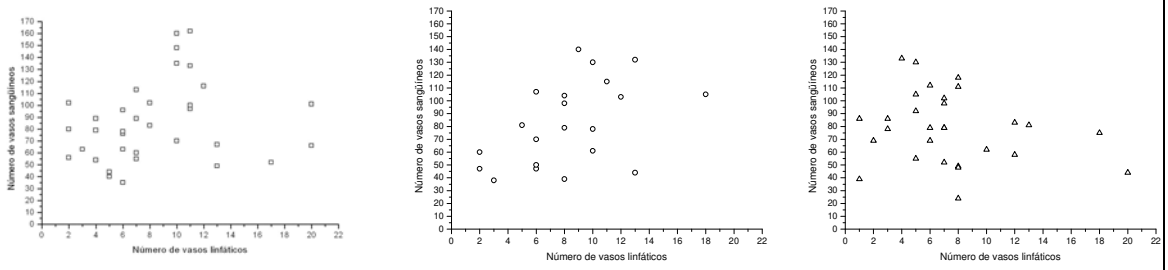


Figura 1 – Dispersão das medidas de CD34 e D2-40.



VEGF fraco VEGF moderado VEGF intenso

Figura 2 – Dispersão das medidas de CD34 e D2-40 em cada categoria de VEGF.

Análise descritiva e comparação dos marcadores CD34 e D2-40 entre as categorias de VEGF.

vegfc	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Kruskal-Wallis)
fraco	CD34MAX	34	85.7	33.7	35.0	79.5	162.0	0.8852
	D2MAX	34	8.4	4.6	2.0	7.0	20.0	0.4640

intenso	CD34MAX	29	79.2	27.4	24.0	79.0	133.0
	D2MAX	29	7.3	4.4	1.0	7.0	20.0
mod	CD34MAX	21	82.3	32.7	38.0	79.0	140.0
	D2MAX	21	8.3	3.9	2.0	8.0	18.0

Quadro 4 – Análise descritiva e comparação das variáveis entre presença ou não de linfonodo sentinela.

LS	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
N	T	60	1.1	0.5	0.2	1.0	2.5	**0.0187**
	IDADE	60	56.8	9.6	32.0	56.5	77.0	0.0597
	CD34MAX	60	82.8	31.0	24.0	80.5	162.0	0.7968*
	D2MAX	60	7.8	4.3	1.0	7.0	20.0	0.6366**
P	T	24	1.4	0.6	0.6	1.4	3.0	
	IDADE	24	52.4	8.7	33.0	53.0	68.0	
	CD34MAX	24	82.0	32.1	39.0	78.5	160.0	
	D2MAX	24	8.4	4.5	1.0	7.5	20.0	

*p-valor=0.6481 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor
**p-valor=0.6461 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS GH

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	1	2	3	Total
N	28	27	5	60
	33.33	32.14	5.95	71.43
	46.67	45.00	8.33	
	80.00	65.85	62.50	
P	7	14	3	24
	8.33	16.67	3.57	28.57
	29.17	58.33	12.50	
	20.00	34.15	37.50	
Total	35	41	8	84
	41.67	48.81	9.52	100.00

p-valor=0.3334 (Qui-quadrado)
p-valor=0.3398 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS RE

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
N	11	48	59
	13.25	57.83	71.08
	18.64	81.36	
	84.62	68.57	
P	2	22	24
	2.41	26.51	28.92
	8.33	91.67	
	15.38	31.43	
Total	13	70	83
	15.66	84.34	100.00

Frequency Missing = 1

p-valor=0.3290 (Fisher)
p-valor=0.2125 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS RP

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	N	P	Total
N	10	49	59
	12.05	59.04	71.08
	16.95	83.05	
	76.92	70.00	
P	3	21	24
	3.61	25.30	28.92
	12.50	87.50	
	23.08	30.00	
Total	13	70	83
	15.66	84.34	100.00

Frequency Missing = 1

p-valor=0.7476 (Fisher)
p-valor=0.4884 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do

