

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANNA PAULA DE BORBA BATSCHAUER

**AVALIAÇÃO HEMOSTÁTICA E MOLECULAR EM MULHERES COM CÂNCER DE  
MAMA RECEPTOR HORMONAL NEGATIVO**

Belo Horizonte – MG  
Dezembro de 2009

ANNA PAULA DE BORBA BATSCHAUER

**AVALIAÇÃO HEMOSTÁTICA E MOLECULAR EM MULHERES COM CÂNCER DE  
MAMA RECEPTOR HORMONAL NEGATIVO**

Tese, como requisito parcial, para obter o grau de doutor em Ciências farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho.

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes.

Co-orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges.

Belo Horizonte – MG  
Dezembro de 2009

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### "Avaliação hemostática e molecular em mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo"

**Anna Paula de Borba Batschauer**

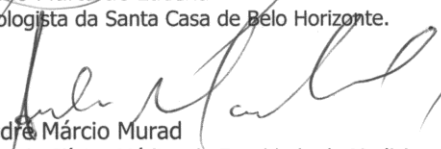
Tese aprovada em 16/12/2009 pela seguinte Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi  
Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP



Dr. Clécio Ênio Murta de Lucena  
Médico mastologista da Santa Casa de Belo Horizonte.



Prof. Dr. André Márcio Murad  
Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG



Profa. Dra. Helenice Gobbi  
Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG



Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes (Coorientadora)  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG



Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges (Coorientadora)  
COLTEC - Faculdade de Farmácia - UFMG



Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho (Orientadora)  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG

Dedico o grau de Doutor ao meu Pai Júlio e meu irmão Júlio, homens de muita fé, que mostraram na luta pela vida ultrapassar qualquer barreira.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Professora Maria das Graças Carvalho, pelo seu apoio e inspiração no amadurecimento de meus conhecimentos, estando presente em todos os momentos, minha mais profunda gratidão;

Às co-orientadoras Professoras Ana Paula Fernandes e Karina Braga Gomes Borges que me permitiram mergulhar no universo da Biologia Molecular sem restrição;

Aos professores Luci, Lauro, Marinez e Josiane, que sempre estiveram presentes de alguma forma, apoiando, ajudando e compartilhando todos os momentos desta trajetória;

Às amigas-irmãs Lillian e Januária que encontrei na UFMG, muito obrigada pela acolhida e por sempre estarem por perto agora e sempre;

Às novas amigas de pós-graduação Isabela, Fernanda, Michelle, Vanessa, Nathalia, Danielle e Anna Letícia que participaram do trabalho e sem ajuda de vocês este trabalho não seria o mesmo;

Aos técnicos em Educação do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, Fátima, Nilce, Marisa, Márcio, Eduardo e tantos outros;

Aos meus familiares, em especial minha filha Nathalia, minha mãe Amandia e meu companheiro Yann, agradeço a compreensão e apoio, com minhas desculpas pela ausência e falta de paciência;

Aos meus colaboradores do Laboratório Batschauer, que foram capazes de suprir minha ausência, ainda participaram de coletas e seleção de algumas pacientes;

À UNIVALI, coordenador, professores e alunos que aceitaram minha condição de trabalho e apoiaram ilimitadamente a conclusão deste estudo.

## RESUMO

O câncer de mama é a causa mais comum de morte por câncer em mulheres. Os mecanismos envolvidos no processo de metástase estão pouco elucidados, especialmente as alterações hemostáticas que ocorrem no desenvolvimento do câncer e que parecem estar associadas à gravidade da doença. O presente estudo teve como objetivo investigar em mulheres com câncer de mama, receptor hormonal negativo, em um período de dois anos, possíveis alterações hemostáticas e moleculares associando-as com marcadores de prognóstico já estabelecidos, em três momentos distintos: logo após o diagnóstico do câncer de mama, ao final do tratamento quimioterápico e aos dois anos após o diagnóstico da doença. Foram estudadas 33 pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo e um grupo controle com 63 mulheres sem história da doença. Como marcadores hemostáticos, foram avaliados os níveis plasmáticos de dímero-D e fator tissular. A pesquisa das frequências de mutações/polimorfismos nos genes da *metileno tetra hidro folato redutase (MTHFR)*, do *receptor 4 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR4)* e da *hemocromatose (HFE)* foram realizadas em busca de novos marcadores moleculares de interesse diagnóstico e/ou prognóstico para o câncer de mama. As variáveis de prognóstico como idade, triplo negativo, *status* linfonodal, HER2, p53, ki67, tamanho do tumor e grau de diferenciação foram analisados em função da presença ou não de metástases/óbito e em função dos níveis plasmáticos de dímero-D e de fator tissular. Os dados deste estudo analisados em conjunto, permitem inferir que o sistema hemostático está ativado em pacientes com câncer de mama ao diagnóstico, traduzido por níveis significativamente mais elevados do dímero-D e do fator tissular, confirmando relatos prévios da literatura sobre um estado de hipercoagulabilidade em pacientes com doenças malignas. No entanto, os níveis de dímero-D não foram capazes de funcionar como um marcador de prognóstico ao diagnóstico, todavia, foram capazes de refletir o agravamento da doença traduzida por iminente óbito. Além disso, a avaliação deste marcador não permitiu inferir sobre sobrevida livre de doença. As variáveis de prognóstico não se mostraram associadas ao desenvolvimento de metástases/óbito e nem com os níveis dos marcadores hemostáticos, tais como dímero-D e fator tissular.

A mutação H63D em homozigose no gene *HFE* apresentou associação com o câncer de mama, enquanto a mutação C677T no gene *MTHFR* apresentou associação com metástase/óbito, comprometimento de linfonodos e superexpressão de HER2 e Ki67. A presença do polimorfismo Gly388Arg no gene *FGFR4*, se apresentou associada à variável Ki67 e à maior probabilidade de risco de desenvolver metástase/óbito quando comparado às outras alterações genéticas. Os resultados promissores do dímero-D como um marcador de evolução da doença, bem como os resultados preliminares das análises moleculares, sinalizaram para a necessidade de estudos adicionais envolvendo uma contínua avaliação deste marcador hemostático e outras técnicas moleculares, em um maior número de mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo.

**Palavras-chave:** Câncer de mama receptor hormonal negativo, variáveis de prognóstico, dímero-D, fator tissular, mutações/polimorfismo.

