



GLÁUCIA BEATRIZ DE FREITAS LORENZETTI

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela candidata Gláucia Beatriz de Freitas Lorenzetti e aprovada pela Comissão Julgadora -
Campinas 15 de agosto 1991.

Regina Pisani

ESTUDO SOBRE A PRESENÇA DE ATIVADORES DE PLASMINOGÊNIO E SEUS INIBIDORES NO PLASMA DE PACIENTES COM CARCINOMA MAMÁRIO.

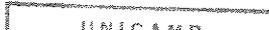
Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia Celular

Orientadora: Prof. Dr. Regina de Castro Bicudo Pisani†

Bc/9109427

CAMPINAS

1991



UNIDADE BC
 CHAMADA _____
 EX 14482
 COMBO BC 308191
 ROC. 308191
 REC 8.000,00
 DATA 13/09/91

CM-00015718-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

L887e

Lorenzetti, Gláucia Beatriz de Freitas

Estudo sobre a presença de ativadores de plasminogênio e seus inibidores no plasma de pacientes com carcinoma mamário / Gláucia Beatriz de Freitas Lorenzetti. -- Campinas, SP : (s.n.1, 1991.

Orientador: Regina de Castro Bicudo Pisani.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ativadores de plasminogênio. 2. Inibidores de enzima proteolítica. 3. Mamas - Cancer. I. Pisani, Regina de Castro Bicudo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

20. CDD- 574.192 56
616.994 49

Índices para catálogo sistemático:

- | | |
|--------------------------------------|------------|
| 1. Ativadores de plasminogênio | 574.192 56 |
| 2. Inibidores de enzima proteolítica | 574.192 56 |
| 3. Mamas : Cancer | 616.994 49 |

Aos membros da banca prévia, Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, Prof. Dr. Jessé de Paula Neves Jorge e Profa. Dra. Laurecir Gomes, pelas valiosas críticas e sugestões.

À grande amiga, Profa. Dra. Tereza Cristina S. Cavalcanti, pela contribuição neste trabalho com críticas, sugestões, correção das referências bibliográficas e também pelos conselhos, força e carinho.

Ao Fernando Guimarães, pela contribuição neste trabalho com sugestões principalmente na metodologia, pela amizade e também pelas caronas.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, por ter me ajudado a escolher o caminho, pela atenção, carinho e compreensão.

À Nicéia Barreiro Lino Gonçalves Marroni, pela dedicação e solicitude nas coletas de sangue das mulheres do grupo controle.

Às auxiliares e enfermeiras da Enfermaria de Oncologia, pela realização das coletas de sangue das pacientes, especialmente à enfermeira Rosimeire Aparecida Teixeira Mendes, pelo apoio e simpatia constantes.

Às mulheres, pacientes e controles, que colaboraram com esta pesquisa doando seu sangue.

Ao Reinaldo Cúrcio, por me ensinar a usar o programa SAS, por desenvolver o programa para comparação entre retas de regressão, e também pelo interesse, paciência e disponibilidade constantes em me ajudar sempre que precisei.

À equipe da Assessoria Técnica do CAISM, pelo excelente trabalho realizado: Sueli Chaves (direção e organização das referências bibliográficas), Isabel Cristina Gardenal de Arruda (revisão do texto), Maria do Rosário G. Rodrigues (gráficos e capa), Fernanda Atibaia (audiovisual), Patrícia Coy (tradução) e também Neusa Bonfante, Marisa Damasceno e Maria José Andrade.

Às meninas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais, Denise, Isildinha, Lúcia, Márcia e Helena, pelo incentivo, apoio, amizade e compreensão.

Às meninas do PCCM: Albinha, Jandira, Márcia e sobretudo, Neusinha, pelo apoio e colaboração no levantamento de dados dos controles e também pelo "alto astral".

Às funcionárias do Ambulatório de Mama, principalmente Rogéria e Cidinha, pelo apoio e colaboração no

levantamento de dados das pacientes.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular que contribuíram, direta ou indiretamente, para esta etapa da minha formação.

Aos meus sogros, Sebastião e Lúcia, por estarem sempre torcendo por mim.

Às Profas. Fátima Aparecida Bottcher Luiz e Sílvia de Barros Mazon, pelo interesse demonstrado e por compartilharem comigo suas experiências anteriores.

À Flávia Maria Bueno Rosa *in memoriam*, que me arrebatou do mundo das idéias, dos livros e das teorias maravilhosas e me fez enxergar o outro lado da moeda: a prática - real, apesar de triste.

Ao Prof. Dr. Quivo S. Tahin pelas sugestões na metodologia.

À Sílvia Pergamo Miranda e ao Prof. Dr. Aquiles Eugénico Piedrabuena, pelos testes de comparação entre retas de regressão.

Ao Prof. Dr. Rodney Bassanezzi e Andréia,

pelos ajustes da curva-padrão de uroquinase.

Ao Sérgio Vera Schneider, pela contribuição nas análises estatísticas.

Aos Drs. Sérgio Bruno e Verdiani, pelo auxílio no estadiamento das pacientes.

Ao Dr. Aarão Mendes Pinto Neto, pelo auxílio na caracterização do estado menopausal das pacientes e controles.

Ao Sr. Pedro, do Centro de Comunicações, pelas fotografias de última hora.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais, pela utilização de seus materiais e instalações, e também pela dosagem de receptores de estrógeno.

Ao Laboratório de Pesquisas Bioquímicas pelo empréstimo de materiais e equipamentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante parte deste trabalho.

E a tantas outras pessoas que me ajudaram de uma maneira ou de outra ...

ÍNDICE

SIGLAS E ABREVIATURAS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1. A AMOSTRA	15
2.1.1. Grupo de pacientes	15
2.1.2. Grupo controle	16
2.2. PROCEDIMENTOS	17
2.2.1. Caracterização da amostra segundo a idade e provável função ovariana estrogênica.....	17
2.2.2. Estudo anatomopatológico e clínico dos tumores..	19
2.2.2.1. Tipo histológico	20
2.2.2.2. Grau histológico (GH).....	20
2.2.2.3. Grau nuclear (GN).....	21

2.2.2.4.	Invasão de vasos linfáticos (IVL).....	22
2.2.2.5.	Metástase em linfonodos e número de linfonodos invadidos	22
2.2.2.6.	Invasão extranodal (IEN).....	23
2.2.2.7.	Metástase a distância	23
2.2.2.8.	Sistema TNM e estadiamento	31
2.2.3.	Dosagem de receptores de estrógeno (RE)	25
2.2.4.	Análise do plasma	26
2.2.4.1.	Obtenção da amostra de plasma	26
2.2.4.2.	Ensaio de lise em placa de caseína	27
2.2.4.3.	Composição e preparação das placas de caseína	27
2.2.4.4.	Padrão	29
2.2.4.5.	Curva padrão de uroquinase (UK)	30
2.2.4.6.	Inoculação e incubação das amostras ...	32
2.2.4.7.	Acidificação do plasma	34
2.2.4.8.	Leitura dos ensaios	36
2.2.4.9.	Cálculo da concentração de PA das amostras	36
2.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38

3. RESULTADOS	44
3.1. CONCENTRAÇÕES DE PA LIVRE E INIBIDO NOS CONTROLES E PACIENTES	44
3.2. CONCENTRAÇÕES DE PA LIVRE E INIBIDO EM FUNÇÃO DE VARIÁVEIS ESTUDADAS APENAS NO GRUPO DE PACIENTES	53
4. DISCUSSÃO	79
5. CONCLUSÕES	104
6. RESUMO	106
7. SUMMARY	108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPc	adenosina 5'-monofosfato cíclico
CA	carcinoma
CAISM	Centro de Atenção Integral A Saúde da Mulher
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DCC	técnica do carvão recoberto por dextran usada na dosagem de receptores de estrógeno e progesterona
DI	carcinoma ductal invasivo
DP	desvio padrão
EC	estadiamento clínico
ECP	estadiamento histopatológico
fm/mg	fentomoles por miligrama
GH	grau histológico
GL	graus de liberdade
GN	grau nuclear
HC	Hospital de Clínicas
HT	hormonoterapia
IEN	invasão extranodal
IS	carcinoma intraductal ou <i>in situ</i>
IVL	invasão de vasos linfáticos da mama
m	coeficiente angular da reta
M	concentração molar
Met Dist	metástase a distância

Met Linf	metástase em linfonodos axilares
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
n	tamanho amostral
ng/ml	nanogramas por mililitro
P	probabilidade
PA	ativador de plasminogênio
PAI	ativador de plasminogênio inibido
PAI 1	inibidor de ativador de plasminogênio tipo endotelial
PAI 2	inibidor de ativador de plasminogênio tipo placentário
PAI 3	inibidor urinário de uroquinase
PAL	ativador de plasminogênio livre
PA PAI	complexo formado entre ativador de plasminogênio e seu inibidor
PAT	ativador de plasminogênio total
PCCM	Programa de Controle de Câncer de Mama
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
pN	classificação histopatológica dos linfonodos regionais
pT	classificação histopatológica do tumor primário
pTNM	classificação histopatológica dos tumores
Pu	unidade Ploug
QT	quimioterapia
r	coeficiente de correlação

"...NÃO ESTAMOS ALEGRES,
É CERTO,
MAS TAMBÉM POR QUE RAZÃO
HAVERÍAMOS DE FICAR TRISTES?
O MAR DA HISTÓRIA
É AGITADO.
AS AMEAÇAS
E AS GUERRAS
HAVEMOS DE ATRAVESSÁ-LAS,
ROMPÊ-LAS AO MEIO,
CORTANDO-AS
COMO UMA QUILHA CORTA
AS ONDAS. "

Maiakóvski

DEDICO ESTE TRABALHO
AOS MEUS PAIS, ENIO E ODETE,
E AO MEU MARIDO, SIDNEY.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regina de Castro Bicudo Pisani, pela orientação deste trabalho e pelas oportunidades que me deu.

Aos meus pais, Odete e Enio, pela formação que me deram, pela preocupação constante com os estudos, incentivando-me e apoiando-me sempre.

Ao Sidney, pelo respeito, carinho e dedicação. Por não ter me deixado esmorecer em momento algum. Por ter colaborado na execução deste trabalho, com idéias, sugestões, colagem das fotos, digitação e também, indiretamente, assumindo minhas tarefas domésticas. Pela paciência, pelo afeto, pelo apoio, etc., etc., etc...

Ao Diretor da Divisão de Oncologia do CAISM, Dr. Henrique Benedito Brenelli, por permitir a realização deste trabalho e também pelo apoio e interesse.

Ao Prof. Dr. Francisco Chagas Pisani, pelas idéias brilhantes, que permitiram transformar objetos do dia-a-dia em material de trabalho científico.

RE	receptores de estrógeno
RPg	receptores de progesterona
RSV	vírus do sarcoma Rous
RT	radioterapia
TNM	classificação clínica dos tumores
tPA	ativador de plasminogénio tipo tecidual
UI	unidade internacional
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UK	uroquinase
uPA	ativador de plasminogénio tipo uroquinase
U WHO	unidade da Organização Mundial de Saúde
χ^2	Qui-Quadrado

1. INTRODUÇÃO

O comportamento biológico de células cancerosas é caracterizado por alguns padrões fundamentais como, por exemplo, crescimento, invasão, dispersão e, ocasionalmente, alteração das funções. As principais características biológicas que distinguem as células cancerosas das células normais são a habilidade de invadir os tecidos adjacentes e a capacidade de se disseminarem para outros tecidos (WOOD & STRAULI, 1973). Muitos mecanismos de invasão estão relacionados à degradação dos tecidos, na qual, aparentemente, a destruição da matriz extracelular por substâncias líticas desempenha um papel importante (DANO, ANDREASEN, GRONDAHL-HANSEN et al., 1985). Alguns estudos utilizando técnicas histoquímicas demonstram a presença de enzimas proteolíticas dentro ou ao redor de células tumorais em áreas de invasão (WOOD & STRAULI, 1973; CLAVEL, CHAVANEL, BIREMBAUT, 1986). Dentre estas substâncias, uma classe específica de enzimas, a dos ativadores de plasminogênio (PA), vem tendo um papel de destaque em relação aos processos de invasão.

Esses ativadores de plasminogênio são glicoproteínas pertencentes à classe das proteases serinas e têm a propriedade de catalisar a hidrólise de uma ligação peptídica do zimógeno plasminogênio, transformando-o em plasmina

CREBOUD-RAVAUX, 1985; DANO, ANDREASEN, GRONDAHL-HANSEN et al., 1985; SAKSELA, 1985; BUSSO, BELIN, FAILLY-CREPIN et al., 1987). São divididos em dois grupos: o dos ativadores do tipo uroquinase - uPA - e o do tipo tecidual - tPA. Nos mamíferos, diferem entre si pelo tamanho da molécula, por suas propriedades imunológicas e por sua seqüência de aminoácidos (CREBOUD-RAVAUX, 1985; GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al., 1988). A comparação de suas seqüências de aminoácidos, assim como da seqüência de nucleotídeos de seus cDNAs, indica que o tPA e o uPA são produtos de genes diferentes, mas relacionados (BUSSO, BELIN, FAILLY-CREPIN et al., 1986). O uPA tem peso molecular de aproximadamente 50.000 dáltons, localiza-se no cromossomo 10 da célula humana, é neutralizado por anticorpos anti-uroquinase e sua interação com a fibrina é baixa. Já o tPA tem peso molecular de aproximadamente 70.000 dáltons, localiza-se no cromossomo 8 da célula humana, não reage com anticorpos anti-uroquinase, mas com anticorpos preparados contra ativadores retirados de determinados tecidos e possui alta afinidade por fibrina (CREBOUD-RAVAUX, 1985; GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al., 1988). Tanto a uroquinase humana como o tPA produzido por uma cultura de células de melanoma humano já tiveram suas estruturas primárias completamente determinadas (CREBOUD-RAVAUX, 1985).

A plasmina, gerada através da ativação do plasminogénio pelo uPA ou pelo tPA, é uma enzima proteolítica de

baixa especificidade semelhante à tripsina, que atua na degradação de proteoglicanos, fibronectina, laminina, fibrina e caseína, sendo, assim, importante nos processos de destruição da matriz extracelular (WOOD & STRAULI, 1973; MAHMOUD & GAFFNEY, 1985; SAKSELA, 1985; BUSSO, BELIN, FAILLY-CREPIN et al., 1986) e da membrana basal (LIOTTA, GOLDFARB, BRUNDAGE et al., 1981). A plasmina por si só não é capaz de degradar o colágeno, outro componente da matriz extracelular, mas pode ativar a colagenase tipo IV que tem esta capacidade (CLAVEL, CHAVANEL, BIREMBAUT, 1986).

Em alguns processos biológicos normais onde ocorrem invasão celular e rearranjo dos tecidos, como: na degradação de tecidos; na dissolução de coágulos; invasão de tecidos por macrófagos; na ovulação, quando da ruptura dos folículos de Graaf; na espermogênese; na embriogênese inicial durante a implantação do trofoblasto e na involução da glândula mamária após o término da lactação, tem sido demonstrado o envolvimento dos ativadores de plasminogênio (DANO, MOLLER, OSSOWSKI et al., 1980; CARLSEN, RAMSHAW, WARRINGTON, 1984; SAKSELA, 1985; FEINBERG, KAO, HAIMOWTZ, 1989).

Embora os ativadores de plasminogênio sejam encontrados como traços em todos os tecidos normais, sua produção parece aumentada nos processos de transformação maligna (OSSOWSKI, QUIGLEY, KELLERMAN et al., 1973; OSSOWSKI, JAMES,

QUIGLEY et al, 1974). Os vírus oncogênicos e os promotores de tumor relacionados com esta transformação induzem a síntese celular e a liberação de PA (WOOD & STRAULI, 1973). BELL, BRAKENBURY, LESLIE et al. (1990) mostraram que a secreção de uPA por fibroblastos de embrião de galinha é aumentada em 50 vezes após transformação pelo vírus do sarcoma Rous (RSV).

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar a produção de PA em tumores humanos, como tumores de cólon (MARKUS, CAMIOLO, KOHGA et al., 1983; KOHGA, HARVEY, WEAVER et al., 1985; BURTIN, CHAVANEL, ANDRÉ-BOUGARAN et al., 1987), tumores de próstata (CAMIOLO, MARKUS, ENGLANDER et al., 1984), tumores de endométrio (SOSZKA & OLSZEWSKI, 1986), melanomas (WANG, MCLOUGHLIN, RICHIE et al., 1980; MARKUS, KOHGA, CAMIOLO et al., 1984) e outros.

Sabe-se que uma grande quantidade de tecidos tumorais humanos mostra uma elevação significativa de PA quando comparados ao tecido normal correspondente do mesmo hospedeiro, e descobriu-se que este aumento da atividade do PA é predominantemente do tipo uroquinase (uPA) (SOSZKA & OLSZEWSKI, 1986). Sugere-se que os produtos de degradação gerados pela atividade destas enzimas poderiam constituir uma reserva nutritiva para o tumor, e, ainda, ser um reservatório de fatores angiogênicos, os quais facilitariam o crescimento dos vasos sanguíneos na direção do tumor e no seu interior, garantindo a

nutrição das células com o aumento do volume tumoral (REBOUD-RAVAUX, 1985).

Com relação às patologias malignas, tem-se buscado estabelecer uma correlação sólida entre o aumento do conteúdo de PA e a invasão de tecidos adjacentes normais pelas células tumorais, com o intuito de esclarecer o processo de invasão local, loco-regional e mesmo de metastatização.

Em tecidos mamários malignos são inúmeros os trabalhos que analisam a produção de PA e sua relação com a invasividade (SUTHERLAND, 1980; PARANJPE, ENGEL, YOUNG et al., 1980; MIRA-Y-LOPEZ, REICH, OSSOWSKI, 1983; O'GRADY, LIJNEN, DUFFY, 1985; MIRA-Y-LOPEZ & OSSOWSKI, 1987; BURTIN, CHAVANEL, ANDRÉ-BOUGARAN et al., 1987; PACHECO, MARQUES, BRENTANI, 1989). PETERSON, KJARTANSSON, KORSAN-BENGTSEN et al. (1973) mostraram um aumento da atividade fibrinolítica associado a uma tendência para o crescimento invasivo de carcinomas de mama e formação de metástase em linfonodos regionais. EVERS, PATEL, MADEJA et al. (1982) encontraram um nível de PA no tecido tumoral mamário quatro vezes maior que no tecido normal. LAYER, BURNAND, GAFFNEY et al. (1987) verificaram que o uPA encontra-se aumentado em extratos de tecidos mamários malignos em relação aos benignos, enquanto o tPA permanece igual em todos os tecidos estudados. JANICKE, SCHMITT, ULM et al. (1989) também relataram um aumento de uPA no tecido carcinomatoso mamário em relação às lesões

benignas da mama, sendo o aumento do uPA associado a variáveis de mau prognóstico e a uma diminuição do intervalo livre de doença.

Como a degradação do tecido pode apresentar um papel crucial na invasividade dos tumores e como a invasividade, pelo menos em alguns casos, pode ser parte do processo metastático, essa hipótese pode ser ampliada, postulando-se um papel para os PA na invasividade e na metástase (DANO, ANDREASEN, GRONDAHL-HANSEN et al., 1985).

COLOMBI, BARLATI, MAGDELENAT et al. (1984) sugeriram que uma alta atividade de PA no tecido tumoral poderia participar da destruição do tecido peritumoral, permitindo, assim, a sua invasão pelo tumor. Por outro lado, uma alta atividade coagulatória tem sido descrita em pacientes com tumor, podendo esta alteração ser causada por uma diminuição da atividade de PA no plasma de pacientes com câncer, o que aumentaria a fibrina plasmática e seus depósitos.

Essa desordem inicial na coagulação do sangue favoreceria a formação de metástases, pois a fibrina aumentada poderia originar microtrombos, que seriam usados para a ancoragem das células metastáticas no plasma ou ainda como envoltórios de fibrina para as células metastáticas, protegendo-as das possíveis reações imunológicas do hospedeiro e da força de atrito na circulação (COLOMBI, BARLATI, MAGDELENAT et al., 1984). Esta diminuição da atividade do PA do plasma parece

estar relacionada à existência de metástases em linfonodos axilares, uma vez que quase todos os linfonodos invadidos ocorrem em pacientes com níveis muito baixos de atividade plasmática de PA (COLOMBI, BARLATI, MAGDELENAT et al., 1984). OSSOWSKI & REICH (1983) forneceram uma evidência direta, embora experimental, da participação do PA no processo metastático através da descoberta de que anticorpos contra uPA, mas não contra tPA, inibiam metástase após transplante de células de carcinoma humano HEP3 em embriões de galinha.

Alguns agentes que previnem a formação de microtrombos, que os dissolvem quando formados ou que inibem a agregação das plaquetas normalmente suprimem a implantação das células metastáticas no órgão-alvo. Por outro lado, o processo é geralmente aumentado por agentes antifibrinolíticos. Estes resultados vêm fortalecer a hipótese de que os microtrombos seriam responsáveis pelo aumento do processo de implantação (DANO, ANDREASEN, GRONDAHL-HANSEN et al., 1985; MARKUS, CAMIOLA, KOHGA et al., 1983).

A partir do conhecimento de que o uPA é uma enzima-chave na degradação dos tecidos e na invasividade e que o tPA é uma enzima-chave na trombólise, especialmente por sua alta afinidade por fibrina (COLLEN, 1980), pode-se especular que os dois tipos de ativadores, em alguns casos, podem ter efeitos opostos na formação de metástases, exercidos em diferentes passos

do processo metastático (DANO, ANDREASEN, GRONDAHL-HANSEN et al., 1985).

A metástase é a principal causa de morte na maioria dos pacientes portadores de tumores malignos. Aproximadamente 50% dos pacientes que desenvolvem um tumor maligno podem ser curados pelas terapias utilizadas atualmente. No grupo onde o tratamento falha, a maioria dos pacientes morre devido às metástases. Em geral, as metástases a distância são muito pequenas para serem detectadas enquanto o tumor primário é tratado, e o início da dispersão das colônias metastáticas ocorre comumente antes que os sintomas clínicos das metástases sejam evidentes. Além disso, a maioria dos pacientes apresenta metástases múltiplas (LIOTTA, RAO, WEWER, 1986).

Dado que a formação de colônias é um processo contínuo e crescente com o tempo, a identificação de grandes metástases num dado órgão é freqüentemente acompanhada de um grande número de micrometástases ocultas. A variação de tamanho e idade das metástases, sua localização anatômica, sua dispersão e composição heterogênea são fatores que impedem a remoção cirúrgica e limitam a concentração efetiva de drogas anticâncer que devem atingir as colônias metastáticas (LIOTTA, RAO, WEWER, 1986).