LS DUM

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	M	PRE	Total
N	49	11	60
	58.33	13.10	71.43
	81.67	18.33	
	75.38	57.89	
P	16	8	24
	19.05	9.52	28.57
	66.67	33.33	
	24.62	42.11	
Total	65	19	84
	77.38	22.62	100.00

p-valor=0.1377 (Qui-quadrado)
p-valor=0.1692 (regressão logística múltipla), ajustado para tamanho do tumor

tumor

```
LS        HIST
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |D       |L       |O       |  Total
---------+--------+--------+--------+
N        |     50 |      3 |      7 |     60
         |  59.52 |   3.57 |   8.33 |  71.43
         |  83.33 |   5.00 |  11.67 |
         |  69.44 |  60.00 | 100.00 |
---------+--------+--------+--------+
P        |     22 |      2 |      0 |     24
         |  26.19 |   2.38 |   0.00 |  28.57
         |  91.67 |   8.33 |   0.00 |
         |  30.56 |  40.00 |   0.00 |
---------+--------+--------+--------+
Total          72        5        7       84
            85.71     5.95     8.33   100.00
```

p-valor=0.1622 (Fisher)
p-valor=0.9344 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

```
LS              vegfc
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |fraco   |intenso |mod     |  Total
---------+--------+--------+--------+
N        |     24 |     23 |     13 |     60
         |  28.57 |  27.38 |  15.48 |  71.43
         |  40.00 |  38.33 |  21.67 |
         |  70.59 |  79.31 |  61.90 |
---------+--------+--------+--------+
P        |     10 |      6 |      8 |     24
         |  11.90 |   7.14 |   9.52 |  28.57
         |  41.67 |  25.00 |  33.33 |
         |  29.41 |  20.69 |  38.10 |
---------+--------+--------+--------+
Total          34       29       21       84
            40.48    34.52    25.00   100.00
```

p-valor=0.4009 (Qui-quadrado)
p-valor=0.5704 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

```
LS        INVAP
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |N       |P       |  Total
---------+--------+--------+
N        |     56 |      4 |     60
         |  66.67 |   4.76 |  71.43
         |  93.33 |   6.67 |
         |  71.79 |  66.67 |
---------+--------+--------+
P        |     22 |      2 |     24
         |  26.19 |   2.38 |  28.57
         |  91.67 |   8.33 |
         |  28.21 |  33.33 |
---------+--------+--------+
Total          78        6       84
            92.86     7.14   100.00
```

p-valor=1.0000 (Fisher)
p-valor=0.8392 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

```
LS        INVIH
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |N       |P       |  Total
---------+--------+--------+
N        |     43 |     17 |     60
         |  51.19 |  20.24 |  71.43
         |  71.67 |  28.33 |
         |  74.14 |  65.38 |
---------+--------+--------+
P        |     15 |      9 |     24
         |  17.86 |  10.71 |  28.57
         |  62.50 |  37.50 |
         |  25.86 |  34.62 |
---------+--------+--------+
Total          58       26       84
            69.05    30.95   100.00
```

p-valor=0.4117 (Qui-quadrado)
p-valor=0.4930 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

```
LS        CERB
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |N       |P       |  Total
---------+--------+--------+
N        |     40 |     18 |     58
         |  48.78 |  21.95 |  70.73
         |  68.97 |  31.03 |
         |  72.73 |  66.67 |
---------+--------+--------+
P        |     15 |      9 |     24
         |  18.29 |  10.98 |  29.27
         |  62.50 |  37.50 |
         |  27.27 |  33.33 |
---------+--------+--------+
Total          55       27       82
            67.07    32.93   100.00

       Frequency Missing = 2
```

p-valor=0.5708 (Qui-quadrado)
p-valor=0.4486 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

```
            Estagio clínico agrupado
 LS         EC
 Frequency|
 Percent  |
 Row Pct  |
 Col Pct  |       1|       2|  Total
 ---------+--------+--------+
 N        |     58 |      2 |     60
          |  69.05 |   2.38 |  71.43
          |  96.67 |   3.33 |
          | 100.00 |   7.69 |
 ---------+--------+--------+
 P        |      0 |     24 |     24
          |   0.00 |  28.57 |  28.57
          |   0.00 | 100.00 |
          |   0.00 |  92.31 |
 ---------+--------+--------+
 Total          58       26       84
             69.05    30.95   100.00
```

p-valor<**0.0001** (Qui-quadrado)
p-valor=0.2658 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

Quadro 5 – Comparação dos resultados de invasão.