## ABSTRACT

The breast cancer is the most common cause of death in women by malignant disease. The mechanisms related to recurrence are unclear, especially the hemostatic alterations that occur during the development of the disease and seem to be related to its aggressiveness. The study had as aim to assess in women with hormone negative receptor breast cancer, in a 24 months period, possible hemostatic and molecular alterations in order to associate them with prognosis markers already established in three different occasions: immediately after the breast cancer diagnosis, at the end of the chemotherapy and two years after the disease diagnosis. Thirty three patients with hormone negative receptor breast cancer and a control group with sixty three women, with no history of cancer have been studied. As hemostatic markers, plasma D dimer and tissue factor levels were measured. Mutations/polymorphisms in the genes of the *methylenetetrahydro folate reductase (MTHFR)*, *fibroblasts growing factor receptor 4 (FGFR4)* and *hemochromatosis (HFE)* were also investigated, searching for new possible molecular markers for prognosis or diagnosis in breast cancer. Prognosis variables as age, triple negative tumors, lymph nodes status, HER2, p53, Ki67, tumor size and grade were investigated and related to the presence or absence of metastasis/death, and to both plasma levels of D dimer and tissue factor.

The data taken together allow to infer that the hemostatic system is activated in patients with breast cancer at the diagnosis, which is indicated by levels of D dimer and tissue factor significantly more elevated compared to the those for the control group. This fact confirms previous reports on a hypercoagulability state in patients with malignant diseases. However, the levels of D dimer failed as a prognosis marker at the diagnosis. By other hand, they correlated with the severity of the disease assessed by presence of metastasis/death. The assessment of this marker did not allow infer about disease-free survival. Prognosis variables did not show to be associated to either development of metastasis/death or with the plasma levels of D dimer or tissue factor. H63D mutation in homozygosis in the gene *HFE* showed to be associated with breast cancer, while the C677T mutation in the gene *MTHFR* showed to be associated with metastasis/death, lymph nodes involvement and superexpression of both HER2 and Ki67. The Gly388Arg in the gene *FGFR4* polymorphism showed to be associated to Ki67 and to a higher probability for developing metastasis/death as compared to the other genetic alterations. The promising results for D dimer as a disease progressing marker, as well as the preliminary results of molecular analyses, address to new studies involving a continuous measurement of this hemostatic marker and molecular profiling techniques in a larger number of women with hormone negative receptor breast cancer.

**Key Words:** Hormone negative receptor breast cancer, prognosis variables, D dimer, tissue factor, mutations/polymorphisms.

## LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Representação esquemática da cascata de coagulação <i>in vitro</i> e fibrinólise.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>2 Modelo atual da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares <i>in vivo</i> adaptado de HOFFMAN (2003): fases de iniciação, de amplificação e de propagação.....</b> | <b>38</b> |
| <b>3 Curva de sobrevida de Kaplan Meier em relação às variáveis de prognóstico.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>4 Curva de sobrevida de Kaplan Meier em relação às variáveis de prognóstico.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>5 Níveis plasmáticos de dímero-D em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, relacionado às diferentes variáveis clínicas...</b>                                 | <b>58</b> |
| <b>6 Níveis plasmáticos de dímero-D em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo e características imunoistoquímicas.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>7 Níveis plasmáticos de dímero-D em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>8 Medianas de dímero-D do grupo controle e nos três momentos da coleta de sangue.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>9 Curva de sobrevida em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, em relação às determinações do dímero-D, Kaplan Meier (p=0,297).....</b>                        | <b>62</b> |
| <b>10 Níveis plasmáticos de fator tissular em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, relacionado às diferentes variáveis clínicas.....</b>                        | <b>64</b> |
| <b>11 Níveis plasmáticos de fator tissular em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo e características imunoistoquímicas...</b>                                    | <b>65</b> |