Além da existência de fatores enzimáticos ou líticos modificando o estroma e a atividade coagulatória,

participam, aparentemente, dos mesmos processos algumas substâncias capazes de modular a ação invasiva através da regulação das enzimas do tipo PA (DANO, ANDREASEN, GRONDAHL-HANSEN et al., 1985). A regulação do PA pode se dar em vários níveis, como, por exemplo, na síntese, na transcrição, na tradução, na liberação para o meio extracelular e na atividade enzimática. Desta forma, os hormônios esteróides, a trombina, os fatores de crescimento, os hormônios peptídicos e as aminas biogênicas são substâncias que podem alterar a síntese de tPA (GERARD & MEIDELL, 1989). O phorbol ester, um promotor de tumor, apresenta como efeito freqüente, mas não universal, a indução e/ou estimulação da síntese de PA (DEGEN, ESTENSEN, NAGAMINE et al., 1985). A calcitonina, vasopressina e outros agentes que elevam o AMPc intracelular induzem uma linhagem celular de rim (LLC-PK1), a qual produz pouco ou nenhum uPA detectável sob condições basais, a formar grandes quantidades de uPA e mRNA uPA (DEGEN, ESTENSEN, NAGAMINE et al., 1985).

Além dessas substâncias reguladoras, a descrição dos inibidores de PA conduziu ao conceito de que a atividade fibrinolítica das células reflete o balanço entre a atividade de PA e a de seus inibidores: assim, agentes que modificam a atividade de PA podem fazê-lo alterando tanto os níveis de PA como os níveis de inibidores ou ambos (BUSSO, BELIN, FAILLY-CREPIN et al., 1986).

Os inibidores de PA são uma família de inibidores de proteases serinas (serpins) que controlam a atividade de PA, formando complexos com eles. Estas substâncias são distintas, genética e imunologicamente, e foram descritos na literatura o inibidor de PA do tipo endotelial (PAI-1), o inibidor de PA tipo placentário (PAI-2) e protease nexina-I (SPRENGERS & KLUFT, 1987; FEINBERG, KAO, HAIMOWITZ et al., 1989; BAKER, BLEAKLEY, WOODROW et al., 1990). O PAI-1 pode inibir tanto uPA quanto tPA, é produzido por células endoteliais em cultura assim como por outras linhagens celulares e é encontrado no plasma humano, em condições normais, numa concentração média de 3,5 UI/ml. O PAI-2 foi isolado da placenta humana, reage com uPA e tPA e só é encontrado no plasma humano a partir do terceiro trimestre de gravidez, em concentrações muito altas. A protease nexina-I, ausente no plasma, é produzida por várias células dependentes de ancoragem, incluindo fibroblastos, células musculares cardíacas e células do epitélio renal; inibe várias proteases serinas como tripsina, trombina e plasmina com maior afinidade que uPA e tPA (SPRENGERS & KLUFT, 1987; BAKER, BLEAKLEY, WOODROW et al., 1990). Recentemente foi descrito um outro inibidor de PA, o inibidor urinário de uroquinase (PAI-3) (CASTELLOTE, GRAU, LINDE et al., 1990).

Os inibidores de atividades fibrinolíticas são, geralmente, considerados como o primeiro mecanismo de defesa

contra o aumento da atividade fibrinolítica. A baixa atividade inibitória encontrada ao nível do tecido tumoral pode ser interpretada como um resultado da depleção da barreira defensiva deste local. De acordo com alguns pesquisadores pode-se especular que uma taxa alta de ativadores em relação a inibidores corresponde a alterações patológicas mais avançadas (SOSZKA & OLSZEWSKI, 1986).

Um importante desafio aos pesquisadores do câncer é o desenvolvimento de métodos mais adequados para predizer a agressividade metastática do tumor do paciente, prevenir a invasão local, identificar e tratar clinicamente as micrometástases silenciosas. Muitos laboratórios estão estudando os mecanismos fundamentais de invasão e metástases, na esperança de identificar fatores bioquímicos específicos para constituir a base de tais estratégias diagnósticas ou terapêuticas. Nos últimos anos, relevantes progressos foram feitos em direção a este objetivo (LIOTTA, RAO, WEWER, 1986).

Considera-se que a avaliação do comprometimento dos nódulos axilares é tradicionalmente um dos marcadores de maior valor prognóstico em câncer de mama. Porém, este tipo de determinação requer cirurgia de mama de grande amplitude, enquanto os marcadores bioquímicos podem ser medidos usando-se procedimentos cirúrgicos mais conservativos. Com a tendência crescente de se optar por cirurgias conservativas, os

marcadores bioquímicos poderão desempenhar um papel importante na avaliação do prognóstico do câncer de mama, além de poderem ajudar a distinguir aquela minoria dos cânceres de mama que, mesmo sendo linfonodos negativos, são muito agressivos (DUFFY, O'GRADY, DEVANEY et al., 1988a; DUFFY, 1990). Segundo estes pesquisadores, o tPA pode ser incluído na crescente lista de marcadores bioquímicos com valor prognóstico no câncer de mama, juntamente com receptores de estrógeno, receptores de progesterona, sítios de ligação para lectinas, entre outros.

Além de poderem ser usados como marcadores bioquímicos, os PA, devido ao fato de exercerem sua ação particularmente ao nível extracelular, são facilmente acessíveis a inibidores, podendo o uso de inibidores específicos de uPA ter um efeito terapêutico na degradação dos tecidos e na metástase, ainda que os possíveis efeitos tóxicos colaterais deste tratamento permaneçam por ser determinados (DANO, ANDREASEN, GROUND AHL-HANSEN et al., 1985).

Sabe-se também que as variações na atividade dos PA, se tumorais ou plasmáticos, podem merecer interpretações diferentes com relação à capacidade invasiva e/ou metastática de um tumor. Desta forma, o aumento de PA pode não significar obrigatoriamente uma atividade proteolítica também aumentada, seja no tumor ou no plasma, visto que diferentes concentrações de inibidores podem modificar o efeito dos PA em quaisquer das

localizações citadas. Assim, para se ter uma visão mais ampla da paciente como um todo, é necessário, além de quantificar o conteúdo de PA no tumor, avaliar a concentração destas enzimas e de seus inibidores no plasma. Poucos trabalhos foram desenvolvidos neste sentido. PACHECO, BRENTANI, FRANCO et al. (1988); GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al. (1988); GRONDAHL-HANSEN, BACH, MUNKHOLM-LARSEN (1990) estudaram relações entre carcinomas mamários e PA no plasma. MANNUCCI, CUGNO, BOTTASSO et al. (1990) analisaram os níveis de tPA, uPA e PAI em carcinomas de mama e melanomas. KIRCHHEIMER, BINDER, PFLUEGER et al. (1985) estudaram PA plasmático no câncer de próstata, e SAITO, NAGASHIMA, IWATA et al. (1990) estudaram em tumores uterinos e ovarianos. Porém estes trabalhos, em geral, não relacionaram a presença de PA plasmático com diferentes características do tumor primário e das metástases.

Tem sido sugerido que o sistema fibrinolítico está num equilíbrio dinâmico com o sistema de coagulação para manter um leito vascular aberto e intacto. A visão de que o sistema fibrinolítico está continuamente ativo *in vivo* é mantida pelos achados de atividade de PA em sangue normal e, um nível reduzido, em pacientes com trombose venosa ou doença cardíaca isquêmica (COLLEN, 1980). GRANELLI-PIPERNO & REICH (1978) afirmaram que tanto uPA quanto tPA são encontrados no sangue.

A investigação de extratos tumorais e do

plasma, quanto à presença de PA e de seus respectivos inibidores em pacientes com câncer de mama, poderia servir para um melhor entendimento dos fenômenos de invasividade, além de eventualmente contribuir para o estabelecimento de um método que possibilite prever a capacidade de invasão - local e a distância - de um tumor.

Desta forma, no presente trabalho pretendeu-se estabelecer o nível de atividade de PA e o seu grau de inibição no plasma de pacientes com carcinoma de mama, relacionando os dados obtidos com determinadas variáveis do tumor e com os valores calculados para uma amostra controle. Para atingir este objetivo, foi efetuado neste trabalho: 1) a avaliação da concentração de PA livre e complexado com seus inibidores, no plasma de pacientes com carcinoma mamário e numa amostra controle, como um todo, e agrupando-as de acordo com a idade e a provável função ovariana estrogénica; 2) a análise das concentrações obtidas de PA livre e complexado com seus inibidores, em função das seguintes características da doença: tipo histopatológico do tumor, graus histológico e nuclear do tumor, presença ou ausência de invasão de vasos linfáticos da mama tumoral, comprometimento dos linfonodos axilares, invasão extranodal, presença ou ausência de metástases a distância, estadiamento histopatológico e conteúdo de receptores de estrógeno no tumor.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. A AMOSTRA

A concentração de PA e de seus inibidores foi avaliada num total de 101 amostras de plasma provenientes de dois grupos: grupo de pacientes e grupo controle.

2.1.1. Grupo de pacientes

O grupo de pacientes constituiu-se de 80 mulheres portadoras de patologias mamárias malignas, escolhidas ao acaso, sem que houvesse qualquer estratificação inicial por idade, raça ou estágio clínico da doença. Estas mulheres estavam sendo tratadas e/ou acompanhadas pelo Ambulatório de Mama pertencente à Divisão de Oncologia no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISMD - UNICAMP).

Para cada indivíduo participante desse grupo foi preenchida uma ficha a partir das pastas que cada paciente possuía no Ambulatório de Mama. O modelo desta ficha será apresentado no final do capítulo Materiais e Métodos.

2.1.2. Grupo controle

O grupo controle constituiu-se de 21 mulheres não portadoras de carcinoma mamário ou de qualquer patologia mamária benigna, sem sintomas de patologia tromboembólica e que não estavam fazendo uso de hormônios. Estas mulheres foram selecionadas no Programa de Controle de Câncer de Mama (PCCM) do CAISM e só foram incluídas na amostra após terem sido classificadas como "sem alterações mamárias" no diagnóstico clínico final. Para o grupo controle também não houve qualquer estratificação por idade ou raça.

Nesse grupo, parte do levantamento foi realizado através das pastas que cada doadora possuía no PCCM e parte através de uma entrevista com a própria doadora. O modelo da ficha para os controles será apresentado no final do capítulo Materiais e Métodos.

2.2. PROCEDIMENTOS

2.2.1. Caracterização da amostra segundo a idade e provável função ovariana estrogênica

Segundo HALBE (1982), o climatério é a fase da vida biológica da mulher que representa a transição entre menacme e a senectude e está fundamentado na função ovariana estrogênica, que praticamente desaparece entre dois e cinco anos após a menopausa. O diagnóstico da menopausa somente pode ser firmado após um ano de amenorréia. No Brasil, a idade média da menopausa situa-se ao redor de 45 a 47 anos. A distribuição da incidência etária da menopausa segue uma curva de Gauss que começa por volta de 40 anos e termina aproximadamente aos 55 anos.

Com base nesses fatos, as mulheres participantes da amostra estudada neste trabalho foram divididas em três grupos, de acordo com a idade e a provável função estrogênica ovariana:

Grupo 1- Normoestrogênico: mulheres em menacme (até 35 anos) ou com deficiência estrogênica leve (entre 35 e 40 anos).

Grupo 2- Deficiência estrogênica moderada ou peri-menopausa: mulheres climatéricas com idade compreendida entre 41 e 55 anos.

Grupo 3- Deficiência estrogênica severa ou pós-menopausa: mulheres com mais de 55 anos ou menopausadas há mais de um ano.

Na amostra controle, o grupo 1 foi formado por sete mulheres normoestrogênicas quanto à função ovariana, que ainda apresentavam ciclos menstruais, sendo quatro com idade inferior a 35 anos e três com idade entre 35 e 40 anos. O grupo 2, de deficiência estrogênica moderada, foi composto por 11 mulheres, das quais oito ainda menstruavam e três apresentavam amenorréia há menos de um ano. As três mulheres restantes, com idade superior a 55 anos, formaram o grupo 3, de deficiência estrogênica severa, estando menopausadas há mais de um ano.

Na amostra de pacientes, o grupo 1 foi constituído por 12 mulheres sem história de amenorréia, sendo seis com idade inferior a 35 anos e seis com idade entre 35 e 40 anos. O grupo 2, com deficiência moderada, foi formado por 17 mulheres entre 41 e 55 anos, das quais 13 ainda menstruavam e quatro possuíam um intervalo de amenorréia inferior a um ano. No grupo 3, de pacientes com deficiência estrogênica severa, foram classificadas 50 mulheres, sendo: quatro menopausadas há mais de um ano, com idade inferior a 55 anos; três ooforectomizadas, das quais duas aos 40 anos e uma aos 48 anos, sem complementação hormonal; 38 mulheres com idade superior a 55 anos e com menopausa natural há mais de dois anos; e cinco mulheres com

idade superior a 55 anos, que foram hysterectomizadas. A ocorrência de hysterectomia aos 44 anos em uma paciente de 47 anos ocasionou sua exclusão na análise das variáveis função ovariana e receptores de estrógeno.

2.2.2. Estudo anatomopatológico e clínico dos tumores

O estudo anatomopatológico dos tumores retirados das pacientes forneceu as variáveis: tipo histológico do tumor, grau histológico e grau nuclear do tumor, invasão de vasos linfáticos da mama, metástase em linfonodos, número de linfonodos invadidos e invasão extranodal. Estes exames foram realizados pelo Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas (FCMD - UNICAMP, segundo técnica de rotina utilizada neste Serviço, que consiste de: fixação com formalina 10%, embebição em parafina, cortes de 5 μ m de espessura e coloração com hematoxilina-eosina.

Outras variáveis, como metástase a distância, sistema TNM e estadiamento histopatológico dos tumores foram obtidas a partir do estudo clínico ou da combinação entre os estudos clínico e anatomopatológico dos tumores.

Na maioria das variáveis estudadas não foi possível classificar todas as pacientes contidas na amostra, pois, por motivos diversos, não se conseguiu obter informações

suficientes que preenchessem os parâmetros necessários a essas classificações.

2.2.2.1. Tipo histológico

Na amostra estudada foram encontrados dois tipos de carcinoma ductal: o carcinoma ductal *in situ* (IS) e o carcinoma ductal invasivo (DI). O câncer que se origina nos grandes ductos da mama é denominado carcinoma ductal. O carcinoma ductal *in situ* ou intraductal caracteriza-se pela proliferação de células epiteliais, com características de malignidade, no interior do ducto da mama. Neste caso, a membrana basal, vista ao microscópio óptico, está intacta e as células malignas não ultrapassaram o seu habitat natural. Havendo invasão do estroma mamário por estas células cancerosas, seja pela rotura ou pela permeação da membrana basal do ducto, o tumor é denominado carcinoma ductal invasivo (ALVARENGA, 1980).

2.2.2.2. Grau histológico (GH)

Os carcinomas invasivos podem ser graduados em três grupos, de acordo com ALVARENGA (1980):

Grau histológico I: carcinoma bem diferenciado

com possível comportamento biológico mais favorável.

Grau histológico II: carcinoma medianamente diferenciado, cujo comportamento é difícil de se prever.

Grau histológico III: carcinoma indiferenciado ou pouco diferenciado, com provável pior prognóstico.

2.2.2.3. Grau nuclear (GN)

De acordo com ALVARENGA (1980), o grau nuclear analisa características nucleares das células tumorais, tais como tamanho, forma, alterações da cromatina bem como a frequência de mitoses. Estes fatores, em conjunto, têm um valor prognóstico específico, podendo ser classificados em três graus nucleares:

Grau nuclear 1: são aqui agrupados os tumores cujas células apresentam núcleos grandes, de tamanho e forma variados, com cromatina grosseira, nucléolos proeminentes e mitoses abundantes. Os tumores com grau nuclear 1 são os menos diferenciados e os de pior prognóstico.

Grau nuclear 2: intermediário entre os graus nucleares 1 e 3, quanto às características nucleares e prognóstico.

Grau nuclear 3: é constituído por tumores nos quais as células têm núcleos relativamente pequenos, uniformes, com cromatina frouxa, sem nucléolos ou com nucléolos não

proeminentes e em cujas preparações não se observam mitoses. Os tumores com grau nuclear 3 são bem diferenciados e de melhor prognóstico.

2.2.2.4. Invasão de vasos linfáticos (IVL)

A observação de células tumorais no interior de vasos linfáticos da mama tem um significado prognóstico importante. A presença destas células em vasos peritumorais é um indicador importante do intervalo livre de doença em pacientes sem metástase em linfonodos (PAGE, ANDERSON, CONNOLY et al., 1987).

2.2.2.5. Metástase em linfonodos e número de linfonodos invadidos

A investigação da presença ou não de células carcinomatosas, através do exame histológico de todos os linfonodos axilares encontrados num espécime proveniente de mastectomia, é que define as variáveis metástase em linfonodos e o número de linfonodos invadidos (ALVARENGA, 1980).

2.2.2.6. Invasão extranodal (CIEN)

Invasão extranodal corresponde à difusão de células tumorais metastáticas de depósitos linfonodais para o tecido axilar adjacente (PAGE & ANDERSON, 1987).

2.2.2.7. Metástase a distância

Células cancerosas, quando carregadas para um local distante do tumor primário, podem se implantar, formando metástases. Foram consideradas portadoras de metástases a distância as pacientes que, através de exame clínico, anatomopatológico, técnicas laboratoriais e de radiodiagnóstico ou por outros métodos, mostraram células cancerosas em local distante do tumor primário, excluídas as metástases em linfonodos regionais, ou seja, axilares e/ou mamários internos (CHIMINAZZO & TEIXEIRA, 1980).

2.2.2.8. Sistema TNM e estadiamento dos tumores

O sistema TNM descreve a extensão anatômica da doença e está baseado na pesquisa de três componentes, segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC) (CHERMANEK & SOBIN, 1989):

T - extensão do tumor primário;

N - ausência ou presença e a extensão das metástases em linfonodos regionais;

M - ausência ou presença de metástases a distância.

Duas classificações são descritas para cada local anatômico, a saber:

a) Classificação clínica (pré-tratamento), designada TNM, é baseada nas evidências conseguidas antes do tratamento. Tais evidências surgem dos achados clínicos, diagnósticos por imagens, endoscopia, biópsia, exploração cirúrgica e outros exames relevantes;

b) Classificação histopatológica (pós-cirúrgica), designada pTNM, é baseada nas evidências conseguidas antes do tratamento, suplementada ou modificada pela evidência adicional conseguida através da cirurgia e do exame histopatológico.

O estágio clínico é essencial para selecionar e avaliar a terapêutica, enquanto que o estágio histopatológico fornece dados mais precisos para estimar o prognóstico e avaliar os resultados finais, razão pela qual foi utilizado este último para análise estatística dos dados.

2.2.3. Dosagem de receptores de estrógeno (RE)

Quando um processo de transformação maligna ocorre em um tecido, as células que o constituem podem preservar os receptores ou perdê-los, total ou parcialmente. Se a perda é total, as células, e conseqüentemente o tecido correspondente, escapam ao controle hormonal. Entretanto, se a perda é parcial, é provável que o hormônio continue a reconhecer aquele tecido como um tecido-alvo. Os tumores mamários que não contêm receptores de estrógeno, têm pouca ou nenhuma possibilidade de regressão pela terapia endócrina, enquanto as estimativas das proporções de pacientes com tumores RE positivos que realmente se beneficiam desta terapia oscilam de 40 a 80%.

A dosagem de RE nos tumores foi executada no Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais/CAISM, pela técnica do carvão recoberto por dextran (DCC). A amostra foi dividida em dois grupos: o RE positivo e o RE negativo, de acordo com a presença ou ausência de RE nos tumores, sendo considerados positivos os tumores com mais de 5 fm/mg de proteína no citossol (PISANI & PINOTTI, 1980).

Devido à ausência de dados de algumas pacientes, não foi possível o aproveitamento total da amostra nesta variável.

2.2.4. Análise do plasma

2.2.4.1. Obtenção da amostra de plasma

Um volume de aproximadamente 5 ml de sangue, retirado de cada doadora, foi colocado num frasco contendo heparina sódica na concentração final de 50 UI para cada ml de sangue e centrifugado a 1400 g por 5 minutos a 2°C para separação do plasma. As amostras de sangue foram sempre transportadas e manipuladas em banho de gelo e cada plasma obtido foi aliquotado e estocado a -20°C.

As coletas de sangue das pacientes com carcinoma mamário foram realizadas no dia da internação, geralmente um a dois dias antes da data da cirurgia mamária. De acordo com a Diretoria da Divisão de Oncologia e com o Serviço de Enfermagem, ficou estabelecido que a coleta para este trabalho fosse juntamente com a coleta de sangue para os exames pré-operatórios, evitando, assim, interferência na rotina hospitalar e incômodos desnecessários à paciente.

As coletas de sangue dos indivíduos do grupo controle foram feitas posteriormente à consulta no PCCM. Estas mulheres foram esclarecidas do objetivo do trabalho e assinaram um documento declarando doação voluntária de sangue e concordando que o mesmo fosse usado em pesquisas na área de

câncer de mama.

2.2.4.2. Ensaio de lise em placa de caseína

Para quantificar os PA e seus inibidores no plasma foi utilizado o método de ensaio de lise em placa de caseína, com base nos métodos descritos por YANG, KIRKLAND, JORGENSEN et al. (1980); SAKSELA (1981); HUARTE, BELIN & VASSALLI (1985) modificados neste laboratório. O método consiste em incubar as amostras e um padrão de concentração conhecida em poços de 5 mm de diâmetro, feitos em gel de agarose opaco, contendo caseína com plasminogênio (placa teste) e sem plasminogênio (placa controle).

2.2.4.3. Composição e preparação das placas de caseína

Placa Teste (placa com plasminogênio)

- agar (Bacto-agar - Difco) 1%
- leite em pó desnatado (Molico - Nestlé) 0,7%
- azida sódica (Riedel-deHaën) 0,1%

- plasminogênio humano (P-7397 - Sigma) 1 U WHO/placa¹
- volume total - 80 ml

Placa controle (placa sem plasminogênio)

- agar (Bacto-agar - Difco) 1%
- leite em pó desnatado (Molico - Nestlé) 0,7%
- azida sódica (Riedel-deHaën) 0,1%
- volume total - 80 ml

O agar era fundido e esterilizado em autoclave a 120°C e 1,5 atmosferas de pressão, durante 30 minutos, e adicionado ao leite e à azida. Esperava-se que a mistura chegasse a uma temperatura de 45°C, quando então era adicionado o plasminogênio (placa teste). Esta mistura era homogeneizada rapidamente, com movimentos circulares leves, para evitar a formação de bolhas. Em seguida era vertida sobre uma placa de vidro (20 cm X 20 cm) previamente apoiada sobre um banho-maria a 56°C, de modo a manter a superfície superior da placa a 37°C. Enquanto a placa permanecia nesta temperatura, a mistura se mantinha líquida. Para a placa controle o procedimento era o

¹ 1 Unidade Sigma de plasminogênio produz uma absorbância igual a 1,0 ($\lambda = 275 \text{ nm}$) a partir da α -caseína em 20 minutos a pH 7.5 e 37,5°C, quando medidos os produtos solúveis do ácido perclórico num volume de 5,0 ml. 1 Unidade Sigma é aproximadamente igual a 3 Unidades WHO (1st British standard 78/646) (PLASMINOGÊNIO, 1990).

mesmo, exceto por não haver adição do plasminogênio.