INVIH / INVAP	N	P	Total
N	57	1	58
	67.86	1.19	69.05
	98.28	1.72	
	73.08	16.67	
P	21	5	26
	25.00	5.95	30.95
	80.77	19.23	
	26.92	83.33	
Total	78	6	84
	92.86	7.14	100.00

p-valor<**0.0001** (teste de McNemar) – houve mudança significativa entre os resultados dos exames

Quadro 6 – Análise descritiva e comparação das variáveis entre grupos de risco.

RISCO / GH — p-valor<**0.0001** (Fisher)

RISCO / GH	1	2	3	Total
A	2	3	2	7
	2.38	3.57	2.38	8.33
	28.57	42.86	28.57	
	5.71	7.32	25.00	
B	23	1	0	24
	27.38	1.19	0.00	28.57
	95.83	4.17	0.00	
	65.71	2.44	0.00	
M	10	37	6	53
	11.90	44.05	7.14	63.10
	18.87	69.81	11.32	
	28.57	90.24	75.00	
Total	35	41	8	84
	41.67	48.81	9.52	100.00

RISCO / RE — p-valor=0.8942 (Fisher)

RISCO / RE	N	P	Total
A	1	6	7
	1.20	7.23	8.43
	14.29	85.71	
	7.69	8.57	
B	3	21	24
	3.61	25.30	28.92
	12.50	87.50	
	23.08	30.00	
M	9	43	52
	10.84	51.81	62.65
	17.31	82.69	
	69.23	61.43	
Total	13	70	83
	15.66	84.34	100.00

Frequency Missing = 1

RISCO / RP — p-valor=1.0000 (Fisher)

RISCO / RP	N	P	Total
A	1	6	7
	1.20	7.23	8.43
	14.29	85.71	
	7.69	8.57	
B	4	20	24
	4.82	24.10	28.92
	16.67	83.33	
	30.77	28.57	

RISCO / HIST — p-valor<**0.0001** (Fisher)

RISCO / HIST	D	L	O	Total
A	7	0	0	7
	8.33	0.00	0.00	8.33
	100.00	0.00	0.00	
	9.72	0.00	0.00	
B	14	3	7	24
	16.67	3.57	8.33	28.57
	58.33	12.50	29.17	
	19.44	60.00	100.00	

```
M         |       8 |      44 |      52
          |    9.64 |   53.01 |   62.65
          |   15.38 |   84.62 |
          |   61.54 |   62.86 |
---------+--------+--------+
Total          13       70       83
            15.66    84.34   100.00

       Frequency Missing = 1
```

```
M         |      51 |       2 |       0 |      53
          |   60.71 |    2.38 |    0.00 |   63.10
          |   96.23 |    3.77 |    0.00 |
          |   70.83 |   40.00 |    0.00 |
---------+--------+--------+--------+
Total          72        5        7       84
            85.71     5.95     8.33   100.00
```

```
RISCO      estagio   p-valor<0.0001 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |       1|       2|  Total
---------+--------+--------+
A        |       0 |       7 |       7
         |    0.00 |    8.33 |    8.33
         |    0.00 |  100.00 |
         |    0.00 |   26.92 |
---------+--------+--------+
B        |      23 |       1 |      24
         |   27.38 |    1.19 |   28.57
         |   95.83 |    4.17 |
         |   39.66 |    3.85 |
---------+--------+--------+
M        |      35 |      18 |      53
         |   41.67 |   21.43 |   63.10
         |   66.04 |   33.96 |
         |   60.34 |   69.23 |
---------+--------+--------+
Total          58       26       84
            69.05    30.95   100.00
```

```
RISCO     INVIH    p-valor=0.7636 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |N       |P       |  Total
---------+--------+--------+
A        |       5 |       2 |       7
         |    5.95 |    2.38 |    8.33
         |   71.43 |   28.57 |
         |    8.62 |    7.69 |
---------+--------+--------+
B        |      15 |       9 |      24
         |   17.86 |   10.71 |   28.57
         |   62.50 |   37.50 |
         |   25.86 |   34.62 |
---------+--------+--------+
M        |      38 |      15 |      53
         |   45.24 |   17.86 |   63.10
         |   71.70 |   28.30 |
         |   65.52 |   57.69 |
---------+--------+--------+
Total          58       26       84
            69.05    30.95   100.00
```

```
RISCO     vegfc   p-valor=0.7095 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |fraco   |intenso |mod     |  Total
---------+--------+--------+--------+
A        |       4 |       1 |       2 |       7
         |    4.76 |    1.19 |    2.38 |    8.33
         |   57.14 |   14.29 |   28.57 |
         |   11.76 |    3.45 |    9.52 |
---------+--------+--------+--------+
B        |      11 |       8 |       5 |      24
         |   13.10 |    9.52 |    5.95 |   28.57
         |   45.83 |   33.33 |   20.83 |
         |   32.35 |   27.59 |   23.81 |
---------+--------+--------+--------+
M        |      19 |      20 |      14 |      53
         |   22.62 |   23.81 |   16.67 |   63.10
         |   35.85 |   37.74 |   26.42 |
         |   55.88 |   68.97 |   66.67 |
---------+--------+--------+--------+
Total          34       29       21       84
            40.48    34.52    25.00   100.00
```

```
RISCO     vegfc    p-valor=0.7485 (Qui-
quadrado)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |fraco   |intenso |mod     |  Total
---------+--------+--------+--------+
A + M    |      23 |      21 |      16 |      60
         |   27.38 |   25.00 |   19.05 |   71.43
         |   38.33 |   35.00 |   26.67 |
         |   67.65 |   72.41 |   76.19 |
---------+--------+--------+--------+
B        |      11 |       8 |       5 |      24
         |   13.10 |    9.52 |    5.95 |   28.57
         |   45.83 |   33.33 |   20.83 |
         |   32.35 |   27.59 |   23.81 |
---------+--------+--------+--------+
Total          34       29       21       84
            40.48    34.52    25.00   100.00
```