|  |    |
|--|----|
| 12 Níveis plasmáticos de fator tissular em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo.....  | 66 |
| 13 Medianas de fator tissular em controles e pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo nos três momentos de coleta .....                                       | 68 |
| 14 Curva de sobrevivência de Kaplan Meier em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, em relação aos níveis plasmáticos do fator tissular ( $p=0,307$ )..... | 68 |
| 15 Gel de poliacrilamida demonstrando a pesquisa da mutação C677T no gene da <i>MTHFR</i> .....  | 70 |
| 16 Gel de poliacrilamida demonstrando a pesquisa do polimorfismo Gly388Arg no gene do <i>FGFR4</i> .....   | 70 |
| 17 Gel de poliacrilamida demonstrando a pesquisa da mutação C282Y no gene da <i>HFE</i> .....  | 71 |
| 18 Gel de poliacrilamida demonstrando a pesquisa da mutação H63D no gene da <i>HFE</i> .....   | 71 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| 1 Estimativas, para o ano de 2008, de novos casos de câncer de mama em mulheres, e suas respectivas taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres..... | 18 |
| 2 Graduação histológica do tumor segundo Bloom Richardson.....   | 26 |
| 3 Sistema de classificação dos tumores malignos .....  | 28 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| 1 Seqüência de oligonucleotídeos e condições de amplificação utilizados na PCR de fragmentos do gene <i>MTHFR</i> , <i>FGFR4</i> e <i>HFE</i> .....                      | 50 |
| 2 Preparo das reações de PCR e digestão para a <i>MTHFR</i> (C667T), <i>FGFR4</i> (Gly388Arg) e <i>HFE</i> (C828Y e H63D).....   | 51 |
| 3 Características clínico-patológicas das pacientes com câncer de mama, atendidas no CEPON, na cidade de Itajaí-SC, no período d 2006 a 2009.....                        | 54 |
| 4 Análise de regressão logística univariada entre metástase/óbito e variáveis de prognóstico.....  | 55 |
| 5 Análise de regressão logística univariada entre dímero-D e variáveis de prognóstico.....   | 63 |
| 6 Análise de correlação estatística entre a determinação do dímero-D e o fator tissular.....   | 69 |
| 7 Freqüência do polimorfismo Gly388Arg no gene <i>FGFR4</i> entre os grupos estudados.....   | 72 |
| 8 Freqüência da mutação C677T no gene <i>MTHFR</i> entre os grupos estudados.....  | 73 |
| 9 Freqüência da mutação C282Y no gene <i>HFE</i> entre os grupos estudados..   | 73 |
| 10 Freqüência da mutação H63D no gene <i>HFE</i> entre os grupos estudados..   | 74 |
| 11 Regressão logística múltipla entre as mutações e variáveis clínicas.....  | 74 |
| 12 Probabilidade de a mutação influenciar no desenvolvimento de metástase/óbito individualmente e em associação.....   | 75 |
| 13 Características clínicas, hemostáticas e moleculares das pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo que evoluíram para óbito no período de 24 meses..... | 76 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|              |   |
|--------------|---|
| <b>ANOVA</b> | <b>Análise de Variância</b>                                     |
| <b>AT</b>    | <b>Anti-Trombina</b>  |
| <b>ADP</b>   | <b>Adenosina Difosfato</b>                                      |
| <b>ATP</b>   | <b>Adenosina Trifosfato</b>                                     |
| <b>dNTP</b>  | <b>Dinucleotídeos</b>   |
| <b>FGFR</b>  | <b>Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos</b>         |
| <b>FPA</b>   | <b>Fator Ativador do Plasminogênio</b>                          |
| <b>F1+2</b>  | <b>Fragmento 1+2 do Fibrinogênio</b>                            |
| <b>HFE</b>   | <b>Hemocromatose</b>  |
| <b>HER2</b>  | <b>Receptor Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidermal Humano</b> |
| <b>INCA</b>  | <b>Instituto Nacional do Câncer</b>                             |
| <b>MTHFR</b> | <b>Metileno Tetra Hidro Folato Redutase</b>                     |
| <b>MTHF</b>  | <b>Metileno Tetra Hidro Folato</b>                              |
| <b>PAI-1</b> | <b>Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo 1</b>             |
| <b>PDF</b>   | <b>Fator Derivado de Plaquetas</b>                              |
| <b>SAM</b>   | <b>S- Adenosil Metionina</b>                                    |
| <b>TF</b>    | <b>Fator Tissular</b>   |
| <b>TAT</b>   | <b>Trombina Anti-Trombina</b>                                   |
| <b>TRH</b>   | <b>Terapia de Reposição Hormonal</b>                            |
| <b>PCR</b>   | <b>Reação em Cadeia de Polimerase</b>                           |
| <b>VEGF</b>  | <b>Fator de Crescimento de Endotélio Vascular</b>               |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....</b>             | <b>13</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                       | <b>17</b> |
| <b>2.1 Aspectos Gerais do Câncer.....</b>                 | <b>17</b> |
| <b><u>2.1.1 Características Epidemiológicas</u> .....</b> | <b>17</b> |
| <b><u>2.1.2 Carcinogênese Mamária.....</u></b>            | <b>19</b> |
| <b><u>2.1.3 Fatores de Risco.....</u></b>                 | <b>21</b> |
| <b>2.2 Fatores Prognóstico.....</b>                       | <b>22</b> |
| <b><u>2.2.1. Classificação Histológica.....</u></b>       | <b>23</b> |
| <b><u>2.2.2 Estadiamento.....</u></b>                     | <b>26</b> |
| <b>2.3 Marcadores Genéticos de Prognóstico.....</b>       | <b>29</b> |
| <b>2.4 Outros Marcadores Prognósticos.....</b>            | <b>33</b> |
| <b><u>2.4.1 Capacidade Proliferativa.....</u></b>         | <b>33</b> |
| <b><u>2.4.2 Receptores Hormonais.....</u></b>             | <b>33</b> |
| <b><u>2.4.3 Triplo Negativo.....</u></b>                  | <b>34</b> |
| <b>2.5 Sistema Hemostático.....</b>                       | <b>35</b> |
| <b>2.6 Carcinogênese e Hipercoagulabilidade.....</b>      | <b>40</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                   | <b>45</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                          | <b>46</b> |
| <b>4.1 Casuística.....</b>                                | <b>46</b> |
| <b>4.2 Amostras Biológicas.....</b>                       | <b>47</b> |
| <b>4.3 Métodos.....</b>                                   | <b>48</b> |
| <b><u>4.3.1 Parâmetros Hemostáticos</u> .....</b>         | <b>48</b> |
| <b><u>4.3.2. Parâmetros Moleculares.....</u></b>          | <b>49</b> |
| <b>4.4 Análise Estatística.....</b>                       | <b>51</b> |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>                                 | <b>53</b> |
| <b>5.1 Aspectos clínico-patológicos.....</b>              | <b>53</b> |
| <b>5.2 Aspectos hemostáticos.....</b>                     | <b>57</b> |

|  |     |
|--|-----|
| <b>5.2.1 Dímero-D</b> .....                      | 57  |
| <b>5.2.2 Fator tissular (FT)</b> .....           | 63  |
| <b>5.3 Aspectos moleculares</b> .....            | 69  |
| <b>5.4 Variantes relacionadas ao óbito</b> ..... | 75  |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....                         | 77  |
| <b>6.1 Aspectos clínicos</b> .....               | 77  |
| <b>6.2 Aspectos hemostáticos</b> .....           | 82  |
| <b>6.2.1 Dímero-D</b> .....                      | 82  |
| <b>6.2.2 Fator Tissular (FT)</b> .....           | 87  |
| <b>6.3 Aspectos moleculares</b> .....            | 92  |
| <b>6.4 Perspectivas futuras</b> .....            | 96  |
| <b>8 CONCLUSÕES</b> .....                        | 98  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....          | 99  |
| <b>APÊNDICE A</b> .....                          | 108 |
| <b>APENDICE B</b> .....                          | 109 |
| <b>ANEXO A</b> .....                             | 110 |
| <b>ANEXO B</b> .....                             | 111 |
| <b>ANEXO C</b> .....                             | 112 |
| <b>ANEXO D</b> .....                             | 116 |

## 1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

O câncer de mama é uma das principais causas de óbito entre as mulheres. A distribuição dos novos casos da doença em relação à classificação topográfica parece bem heterogênea entre os diferentes estados e capitais do Brasil. Na estimativa do INCA para o ano de 2010, o número de novos casos esperados para o país é de 49.240, com risco estimado de 49 casos para cada 100 mil mulheres, sendo que em Santa Catarina são estimados 1.570 novos casos (BRASIL, 2009).