Imediatamente após a colocação da mistura sobre a placa, colocavam-se sobre ela, a uma altura e distância constantes, seis varetas de vidro às quais estavam acopladas cinco esferas de aço inox com diâmetro regular de 5 mm cada, de forma que, em contato com o gel, formassem 30 poços de tamanho uniforme. A placa era cuidadosamente retirada do banho-maria e resultava num gel com 2 mm de espessura após atingir a temperatura ambiente. Então as varetas de vidro eram retiradas, e, nos locais correspondentes às esferas, permaneciam pequenas depressões de aproximadamente 5 mm de diâmetro com capacidade suficiente para conter um volume de 10 μ l em seu interior.

2.2.4.4. Padrão

O padrão usado nos ensaios foi o ativador de plasminogênio na forma de uroquinase (UK) (Sigma U-1627) obtida a partir de urina humana. O padrão de concentração conhecida produziu uma resposta, quando ensaiado, proporcional à sua atividade enzimática. Através da construção de uma curva-padrão foi possível determinar qual relação matemática seria usada para comparação dos halos produzidos pelo padrão e pelas amostras.

2.2.4.5. Curva-padrão de uroquinase (UK)

A curva-padrão de UK baseou-se na relação existente entre a variação de concentração de UK e do diâmetro do halo de proteólise produzido através do método empregado neste trabalho (Figura 1). As seguintes concentrações do padrão em Ploug units/ml (Pu/ml)² foram usadas:

- triplicatas: 0,25; 2,50; 6,25; 12,50; 18,75; 25,00
- duplicatas: 37,50; 50,00; 75,00; 100,00; 125,00; 150,00

Com o auxílio do Departamento de Matemática Aplicada do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação (IMECC) - UNICAMP, foram realizadas pelo menos três tentativas de ajuste da curva-padrão obtida, com o objetivo de estabelecer uma função matemática que melhor definisse seu comportamento e que seria usada para calcular a concentração de PA das amostras a partir do diâmetro dos halos de proteólise por elas produzidos. De todos os ajustes tentados, o que melhor se adaptava às necessidades deste trabalho foi aquele feito por

²Segundo GRANT, RAMSHAW, BADENOCH-JONES et al. (1986), 1 Unidade Ploug (Pu) corresponde à quantidade da uroquinase equivalente a aproximadamente 1,4 CTA (Committee on Thrombolytic Agents), ou a aproximadamente 1 UI (Unidade Internacional). 1 Unidade Sigma ativa aquela quantidade de plasminogênio que produz uma absorbância igual a 1,0 por ml por minuto a pH 7.5 e 37°C, quando medidos os produtos solúveis do ácido perclórico a partir da α -caseína. 1 Unidade Sigma é equivalente a 5.000-10.000 Pu (UROKINASE, 1990). Para efeito dos cálculos neste trabalho, 1 Unidade Sigma corresponde a 7500 Pu.

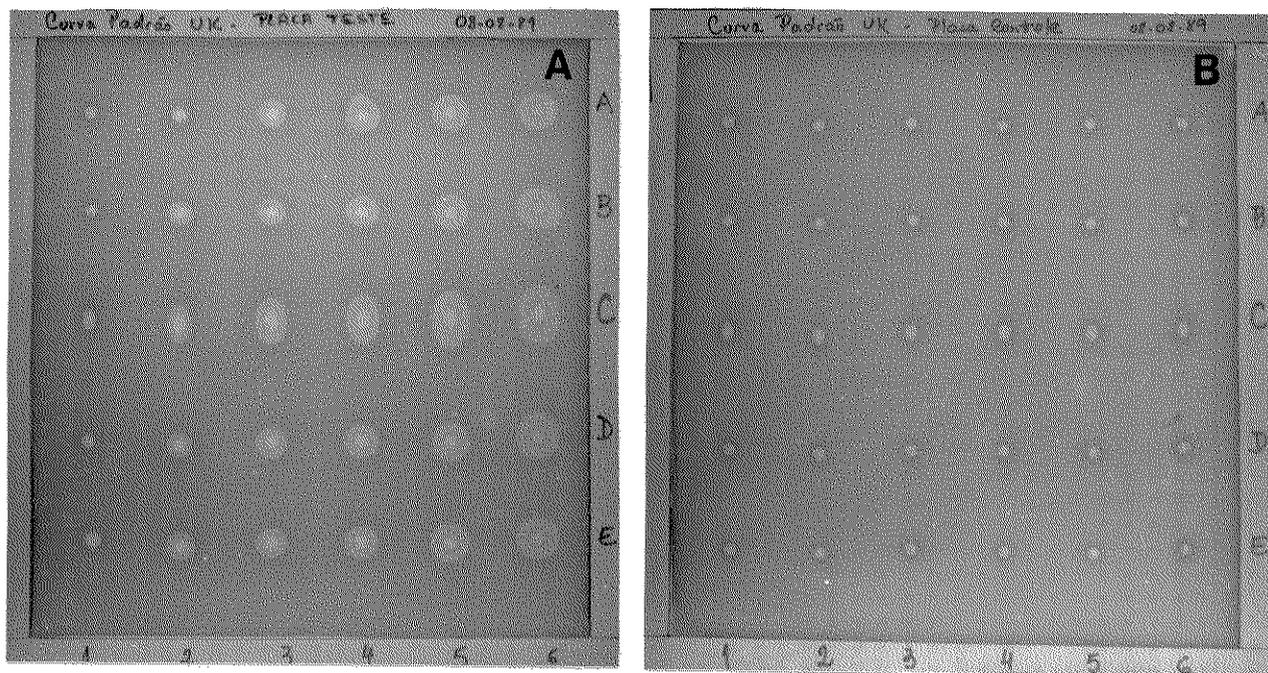


Figura 1 - Curva padrão de uroquinase (UK) em placa teste com plasminogênio (A) e placa controle sem plasminogênio (B). Concentrações de UK variaram de 0,25 a 150 Pu/ml.

retas, onde a curva-padrão passou a ser representada por três retas que melhor se adaptaram a ela (Gráfico 1).

O ponto de intersecção entre as retas 1 e 2 foi definido pela concentração de UK 6,25 Pu/ml e entre as retas 2 e 3 pela concentração de UK 25,00 Pu/ml. Para utilizar este ajuste foi necessário que em cada placa fossem empregadas três concentrações diferentes do padrão, que permitissem definir a equação das três retas.

Uma vez definidas as três retas a partir dos pontos obtidos (diâmetro do halo de proteólise do padrão em função da concentração do padrão), foi possível calcular a concentração de PA das amostras ensaiadas, usando, para cada amostra, a equação da reta à qual pertencia o ponto referente ao diâmetro de seu halo de proteólise.

2.2.4.6. Inoculação e incubação das amostras

Em cada placa ensaiaram-se cinco amostras de pacientes, uma amostra controle e quatro concentrações diferentes do padrão (UK). Cada amostra foi inoculada em quatro poços da placa, sendo que dois poços foram ocupados por plasma sem tratamento e, outros dois, por plasma acidificado. As concentrações do padrão usadas foram: 6,25 e 12,5 Pu/ml (dois poços cada) e 18,5 e 37,5 Pu/ml (um poço cada). O volume de

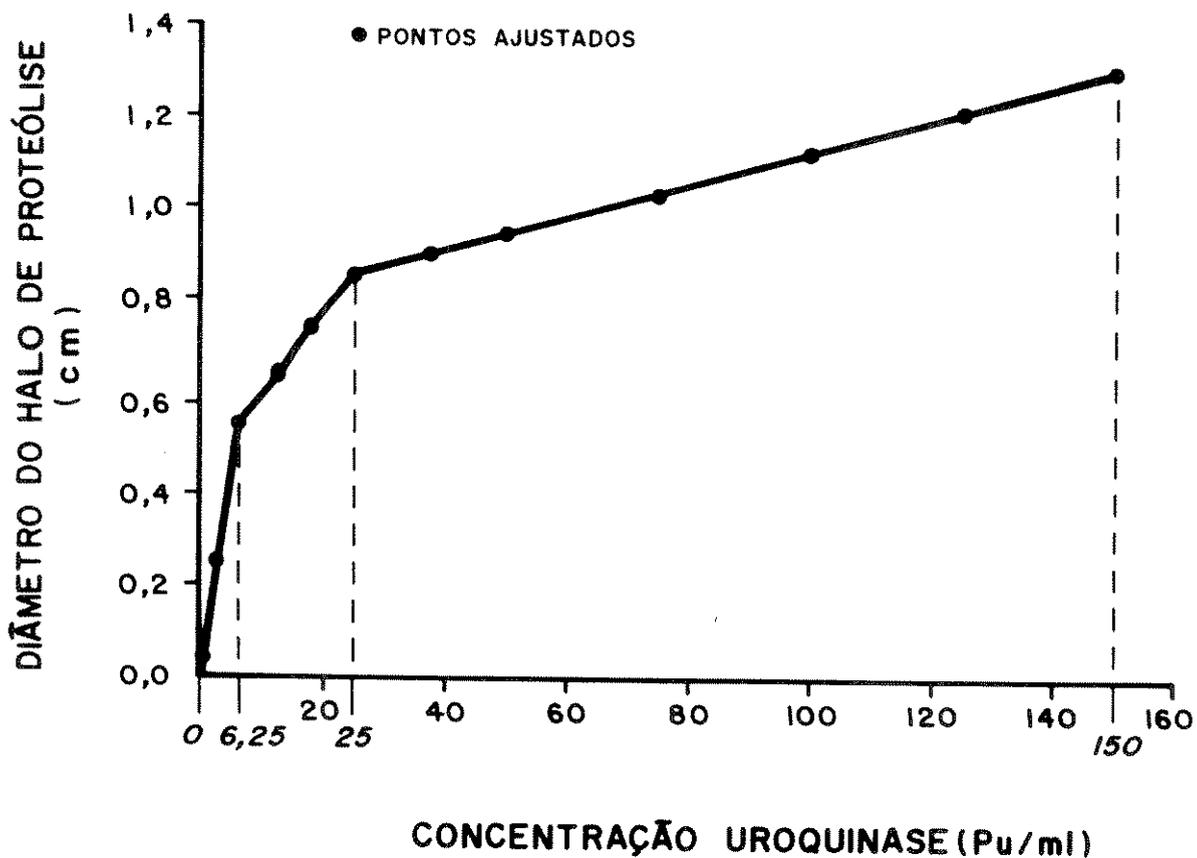


Gráfico 1 - Curva-padrão de uroquinase ajustada por três retas; variação do diâmetro do halo de proteólise em função de concentrações de uroquinase.

inoculação das amostras e dos padrões nos poços foi sempre 10 μ l (Figura 2).

Após a inoculação, colocavam-se, nos quatro lados da placa, filetes de vidro sobre os quais se apoiava uma outra placa de vidro (20 cm X 20 cm) que cobria totalmente o gel. Sob a placa de cobertura era colocado um papel de filtro umedecido, de modo a impedir a desidratação do gel. Após isto, todo o sistema era vedado, colando-se fita crepe nas laterais.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C e a medida do diâmetro dos halos de lise formados foi sempre feita após 72 horas de incubação.

2.2.4.7. Acidificação do plasma

A acidificação do plasma foi executada em uma das alíquotas de plasma correspondente a cada indivíduo, segundo o método descrito por SOSZKA & OLSZEWSKI (1986), modificado neste laboratório, que permite destruir o complexo formado entre o PA e seu inibidor (PA-PAI), liberando o PA. Consiste na adição de tampão glicina 0,5M pH 2,5 à amostra numa proporção volumétrica de 2:1 e neutralização da solução com tampão Tris-HCl 1,0M pH 8,1 volume a volume, após 90 minutos de incubação da primeira mistura à temperatura ambiente. Portanto, após a acidificação e neutralização, cada amostra de plasma acidificado fica quatro

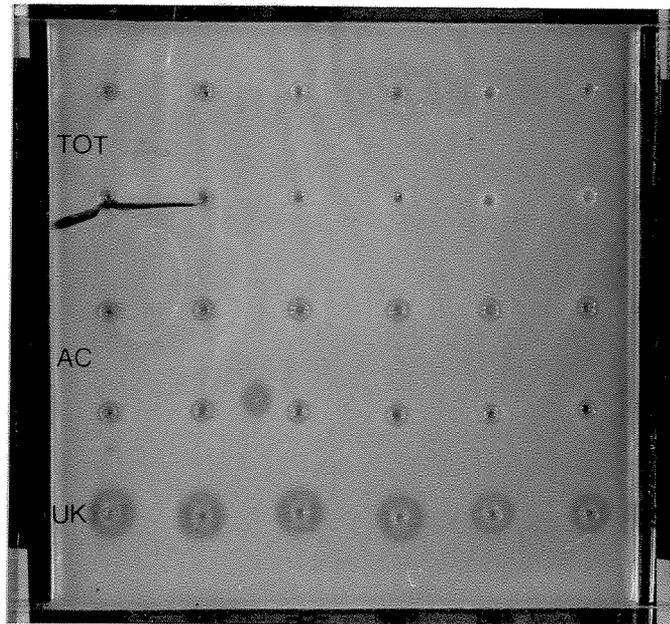


Figura 2 - Ensaio com as amostras de plasma em placa teste com plasminogênio: plasmas totais (TOT), plasmas acidificados (AC) e padrões de uroquinas (UK).

vezes diluída em relação ao plasma sem tratamento.

2.2.4.8. Leitura dos ensaios

Após 72 horas de incubação, as placas eram abertas retirando-se a fita crepe das laterais e a placa de vidro de cobertura. A placa inferior, contendo o gel com os poços, era colocada sobre um negatoscópio forrado com papel preto transparente, a uma distância de aproximadamente 10 cm. O diâmetro do halo de lise de cada poço era medido com um paquímetro auxiliado por uma lupa, sempre pelo mesmo observador.

2.2.4.9. Cálculo da concentração de PA das amostras

De acordo com o método utilizado, o diâmetro da área clara e circular resultante da proteólise ao redor dos poços de inoculação é proporcional, na placa teste, às quantidades de PA e proteases inespecíficas presentes na amostra e, na placa controle, apenas às concentrações de proteases inespecíficas. Assim, subtraindo-se do diâmetro do halo de proteólise, obtido na placa teste, o valor do diâmetro do halo obtido na placa controle, é possível chegar-se a um valor, em milímetros, proporcional ao conteúdo de PA presente em cada

amostra. Esta medida comparada à do halo produzido pelo padrão, já descontado o diâmetro do poço, fornece a quantidade de PA presente na amostra expressa em Pu/ml.

Um reajuste da curva-padrão foi realizado para cada ensaio utilizando-se as diferentes concentrações de UK incubadas em cada placa e os diâmetros dos halos de lise por elas produzidos, tomando-se o cuidado de descontar, de cada diâmetro de halo, o diâmetro do poço. Através destes reajustes foram encontradas as equações que regiam cada uma das três retas em cada experimento.

Como todas as amostras foram ensaiadas em duplicatas, inicialmente calculou-se a média dos diâmetros dos halos de lise de cada duplicata nas placas teste e controle. Em seguida, a média dos diâmetros dos halos de lise produzidos na placa controle foi subtraída da média dos diâmetros dos halos de lise da placa teste. Nos plasmas sem tratamento, com este valor calculou-se a concentração de PA livre (PAL) da amostra em Pu/ml através da equação da reta que continha simultaneamente os valores correspondentes aos diâmetros dos halos do padrão e da amostra. Nos plasmas acidificados, o valor da diferença dos diâmetros dos halos entre a placa teste e controle foi multiplicado por quatro para corrigir a diluição do plasma no processo de acidificação. A partir deste valor corrigido, determinou-se a concentração de PA total da amostra, da mesma

maneira descrita anteriormente para o plasma sem tratamento. Subtraindo-se a concentração de PA livre não complexado com o inibidor da concentração de PA total de cada amostra, obteve-se a concentração de PA complexado com inibidor ou PA inibido (PAI).

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre o grupo controle e o de pacientes, quanto à distribuição de indivíduos de acordo com classes diferentes de concentração de PA livre ou inibido, foi feita pelo teste Qui-Quadrado.

As médias amostrais de PA, livre ou inibido, estimadas para controles e pacientes foram comparadas pelo teste t de Student (BEIGUELMAN, 1977). Este mesmo teste foi empregado no grupo de pacientes para comparação das médias de PA, livre ou inibido, toda vez que uma variável compreendia apenas duas classes diferentes.

Para comparar simultaneamente as médias estimadas para PA livre ou inibido dentro de uma mesma variável com mais de duas classes, utilizou-se a Análise de Variância (BEIGUELMAN, 1977). Na identificação de qual ou quais destas médias diferiam significativamente entre si, foi utilizado o teste de Tukey, que permite, nestes casos, a comparação das médias duas a duas (VIEIRA, 1981b).

A correlação foi utilizada sempre que se quis estudar o comportamento conjunto de duas variáveis quantitativas distintas (VIEIRA, 1981a). Este teste foi aplicado para analisar o comportamento do PA livre e inibido entre si e também de cada uma destas formas de PA em relação à concentração de outras variáveis quantitativas.

O diagrama de dispersão foi empregado para visualizar o comportamento conjunto de duas variáveis através da representação gráfica. Na realização do gráfico, o PAL foi tomado como variável independente, e, seus valores, portanto, colocados no eixo X, enquanto o PAI foi tomado como variável dependente, sendo expresso no eixo Y (VIEIRA, 1981a). A regressão linear foi efetuada para estabelecer a equação da reta que descreve a variação de PAI em função da variação de PAL. As retas obtidas através deste teste foram comparadas duas a duas quanto à angulação através do Teste de Comparação entre Retas de Regressão (PIEDRABUENA, 1990).³

A correlação, juntamente com o diagrama de dispersão, e a regressão linear foram executadas entre PAL e PAI para diversas situações onde se compararam controles e pacientes e também diferentes variáveis da doença.

Para todos os testes estatísticos descritos anteriormente, o nível de significância considerado foi o de 5%.

³PIEDRABUENA, AE. Comunicação pessoal.

FICHA CLÍNICA DAS PACIENTES

- Dados Pessoais:

- Nome
- Idade
- Cor
- Estado civil
- Endereço
- Número de registro do HC
- Número de registro do Ambulatório de Mama

- Antecedentes pessoais

- Medicações atuais, pregressas e tratamentos hormonais

- Antecedentes tocoginecológicos:

- Estado menstrual
- Idade da telarca, menarca e menopausa
- Idade do primeiro parto e primeira lactação
- Número de gravidezes, partos e abortos
- Antecedentes sexuais e mamários

- Antecedentes oncológicos

- Antecedentes familiares para CA de mama e outros

- Dados relativos à doença:

- Data de internação e cirurgia
- Hipótese diagnóstica
- Ocorrência de recidiva

- Data de cirurgia anterior
 - Mama acometida
 - Tratamentos químico (QT), radio (RT) e hormonoterápicos (HT)
 - Tipo histológico do tumor
 - Classificação TNM
 - Estadiamentos clínico (EC) e patológico (ECP) do tumor
 - Graus histológico (GH) e nuclear (GN) do tumor
 - Presença de invasão de vasos linfáticos (IVL) e invasão extranodal (IEN)
 - Presença de metástase em linfonodos (MetLinf)
 - Número de linfonodos invadidos
 - Presença de metástase a distância
 - Dosagem de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RPg)
- Variáveis medidas no plasma:
- PA livre (PAL)
 - PA total (PAT)
 - PA inibido (PAI)
 - Concentração de proteínas totais

FICHA CLÍNICA DOS CONTROLES

- Dados Pessoais:
 - Nome
 - Idade
 - Cor
 - Estado civil
 - Endereço
 - Número de registro do HC
 - Número de registro do PCCM
- Data da consulta e do retorno
- Sintomas ou queixas atuais
- Antecedentes pessoais
- Medicações atuais, pregressas e tratamentos hormonais
- Patologias tromboembolíticas
- Outras patologias
- Antecedentes tocoginecológicos:
 - Estado menstrual
 - Idade da telarca, menarca e menopausa
 - Idade do primeiro parto e primeira lactação
 - Número de gravidezes, partos e abortos
 - Antecedentes sexuais e mamários
- Volume das mamas
- Antecedentes oncológicos

- Antecedentes familiares para CA de mama e outros
- Impressão clínica
- Resultados dos exames:
 - Termografia de placa
 - Ecografia
 - Mamografia
- Diagnóstico clínico final
- Diagnóstico histológico final
- Citologia
- Variáveis medidas no plasma:
 - PA livre (PAL)
 - PA total (PAT)
 - PA inibido (PAI)
 - Concentração de proteínas totais

3. RESULTADOS

3.1. Concentrações de PA livre e inibido nos controles e pacientes

A análise do grupo controle e de pacientes através do teste do Qui-Quadrado mostrou que a distribuição das proporções de pacientes com câncer de mama diferiu significativamente daquela de indivíduos do grupo controle, quando se consideraram classes de concentrações crescentes de PA livre (Tabela 1).

Essas classes de concentrações de PA livre foram reunidas entre si de várias maneiras, formando tabelas 2X2. Para cada combinação foi calculado um novo valor de Qui-Quadrado, o que possibilitou identificar a classe número quatro (valores de PA livre maiores que 0,24 Pu/ml) como sendo a geradora da diferença na distribuição de indivíduos, por conter um acúmulo de pacientes em relação ao número de controles.

Com relação ao PA inibido, esse mesmo teste não mostrou diferença na proporção de pacientes e controles quanto à sua distribuição em classes crescentes de concentração de PA (Tabela 2).

Tabela 1 - Distribuição de pacientes com câncer de mama e de controles segundo classes de PA livre (PAL) em Pu/ml

Classes PAL	Controle	Pacientes	Total
1) zero	17	33	50
2) $0 < PAL \leq 0,12$	2	10	12
3) $0,12 < PAL \leq 0,24$	1	10	11
4) $PAL > 0,24$	1	27	28
Total	21	80	101
$X^2=11,38$ para 3 Graus de Liberdade (GL), $P < 0,01$ ←			

Tabela 2 - Distribuição de pacientes com câncer de mama e de controles segundo classes de PA inibido (PAI) em Pu/ml

Classes PAI	Controle	Pacientes	Total
1) zero	3	12	15
2) $0,0 < PAI \leq 1,0$	6	14	20
3) $1,0 < PAI \leq 2,0$	5	28	33
4) $2,0 < PAI \leq 3,0$	5	13	18
5) $3,0 < PAI \leq 4,0$	1	6	7
6) $PAI > 4,0$	1	7	8
Total	21	80	101
$X^2=2,72$ para 5 GL, $P < 0,80$			

Os Gráficos 2 e 3 expressam as frequências relativas de pacientes comparadas às de controles, agrupadas em classes de PA livre e de PA inibido. A análise dos gráficos mostra que, com relação ao PA livre, os controles se concentram principalmente nas três primeiras classes, entre zero e 0,24 Pu/ml, sendo que 81% dos controles não apresentam qualquer atividade de PA livre. Entretanto, nas pacientes a distribuição é mais ampla, variando principalmente de zero a 0,72 Pu/ml, com somente 41,3% do total delas sem atividade de PA livre. Com relação ao PA inibido, a concentração de controles encontra-se ligeiramente deslocada para a esquerda quando comparada com a de pacientes.