Risco	Variável	n	média	dp	mínimo	mediana	máximo	p-valor (Kruskal-Wallis)
A	CD34MAX	7	65.9	23.7	40.0	54.0	104.0	0.1196
	D2MAX	7	6.7	5.0	1.0	6.0	17.0	0.3130
B	CD34MAX	24	76.1	25.6	38.0	79.0	140.0	
	D2MAX	24	7.7	5.0	1.0	7.0	20.0	
M	CD34MAX	53	87.7	33.3	24.0	81.0	162.0	
	D2MAX	53	8.3	4.0	2.0	8.0	20.0	

Quadro 7 – Resultados da análise de regressão logística múltipla para identificar marcadores que influenciam nos grupos de risco.

Modelo: risco alto + moderado (n=60) x risco baixo (n=24)

Variável	parâmetro	erro padrão	p-valor	OR	IC95%
Intercepto	-0.2095	0.8569	0.8069	-	-
CD34MAX	0.0102	0.00837	0.2243	1.010	0.994; 1.027
D2MAX	0.0118	0.0565	0.8347	1.012	0.906; 1.130
vegfc intenso x fraco	0.2988	0.5624	0.5952	1.348	0.448; 4.059
vegfc mod x fraco	0.4696	0.6383	0.4619	1.599	0.458; 5.588

nenhuma variável foi significativa ao nível de 5%

Quadro 8 – Análise descritiva e comparação dos marcadores entre estagio e CERB.

estagio vegfc p-valor=0.5592 (Qui-quadrado)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	fraco	intenso	mod	Total
1	23	22	13	58
	27.38	26.19	15.48	69.05
	39.66	37.93	22.41	
	67.65	75.86	61.90	
2	11	7	8	26
	13.10	8.33	9.52	30.95
	42.31	26.92	30.77	
	32.35	24.14	38.10	
Total	34	29	21	84
	40.48	34.52	25.00	100.00

CERB vegfc p-valor=0.6603 (Qui-quadrado)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	fraco	intenso	mod	Total
N	24	18	13	55
	29.27	21.95	15.85	67.07
	43.64	32.73	23.64	
	72.73	64.29	61.90	
P	9	10	8	27
	10.98	12.20	9.76	32.93
	33.33	37.04	29.63	
	27.27	35.71	38.10	
Total	33	28	21	82
	40.24	34.15	25.61	100.00