O câncer de mama é caracterizado por um distúrbio nos mecanismos celulares de proliferação e apoptose, levando a uma ruptura nos processos que regulam o ciclo celular. Em geral, as lesões malignas do tecido glandular mamário são constituídas por células com intensa atividade mitótica. A proliferação destas células atípicas resulta na destruição da arquitetura glandular normal, ou seja, o tecido mamário torna-se desorganizado, perdendo sua compartimentalização em função da perda das células mioepiteliais que circundam os grupamentos glandulares (PINHO; COUTINHO, 2005).

A carcinogênese mamária ainda é um processo complexo, não sendo totalmente conhecido. Sabe-se que a origem da transformação neoplásica está associada à instabilidade genômica, com conseqüente ocorrência de mutações pontuais, deleções, amplificações, rearranjos cromossômicos e eventos epigenéticos. As alterações cromossômicas que ocorrem nas células neoplásicas resultam na ocorrência de eventos genéticos classicamente envolvidos na carcinogênese mamária, caracterizados pela ativação de oncogenes e perda da atividade de genes supressores tumorais (WOGAN et al., 2004).

Para o entendimento dos fenômenos oncogênicos é fundamental o conhecimento dos fatores de risco associados ao câncer. Alguns polimorfismos gênicos em pacientes com câncer de mama têm sido amplamente estudados, sugerindo que o evento genético, em alguns casos, possa ser um importante fator de risco e/ou prognóstico para o câncer de mama (CAMPBELL et al., 2002).

A compreensão da biologia dos tumores malignos e das alterações benignas associadas ao aumento do risco de câncer é fundamental na tentativa de minimizar a ocorrência de novos casos e reverter este quadro epidemiológico (VIALE, 2005).

A avaliação prognóstica e terapêutica dos carcinomas mamários depende de vários fatores, como a classificação histopatológica do tumor, o estadiamento clínico segundo o Sistema de Classificação dos Tumores Malignos (TNM) (tamanho, nódulos e metástases), além da expressão de receptores hormonais e de protooncogenes como o HER-2 (human epidermal growth factor receptor-2), da idade ao diagnóstico, dentre outros. Sabe-se que a identificação dos fatores de risco bem como de marcadores tumorais bioquímicos contribui para o estabelecimento da terapêutica adequada nas pacientes portadoras de câncer de mama (BLACKWELL et al., 2004; LANG et al., 2008; SELLAHEWA et al., 2008).

Um importante subgrupo no câncer de mama é o triplo negativo. Tumores que apresentam ausência de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e não apresentam expressão do fator de crescimento epidérmico tirosino quinase 2 (HER2), não podem se beneficiar de terapias específicas. Este grupo específico, atualmente apresenta o pior prognóstico, associado à menor sobrevida global (LACROIX et al., 2004; REIS-FILHO et al., 2005; NISHIMURA, R., 2008).

O câncer de mama é uma doença com alto poder de metastização, sendo que um número significativo de pacientes apresenta uma sobrevida inferior a cinco anos após o término do tratamento primário. A doença é de evolução pouco previsível, com história natural e prognóstico muito variados, sendo que tumores muito pequenos podem apresentar alto potencial metastático associado com uma evolução muito rápida (OZBAS et al., 2003; BENOY et al., 2005).

A associação do câncer com alterações hemostáticas foi primeiramente descrita por Armand Trousseau no século XIX. Atualmente esta associação tem sido amplamente estudada e muitos avanços já foram obtidos nos aspectos clínico, laboratorial e epidemiológico (BULLER et al., 2007).

Alguns pacientes com doenças malignas ainda não diagnosticadas, poderão desenvolver trombose venosa profunda (TVP) ou embolismo pulmonar (RAK et al., 2006). A ativação do mecanismo hemostático em pacientes com câncer tem sido evidenciada laboratorialmente por meio de marcadores de hipercoagulabilidade. O

aumento dos níveis plasmáticos destes marcadores, em pacientes com câncer, tem sido associado à progressão da doença e metástase.

Dentro deste contexto, Blackwell e colaboradores (2000) sugeriram que o dímero-D pode ser um importante marcador prognóstico para invasão linfovascular no câncer de mama.

Apesar do câncer de mama ter sido amplamente estudado nas últimas décadas, a etiologia da doença e os mecanismos relacionados com a recidiva continuam pouco elucidados. Portanto, novos estudos associando marcadores de risco e de prognóstico já bem estabelecidos, com possíveis alterações hemostáticas e moleculares poderão agregar novos conhecimentos aos já existentes. A avaliação prospectiva destas pacientes poderá fornecer importantes subsídios para a adoção de condutas adequadas no controle do câncer de mama.

Cumprido ressaltar que os marcadores moleculares poderão ser importantes na avaliação do risco da doença, bem como no prognóstico e resistência ao tratamento, enquanto que os parâmetros hemostáticos que serão avaliados no presente estudo, se associados aos marcadores prognósticos convencionais, poderão ser ferramentas alternativas úteis na avaliação do prognóstico da doença, bem como na discriminação de pacientes em risco para tromboembolismo venoso.

Deve ser ainda enfatizado que a maioria dos estudos com câncer de mama foi realizada em mulheres com receptor hormonal positivo. No entanto, estas apresentam melhor prognóstico em relação àquelas apresentando receptor hormonal negativo. Portanto, ao nosso ver, estudos envolvendo mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo devem ser desenvolvidos no intuito de se conhecer melhor a evolução desta importante doença, em grupos mais homogêneos, explorando o papel de alguns marcadores hemostáticos e moleculares com vistas à possível utilização destes no controle do câncer de mama.

Diante do exposto acima, pretende-se com o estudo em questão a busca de conhecimentos adicionais referentes ao papel da hemostasia e de algumas alterações genéticas na evolução do câncer de mama, já que os mecanismos relacionados à recidiva continuam pouco elucidados.



Partindo da premissa que anormalidades hemostáticas, dentre outros fatores, podem predispor ao tromboembolismo venoso em pacientes com câncer, e que aqueles que apresentam esta complicação possuem sobrevida menor, torna-se bastante pertinente e oportuno estudos envolvendo pacientes com câncer de mama, em especial aquelas com receptor hormonal negativo, alguns dos quais, triplo negativo, e o reflexo desta doença sobre o complexo mecanismo hemostático.