A comparação das médias estimadas para esses dois grupos mostrou que a média de PA livre nas pacientes foi significativamente maior que a dos controles, enquanto as médias de PA inibido não diferiram significativamente entre si (Tabela 3).

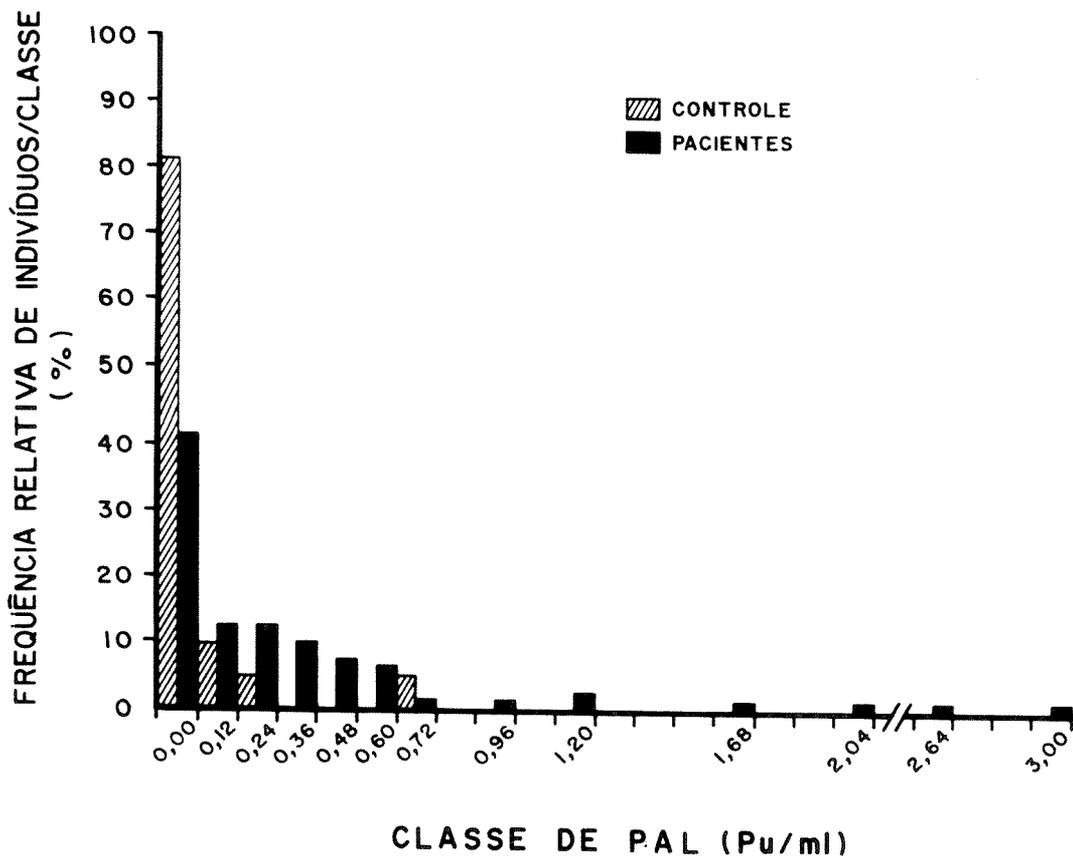


Gráfico 2 - Distribuição de pacientes com câncer de mama e de controles segundo classes de concentração de PA plasmático livre (PAL).

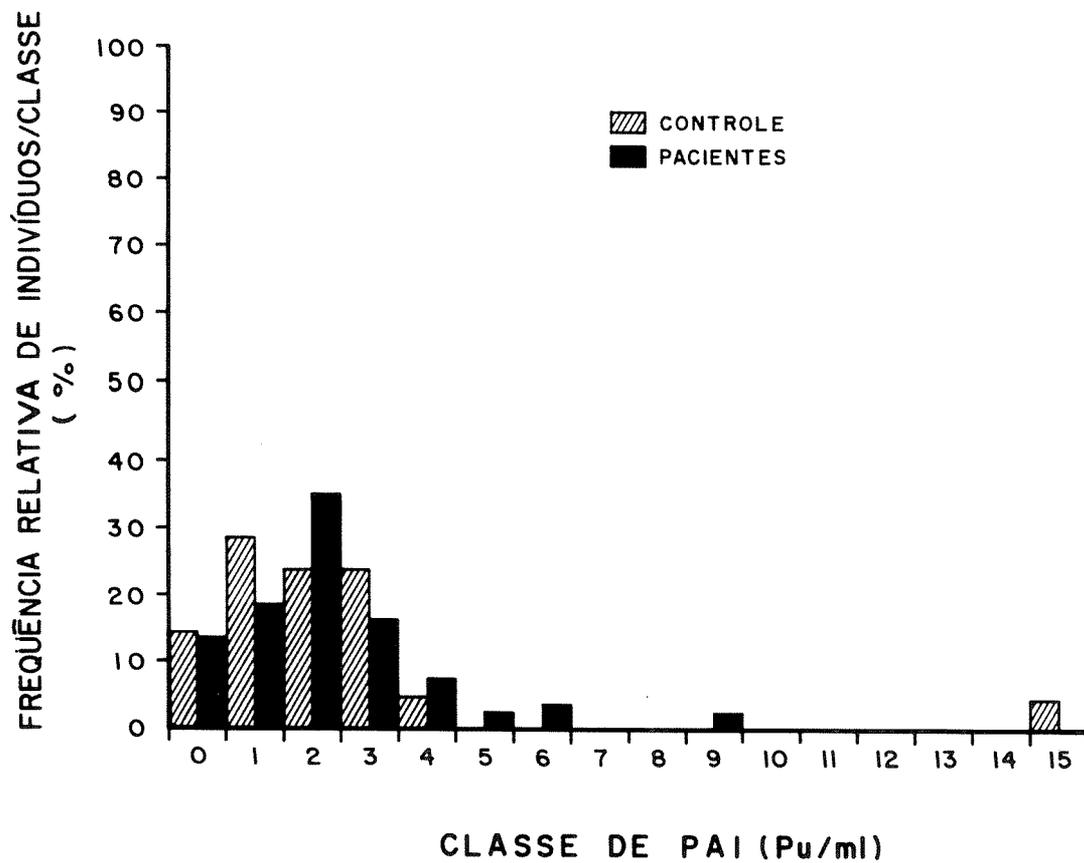


Gráfico 3 - Distribuição de pacientes com câncer de mama e de controles segundo classes de concentração de PA plasmático inibido (PAI).

Tabela 3 - Comparação entre médias de concentrações de PA plasmático livre e inibido em pacientes e controles; valores expressos em média (Pu/ml) \pm desvio-padrão (DP)

	PA livre	PA inibido
Controles (n=21)	0,039 \pm 0,13	1,982 \pm 3,16
Pacientes (n=80)	0,289 \pm 0,54	1,766 \pm 1,68
P-valor	0,0003 \leftarrow	0,7644

Tanto no grupo controle quanto no de pacientes as concentrações de PA livre e PA inibido não se mostraram correlacionadas, como expressa o Gráfico 4. As duas retas de regressão apresentadas mostram, porém, coeficientes angulares que diferem estatisticamente entre si ($P < 0,001$), sendo positivo e maior o coeficiente que expressa a inclinação da reta de regressão correspondente às pacientes.

A análise das concentrações de PAL em pacientes e controles, segundo a idade e provável função estrogênica ovariana mostrou que as pacientes com função ovariana normoestrogênica e com deficiência estrogênica severa apresentaram médias de PA livre significativamente maiores que os controles, nas classes correspondentes, não tendo sido esta

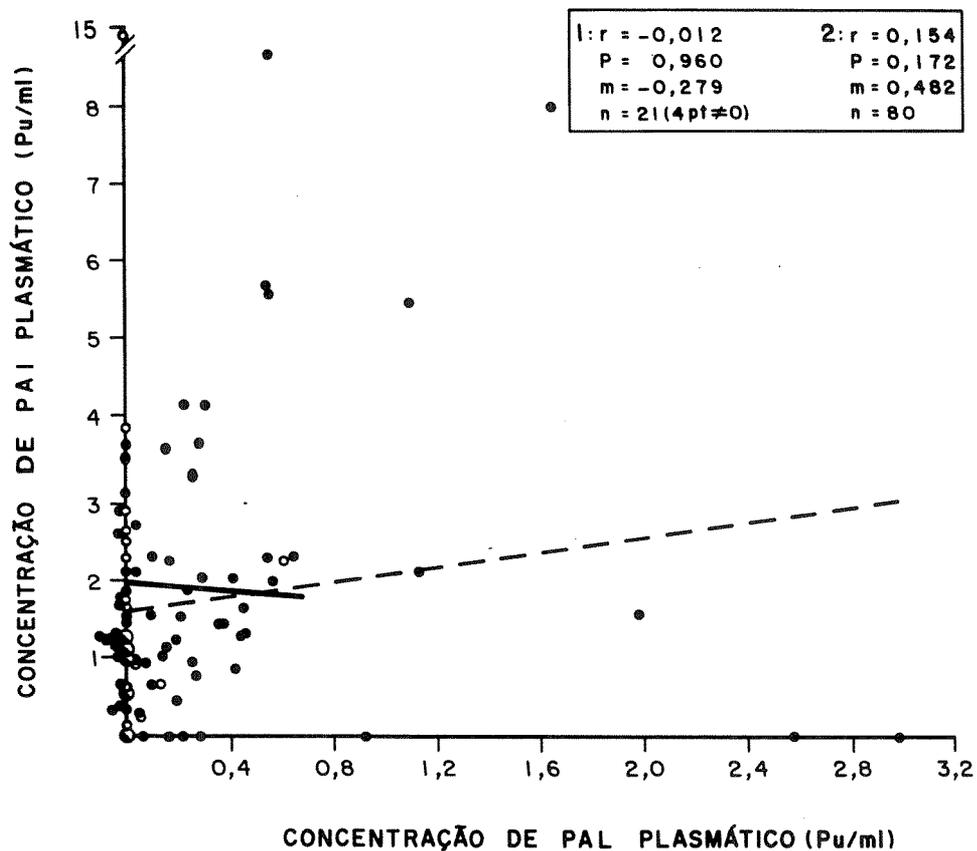


Gráfico 4 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL nos grupos de controles (1: — e o) e pacientes (2: --- e ●). Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ●.

diferença detectada entre aquelas com deficiência estrogênica moderada. As médias das concentrações de PA inibido de controles e pacientes não diferiram de modo estatisticamente significativo em quaisquer das três situações de idade e função ovariana consideradas (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático livre e inibido em controles e pacientes agrupados de acordo com a idade e provável função estrogênica ovariana; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

Função ovariana		PA livre	PA inibido
Normoestrogênica	Controles (n=7)	0,005 \pm 0,01	0,949 \pm 0,99
	Pacientes (n=12)	0,312 \pm 0,38	1,736 \pm 1,25
	P-valor	0,0182 \leftarrow	0,1552
Def. estrogênica moderada	Controles (n=9)	0,082 \pm 0,20	2,734 \pm 4,66
	Pacientes (n=17)	0,218 \pm 0,31	1,576 \pm 1,42
	P-valor	0,2511	0,4858
Def. estrogênica severa	Controles (n=5)	0,010 \pm 0,02	2,076 \pm 1,37
	Pacientes (n=50)	0,308 \pm 0,63	1,800 \pm 1,86
	P-valor	0,0017 \leftarrow	0,7482

A comparação das médias de concentração de PA livre e inibido entre as três classes de idade e provável função estrogênica ovariana, segundo o método de Análise de Variância, também não mostrou diferenças significativas do ponto de vista estatístico, seja no grupo controle ou no de pacientes (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre as médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, estimadas para as classes de idade e provável função estrogênica ovariana no grupo de pacientes e controles; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

Função ovariana		PA livre	PA inibido
Controles	Normoestrogênica (n=7)	0,005 \pm 0,01	0,949 \pm 0,99
	Def.estrog.moderada (n=9)	0,082 \pm 0,20	2,734 \pm 4,66
	Def.estrog.sever (n=5)	0,010 \pm 0,02	2,076 \pm 1,37
P-valor		0,4693	0,5561
Pacientes	Normoestrogênica (n=12)	0,312 \pm 0,38	1,736 \pm 1,25
	Def.estrog.moderada (n=17)	0,218 \pm 0,31	1,576 \pm 1,42
	Def.estrog.sever (n=50)	0,308 \pm 0,63	1,800 \pm 1,86
P-valor		0,8316	0,8972

Uma correlação positiva entre PA livre e PA inibido foi encontrada apenas nas pacientes com deficiência

estrogênica moderada (Gráficos 5, 6, 7). Porém, os coeficientes que expressam a inclinação das retas de regressão obtidos para estas situações foram significativamente diferentes ($P < 0,001$) nas quinze combinações possíveis, quando comparados dois a dois.

3.2. Concentrações de PA livre e inibido em função de variáveis estudadas apenas no grupo de pacientes

As médias de PA livre e inibido referentes aos dois tipos histológicos dos tumores presentes na amostra estudada, o carcinoma intraductal ou *in situ* (IS) e o carcinoma ductal invasivo (DI) não diferiram de forma estatisticamente significativa (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com o tipo histológico do tumor; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
DI (n=73)	0,299 \pm 0,56	1,819 \pm 1,73
IS (n=3)	0,070 \pm 0,12	1,335 \pm 1,45
P-valor	0,4811	0,6342

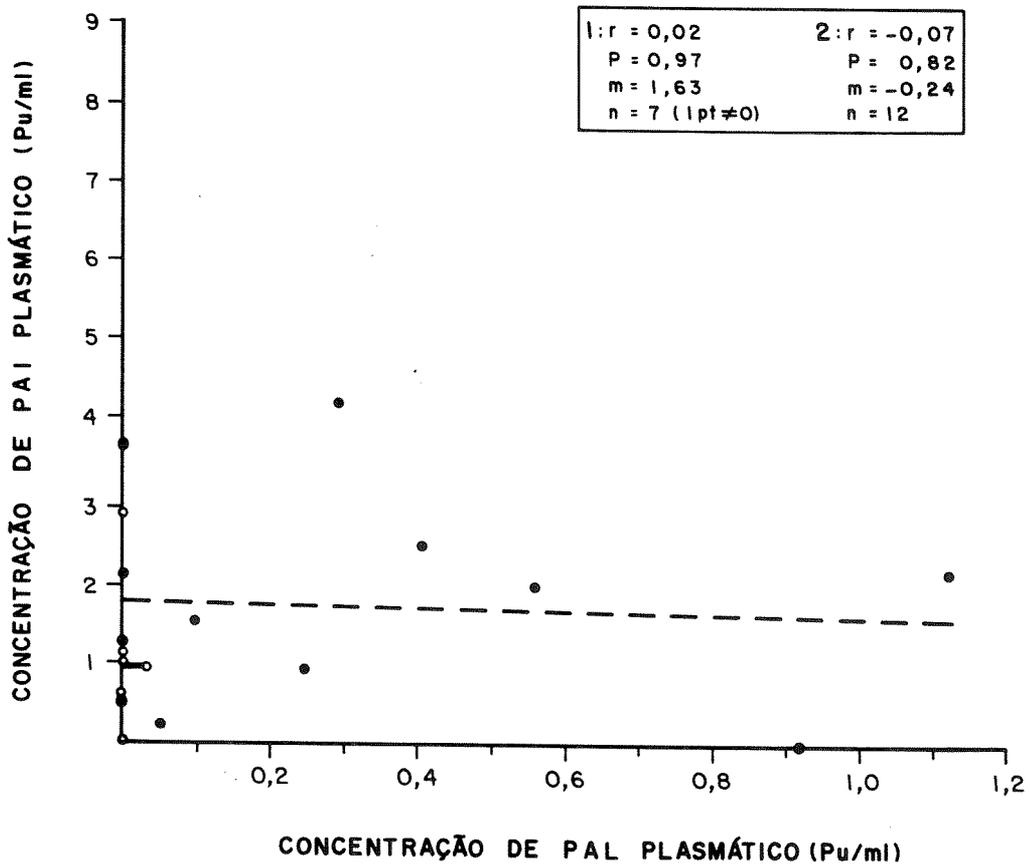


Gráfico 5 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL nos grupos de controles (1: — e ○) e pacientes (2: --- e ●) normoestrogênicos.

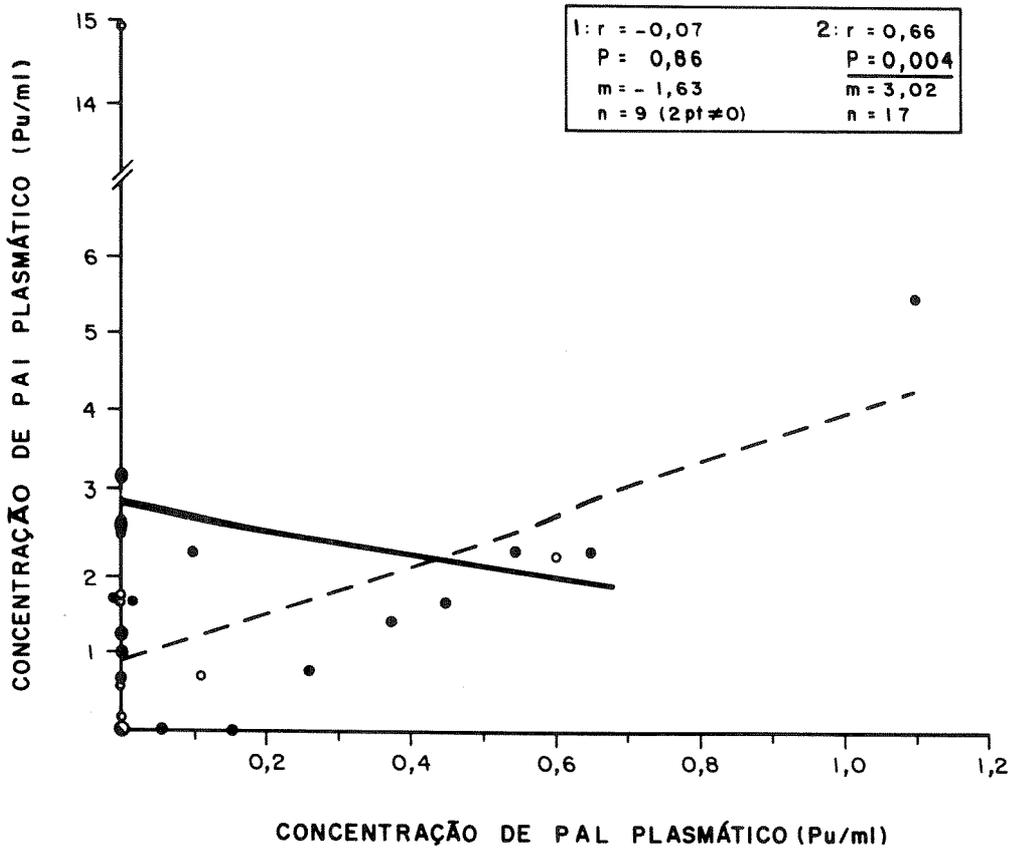


Gráfico 6 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL nos grupos de controles (1: — e o) e pacientes (2: --- e ●) com deficiência estrogênica moderada. Um valor de y para x=0 foi plotado à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

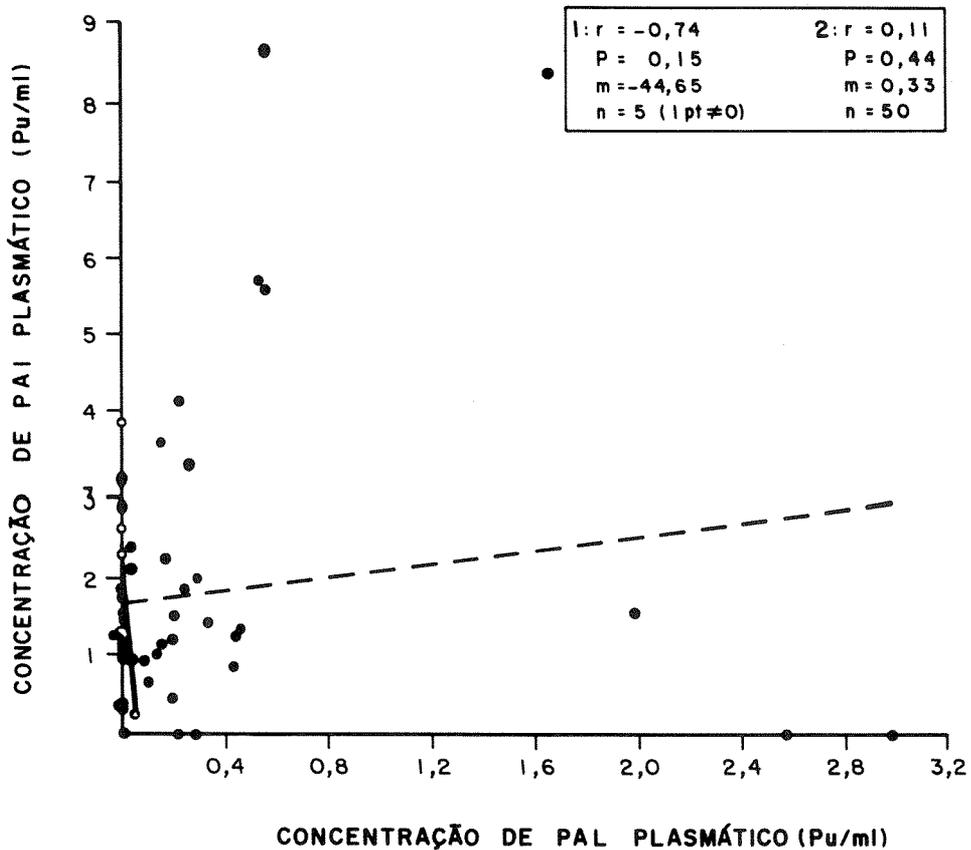


Gráfico 7 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL nos grupos de controles (1: — e o) e pacientes (2: --- e ●) com deficiência estrogênica severa. Um valor de y para x=0 foi plotado à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

Também não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas quando se compararam, por Análise de Variância, as médias de PA livre e de PA inibido, estimadas para os graus histológicos I, II e III (Tabela 7), nem mesmo quando foi excluído o grau histológico I (n=1) e as médias dos graus histológicos II e III comparadas pelo teste t de Student (Tabela 8).

Tabela 7 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com o grau histológico (GH) do tumor; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
GH I (n= 1)	0,036	2,144
GH II (n=21)	0,391 \pm 0,51	1,823 \pm 1,67
GH III (n=51)	0,267 \pm 0,58	1,811 \pm 1,78
P-valor	0,6272	0,9823

Tabela 8 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com os graus histológicos (GH) do tumor II e III; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
GH II (n=21)	0,391 \pm 0,51	1,823 \pm 1,67
GH III (n=51)	0,267 \pm 0,58	1,811 \pm 1,78
P-valor	0,4001	0,9798

Embora não tenha sido encontrada uma correlação significativa entre PA livre e PA inibido nos graus histológicos II ou III (Gráfico 8), a reta que expressa a regressão destas formas de PA, no grau histológico II, apresenta um coeficiente angular positivo e significativamente maior com relação ao do grau histológico III ($P < 0,001$).