Frequency Missing = 2

estagio	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
1	CD34MAX	58	84.1	30.6	24.0	81.0	162.0	0.3864
	D2MAX	58	7.9	4.4	1.0	7.0	20.0	0.9072
2	CD34MAX	26	79.2	32.6	35.0	77.0	160.0	
	D2MAX	26	8.2	4.4	1.0	6.5	20.0	

CERB	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
N	CD34MAX	55	85.8	30.2	38.0	81.0	160.0	0.1034
	D2MAX	55	8.1	4.4	1.0	7.0	20.0	0.3592
P	CD34MAX	27	73.9	30.6	24.0	69.0	162.0	
	D2MAX	27	7.3	4.1	1.0	6.0	18.0	

Quadro 9 – Análise descritiva e comparação das variáveis entre presença ou não de linfonodo sentinela, somente para risco alto+moderado.

LS	Variável	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
N	IDADE	36	56.7	8.9	40.0	55.5	77.0	0.1076
	T	36	1.0	0.6	0.2	1.0	2.2	**0.0225**
	CD34MAX	36	87.3	33.7	24.0	84.5	162.0	0.5213*
	D2MAX	36	7.9	3.9	2.0	8.0	18.0	0.8080**
P	IDADE	24	52.4	8.7	33.0	53.0	68.0	
	T	24	1.4	0.6	0.6	1.4	3.0	
	CD34MAX	24	82.0	32.1	39.0	78.5	160.0	
	D2MAX	24	8.4	4.5	1.0	7.5	20.0	

*p-valor=0.8781 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor
**p-valor=0.9190 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

LS Frequency Percent Row Pct Col Pct	vegfc fraco	intenso	mod	Total
N	13 21.67 36.11 56.52	15 25.00 41.67 71.43	8 13.33 22.22 50.00	36 60.00
P	10 16.67 41.67 43.48	6 10.00 25.00 28.57	8 13.33 33.33 50.00	24 40.00
Total	23 38.33	21 35.00	16 26.67	60 100.00

p-valor=0.3818 (Qui-quadrado)
p-valor=0.4318 (regressão logística múltipla), ajustado para idade e tamanho do tumor

Bibliografia

Conover, W.J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque.

Tabachnick, B.G. e Fidell,L.S. (2001). Using Multivariate Statistics. 4ª ed. Allyn&Bacon. Needham Heights. MA. USA.

Programa Computacional

SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.1.3 Service Pack 3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA.

ANEXO 4- Metodologia de pesquisa do Linfonodo-sentinela* no CM. Departamento de Radiologia-FCM-UNICAMP.

1. Orientação do paciente sobre o procedimento.
2. Injeção intradérmica de 0,2 ml de dextran-^{99m}Tc, com atividade de 0,4 mCi (7,4 MBq) em um ponto peri-tumoral (geralmente local da biópsia).
3. Cerca de 60 minutos depois, aquisição de imagens estáticas nas projeções anterior e lateral do tórax em câmara de cintilação equipada com colimador de baixa energia e alta resolução. Caso não seja possível a identificação do linfonodo sentinela na primeira hora de estudo, imagens adicionais são adquiridas mais tardiamente.
4. São realizadas "marcas" na pele da paciente, na porção anterior e lateral do tórax, a fim de auxiliar na localização do linfonodo no intra-operatório (noção de profundidade).
5. Durante a cirurgia, a localização do linfonodo sentinela é feita com auxílio da sonda portátil *(gamma-probe).* O *probe* deve ser coberto com uma proteção estéril e utilizado pelo cirurgião para dirigir a pesquisa intra-operatória do LNS. O número de contagens do LNS *in vivo* e após sua ressecção (*ex vivo*), é medido e registrado. Caso a atividade no campo cirúrgico se mantenha acima de 1/10 das contagens detectadas antes da remoção do LNS, é realizada a pesquisa e ressecção de outros linfonodos captantes. Linfonodo sentinela ressecado é encaminhado, então, para estudo histopatológico.

---

* O conceito de linfonodo sentinela baseia-se na progressão ordenada e seqüencial do tumor ao longo do sistema linfático. O linfonodo sentinela recebe a drenagem da região do tumor e é o primeiro a ser acometido pela doença.

A.D.C.C.
FCM-UNICAMP

Edição
-2008-