Os conhecimentos ora existentes, as controvérsias encontradas na literatura e lacunas sobre o tema, constituem forte motivação para este estudo, cuja racional nos remete às seguintes questões:

- Estariam os níveis plasmáticos das variáveis hemostáticas associados aos fatores prognósticos tais como tipo e grau histológicos, tamanho do tumor, invasão linfonodal, idade ao diagnóstico, história familiar, características genéticas, dentre outros?
- À luz do conhecimento de que o fator tissular constitui o maior desencadeador da ativação do mecanismo hemostático, estaria o mesmo, quando em níveis elevados, associado à exacerbação do câncer de mama favorecendo a formação de metástase?
- Alterações hemostáticas relacionadas à hipercoagulabilidade, como níveis elevados do dímero-D e Fator tissular e/ou alterações moleculares poderiam constituir um útil marcador associado ao prognóstico desfavorável? Por outro lado, o perfil hemostático normal poderia refletir sobrevida livre de doença?

Finalmente, cabe reiterar que um maior entendimento sobre os fatores clínicos, genéticos, epidemiológicos e outros relacionados ao desenvolvimento e/ou prognóstico da doença constitui subsídio para melhorar o controle da doença uma vez instalada.

Outros possíveis marcadores de prognóstico não convencionais, como os marcadores de hipercoagulabilidade, podem assumir considerável importância como um fator adicional na tomada de decisões quanto ao tratamento e outras condutas clínicas. Cumpre também ressaltar que o acompanhamento do perfil hemostático em pacientes com câncer em geral, também poderá ser útil na prevenção de eventos trombóticos mediante a adoção de medidas profiláticas adequadas, contribuindo para reduzir a morbidade nestes pacientes.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Aspectos Gerais do Câncer**

No organismo verificam-se formas de crescimento celular controlada e não controlada. A hiperplasia e a metaplasia são exemplos de fenômenos de proliferação e diferenciação celular controlados, enquanto que as neoplasias correspondem às formas de crescimento não controladas e são denominadas, na prática, de tumores. O câncer é caracterizado por um conjunto de distúrbios heterogêneos, de etiologias distintas e multifatoriais. Uma das dificuldades encontradas no estudo das neoplasias está relacionada com a definição da origem histológica (histogênese) do tumor, a qual se baseia na morfologia e nas características biológicas das células tumorais. Com a evolução do conhecimento, a neoplasia foi definida como uma proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro (ROBBINS, 2000).

O câncer pode ser definido como uma doença que surge quando uma única célula adquire a propriedade de proliferação excessiva e incapacidade de induzir morte celular programada (apoptose). Associados a estas modificações, estão a diminuição progressiva da função normal, a aquisição de propriedades como invasão, através da infiltração das células cancerosas nos tecidos normais circunvizinhos; e metástases, quando as células cancerosas são capazes de entrar no sistema circulatório e promover crescimento secundário em regiões distantes no corpo (FRANKS, 1990).

#### **2.1.1 Características Epidemiológicas**

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, aproximadamente 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama. A estimativa é que em 2010 serão

diagnosticados aproximadamente 49.240 novos casos, com um risco aproximado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2009).

O Quadro 1 demonstra as estimativas de novos casos de câncer de mama, bem como as taxas brutas de incidência no Brasil, discriminados por região e suas respectivas capitais.

**Quadro 1 - Estimativas para o ano de 2010 de novos casos de câncer de mama em mulheres e suas respectivas taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres**

| Localidade                    | Estados |           | Capitais |           |
|-------------------------------|---------|-----------|----------|-----------|
|                               | Casos   | Tx. Bruta | Casos    | Tx. Bruta |
| Região Norte                  | 1.350   | 16,62     | 800      | 31,17     |
| Região Nordeste               | 8.270   | 30,11     | 3.260    | 53,14     |
| Região Centro-Oeste           | 2.690   | 37,68     | 730      | 51,75     |
| Região Sudeste                | 27.620  | 64,54     | 10.850   | 94,71     |
| Região Sul                    | 9.310   | 64,30     | 1.900    | 96,92     |
| Região Sul - Curitiba/PR      | 2.990   | 54,46     | 730      | 77,62     |
| Região Sul - Porto Alegre/RS  | 4.750   | 81,57     | 1.040    | 127,71    |
| Região Sul – Florianópolis/SC | 1.570   | 49,58     | 130      | 62,90     |

Fonte: BRASIL, 2009.

Entretanto, apesar de ser considerada uma doença de bom prognóstico caso o diagnóstico seja realizado precocemente e seguido de tratamento adequado, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que a doença continua sendo diagnosticada em estágios avançados quando comparado com países desenvolvidos. Na população brasileira, a sobrevivência média após cinco anos é de 61% (BRASIL, 2009).

O câncer de mama é também a primeira causa de morte por câncer em mulheres no Brasil. Nas últimas duas décadas, a taxa bruta de mortalidade por câncer de mama apresentou uma elevação de 68%, passando de 5,77 em 1979 para 9,70 mortes por

100.000 mulheres em 1998. É a maior causa de óbitos por câncer na população feminina, principalmente na faixa etária entre 40 e 69 anos (BRASIL, 2007).

A incidência do câncer de mama no Brasil está em torno de 11,5 mulheres em 100.000 e a mortalidade é de 9,2 óbitos em 100.000. No estado de Santa Catarina esta incidência é bem maior, sendo de 30,56/100.000 casos, enquanto a taxa de mortalidade de 35% é menor que a média brasileira, calculada em 80% (BRASIL, 2004).

Um aspecto epidemiológico importante está relacionado à semelhança das taxas de incidência de câncer de mama na Região Sul do Brasil com as taxas de incidência de grande parte dos países europeus, o que pode ser explicado pelo predomínio de origem caucasiana dos indivíduos nesta região do país. Entre 1980 e 1995, a mortalidade por câncer de mama feminino aumentou em todas as regiões. Entre os inúmeros fatores de risco, pode-se destacar o menor número médio de filhos, gestações iniciadas em idades mais avançadas, melhor nível socioeconômico e maior uso de terapia de reposição hormonal (TRH) (WÜNSCH et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007).

### **2.1.2 Carcinogênese Mamária**

A carcinogênese caracteriza-se por mutações genéticas herdadas ou adquiridas pela ação de agentes ambientais, químicos, hormonais, radioativos e virais, denominados carcinógenos (COTRAN et al., 2000). Os principais alvos da alteração genética são os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes que controlam a morte celular programada ou apoptose. Acredita-se que os genes reparadores do DNA também possuam papel de destaque na carcinogênese, pois qualquer anormalidade nesses genes predisporia a mutações no genoma com subsequente transformação neoplásica (ZHANG et al., 2000).