Os três graus nucleares do tumor, comumente expressos no relatório do anatomopatologista, foram comparados entre si com relação às médias de PA livre e inibido pelo método de Análise de Variância, não tendo sido encontradas diferenças significativas (Tabela 9). Porém, a exclusão do grau nuclear 3 (n=1) e a comparação das médias dos graus nucleares 1 e 2 pelo teste t de Student, ainda que não tenham alterado o resultado do

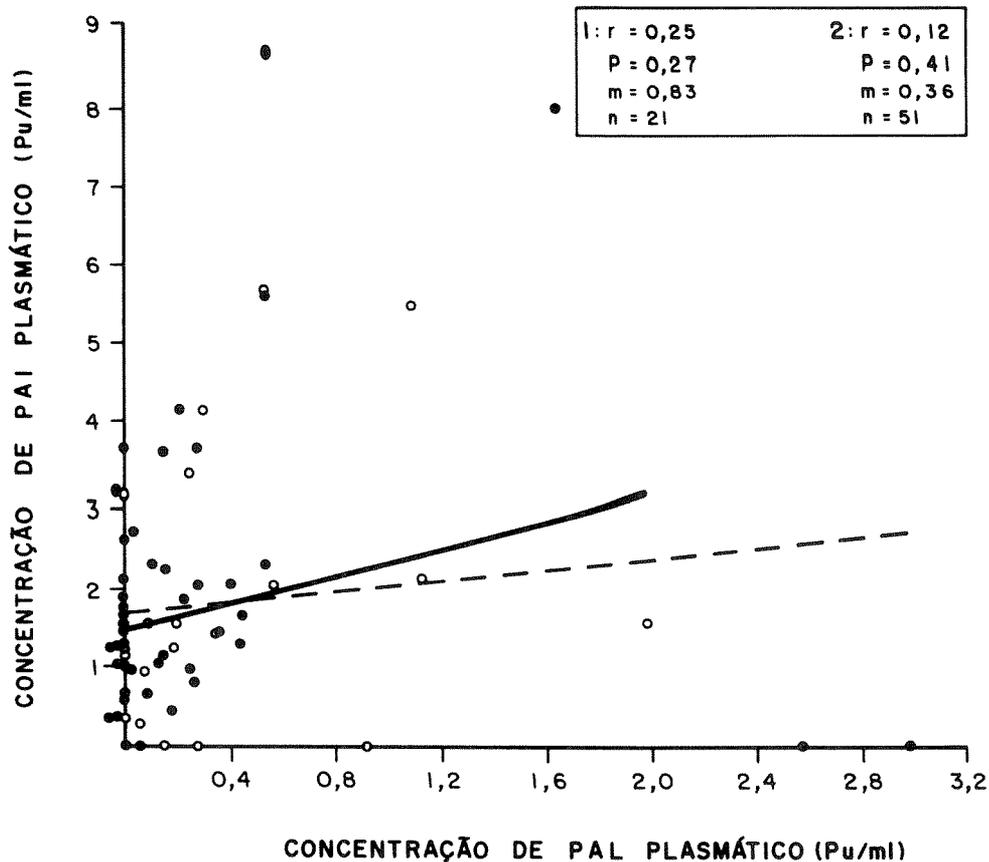


Gráfico 8 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL em pacientes com grau histológico II (1: — e \circ) e grau histológico III (2: --- e \bullet). Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização.

teste anterior quanto ao PA livre, revelaram a presença de um grau de inibição significativamente maior no grau nuclear 2 em relação ao grau nuclear 1 (Tabela 10).

Tabela 9 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com o grau nuclear (GN) do tumor; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
GN 1 (n=31)	0,247 \pm 0,54	1,280 \pm 1,03
GN 2 (n=40)	0,341 \pm 0,59	2,057 \pm 1,79
GN 3 (n= 1)	0,036	2,144
P-valor	0,7090	0,1031

Tabela 10 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com os graus nucleares (GN) do tumor 1 e 2; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
GN 1 (n=31)	0,247 \pm 0,54	1,280 \pm 1,03
GN 2 (n=40)	0,341 \pm 0,59	2,057 \pm 1,79
P-valor	0,4918	0,0344 \leftarrow

Não foram obtidas correlações significativas entre PA livre e PA inibido nos graus nucleares 1 e 2 (Gráfico 9), mas as retas de regressão correspondentes a estes graus nucleares mostram coeficientes angulares que expressam inclinações diferentes ($P < 0,001$), com tendência negativa na de grau nuclear 1.

As pacientes com invasão dos vasos linfáticos da mama por células tumorais, quanto às médias de PA livre e inibido, não diferiram daquelas onde isto não ocorreu (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com a presença ou ausência de invasão de vasos linfáticos (IVL) da mama por células tumorais; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
Sem IVL (n=55)	0,233 \pm 0,44	1,850 \pm 1,81
Com IVL (n=20)	0,454 \pm 0,78	1,638 \pm 1,47
P-valor	0,2436	0,6403

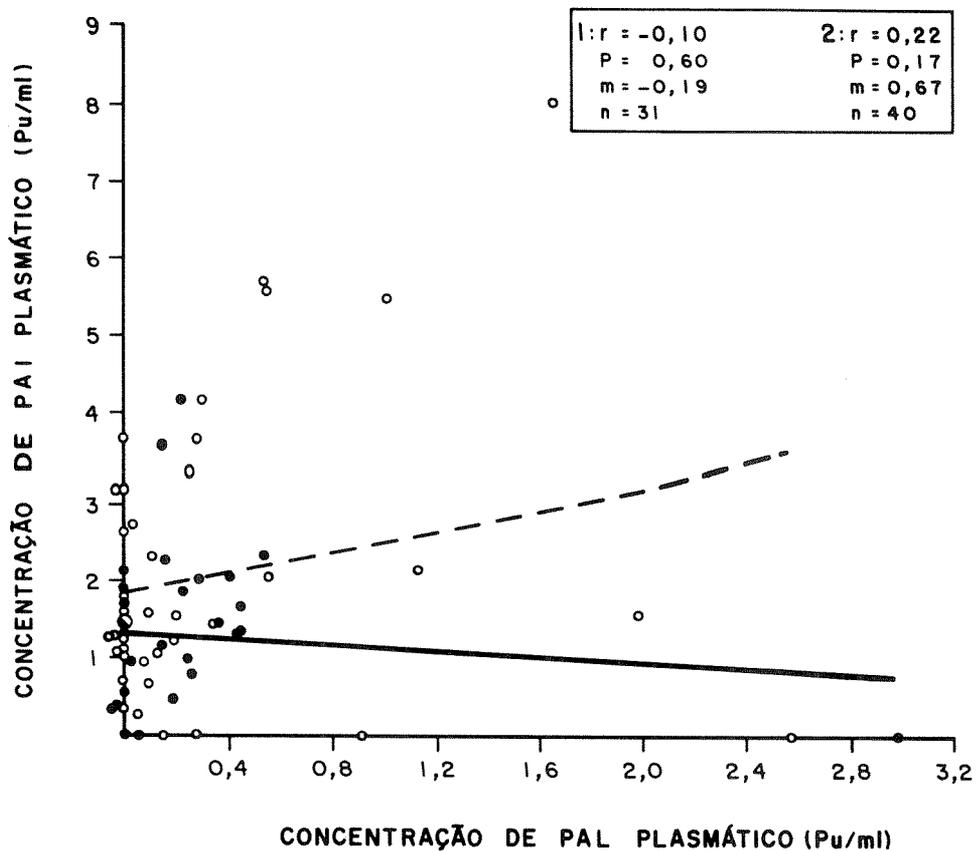


Gráfico 9 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL em pacientes com grau nuclear 1 (1: — e o) e grau nuclear 2 (2: --- e ●) do tumor. Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

As concentrações de PA livre e de inibido estão positivamente correlacionadas nas pacientes sem invasão de vasos linfáticos, e o coeficiente que expressa a inclinação da reta de regressão destes pontos é positiva e significativamente maior ($P < 0,001$) que o correspondente às pacientes com invasão de vasos linfáticos nas quais estas formas de PA não se apresentam correlacionadas (Gráfico 10).

Ainda que as médias das concentrações de PA livre, nos grupos de pacientes com e sem metástase em linfonodos, não sejam significativamente diferentes entre si, a média das concentrações de PA inibido, estimada entre pacientes com metástase em linfonodos, foi significativamente menor do que aquela entre pacientes sem metástase (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com a presença ou ausência de metástase em linfonodos (Met Linf); valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
Sem Met Linf (n=30)	0,205 \pm 0,30	2,287 \pm 1,89
Com Met Linf (n=45)	0,350 \pm 0,67	1,464 \pm 1,54
P-valor	0,2042	0,0416 \leftarrow

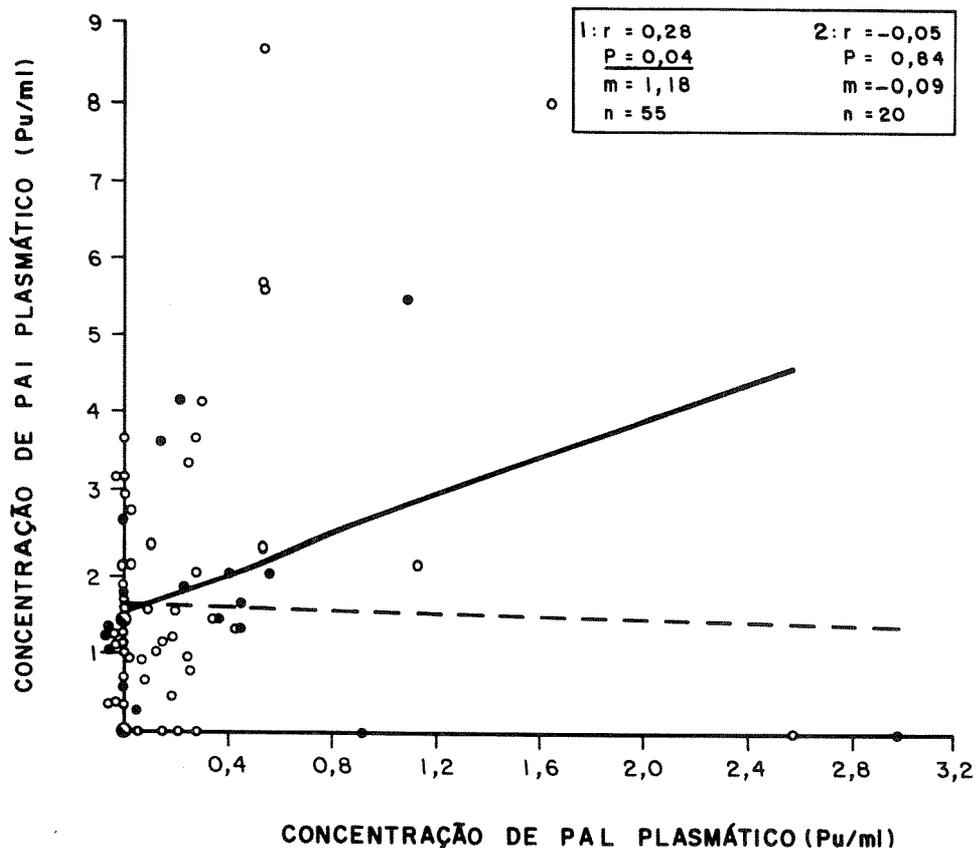


Gráfico 10 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL em pacientes sem (1: — e o) e com (2: --- e ●) invasão de vasos linfáticos da mama por células tumorais. Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

No grupo de pacientes sem metástase em linfonodos constatou-se uma correlação positiva entre as concentrações de PA livre e de PA inibido, o que não ocorreu no de pacientes com metástase (Gráfico 11). Além disso, as retas que representam a regressão dos valores de PA livre e de PA inibido, obtidos nestes grupos, possuem coeficientes angulares significativamente diferentes, sendo maior o coeficiente que expressa a inclinação da reta referente às pacientes sem metástases em linfonodos ($P < 0,001$).

O estudo das concentrações de PA livre ou de PA inibido, com relação à variável número de linfonodos invadidos, não demonstrou a existência de uma correlação significativa entre as concentrações de PA inibido ou de PA livre e esta mesma variável (Gráfico 12). Todavia, as retas de regressão, que representam a concentração de cada uma das formas de PA em função do número de linfonodos invadidos, possuem coeficientes angulares que mostram inclinações diferentes e em sentidos opostos ($P < 0,001$).

A comparação das médias estimadas para as concentrações de PA livre e de PA inibido, entre pacientes com e sem invasão extranodal, mostrou que estatisticamente não existe diferença significativa entre estes grupos com relação a estas

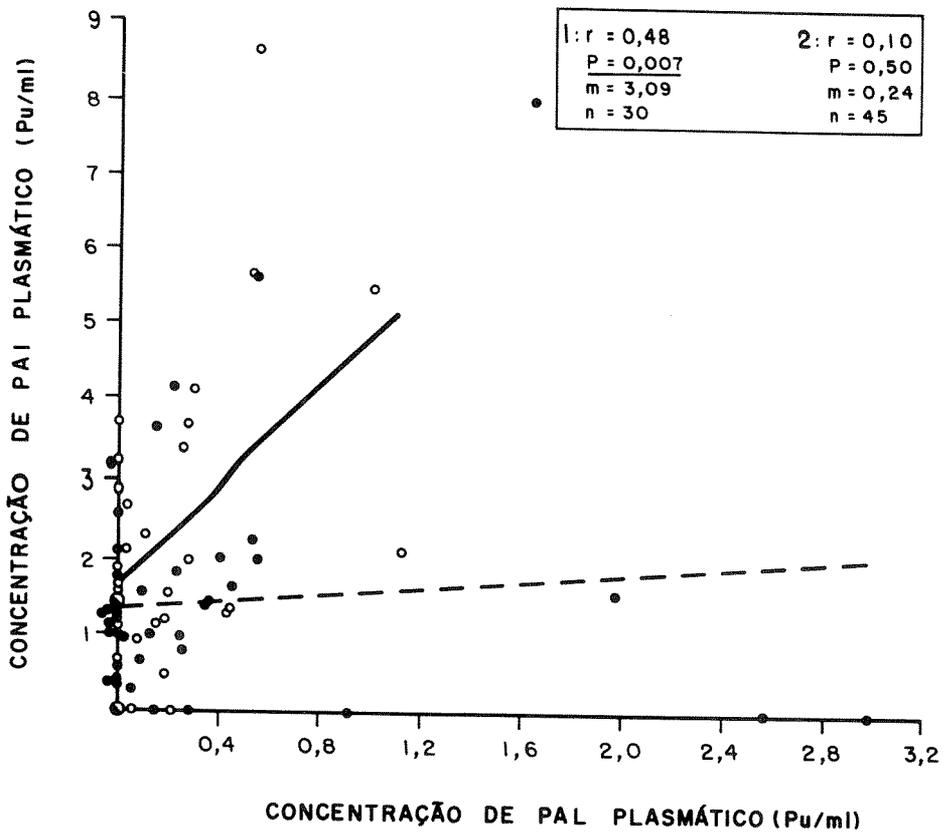


Gráfico 11 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL em pacientes sem (1: — e o) e com (2: --- e ●) metástase em linfonodos. Alguns valores de y para $x=0$ foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

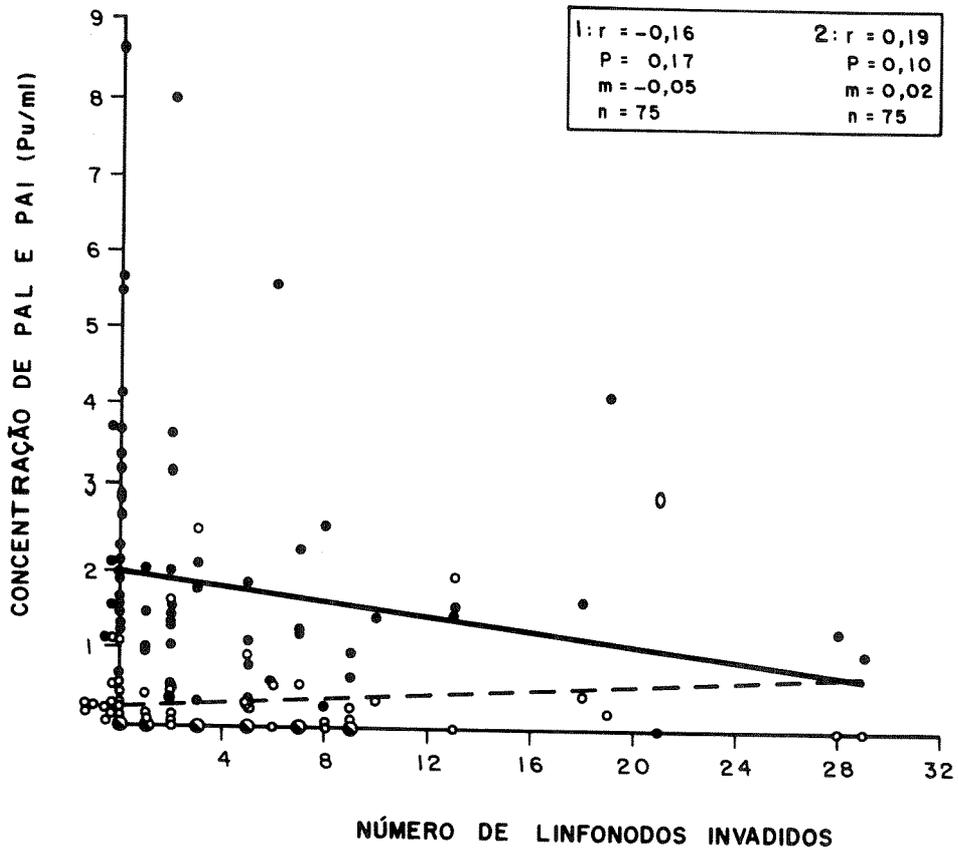


Gráfico 12 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI (1: — e o) ou PAL (2: --- e ●) em função do número de linfonodos invadidos. Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

formas de PA (Tabela 13).

Tabela 13 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com a presença ou ausência de invasão extranodal (IEN); valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
Sem IEN (n=51)	0,278 \pm 0,52	2,026 \pm 1,83
Com IEN (n=24)	0,322 \pm 0,63	1,301 \pm 1,37
P-valor	0,7525	0,0889

O teste da correlação entre as concentrações de PA livre e de PA inibido em pacientes com ou sem invasão extranodal também não foi significativo nestes grupos (Gráfico 13), porém os valores tendem a se correlacionar de forma positiva nas pacientes sem invasão extranodal (P=0,1075). Esta tendência é reforçada pelo fato de a reta obtida pela regressão destes pontos apresentar um coeficiente angular, ou seja, uma inclinação significativamente maior (P<0,001) que a da reta referente à regressão dos pontos obtidos nas pacientes que apresentam invasão

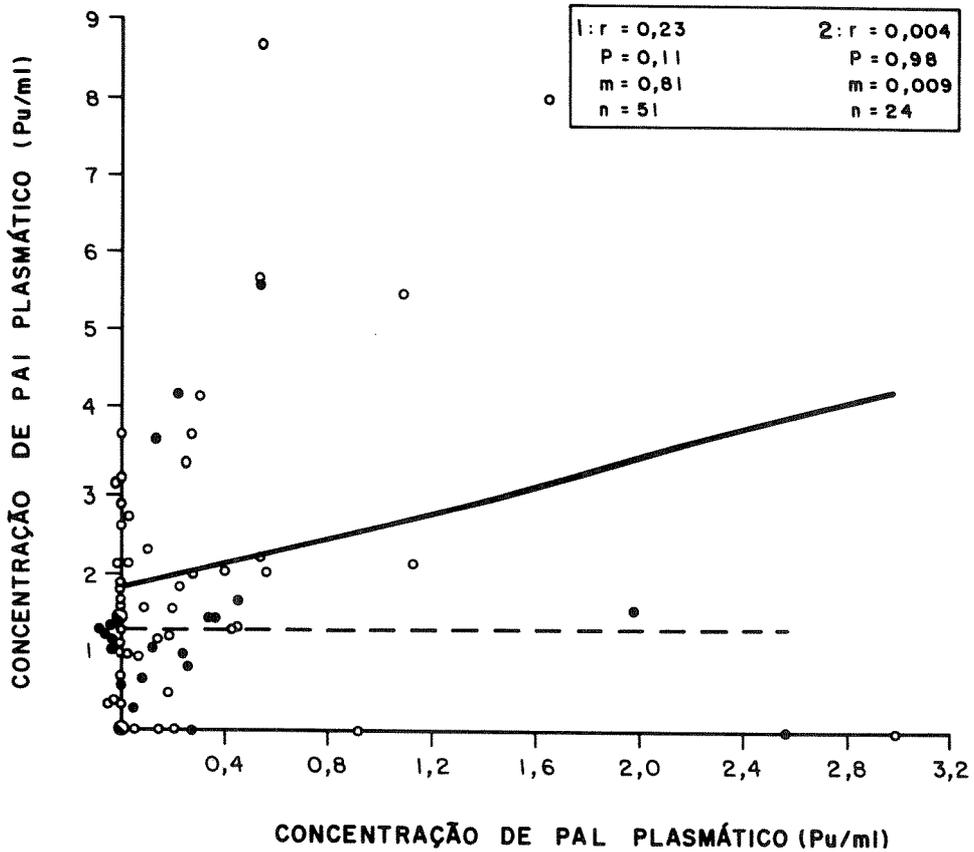


Gráfico 13 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL em pacientes sem (1: — e o) e com (2: --- e ●) invasão extranodal. Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

extranodal.

A associação das variáveis metástase em linfonodos e invasão extranodal criou as três classes descritas a seguir:

1- pacientes sem metástase em linfonodos e sem invasão extranodal;

2- pacientes com metástase em linfonodos e sem invasão extranodal;

3- pacientes com metástase em linfonodos e com invasão extranodal.

A análise das concentrações de PA livre e de PA inibido nessas três classes mostrou uma correlação significativa entre PA livre e PA inibido apenas no primeiro caso, enquanto os coeficientes que expressam a inclinação de cada reta de regressão diferem entre si ($P < 0,001$) e decrescem de valor no sentido da primeira para a terceira classe (Gráfico 14).

As médias das concentrações de PA livre e de PA inibido das pacientes com ou sem metástase a distância não apresentaram diferenças significativas (Tabela 14).

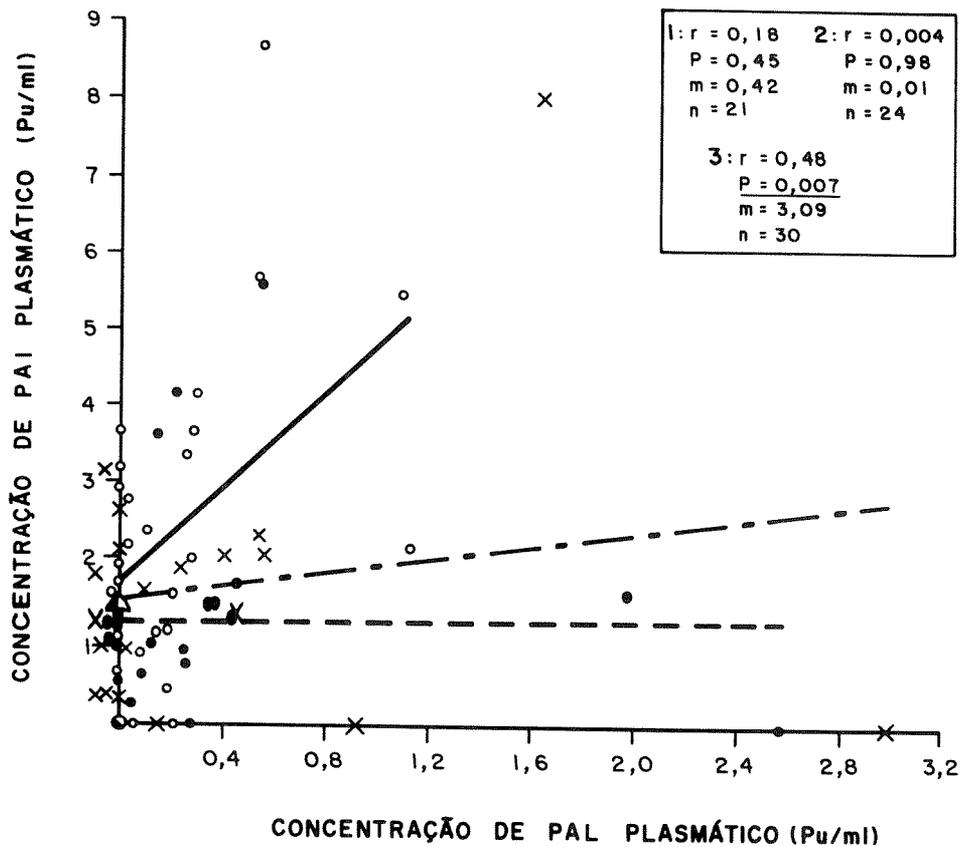


Gráfico 14 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL em pacientes com metástase em linfonodos e sem invasão extranodal (1: --- e X); com metástase em linfonodos e com invasão extranodal (2: --- e ●) e sem metástase em linfonodos e sem invasão extranodal (3: — e o). Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ ○ = ● ; ▲ ⇒ X = ○ = ● .

Tabela 14 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com a presença ou ausência de metástase a distância (Met Dist); valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
Sem Met Dist (n=69)	0,302 \pm 0,57	1,786 \pm 1,77
Com Met Dist (n=11)	0,208 \pm 0,21	1,641 \pm 1,08
P-valor	0,3208	0,7936

Nesses dois grupos também não foi encontrada correlação entre os valores de PA livre e de PA inibido (Gráfico 15). Contudo, o coeficiente que expressa a inclinação da reta de regressão de PA livre e de PA inibido, nas pacientes com metástase a distância, é significativamente maior ($P < 0,001$) que o representado pela inclinação da reta nas pacientes sem metástase.

As variáveis classificação histopatológica do tumor primário (pT), dos linfonodos regionais (pN) e estadiamento histopatológico (ECP) (Tabelas 15, 16 e 17 respectivamente) possuem mais de duas classes. Portanto, a comparação das médias de PA livre e de PA inibido entre as classes de cada uma destas variáveis foi realizada pelo método de Análise de Variância, não tendo sido encontradas diferenças significativas entre as médias estimadas para estas classes.

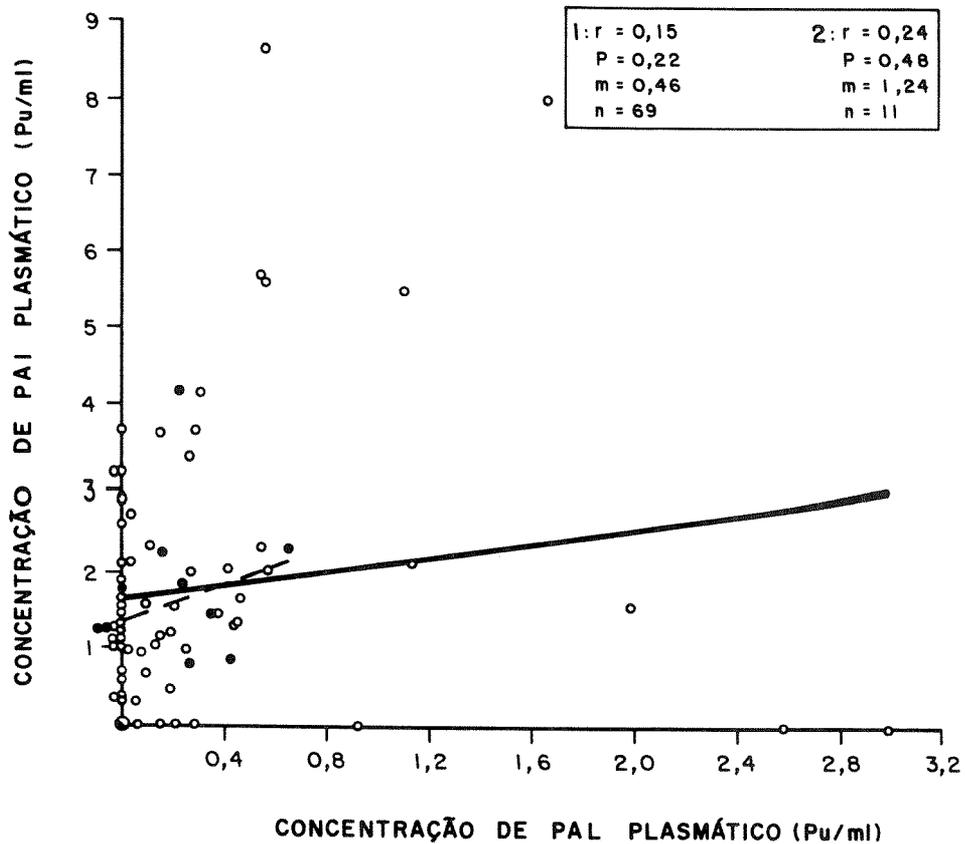


Gráfico 15 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL em pacientes sem (1: — e o) e com (2: --- e ●) metástase a distância. Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

Tabela 15 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com a avaliação histopatológica do tumor primário (pT); valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
pT ₀ (n=1)	zero	2,902
pT _{is} (n=1)	0,209	zero
pT ₁ (n=12)	0,353 \pm 0,77	1,636 \pm 1,24
pT ₂ (n=35)	0,291 \pm 0,45	2,166 \pm 2,13
pT ₃ (n=8)	0,237 \pm 0,23	1,882 \pm 1,68
pT ₄ (n=12)	0,377 \pm 0,86	1,127 \pm 1,00
pT _{4d} (n=5)*	0,138 \pm 0,20	1,287 \pm 0,52
P-valor	0,9802	0,5026

* Carcinoma inflamatório

Tabela 16 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com a avaliação histopatológica dos linfonodos regionais (pN); valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
pN ₀ (n=29)	0,205 \pm 0,30	2,351 \pm 1,89
pN ₁ (n=33)	0,434 \pm 0,76	1,508 \pm 1,75
pN ₂ (n=13)	0,126 \pm 0,18	1,276 \pm 0,69
P-valor	0,1301	0,0754

Tabela 17 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com o estadiamento histopatológico (ECP); valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

ECP	PA livre	PA inibido
0 (n=2)	0,105 \pm 0,15	1,451 \pm 2,05
I (n=8)	0,208 \pm 0,39	2,246 \pm 0,98
IIa (n=21)	0,382 \pm 0,65	2,527 \pm 2,54
IIb (n=20)	0,253 \pm 0,45	1,290 \pm 1,15
IIIa (n=6)	0,246 \pm 0,25	2,336 \pm 1,73
IIIb (n=15)	0,325 \pm 0,78	1,151 \pm 0,93
IV (n=3)	0,204 \pm 0,18	1,161 \pm 0,33
P-valor	0,9778	0,1552

A separação das pacientes em dois subgrupos, de acordo com a presença ou ausência de receptores de estrógeno no tumor, mostrou que as médias de concentração de PA livre e de PA inibido, no plasma de pacientes cujos tumores são positivos para receptores de estrógeno, não diferem daquelas cujos tumores são negativos para estes receptores (Tabela 18).

Tabela 18 - Comparação entre médias de concentração de PA plasmático, livre e inibido, em pacientes agrupadas de acordo com a presença ou não de receptores de estrógeno (RE) no tumor; valores expressos em média (Pu/ml) \pm DP

	PA livre	PA inibido
RE positivo (n=26)	0,263 \pm 0,61	1,553 \pm 1,37
RE negativo (n=36)	0,331 \pm 0,58	1,755 \pm 1,61
P-valor	0,6612	0,6066

Não foi constatada correlação entre as concentrações de PA livre e inibido nos grupos de pacientes com tumores RE positivo ou RE negativo (Gráfico 16). Entretanto, neste último, o coeficiente que expressa a inclinação da reta de regressão de PA livre e de PA inibido foi significativamente maior ($P < 0,001$) que no primeiro.

A análise da concentração de RE versus a de PA livre ou de PA inibido (Gráfico 17) mostra que não existe correlação significativa entre estas concentrações. As retas de regressão produzidas por seus respectivos pontos têm, ambas, coeficientes angulares que representam inclinações negativas, sendo a inclinação da reta de concentração de RE versus a de PA livre significativamente ($P < 0,001$) mais negativa que a da reta de concentração de RE versus a de PA inibido.

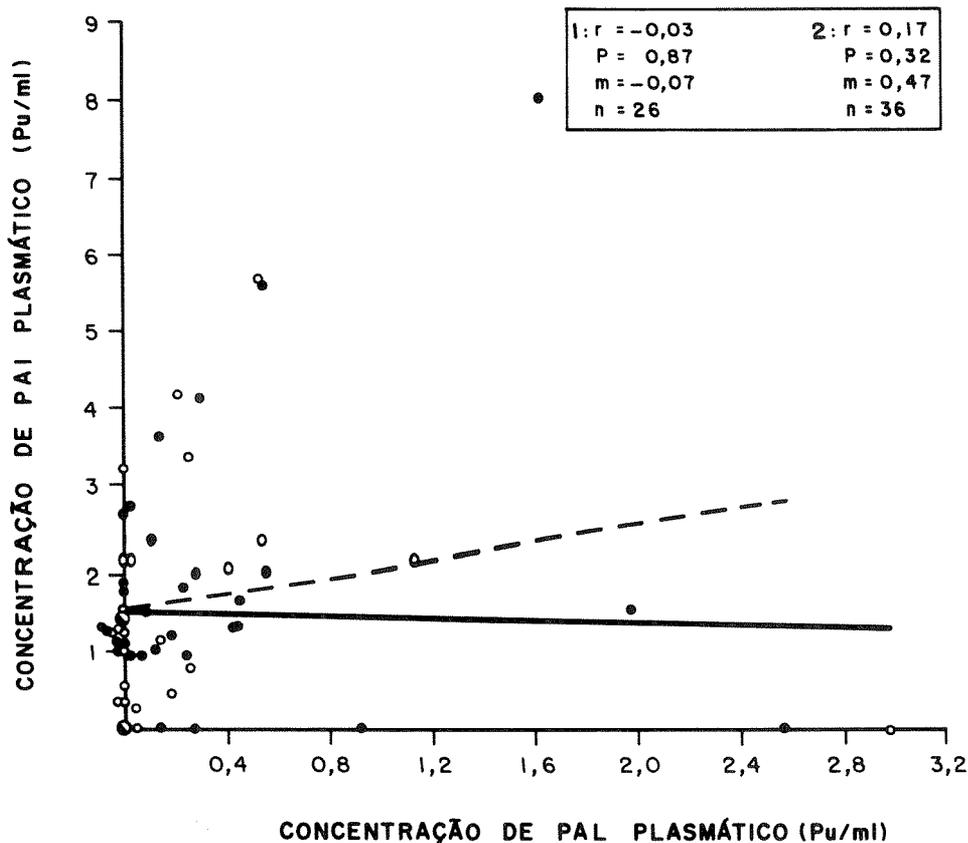


Gráfico 16 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI em função de concentrações de PAL em pacientes agrupadas de acordo com a presença (1: — e o) ou ausência (2: --- e ●) de receptores de estrógeno no tumor. Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

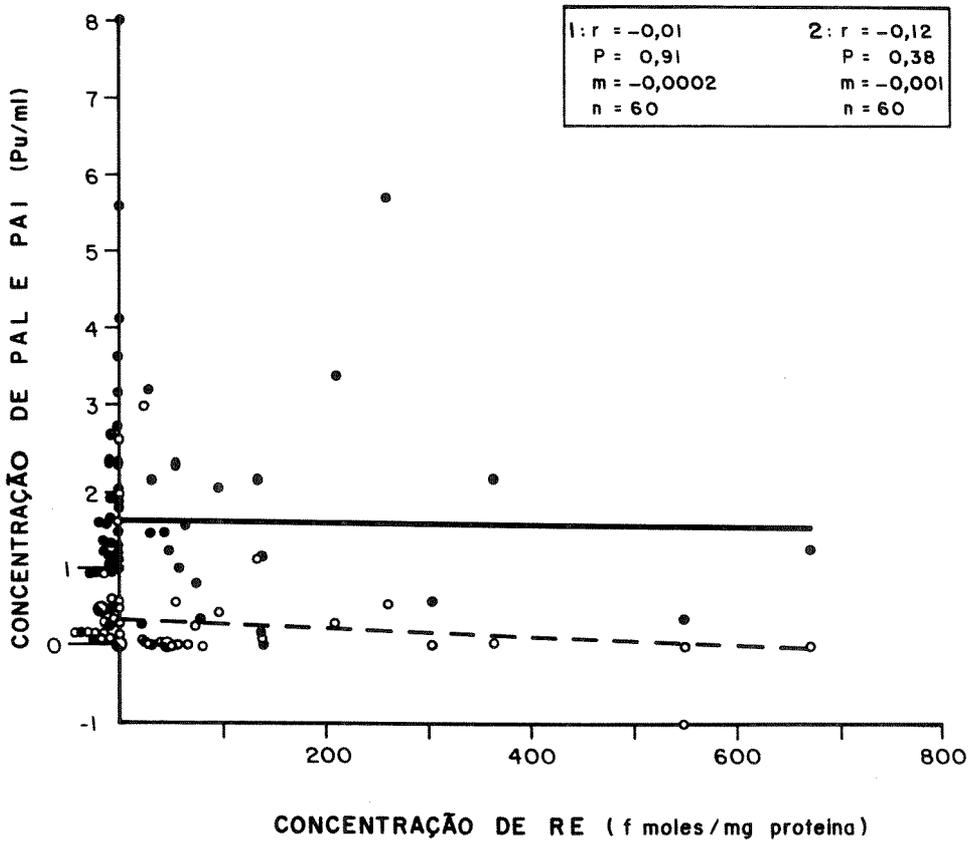


Gráfico 17 - Diagramas de dispersão e retas de regressão para concentrações de PAI (1: — e o) ou PAL (2: --- e ●) em função da concentração de receptores de estrógeno nos tumores. Alguns valores de y para x=0 foram plotados à esquerda do eixo y para melhor visualização. ● ⇒ o = ● .

4. DISCUSSÃO

O estudo comparativo da distribuição de controles e pacientes, quanto às proporções de indivíduos em classes de concentrações de PAL (Tabela 1 e Gráfico 2) e em relação à média (Tabela 3) desta mesma variável, deixa claro que pacientes e controles constituem duas populações distintas quanto à atividade de PAL plasmático, o que está de acordo com a observação de outros autores (GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al., 1988; GRONDAHL-HANSEN, BACH, MUNKHOLM-LARSEN, 1990).

Os resultados apresentados na atual pesquisa mostram também que acima do valor de 0,24 Pu/ml se concentram 34% das pacientes e apenas 5% dos controles. Estes dados estão novamente de acordo com GRONDAHL-HANSEN, BACH, MUNKHOLM-LARSEN (1990), que, apesar de terem avaliado especificamente tPA e utilizado medidas mais sensíveis que as empregadas neste trabalho, também encontraram um valor de corte para o tPA plasmático, obtendo uma distribuição na qual acima de 5ng/ml concentraram-se 40% das pacientes com carcinoma de mama e apenas 6% dos controles.

GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al. (1988), analisando a distribuição de uPA plasmático em

pacientes com câncer de mama e em doadores de sangue sadios, verificaram que nestes o valor de uPA plasmático variava de 0,6 a 1,5 ng/ml, enquanto uma variação maior, de 0,44 a 2,91 ng/ml, era observada nas pacientes com câncer de mama. Além disso, aproximadamente 25% destas pacientes tinham valores acima de 1,5 ng/ml.

MANNUCCI, CUGNO, BOTTASSO et al. (1990), estudando alterações na fibrinólise de pacientes com carcinoma mamário ou com melanoma, constataram que possuíam níveis significativamente maiores de tPA que os controles sadios, e os valores de uPA não diferiam nestes dois grupos. GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al. (1988) verificaram que pacientes com carcinoma mamário tinham valores médios de uPA plasmático significativamente maiores que os controles sadios. Em trabalho mais recente, GRONDAHL-HANSEN, BACH, MUNKHOLM-LARSEN (1990) constataram que os valores de tPA também eram mais altos no plasma de pacientes com câncer de mama quando comparados aos controles sadios.

Embora não se tenha estudado especificamente um determinado tipo de PA, os presentes resultados, mostrando que em média o PAL plasmático está significativamente aumentado nas pacientes com câncer mamário em relação aos controles, estão de acordo com os dados dos autores citados anteriormente (GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al., 1988;

MANNUCCI, CUGNO, BOTTASSO et al., 1990; GRONDAHL-HANSEN, BACH, MUNKHOLM-LARSEN, 1990). Entretanto discordam dos dados de PACHECO, BRENTANI, FRANCO et al. (1988), que compararam a atividade média de PA plasmático em grupos de mulheres com câncer de mama ou portadoras de fibroadenoma, tendo encontrado, para o primeiro grupo, valores médios de PA plasmático significativamente mais baixos que no último.

Desta forma, considerando os presentes resultados quanto à distribuição dos valores de PAL e tendo em vista os dados de outros autores (CAMIOLO, MARKUS, ENGLANDER et al., 1984; GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al., 1988; GRONDAHL-HANSEN, BACH, MUNKHOLM-LARSEN, 1990), parece que, independentemente do tipo de PA avaliado, altos valores de PAL plasmático têm baixa probabilidade de serem encontrados em indivíduos sadios. Estas observações sugerem a possibilidade de uso dos valores deste PA no rastreamento de uma população como a de mulheres que procuram programas de controle de câncer de mama. Assim, utilizando-se metodologia semelhante, aquelas mulheres que apresentassem valores de PAL plasmático acima de 0,24 Pu/ml mereceriam ser detalhadamente investigadas sobre a presença ou não de alteração maligna mamária, já que em termos probabilísticos estariam sob maior risco de apresentá-la.

RASCHE & DIETRICH (1977), apesar de não terem estudado especificamente os ativadores de plasminogênio,

mostraram que complicações tromboembólicas são geralmente típicas no curso de doenças neoplásicas e que estudos sistemáticos detectaram anormalidades hemostáticas em aproximadamente 95% de pacientes com malignidades, seja com ou sem evidências clínicas de uma tendência tromboembólica ou hemorrágica. COLOMBI, BARLATI, MAGDELENATI et al. (1984) também relataram que desordens na coagulação do sangue, tais como alterações no metabolismo de fibrinogênio e fibrina e um aumento na incidência de trombose vascular, são comuns em pacientes com doença maligna avançada.

Analisando especificamente inibidores plasmáticos de tPA, CHMIELEWSKA, RANBY, WIMAN (1983), ao estudarem a distribuição de pacientes com suspeita de distúrbios hemostáticos e de controles sadios em classes de concentração destes inibidores, constataram que os pacientes com distúrbios hemostáticos se situavam em classes mais altas de inibição, enquanto os controles saudáveis apresentavam pouca ou nenhuma inibição, sugerindo que uma inibição alta estaria associada a distúrbios hemostáticos e à doença em questão.

Níveis de inibidores para a atividade de PA significativamente mais altos em pacientes que em controles foram encontrados por MANNUCCI, CUGNO, BOTTASSO et al. (1990). No presente trabalho, todavia, o sistema de inibição de PA, representado pelo PA plasmático inibido, não parece distinguir

controles sadios de pacientes, pois, tanto a distribuição com base em classes de concentrações de PAI quanto as médias desta variável nos dois grupos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabelas 2 e 3; Gráfico 3). É importante observar que a diferença na distribuição de PAL, no sentido de deslocar as pacientes com carcinoma mamário para classes de concentrações mais altas, não foi seguida pelo PAI, mostrando que o sistema de inibição não acompanha obrigatoriamente o aumento de PAL nestas pacientes (Gráficos 2 e 3).

Como referido anteriormente, além dos inibidores de PA, os níveis de PA podem ser regulados por outros fatores. Em muitas linhagens de células cancerosas, a regulação da síntese de ativadores de plasminogênio é influenciada hormonalmente (NEEDHAM, NICHOLSON, AUGUS et al., 1988). De acordo com BUSSO, BELIN, FAILLY-CREPIN et al. (1987), a dexametasona inibe a produção de uPA e de tPA, enquanto estimula a síntese do inibidor PAI-1 em células MDA-MB-231, derivadas de glândula mamária humana. Além disso, inibe a produção de uPA e estimula a síntese de tPA em células HBL-100, uma linhagem estabelecida a partir do leite de uma mulher aparentemente saudável. CAMIOLO, MARKUS, ENGLAND et al. (1984) também relataram a inibição de produção de uPA e de um outro ativador do tipo "não-uroquinase", provavelmente tPA, pela dexametasona em cultura de tecidos

prostáticos malignos.

BUTLER, KIRKLAND, JORGENSEN (1979), avaliando a influência estrogénica na modulação do PA, mostraram que o estradiol estimulava a produção de PA em células MCF-7, uma linhagem de células de câncer de mama humano, mas que este estímulo não ocorria em presença da actinomicina D ou da cicloeximida, indicando que se dava através da síntese de RNA e de proteína. Mostraram, ainda, que a estimulação de PA pelo estrógeno podia ser inibida nestas células pelo tamoxifen e que concentrações altas de estradiol superavam a inibição causada por este antiestrógeno. Posteriormente, BUTLER, KIRKLAND, GARGALA et al. (1983) relataram a existência de outros fatores que alteram a produção de PA: o promotor de tumor phorbol-12-myristate-13 acetate (PMA), que induz um aumento de PA em células HeLa e em fibroblastos de embriões de galinha, e o andrógeno diidrotestosterona, que induz atividade fibrinolítica em células de carcinoma mamário murino mantidas em cultura.