Segundo Gibbs em 2003, acredita-se que para uma célula tornar-se maligna, esta precisa adquirir uma série de habilidades especiais. Cinco ou seis sistemas regulatórios diferentes precisam estar alterados para que uma célula normal adquira

propriedades neoplásicas. Algumas destas habilidades são: a) capacidade de ignorar comandos para cessar a divisão celular enviados por tecidos adjacentes ou por mecanismos internos próprios, b) habilidades para desviar mecanismos apoptóticos, c) habilidades para invadir tecidos próximos e, posteriormente, produzir metástases.

Os tumores malignos possuem a capacidade especificamente de invadir e destruir o mesênquima subjacente promovendo a invasão local. As células tumorais necessitam de nutrientes que são fornecidos pelos tecidos normais por meio da corrente sangüínea. Já se demonstrou que algumas células tumorais produzem uma substância, o fator de angiogênese tumoral (TAF), que estimula o crescimento de vasos sangüíneos através do tumor, garantindo o seu contínuo crescimento. Os novos vasos não são perfeitamente formados sendo facilmente lesados, o que permite à célula tumoral penetrá-los, assim como os vasos linfáticos. Os fragmentos de tecido tumoral podem ser transportados nestes vasos para os linfonodos loco-regionais ou órgãos distantes, onde podem produzir tumores secundários ou metastáticos (GOVIDAN; ARQUETTE, 2004).

A carcinogênese mamária é um processo complexo, ainda não totalmente conhecido que pode ser dividido em três fases importantes: iniciação, promoção e progressão (WOGAN et al., 2004).

Na iniciação, os eventos genéticos envolvidos na carcinogênese mamária são a ativação de protooncogenes e a perda de bloqueio de genes supressores de tumor. Os protooncogenes são genes normais, envolvidos na codificação de proteínas reguladoras da multiplicação celular normal e que podem transformar-se em oncogenes por vários processos genéticos. Os oncogenes ativados promovem uma síntese protéica estimuladora do crescimento e da proliferação anormal das células (BADANO; KATSANIS, 2002).

Os principais oncogenes envolvidos na carcinogênese mamária são c-erbB-2 (ou HER-2/NEU), c-myc e ras, que estão também associados ao aumento do risco para recidivas e metástases. Um aspecto importante a considerar é que a mutação em um único oncogene parece ser incapaz de produzir a transformação maligna e que células normais necessitam da interferência de mais de um oncogene ativado para sofrer tal transformação (BORG et al., 1989).

Já a fase de promoção inicia-se após o evento genético iniciador, sendo os hormônios esteróides, as reações inflamatórias e os fatores de crescimento, estímulos específicos necessários para que ocorra o desenvolvimento do tumor (ARIGA et al., 2005).

A capacidade de invasão e metastatização definida como progressão é estimulada pela atividade de determinadas enzimas, como a catepsina D, e bloqueada pelo sistema imune através da ativação das células NK (*natural killer cells*). No caso do câncer de mama, a metastização atinge mais comumente os ossos, o fígado e o pulmão. A propagação do câncer via linfática, e o acometimento dos linfonodos regionais está relacionado com a sobrevida e o tipo de tratamento, considerando que o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o aparecimento da primeira metástase é inversamente proporcional ao número de linfonodos positivos (OZBAS et al., 2003; GULBEN et al., 2007).

### **2.1.3 Fatores de Risco**

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, inclui a idade ao diagnóstico, histórico familiar, história pregressa de câncer de mama ou doença benigna de mama, fatores hormonais como exposição ao estrogênio, fatores ambientais, idade do primeiro parto, além de hábitos de vida como etilismo, tabagismo, entre outros (GOVIDAN et al., 2004).

Um histórico familiar positivo pode ser um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, embora menos de 10% compreendam casos de origem hereditária. Mutações no gene supressor de tumor BRCA1 estão presentes em 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama e em 85% dos casos de câncer de mama familiar. Já mutações no gene BRCA2 estão diretamente relacionadas ao aparecimento de câncer de mama precoce e confere a predisposição de câncer mamário masculino. (ANTONIOU et al. 2008). Outras síndromes genéticas como a de Li-Fraumeni e de Cowden, estão relacionadas com mutações no gene supressor de tumor p53. A presença da mutação na p53 é observada em 50% dos casos de

carcinoma invasor de mama (ASKMALM et al., 2004).

O histórico pessoal também deve ser considerado, pois as pacientes com câncer de mama prévio têm 3 a 4 vezes mais chances de desenvolver um segundo câncer de mama (GOMES et al., 2007; KOUIDOU et al., 2007; HUGHES, 2008).

Em função da dependência de estrogênio para as células neoplásicas do câncer de mama se desenvolverem, a relação entre a exposição hormonal prolongada e o risco de desenvolver a doença é diretamente proporcional. O câncer de mama é uma doença dependente de hormônio. Mulheres sem ovário e que nunca receberam reposição estrogênica dificilmente desenvolvem câncer de mama. Em contrapartida, casos como menarca precoce, menopausa tardia e primeira gravidez após os 30 anos ou a nuliparidade, são fatores de risco importantes (PINHO; COUTINHO, 2005).

## **2.2 Fatores Prognósticos**

O câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea, com curso clínico que pode ser bastante distinto para diferentes pacientes. Pacientes com o mesmo estadiamento clínico podem evoluir lentamente ou seguir um curso rápido, levando-as ao óbito. Portanto, o tratamento deve ser individualizado, considerando fatores prognósticos que as coloquem em diferentes subgrupos, com diferentes possibilidades de desenvolverem recorrência.

O fator prognóstico é definido com um marcador que esteja associado à sobrevida global ou a sobrevida livre de doença, isto é, um indicador de como será o curso clínico de determinada paciente. A importância clínica dos fatores de prognóstico é identificar as pacientes que se beneficiem de tratamentos adjuvantes (MENKE et al., 2000).

Os estudos de fatores de prognóstico compreendem dois importantes aspectos no câncer de mama. O primeiro consiste em proporcionar informações ao clínico nas decisões de tratamento e condutas, enquanto o segundo ponto importante consiste em poder compreender melhor os mecanismos básicos envolvidos na biologia, controle e propriedades do câncer de mama (GULBEN et al., 2007).