A linhagem celular MCF-7, que sob estimulação hormonal é capaz de formar tumores em ratos atímicos, também produz PA em resposta ao estímulo estrogénico *in vitro* (BUTLER, KIRKLAND, GARGALA et al., 1983). Apenas os hormônios esteróides estrogénicos, quando adicionados em concentrações fisiológicas às células MCF-7 (DICKERMAN, MARTINEZ, SEEGER et al., 1989), resultaram em aumento paralelo da atividade total de PA

decorrente do aumento na atividade de tPA, enquanto os não-estrogênicos não o fizeram.

Esses mesmos autores (DICKERMAN, MARTINEZ, SEEGER et al., 1989) consideraram o ativador de plasminogênio um marcador adicional da integridade funcional dos receptores de estrógeno (RE) nas células tumorais mamárias, tendo em vista que extratos de tumores RE positivos continham maior atividade de PA que tumores RE negativos, e que os tumores com níveis de RE nuclear, RE citossólico e receptores de progesterona (RPg) significantes tinham também os mais altos níveis desta atividade enzimática. YAMASHITA, HORIUCHI, KIMURA et al. (1986), estudando a relação entre atividade de PA e a presença de RE citoplasmático e de RPg e RE nucleares em tumores malignos de mama, verificaram também que a atividade de PA era significativamente maior em tumores positivos para qualquer dos receptores e encontraram correlações positivas entre a atividade enzimática de PA e o conteúdo de RE citoplasmático e de RPg. Para os mesmos autores (YAMASHITA, HORIUCHI, KIMURA et al., 1986), tais resultados sugerem que a atividade desta enzima poderia ser usada como um marcador funcional para a hormonodependência do carcinoma de mama humano.

MIRA-Y-LOPEZ & OSSOWSKI (1987) relataram a ocorrência de uma modulação nos níveis de PA por ação do estradiol somente em carcinomas simultaneamente positivos para RE

e RPg, e, dentro deste grupo, em maior intensidade nas pacientes pós-menopausadas que nas mais jovens. Verificaram, além disso, uma maior liberação de uPA para o meio nutritivo de culturas de curta duração, provenientes de tumores RE e RPg positivos. Contudo, o uPA e o tPA diferem em aspectos relativos à sua síntese, regulação, estrutura e função, o que traz algumas controvérsias, principalmente sobre a regulação hormonal destes ativadores. Assim, ao contrário de outros pesquisadores, DUFFY, O'GRADY, SIMON et al. (1986) postularam que a atividade de PA tumoral não estava correlacionada às condições de RE ou RPg, mas que níveis de tPA, ensaiados por amidólise dependente de plasmina ou por detecção imunorradiométrica do antígeno tPA, correlacionavam-se positivamente ao conteúdo de RE ou RPg. Esta correlação, porém, não se estendia à atividade de uPA, nem de proteases tipo tripsina, quimotripsina ou catepsina B.

PACHECO, MARQUES, BRENTANI (1989) também não encontraram correlação entre níveis de atividade de PA tumoral, seja com o status menopausal das pacientes, seja com as concentrações de RE ou RPg destes tumores. Somente obtiveram diferenças significativas de PA tumoral quando compararam as médias dos grupos de tumores simultaneamente positivos ou negativos para estes dois receptores, no geral da amostra e entre pacientes pós-menopausadas. Entretanto, neste trabalho, a distribuição das pacientes e dos controles em classes de provável

função ovariana estrogênica, com base na idade e em alterações do ciclo menstrual, não mostrou diferenças para os valores de PAI entre as três classes dentro de cada grupo (Tabela 5), nem entre os dois grupos (Tabela 4).

Por outro lado, as diferenças entre os valores de PAL, de controles e de pacientes, encontrados nos grupos considerados normoestrogênicos e de deficiência estrogênica severa (Tabela 4) parecem refletir apenas a diferença já existente com relação a esta variável, quando foram analisados os controles e as pacientes, sem estratificação por classes de função estrogênica ovariana. Da mesma forma não foram encontradas diferenças significativas nas médias de valores de PAL e PAI plasmáticos com relação à presença ou não de RE nos tumores das pacientes (Tabela 18), nem correlação entre a atividade de PAI e PAL plasmáticos e a concentração de RE nos tumores em que este receptor estava presente (Gráfico 17).

Portanto, embora sejam muitos os indícios na literatura que apontam para uma regulação estrogênica com relação ao PA tumoral, este mesmo tipo de influência não ocorreu com relação ao PAL ou PAI plasmático, sugerindo que a modulação dos ativadores de plasminogênio e de seus inibidores plasmáticos deve estar sob a influência de outros fatores. Todavia, é provável que o ativador de plasminogênio livre no plasma não seja a expressão plasmática de aumentos de PA tumoral, pois, se assim fosse,

deveria-se ter encontrado alguma relação entre seus valores e as concentrações de RE, tendo em vista que esta associação parece estar presente nos tecidos carcinomatosos mamários.

Considerando apenas o grupo de pacientes e as variáveis relativas a este grupo, houve, em vários momentos do presente trabalho, dificuldades de comparar os resultados obtidos com os de outros autores. Isto porque, além de serem poucos os estudos que avaliam o PAL e o PAI plasmáticos, a maioria deles não analisa estas variáveis em função daquelas associadas ao tumor, deixando como alternativa a verificação de diferenças e semelhanças de comportamento entre PA tumoral e o PAL e PAI plasmáticos.

O'GRADY, LIJNEN, DUFFY (1985) não encontraram relação entre PA tumoral e o tipo histológico do tumor mamário, e, mesmo os estudos realizados em adenocarcinomas mamários utilizando dois sistemas de classificação diferentes, não mostraram associação entre atividade de PA tumoral e os tipos histológicos de tumor com base nestas classificações (COLOMBI, BARLATTI, MAGDELENAT et al., 1984). Assim, tendo em vista a ausência de associação entre a atividade de PAL e PAI plasmáticos e um tipo histológico particular do tumor (Tabela 6), parece existir uma semelhança no comportamento do ativador de plasminogênio, seja ele plasmático ou tumoral, no que se refere aos tipos histológicos de tumores mamários.

É sabido que a graduação histológica reflete o potencial maligno do tumor, fornecendo informação sobre a velocidade com a qual depósitos secundários do câncer de mama poderão se desenvolver originando metástases (BLOOM & RICHARDSON, 1957). Apesar de existir uma concordância entre vários autores (OSSOWSKI, BIEGEL, REICH, 1979; EVERS, PATEL, MADEJA et al., 1982; NG & KELLEN, 1983; O'GRADY, LIJNEN, DUFFY, 1985; RAMSHAW, BADENOCH-JONES, GRANT et al., 1986; SAPPINO, BUSSO, BELIN et al., 1987) de que o PA tumoral está relacionado ao potencial invasivo do tumor, pouco se sabe sobre o PA plasmático, seus inibidores e esta variável. PACHECO, BRENTANI, FRANCO et al. (1988); PACHECO, MARQUES, BRENTANI (1989) não encontraram qualquer correlação entre os graus histológicos e os níveis de PA medidos no plasma de pacientes ou em extratos de tumores malignos de mama provenientes das mesmas pacientes.

Analogamente, também no presente trabalho não se encontrou qualquer relação entre as médias dos valores plasmáticos de PAL e PAI e a graduação histológica dos tumores malignos de mama. Os trabalhos que analisaram apenas o PA tumoral também não mostraram associação entre grau histológico e concentrações de PA (EVERS, PATEL, MADEJA et al., 1982 e O'GRADY, LIJNEN, DUFFY, 1985). Desta forma, os níveis de ativadores de plasminogênio livres no plasma, bem como os de seus inibidores (Tabelas 7 e 8), constituem variáveis aparentemente independentes

do grau histológico do tumor, expressando suas relações com o processo maligno de maneiras diferentes.

Com relação ao grau nuclear, porém, foi encontrada em média uma concentração de PAI significativamente menor no grau nuclear 1 quando comparado ao grau nuclear 2, ainda que os valores de PAL fossem semelhantes (Tabelas 9 e 10). Esta perda na capacidade de inibição da atividade de PA, a qual resulta em uma maior atividade fibrinolítica, parece estar relacionada ao processo de desdiferenciação celular, uma vez que ocorre no grau nuclear 1, menos diferenciado que o grau nuclear 2. Se, como sugeriram BARRETT, SHEELA, OHKI et al. (1980), o aumento da atividade fibrinolítica pode refletir uma perda do controle das funções genéticas durante o processo de transformação, então a perda na inibição de PA, observada no grau nuclear 1, poderia receber esta mesma interpretação.

A presença de células carcinomatosas em vasos peritumorais da mama é considerada um indicador importante de recorrência precoce em pacientes que não apresentam metástase em linfonodos. Além disso, ela pode ser indicativa de respostas ao tratamento, pois observa-se uma redução de 20% na falha terapêutica entre pacientes sem invasão vascular peritumoral (PAGE, ANDERSON, CONNOLY et al., 1987). Apesar da expectativa teórica de uma possível associação entre PAL e PAI plasmáticos e invasão vascular peritumoral, já que esta é uma indicadora

importante de recorrência precoce, não se encontrou, no presente estudo, diferença entre valores médios de PAL e PAI plasmáticos nos grupos com e sem invasão de vasos linfáticos (Tabela 11).

Nenhuma das variáveis envolvidas no estadiamento tumoral - pT (Tabela 15), pN (Tabela 16) ou ECP (Tabela 17) - mostrou relações significativas com PAL plasmático, o que está de acordo com PACHECO, BRENTANI, FRANCO et al. (1988), que também não encontraram associação significativa nem com estadiamento nem com o tamanho do tumor. Entretanto GRONDAHL-HANSEN, AGERLIN, MUNKHOLM-LARSEN et al. (1988); GRONDAHL-HANSEN, BACH, MUNKHOLM-LARSEN (1990), estudando tipos específicos de PA plasmático, mostraram que a associação entre a extensão do tumor em pacientes com carcinoma de mama é mais forte quanto ao tPA do que quanto ao uPA, e consideraram o nível de tPA mais importante que o do uPA, do ponto de vista de prognóstico no câncer de mama. Com relação ao PAI plasmático, apenas a variável pN apresenta uma tendência ($P= 0,0754$) (Tabela 16) para valores de inibição, em média diminuídos conforme se avança da classe de melhor prognóstico (pN₀) para a de pior prognóstico (pN₂), passando pela classe intermediária (pN₁).

A variável metástase em linfonodos tem sido considerada por vários autores como aquela que melhor avalia o prognóstico do câncer de mama (HELLMAN & HARRIS, 1987; DUFFY, O'GRADY, DEVANEY et al., 1988b; MERKEL & OSBORNE, 1989; DUFFY,

1990). As pacientes com linfonodos histologicamente negativos têm geralmente menor índice de recidiva local bem como sobrevida mais longa que as pacientes com metástases ganglionares. Além disso, a presença de um a três linfonodos positivos tem sido associada a um prognóstico mais favorável do que quando há quatro ou mais linfonodos positivos. De um modo geral, quanto maior o número de linfonodos com metástases de carcinoma de mama, pior é o prognóstico da paciente (ALVARENGA, 1980).

De acordo com BURTIN, CHAVANEL, ANDRÉ-BOUGARAN et al. (1987), existem evidências importantes indicativas da presença e atuação do sistema plasmina tanto em carcinomas primários de mama como em metástases em linfonodos de carcinomas mamário e colorretal. Porém as relações entre as metástases em linfonodos e os diferentes tipos de PA são controvertidas, seja ao nível plasmático ou tumoral. Estudando a atividade de PA tumoral, sem analisar especificamente tPA ou uPA, EVERS, PATEL, MADEJA et al. (1982); O'GRADY, LIJNEN, DUFFY (1985) não encontraram associação entre valores de PA tumoral e a presença ou não de metástases em linfonodos. Também ao nível do tumor, DUFFY, O'GRADY, DEVANEY et al. (1988b) mostraram que aumentos de tPA tumoral não estão associados a um maior comprometimento de linfonodos axilares, mas que o uPA tumoral aumenta de acordo com o número de linfonodos invadidos (DUFFY, O'GRADY, DEVANEY et al., 1988a).

COLOMBI, BARLATI, MAGDELENAT et al. (1984), por outro lado, mostraram que a diminuição da atividade de PA no plasma em carcinoma mamário está relacionada com a presença de metástases em linfonodos axilares; SAPPINO, BUSSO, BELIN, et al. (1987) obtiveram correlações significativas entre conteúdo elevado de uPA e mRNA em carcinomas de pulmão e a presença de metástases em linfonodos regionais. MANNUCCI, CUGNO, BOTTASSO et al. (1990), contudo, estudando pacientes portadores de carcinoma mamário ou de melanoma quanto à presença das atividades de uPA, de inibidor de PA e do antígeno tPA plasmáticos, não detectaram diferenças entre os pacientes com e sem metástase em linfonodos para quaisquer destas variáveis. PACHECO, BRENTANI, FRANCO et al. (1988); PACHECO, MARQUES, BRENTANI (1989) também não encontraram associações entre o número de linfonodos invadidos e os níveis de PA plasmático ou tumoral em pacientes com carcinoma mamário.

No presente trabalho, o nível médio de PAL plasmático não mostrou variação significativa quando analisados os grupos de pacientes com ou sem metástase em linfonodos (Tabela 12) ou quando testada a correlação entre estas variáveis e o número de linfonodos invadidos (Gráfico 12); concordando, assim, com as observações de PACHECO, BRENTANI, FRANCO et al. (1988); PACHECO, MARQUES, BRENTANI (1989); MANNUCCI, CUGNO, BOTTASSO et al. (1990). Entretanto, em média, o PAI plasmático está significativamente diminuído no grupo de pacientes com metástase

em linfonodos (Tabela 12), sugerindo a ocorrência de perda na regulação do sistema de inibição nos casos em que a doença se encontra mais avançada.

Conforme PAGE & ANDERSON (1987), a invasão extranodal não tem sido considerada de grande valor prognóstico. Entretanto, mulheres com um a três linfonodos positivos e invasão extranodal têm um prognóstico pior que aquelas com um a três linfonodos positivos mas que não apresentam invasão extranodal. As médias de PA livre e de PA inibido neste trabalho não são diferentes nos grupos com e sem invasão extranodal, todavia mostram uma tendência ($P=0,0889$) para um nível de inibição menor no grupo com invasão extranodal considerado, clinicamente, como de pior prognóstico em relação à evolução da doença (Tabela 13). Então, também com relação a esta variável, a mesma tendência parece sugerir a perda na inibição e, em decorrência, a menor regulação de atividade fibrinolítica relativa ao PA, enquanto a doença avança.

Sabe-se que a formação de metástases a distância constitui um processo complexo, aparentemente seqüencial e seletivo, envolvendo várias etapas, diferentes mecanismos e fatores. Várias teorias foram formuladas para tentar explicar este processo, cuja discussão, porém, não cabe aqui (BROWN, 1973; COLUCCI, GIAVAZZI, ALESSANDRI et al., 1981; MARKUS, CAMIOLO, KOHGA et al., 1983; COLOMBI, BARLATI, MAGDELENAT, 1984;

BAKER, BLEAKLEY, WOODROW et al., 1990). Entretanto, independentemente da teoria considerada, existe uma concordância básica entre os autores de que neste processo estão envolvidas fases de invasão de células tumorais que implicam na atuação de sistemas proteolíticos como o da plasmina e sua regulação, além de outros. Vários trabalhos mostraram indiretamente que o PA tem aí um papel importante, porém uma das mais diretas evidências da participação do PA neste processo foi dada por OSSOWSKI & REICH (1983) através da descoberta de que anticorpos contra uPA inibiam metástase após transplante de células tumorais HEP3 em embriões de galinha. Linhagens altamente metastáticas variantes de um adenocarcinoma mamário de rato produzem PA em níveis muito mais elevados que as células parentais de baixo potencial metastático, sugerindo uma participação do PA na capacidade metastática aumentada (CRAMSHAW, BADENOCH-JONES, GRANT et al., 1986). Estudando pacientes portadores de carcinoma prostático, KIRCHHEIMER, BINDER, PFLUEGER et al. (1985) observaram que aqueles com metástases ósseas comprovadas apresentavam níveis plasmáticos de uroquinase significativamente mais altos que os pacientes sem metástases.

CARLSEN, RAMSHAW, WARRINGTON (1984) postularam que uma limitação na maioria dos estudos onde não se encontra correlação entre PA e formação de metástases decorre de enfoque metodológico errôneo. Nestes trabalhos, pesquisadores compararam

níveis de PA em tumores ou em sublinhagens tumorais selecionados a partir de suas diferenças de potencial metastático. No caso de linhagens celulares, ao usar células selecionadas para diferentes potenciais metastáticos, não se precisa necessariamente obter uma correlação com a produção de PA, dado que o potencial metastático reduzido poderia resultar de outras alterações no processo. No trabalho de CARLSEN, RAMSHAW, WARRINGTON (1984) foram usadas populações de células tumorais selecionadas por produzirem diferentes níveis de PA, e, então, testadas para determinar seu potencial metastático. Usando esta abordagem, foram capazes de demonstrar uma surpreendente correlação entre produção de PA e potencial metastático. Se isto é verdadeiro com relação a estas populações celulares selecionadas, não parece ser assim no que se refere ao PAL plasmático. No presente trabalho, sete entre 53 (13,2%) pacientes com baixos níveis de PAL ($<0,24$ Pu/ml) e quatro entre 27 (14,8%) com níveis altos de PAL ($>0,24$ Pu/ml) apresentaram metástases a distância, não sendo expressiva esta diferença percentual existente.

Para avaliar o comportamento conjunto de PAL e PAI, na presente pesquisa foram feitas correlações e traçadas retas de regressão dos valores de inibição (PAI) em função do ativador de plasminogênio livre (PAL) para as diversas situações encontradas na amostra estudada. Os coeficientes angulares das retas de regressão foram comparados entre si através do teste de

comparação de retas de regressão, que permite afirmar se as diferenças de inclinação entre as retas observadas visualmente são ou não estatisticamente significativas (PIEDRABUENA, 1990)⁴.

Essa análise ficou prejudicada na comparação geral entre controles e pacientes, bem como na comparação desses grupos quando estratificados em classes de provável função ovariana estrogénica, em razão de haver, entre as mulheres do grupo controle, um acúmulo de valores de PAL iguais a zero e de ser muito restrita a distribuição dos valores restantes (Gráficos 4, 5, 6 e 7).

No grupo de pacientes, porém, verificou-se que, com exceção das variáveis receptores de estrógeno e metástase a distância (Gráficos 15 e 16), a inclinação da reta de regressão, correspondente à classe que em cada variável indica um prognóstico pior e/ou doença em estágio mais avançado, foi sempre significativamente menor que a inclinação da reta de regressão da classe indicativa de melhor prognóstico e/ou doença em estágio menos avançado (Gráficos 8, 9, 10, 11 e 13). Esta constatação parece sugerir que nas pacientes os inibidores de PA (PAI) não acompanham obrigatoriamente os aumentos plasmáticos de PAL, como já foi dito no início desta discussão, quando enfocados controles e pacientes. Mais ainda, parece que a falta de inibição é mais acentuada nas classes de variáveis que indicam tumores mais

⁴PIEDRABUENA, AE. Comunicação pessoal.

indiferenciados (Gráficos 8 e 9) e nas que estão associadas à doença mais avançada e/ou pior prognóstico (Gráficos 10, 11 e 13).

Particularmente, no que se refere à invasão de vasos linfáticos e metástase em linfonodos, verificaram-se, nas classes consideradas de melhor prognóstico para cada uma destas variáveis, retas de regressão com inclinação mais alta que nas outras classes e presença de correlação positiva e significativa entre PAL e PAI, tornando a diferença ainda mais acentuada (Gráficos 10 e 11). A presença destas correlações mostra que um prognóstico melhor nas variáveis invasão de vasos linfáticos e metástase em linfonodos parece estar associada a uma sintonia maior entre os valores de ativador de plasminogênio livre no plasma e de seus inibidores. Além disso, as inclinações das retas, correspondentes aos diferentes prognósticos, indicam uma diminuição da sintonia entre o PAL e o PAI, através do sistema de inibição, com a progressão da doença. Cabe ainda ressaltar que a média de PAI nas pacientes com metástase em linfonodos mostrou ser significativamente menor quando comparada à de pacientes sem estas metástases, sugerindo novamente que a diminuição da sintonia entre PAL e PAI plasmáticos se faz por perdas na inibição.

Com base na afirmação de PAGE & ANDERSON (1987), sobre as mulheres com um a três linfonodos positivos e

com invasão extranodal do tumor terem um prognóstico pior em relação àquelas com um a três linfonodos positivos e sem invasão extranodal, decidiu-se estudar, na presente pesquisa, o comportamento da inibição de PA (PAI) em função do ativador livre (PAL) no plasma, nas três combinações possíveis destas duas variáveis, considerando, para tanto, que a ordem de progressão da doença e prognóstico pior seria: 1) estágio inicial - sem metástase em linfonodos e sem invasão extranodal; 2) estágio intermediário - com metástase em linfonodos e sem invasão extranodal; 3) estágio avançado - com metástase em linfonodos e com invasão extranodal.

Novamente nesse caso a inclinação das retas de regressão para cada uma dessas classes decresce conforme a doença avança ou o prognóstico piora. No estágio inicial a reta de regressão que o representa mostra a maior inclinação, e os valores de PAL e PAI correlacionam-se positiva e significativamente. No estágio intermediário a reta de regressão obtida possui também uma inclinação intermediária, e a reta correspondente ao estágio mais avançado e de pior prognóstico fica quase horizontal (Gráfico 14). Sendo assim, pode-se aqui também propor o mesmo raciocínio feito em relação à invasão de vasos linfáticos e às metástases em linfonodos.

Ainda com relação à variável metástase em linfonodos, foi possível analisar a correlação e traçar as retas

de regressão separadamente para os valores de PAL ou PAI em função do número de linfonodos invadidos (Gráfico 12). Apesar da correlação não ser significativa nem para valores de PAL no plasma nem para os de seus inibidores, a inclinação positiva da reta de regressão de PAL, em função do número de linfonodos invadidos, e a inclinação negativa da reta, que representa a regressão de PAI em função desta mesma variável, sugerem que o PAL no plasma e seus inibidores se comportam de maneira oposta com a progressão da doença, quando avaliada pelo número de linfonodos invadidos.

Até aqui há uma consonância entre as variáveis discutidas, apontando para uma tendência a perdas no sistema de inibição relacionadas a uma indiferenciação maior do tumor e ao avanço da doença.

Entretanto, em relação à variável metástase a distância, mais relacionada com a doença generalizada, a reta de regressão para a classe com metástase, de pior prognóstico, mostra uma inclinação maior que a reta da classe sem metástase (Gráfico 15). Isto sugere que nestas pacientes há maior controle da atividade fibrinolítica relativa ao PA, por parte dos seus inibidores.