Os fatores de prognóstico são classificados em relação ao tumor e ao hospedeiro. Os fatores prognósticos relativos ao tumor são: tipo histológico, grau de diferenciação, tamanho, e invasão linfonodal. Quanto aos fatores relativos ao hospedeiro, são compreendidas características da paciente, como idade ao diagnóstico, histórico familiar, obesidade, além de outras características genéticas ainda não bem estabelecidas (MENKE et al., 2000).

### **2.2.1. Classificação Histológica**

O câncer de mama é uma doença bastante freqüente e continua sendo uma das principais causas de óbito entre as mulheres. Por isso, é importante compreender a biologia dos tumores malignos e das alterações benignas associadas ao aumento do risco de câncer de mama. Nos últimos anos, subclassificações histológicas específicas do câncer de mama foram correlacionadas com prognósticos variáveis, e os tipos de doença benigna que predispõem ao desenvolvimento do câncer foram mais bem estabelecidos (VIALE, 2005).

#### **2.2.1.1 Tumores Benignos de Mama**

O fibroadenoma é a neoplasia benigna mais comum da mama consistindo em um tumor elástico bem delimitado de mama e apresentando-se como uma mistura de tecido conjuntivo fibroso e dutos. Raros casos de carcinoma infiltrante decorrente de um fibroadenoma foram documentados (VIALE, 2005).

Outro tipo de tumor benigno da mama é o papiloma intraductal, o qual é caracterizado como um tumor comum que ocorre nos ductos lactíferos de mulheres de meia-idade ou com idade mais avançada. No entanto, o papiloma intraductal solitário não é uma lesão pré-maligna ou um marcador de aumento de risco de câncer de mama. O adenoma do mamilo é um raro tumor benigno da mama que apresenta uma



complexa proliferação de pequenos dutos. Pode ser confundido com um carcinoma papilar infiltrante, lipomas. Mais raramente fibromas, leiomiomas e hemangiomas ocorrem na mama. Tumores benignos que surgem a partir da pele e estruturas anexas também aparecem ocasionalmente na mama (HARTMANN et al., 2005).

### **2.2.1.2 Tumores Malignos de Mama**

As lesões denominadas carcinoma *in situ* são controvertidas com relação a seu comportamento biológico. O nome implica que estas sejam precursoras obrigatórias do carcinoma invasivo. Histologicamente, os vários subtipos de carcinoma *in situ* possuem contrapartes invasivas. Os carcinomas *in situ* podem ser intraductais, lobulares ou papilares. Entretanto, apenas 20 a 30% das mulheres que apresentaram essas lesões em uma biópsia de mama, e que não tinham recebido qualquer tratamento posterior desenvolveram subseqüentemente câncer invasivo. A probabilidade de um câncer invasivo surgir após diagnóstico de um carcinoma *in situ* varia de acordo com o subtipo histológico da lesão (SCHREER; LUTTGES, 2005).

O carcinoma ductal invasivo (CDI), ou infiltrante, é a forma mais comum de câncer de mama. Nesse câncer, a invasão estromal por células malignas geralmente desencadeia uma acentuada proliferação fibroblástica. Essa “desmoplasia” cria uma massa palpável que representa o sinal mais comum do carcinoma ductal. O carcinoma ductal invasivo geralmente se apresenta como uma massa dura fixa, que não raro é citada como um carcinoma cirroso. No exame macroscópico, o tumor é tipicamente firme e apresenta bordas irregulares. Microscopicamente, o carcinoma ductal invasivo desenvolve-se como ninhos irregulares e cordões de células epiteliais, geralmente dentro de um denso estroma fibroso.

Os cânceres bem diferenciados podem formar glândulas abortivas, enquanto as formas menos diferenciadas consistem em camadas sólidas de células neoplásicas. As células apresentam grau variável de diferenciação e atividade mitótica, não diferenciáveis do ponto de vista citológico das células do carcinoma ductal *in situ*. A doença de Paget do mamilo configura uma variante incomum do carcinoma ductal, seja

*in situ* ou invasivo, que se estende até envolver a epiderme do mamilo e da aréola. O prognóstico da doença de Paget está relacionado com o do câncer ductal subjacente (HARRIS; SOLIN, 2000).

O carcinoma lobular invasivo é a segunda forma mais comum de câncer de mama invasivo, podendo ocorrer isolado ou mesclado ao carcinoma ductal. Como a quantidade de fibrose é variável, a apresentação clínica do carcinoma lobular invasivo varia desde uma massa firme e distinta, similar ao carcinoma ductal, a uma área mais sutil, difusa e endurecida. Microscopicamente, o carcinoma lobular invasivo consiste em faixas isoladas de células malignas infiltrando-se entre fibras estromais, característica denominada de “filas indianas”. Apesar das características citológicas dessa forma de carcinoma invasivo, esta é biologicamente tão agressiva quanto o tipo ductal invasivo. Dez por cento dos carcinomas invasivos exibem aspectos mistos de carcinoma ductal e lobular (HARRIS; SOLIN, 2000).

Dentre os carcinomas de mama invasivo menos comuns podem ser citados o carcinoma colóide (mucinoso), o carcinoma tubular e o carcinoma medular. O carcinoma colóide na sua forma pura apresenta um prognóstico consideravelmente melhor do que o carcinoma ductal ou lobular infiltrante. Entretanto, o carcinoma colóide está freqüentemente mesclado com o carcinoma ductal infiltrante, circunstância na qual o prognóstico é determinado pelo componente ductal. O carcinoma tubular, também conhecido como carcinoma bem diferenciado, possui prognóstico excelente, quando não mesclado com outros tipos, sendo virtualmente curado em todos os casos por mastectomia ou excisão ampla. Finalmente, o carcinoma medular, do ponto de vista clínico e à mamografia, apresenta-se como uma massa circunscrita, carente de calcificações. A definição patológica do carcinoma medular inclui um infiltrado linfóide que abrange a periferia do tumor. Apesar do aspecto histológico altamente maligno dessa neoplasia, este possui um prognóstico claramente melhor do que o prognóstico do carcinoma ductal ou lobular infiltrante (ROSEN et al., 1997).