Como postularam MARKUS, CAMIOLA, KOHGA et al. (1983) após a constatação de que tumores metastáticos de cólon secretam PA numa taxa muito menor que os tumores primários

correspondentes, se a implantação bem sucedida das células tumorais nos órgãos-alvo requer o desenvolvimento de um pequeno trombo composto por plaquetas e fibrina, então é provável que células capazes de originar focos metastáticos não sejam altamente secretoras de PA. Tudo porque esta propriedade, se presente, resultaria na ativação do plasminogênio do sangue em plasmina, com destruição subsequente dos trombos ou dos envoltórios de fibrina considerados essenciais para a ancoragem e o transporte das células. Os resultados de COLOMBI, BARLATTI, MAGDELENAT et al. (1984) mostraram que a atividade do PA em pacientes portadores de tumores era muito alta no tecido maligno, e, ao contrário, muito diminuída no plasma. Em vista disso, os referidos autores propõem que a baixa atividade de PA livre no plasma poderia aumentar a fibrina plasmática, favorecendo a formação de microtrombos e facilitando o processo metastático. Assim, as presentes observações parecem estar de acordo as proposições de MARKUS, CAMIOLO, KOHGA et al. (1983); COLOMBI, BARLATTI, MAGDELENAT et al. (1984), uma vez que nas pacientes sem metástases a distância foi encontrada uma menor tendência de inibição da atividade fibrinolítica, o que provavelmente dificultaria o processo metastático, enquanto nas pacientes com metástase esta atividade acha-se sob melhor controle dos inibidores de PA.

Neste trabalho, à semelhança do que se

considera verdadeiro para o PA tumoral (SOSZKA & OLSZEWSKI, 1986), pode-se interpretar a diminuição na inibição plasmática (PAI) como o resultado na depleção de uma barreira defensiva do hospedeiro e que altas taxas de ativadores livres (PAL) em relação aos seus inibidores poderiam significar doença mais avançada no que se refere às variáveis grau histológico, grau nuclear, invasão de vasos linfáticos da mama, metástase em linfonodos, número de linfonodos invadidos e invasão extranodal, consideradas de valor prognóstico na avaliação do intervalo livre de doença, ou seja, na etapa da doença em que as metástases a distância ainda não foram detectadas. Se, num trabalho posterior, conseguir-se demonstrar uma associação entre intervalo livre de doença e os valores de PAL e PAI plasmáticos, será possível estar diante de um novo marcador bioquímico de valor prognóstico para este momento evolutivo da doença.

Se, de um lado, os tipos de associação encontrados para os valores de PAL e PAI plasmáticos e a variável metástase a distância estão em desacordo com os resultados discutidos para outras variáveis já citadas e relacionadas a um momento anterior na evolução do câncer mamário, de outro lado, concordam com as propostas de MARKUS, CAMIOLO, KOHGA et al. (1983); COLOMBI, BARLATI, MAGDELENAT et al. (1984) para explicar o processo de formação de metástases.

Apesar de os presentes resultados terem sido

em sua maior parte bastante coerentes entre si e concordantes com os de outros autores, é necessário, para melhor entendimento dos problemas e associações aqui discutidos, fazer em estudos posteriores a distinção entre as diferentes formas de PA, empregando métodos mais sofisticados.

5. CONCLUSÕES

A comparação da amostra controle com a de pacientes indica a existência de dois grupos distintos quanto aos valores de PAL plasmático, sendo estes, em média, significativamente mais altos na amostra de pacientes.

Considerando a distribuição dos controles e das pacientes, acima do valor de 0,24 Pu/ml se situam apenas 5% dos controles e 34% das pacientes, justificando o estudo de PAL e PAI plasmático e o uso deste valor para o rastreamento de câncer de mama em mulheres que procuram programas de controle de câncer mamário.

No grupo de pacientes, os aumentos plasmáticos de PAL não são obrigatoriamente acompanhados pelo PAI.

Ao contrário do que ocorre no PA tumoral, não se constatou influência na regulação estrogênica de PAL ou PAI plasmáticos.

Com relação à amostra de pacientes, as variáveis grau histológico, grau nuclear, invasão de vasos

linfáticos da mama, metástase em linfonodos, número de linfonodos invadidos e invasão extranodal mostram uma tendência à diminuição do controle da atividade fibrinolítica plasmática pelos inibidores de PA à medida que a doença progride e/ou o prognóstico piora.

Para uma melhor compreensão das relações dos ativadores de plasminogênio plasmáticos e seus inibidores com os diversos aspectos do carcinoma mamário estudados neste trabalho, são necessários estudos posteriores com o acompanhamento da evolução das pacientes e também a distinção entre as diferentes formas de PA através de métodos mais sofisticados.

6. RESUMO

Os ativadores de plasminogênio (PA) são enzimas proteolíticas que podem contribuir para os processos invasivos e metastáticos das neoplasias. Com o objetivo de avaliar a relação dos PA com as patologias mamárias malignas, foi utilizado um ensaio caseinolítico para dosar o conteúdo de ativadores de plasminogênio livre (PAL) e do complexado com o inibidor (PAI), no plasma de 21 doadores sadios e 80 pacientes com câncer de mama, com extensões variáveis da doença. O valor médio de PAL plasmático para doadores sadios foi $0,039 \pm 0,13$ Pu/ml (D.P.) e para todas as pacientes com câncer de mama foi $0,289 \pm 0,54$ Pu/ml. Este aumento foi estatisticamente significativo ao nível de 0,1%. Tomando-se 0,24 Pu/ml como limite de corte para PAL plasmático, aproximadamente 34% das pacientes e 5% dos controles sadios apresentaram valores de PAL plasmático acima deste ponto. Esta diferença foi estatisticamente significativa ao nível de 1%. Os valores médios e a distribuição de PAI plasmático não diferiram estatisticamente entre pacientes e controles. Não foram encontradas associações entre valores médios de PAL ou PAI plasmáticos e o estado menopausal de controles e pacientes, nem mesmo entre as diferentes variáveis da doença. Estudos sobre o comportamento conjunto de PAI em função

de PAL através de testes de correlação, análise de regressão e comparação entre retas de regressão mostraram que, nas variáveis grau histológico, grau nuclear, invasão de vasos linfáticos, metástases em linfonodos, número de linfonodos invadidos e invasão extranodal, existe uma tendência à diminuição do controle da regulação do PAL através do PAI relacionada a uma maior desdiferenciação do tumor, à piora do prognóstico e ao avanço da doença.

7. SUMMARY

Plasminogen activators (PA) are proteolytic enzymes that may contribute to the invasive and metastatic process in neoplasia. In order to evaluate the relationship of PA with the malignant mammary pathologies, a caseinolytic assay was used to measure the content of free (PAL) and inhibitor-complexed (PAI) plasminogen activators in plasma in 21 healthy donors and 80 breast cancer patients with a varying extent of disease. The mean value of PAL in plasma of the healthy donors was 0.039 ± 0.13 Pu/ml (S.D.) and for the breast cancer patients was 0.289 ± 0.54 Pu/ml. This increase was statistically significant at 0.1% level. Taking 0.24 PU/ml as cut-off-point of plasma PAL, about 34% of the patients and 5% of the healthy controls had values of plasma PAL above this point. This difference was statistically significant at the 1% level. The mean values and the distribution of plasma PAI did not differ statistically between patients and controls. No correlation was found between the mean values of plasma PAL or PAI and neither the menopausal status of controls and patients, nor the different disease variables. Studies on the combined conduct of PAI in regard to PAL, through correlation tests, regression analysis and comparison between regression lines, showed that the variables histological grade, nuclear

grade, invasion of lymphatic vessels, lymph node status , number of invaded lymph nodes and extranodal extension of tumor present a trend to diminished PAI regulation of the control of PAL related to a higher tumor undifferentiation, to bad prognosis and to the disease's progress.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, M. Anatomia patológica. In: PINOTTI, JA. Diagnóstico em Mastologia. São Paulo: Manole, 1980. 363p. p.135-165.
- BAKER, MS; BLEAKLEY, P; WOODROW, GC et al. Inhibition of cancer cell urokinase plasminogen activator by its specific inhibitor PAI-2 and subsequent effects on extracellular matrix degradation. *Cancer Res.*, v.50, p.4676-4684, 1990.
- BARRET, JC; SHEELA, S; OHKI, K et al. Reexamination of the role of plasminogen activator production for growth in semisolid agar of neoplastic hamster cells. *Cancer Res.*, v.40, p.1438-1442, 1980.
- BEIGUELMAN, B. A análise de caracteres quantitativos. In: *Genética Médica. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.* São Paulo: EDART, Ed. da Universidade de São Paulo, 1977. 383p. v.2, cap.10, p.329-385.
- BELL, SM; BRACKENBURY, RW; LESLIE, ND et al. Plasminogen activator gene expression is induced by the src oncogene product and tumor promoters. *J. Biol. Chem.*, v.265,

p.1333-1338, 1990.

BLOOM, HJG & RICHARDSON, WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer*, v.11, p.359-377, 1957.

BROWN, JM. A study of the mechanism by which anticoagulation with warfarin inhibits blood-borne metastases. *Cancer Res.*, v.33, p.1217-1224, 1973.

BURTIN, P; CHAVANEL, G; ANDRÉ-BOUGARAN, J et al. The plasmin system in human adenocarcinomas and their metastases. A comparative immunofluorescence study. *Int. J. Cancer*, v.39, p.170-178, 1987.

BUSSO, N; BELIN, D; FAILLY-CRÉPIN, C et al. Plasminogen activators and their inhibitors in a human mammary cell line (CHBL-100). *J. Biol. Chem.*, v.261, p.9309-9315, 1986.

BUSSO, N; BELIN, D; FAILLY-CRÉPIN, C et al. Glucocorticoid modulation of plasminogen activators and of one of their inhibitors in the human mammary carcinoma cell line MDA-MB-231. *Cancer Res.*, v.47, p.364-370, 1987.

- BUTLER, WB; KIRKLAND, WL; JORGENSEN, TL. Induction of plasminogen activator by estrogen in a human breast cancer cell line (MCF-7). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.90, p.1328-1334, 1979.
- BUTLER, WB; KIRKLAND, WL; GARGALA, TL et al. Steroid stimulation of plasminogen activator production in a human breast cancer cell line (MCF-7). *Cancer Res.*, v.43, p.1637-1641, 1983.
- CAMIOLO, SM; MARKUS, G; ENGLANDER, LS et al. Plasminogen activator content and secretion in explants of neoplastic and benign human prostate tissues. *Cancer Res.*, v.44, p.311-318, 1984.
- CARLSEN, SA; RAMSHAW, IA; WARRINGTON, RC. Involvement of plasminogen activator production with tumor metastasis in a rat model. *Cancer Res.*, v.44, p.3012-3016, 1984.
- CASTELLOTE, JC; GRAU, E; LINDE, MA et al. Detection of both type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in human monocytes. *Thromb. Haem.*, v.63, p.67-71, 1990.
- CHMIELEWSKA, J; RANBY, M; WIMAN, B. Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. *Thromb.*

Res., v.31, p.427-436, 1983.

CHIMINAZZO Jr., H & TEIXEIRA, LC. Estudo crítico dos métodos de avaliação das metástases do câncer de mama. In: PINOTTI, JA, Diagnóstico em Mastologia. São Paulo: Manole, 1980. 363p. p.359-363.

CLAVEL, C; CHAVANEL, G; BIREMBAUT, P. Detection of the plasmin system in human mammary pathology using immunofluorescence. Cancer Res., v.46, p.5743-5747, 1986.

COLLEN, D. On the regulation and control of fibrinolysis. Thromb. Haem., v.43, p.77-89, 1980.

COLOMBI, M; BARLATI, S; MAGDELENAT, H et al. Relationship between multiple forms of plasminogen activator in human breast tumors and plasma and the presence of metastases in lymph nodes. Cancer Res., v.44, p.2971-2975, 1984.

COLUCCI, M; GIAVAZZI, R; ALESSANDRI, G et al. Procoagulant activity of sarcoma sublines with different metastatic potential. Blood, v.57, p.733-735, 1981.

- DANO, K; MOLLER, V; OSSOWSKI, L et al. Purification and characterization of a plasminogen activator from mouse cells transformed by an oncogenic virus. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.613, p.542-555, 1980.
- DANO, K; ANDREASEN, PA; GRONDAHL-HANSEN, J et al. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.*, v.44, p.139-266, 1985.
- DEGEN, JL; ESTENSEN, RD; NAGAMINE, Y et al. Induction and desensitization of plasminogen activator gene expression by tumor promoters. *J. Biol. Chem.*, v.260, p.12426-12433, 1985.
- DICKERMAN, HW; MARTINEZ, HL; SEEGER, JI et al. Estrogen regulation of human breast cancer cell line MCF-7 tissue plasminogen activator. *Endocrinology*, v.125, p.492-500, 1989.
- DUFFY, MJ; O'GRADY, P; SIMON, J et al. Tissue-type plasminogen activator in breast cancer: relationship with estradiol and progesterone receptors. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.77, p.621-623, 1986.
- DUFFY, MJ; O'GRADY, P; DEVANEY, D et al. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. *Cancer*,

v.62, p.531-533, 1988a.

DUFFY, MJ; O'GRADY, P; DEVANEY, D et al. Tissue-type plasminogen activator, a new prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.*, v.48, p.1348-1349, 1988b.

DUFFY, MJ. Biochemical markers as prognostic indices in breast cancer. *Clin. Chem.*, v.36, p.188-191, 1990.

EVERS, JL; PATEL, J; MADEJA, JM et al. Plasminogen activator activity and composition in human breast cancer. *Cancer Res.*, v.42, p.219-226, 1982.

FEINBERG, RF; KAO, LC; HAIMOWITZ, JE et al. Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts. *Lab. Invest.*, v.61, p.20-26, 1989.

GERARD, RD & MEIDELL, RS. Regulation of tissue plasminogen activator expression. *Annu. Rev. Physiol.*, v.51, p.245-262, 1989.

GRANELLI-PIPERNO, A & REICH, E. A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J. Exp.*

Med., v.148, p.223-234, 1978.

GRANT, AJ; RAMSHAW, IA; BADENOCH-JONES, P et al. Purification and characterization of an inhibitor of plasminogen activator released by rat mammary adenocarcinoma cells. Eur. J. Biochem., v.11, p.635-641, 1986.

GRONDAHL-HANSEN, J; AGERLIN, N; MUNKHOLM-LARSEN, P et al. Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for urokinase-type plasminogen activator and its application to plasma from patients with breast cancer. J. Lab. Clin. Med., v.111, p.42-51, 1988.

GRONDAHL-HANSEN, J; BACH, F; MUNKHOLM-LARSEN, P. Tissue-type plasminogen activator in plasma from breast cancer patients determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Br. J. Cancer, v.61, p.412-414, 1990.

HALBE, HW. Climatério. In: HALBE, HW. Ginecologia Endócrina 1. São Paulo: Roca, 1982. 413p. cap.5, p.165-206.

HELLMAN, S & HARRIS, JR. The appropriate breast cancer paradigm. Cancer Res., v.47, p.339-342, 1987.

- HERMANEK, P & SOBIN, LH, ed. TNM - Classificação dos tumores malignos. 4a.ed., Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1989. 197p.
- HUARTE, J; BELIN, D; VASSALLI, J-D. Plasminogen activator in mouse and rat oocytes: induction during meiotic maturation. *Cell*, v.43, p.551-558, 1985.
- JANICKE, F; SCHMITT. M; ULM, K et al. Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet*, v.2, p.1049, 1989.
- KIRCHHEIMER, J; BINDER, BR; PFLUEGER, H et al. Does plasma urokinase antigen reflect tumor urokinase in prostatic carcinoma? *Thromb. Haem.*, v.54, p.729, 1985.
- KOHGA, S; HARVEY, SR; WEAVER, RM et al. Localization of plasminogen activators in human colon cancer by immunoperoxidase staining. *Cancer Res.*, v.45, p.1787-1796, 1985.
- LAYER, GT; BURNAND, KG; GAFFNEY, PJ et al. Tissue plasminogen activators in breast cancer. *Thromb. Res.*, v.45, p.601-607, 1987.

- LIOTTA, LA; GOLDFARB, RH; BRUNDAGE, R et al. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.*, v.41, p.4629-4636, 1981.
- LIOTTA, LA; RAO, CN; WEWER, UM. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann. Rev. Biochem.*, v.55, p.1037-1057, 1986.
- MAHMOUD, M & GAFFNEY, PJ. Bioimmunoassay (BIA) of tissue plasminogen activator (t-PA) and its specific inhibitor (t-PA/INH). *Thromb. Haem.*, v.53, p.356-359, 1985.
- MANNUCCI, PM; CUGNO, M; BOTTASSO, B et al. Changes in fibrinolysis in patients with localized tumors. *Eur. J. Cancer*, v.26, p.83-87, 1990.
- MARKUS, G; CAMIOLA, SM; KOHGA, S et al. Plasminogen activator secretion of human tumors in short-term organ culture including a comparison of primary and metastatic colon tumors. *Cancer Res.*, v.43, p.5517-5525, 1983.
- MARKUS, G; KOHGA, S; CAMIOLA, SM et al. Plasminogen activators in human malignant melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.72,

p.1213-1222, 1984.

MERKEL, DE & OSBORNE, CK. Prognostic factors in breast cancer. Hematol. Oncol. Clin. North Am., v.3, p.641-652, 1989.

MIRA-Y-LOPEZ, R; REICH, E; OSSOWSKI, L. Modulation of plasminogen activator in rodent mammary tumors by hormones and other effectors. Cancer Res., v.43, p.5467-5477, 1983.

MIRA-Y-LOPEZ, R & OSSOWSKI, L. Hormonal modulation of plasminogen activator: an approach to prediction of human breast tumor responsiveness. Cancer Res., v.47, p.3558-3564, 1987.

NEEDHAM, GK; NICHOLSON, S; ANGUS, B et al. Relationship of membrane-bound tissue type and urokinase type plasminogen activators in human breast cancers to estrogen and epidermal growth factor receptors. Cancer Res., v.48, p.6603-6607, 1988.

NG, R; KELLEN, JA. The role of plasminogen activators in metastasis. Med. Hypoth., v.10, p. 291-293, 1983.

O'GRADY, P; LIJNEN, HR; DUFFY, MJ. Multiple forms of plasminogen activator in human breast tumors. Cancer Res., v.45, p.6216-6218, 1985.

OSSOWSKI, L; QUIGLEY, JP; KELLERMAN, GM et al. Fibrinolysis associated with oncogenic transformation: requirement of plasminogen for correlated change in cellular morphology, colony formation in agar and cell motility. J. Exp. Med., v.138, p. 1056-1064, 1973.

OSSOWSKI, L; JAMES, P; QUIGLEY, JP et al. Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. J. Biol. Chem., v.249, p.4312-4320, 1974.

OSSOWSKI, L; BIEGEL, D; REICH, E. Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. Cell, v.16, p.929-940, 1979.

OSSOWSKI, L & REICH, E. Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. Cell, v.35, p.611-619, 1983.

PACHECO, MM; BRENTANI, MM; FRANCO, EL et al. Plasminogen activator expression and steroid hormone receptors in female breast cancer: a multifactorial study. Int. J. Cancer, v. 41, 798-804, 1988.

- PACHECO, MM; MARQUES, LA; BRENTANI, MM. Prognostic value of plasminogen activator in breast cancer. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.32, p.92, 1989.
- PAGE, DL & ANDERSON, TJ. Metastasis of breast cancer. In: *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1987. 362p. cap.19, p.321-334.
- PAGE, DL; ANDERSON, TJ; CONNOLY, JL; SCHNITT, SJ. Miscellaneous features of carcinoma. In: PAGE, DL & ANDERSON, TJ. *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1987. 362p. cap. 16, p.269-299.
- PARANJPE, M; ENGEL, L; YOUNG, N et al. Activation of human breast carcinoma collagenase through plasminogen activator. *Life Sci.*, v.26, p.1223-1231, 1980.
- PETERSON, H-I; KJARTANSSON, I; KORSAN-BENGTSEN, K et al. Fibrinolysis in human malignant tumours. *Acta Chir. Scand.*, v.139, p.219-223, 1973.
- PISANI, R. & PINOTTI, JA. Receptores de estrógeno. In: PINOTTI, JA. *Diagnóstico em Mastologia*. São Paulo: Manole, 1980. 363p. p.167-176.

PLASMINOGEN. SIGMA CHEMICAL, 1990. p.854.

RAMSHAW, IA; BADENOCH-JONES, P; GRANT, A et al. Enhanced plasminogen activator production by highly metastatic variant cell lines of a rat mammary adenocarcinoma. *Inv. Metast.*, v.6, p.133-144, 1986.

RASCHE, H & DIETRICH, M. Hemostatic abnormalities associated with malignant diseases. *Eur. J. Cancer*, v.13, p.1053-1064, 1977.

REBOUD-RAVAUX, M. Les activateurs du plasminogène: aspects généraux et développements récents. *Biochimie*, v.67, p.1197-1216, 1985.

SAITO, K; NAGASHIMA, M; IWATA, M et al. The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma and tissues of patients with ovarian and uterine tumors. *Thromb. Res.*, v.58, p.355-366, 1990.

SAKSELA, O. Radial caseinolysis in agarose: a simple method for detection of plasminogen activator in the presence of inhibitory substances and serum. *Anal. Biochem.*, v.111, p.276-282, 1981.

- SAKSELA, O. Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 823, p.35-65, 1985.
- SAPPINO, AP; BUSSO, N; BELIN, D et al. Increase of urokinase-type plasminogen activator gene expression in human lung and breast carcinomas. *Cancer Res.*, v.47, p.4043-4046, 1987.
- SOSZKA, T & OLSZEWSKI, K. Plasminogen activator and their inhibitors in normal, hyperplastic and carcinomatous human endometrium. *Thromb. Res.*, v.42, p.835-846, 1986.
- SPRENGERS, ED & KLUFT, C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*, v.69, p.381-387, 1987.
- SUTHERLAND, DJA. Plasminogen-activating activity: association with steroid binding by cytosols of human breast cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.64, p.3-7, 1980.
- UROKINASE. SIGMA CHEMICAL, 1990. p.1037.
- VIEIRA, S. Correlação. In: *Introdução à Bioestatística*. Rio de Janeiro: Campus, 1981a. 294p. cap. 5, p.77-89.

VIEIRA, S. Análise de variância. In: Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro: Campus, 1981b. 294p. cap. 14, p.235-237.

WANG, BS; McLOUGHLIN, GA; RICHIE, JP et al. Correlation of the production of plasminogen activator with tumor metastasis in B16 mouse melanoma cell lines. Cancer Res., v.40, p.288-292, 1980.

WOOD, JR & STRAULI, P. II-3. Tumor invasion and metastasis. In: CANCER MEDICINE, eds. J.F. Holland, E. Frei III. Lea & Febiger, Philadelphia (1973).

YAMASHITA, J; HORIUCHI, S; KIMURA, M et al. Plasminogen activator as a functional marker for estrogen dependence in human breast cancer cells. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), v.77, p.177-181, 1986.

YANG, NS; KIRKLAND, W; JORGENSEN, T et al. Absence of fibronectin and presence of plasminogen activator in both normal and malignant human mammary epithelial cells in culture. J. Cell Biol., v.84, p. 120-130, 1980.

Nota: Referências bibliográficas citadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR 6023/1989.