## **2.2.2 Estadiamento**

### **2.2.2.1 Estadiamento Histológico**

A graduação histológica baseia-se nas características arquiteturais do tumor (grau histológico), do núcleo (grau nuclear) e da proliferação celular (grau mitótico). A primeira correlação entre grau tumoral e sobrevida foi relatada por Greenough (1925) e modificada por Bloom e Richardson (1957), que passaram a utilizar um sistema de score, que inclui a formação de túbulos, o tamanho, a forma das células e seus núcleos, além da frequência de hiperchromasia e mitose. A pontuação é feita segundo os critérios abaixo descritos:

- *Diferenciação ou formação de túbulos*: se a lâmina mostrar bem marcada a formação de túbulos = 1 ponto; com moderada formação de túbulos = 2 pontos. Se as células mostraram inadequada formação de túbulos = 3 pontos.
- *Pleomorfismo*: caso os núcleos mostrarem satisfatória uniformidade no tamanho, forma e coloração = 1 ponto; quando estas variações forem moderadas = 2 pontos, um marcado grau de pleomorfismo = 3 pontos.
- *Hiperchromasia e mitoses*: a presença ocasional de hiperchromasia com até 10 figuras de mitose = 1 ponto, caso a presença for moderada com 11-20 mitoses = 2 pontos, se a presença for marcante com mais de 20 mitoses = 3 pontos.

A sobrevida está relacionada com a graduação histológica: Grau I (carcinoma bem diferenciado); grau II (moderadamente diferenciado); grau III (pouco diferenciado). Quanto mais indiferenciado o tumor, pior será o prognóstico, conforme Quadro 2.

**Quadro 2 - Graduação histológica do tumor segundo Bloom Richardson, 1957**

| <b>GRAU</b> | <b>PONTOS</b> | <b>CLASSIFICAÇÃO</b>              |
|-------------|---------------|-----------------------------------|
| G I         | 3 – 5         | Diferenciado                      |
| G II        | 6 – 7         | Moderadamente diferenciado        |
| G III       | 8 – 9         | Pouco Diferenciado/Indiferenciado |

### **2.2.2.2 Estadiamento Clínico**

A necessidade de classificar os casos de câncer em estádios clínicos baseia-se na constatação de que as taxas de sobrevida são diferentes quando a doença está restrita ao órgão de origem ou quando esta está presente em outros órgãos. O estadiamento clínico de um caso de neoplasia maligna avalia seu grau de disseminação. Existem regras internacionalmente estabelecidas para realização dos estadiamentos clínicos, as quais estão em constante aperfeiçoamento. O estágio de um tumor reflete não apenas a taxa de crescimento e a extensão da doença, mas também as características do tumor e sua relação com o hospedeiro (BRASIL, 2007).

A classificação das neoplasias malignas em grupos obedece a diferentes variáveis: localização, diagnóstico histopatológico, produção de substâncias, manifestações sistêmicas, duração dos sinais e sintomas, sexo e idade do paciente, dentre outros. Diversos sistemas de estadiamento poderiam ser concebidos, tendo por base uma ou mais das variáveis mencionadas.

O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema de Classificação dos Tumores Malignos-TNM (BRASIL, 2004). Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. O Quadro 3 representa de forma didática o sistema TNM de classificação dos tumores malignos (BRASIL, 2007).

Além das graduações numéricas, as categorias T e N podem ser subclassificadas em graduações alfabéticas (a, b, c). Tanto as graduações numéricas como as alfabéticas expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos. O símbolo "X" é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada.

**Quadro 3 - Sistema de classificação dos tumores malignos**

| <b>TAMANHO DO TUMOR (T)</b>     |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Tx</b>                       | Tumor não pode ser avaliado   |
| <b>Tis</b>                      | Tumor <i>in situ</i>  |
| <b>T1</b>                       | Tumor com até 2 cm, em sua maior dimensão   |
| <b>T1m</b>                      | Carcinoma microinvasor (até 1 mm)   |
| <b>T1a</b>                      | Tumor com até 0,5 cm em sua maior dimensão  |
| <b>T1b</b>                      | Tumor com mais de 0,5 cm e até 1 cm em sua maior dimensão   |
| <b>T1c</b>                      | Tumor com mais de 1 cm, e até 2 cm em sua maior dimensão  |
| <b>T2</b>                       | Tumor com mais de 2 e até 5 cm em sua maior dimensão  |
| <b>T3</b>                       | Tumor com mais de 5 cm, em sua maior dimensão   |
| <b>T4</b>                       | Qualquer T com extensão para pele ou parede torácica  |
| <b>T4a</b>                      | Extensão para a parede torácica   |
| <b>T4b</b>                      | Edema, ulceração da pele, nódulos cutâneos satélites na mesma mama  |
| <b>T4c</b>                      | Associação do T4a e T4b   |
| <b>T4d</b>                      | Carcinoma inflamatório  |
| <b>LINFONODOS REGIONAIS (N)</b> |   |
| <b>Nx</b>                       | Os linfonodos regionais não podem ser avaliados   |
| <b>N0</b>                       | Ausência de metástase   |
| <b>N1</b>                       | Linfonodo(s) homolateral(is) móvel(is) comprometido(s)  |
| <b>N2</b>                       | Metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), fixos uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas ou metástases clinicamente aparente somente para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral   |
| <b>N2a</b>                      | Metástase para linfonodo(s) axila(es) homolateral(is) fixo(s) uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas   |
| <b>N2b</b>                      | Metástase clinicamente aparente somente para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral, sem evidência clínica de metástase axilar  |
| <b>N3</b>                       | Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is), com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es), ou para linfonodo(s) da mamária interna homolateral clinicamente aparente na presença de evidência de metástase para linfonodo(s) axila(es) homolateral(is), ou metástase para linfonodo(s) axilar(es) ou da mamária interna |
| <b>N3a</b>                      | Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is)   |
| <b>N3b</b>                      | Metástase para linfonodo(s) da mamária interna homolateral e para linfonodo(s) axilar(es)   |
| <b>N3c</b>                      | Metástase para linfonodo(s) supraclavicular(ES) homolateral(is)   |
| <b>METÁSTASES (M)</b>           |   |
| <b>Mx</b>                       | Metástase à distância não pode ser avaliada   |
| <b>M0</b>                       | Ausência de metástase à distância   |
| <b>M1</b>                       | Presença de metástase à distância (incluindo LFN supraclaviculares)   |

Fonte: BRASIL, 2007.

Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas e ficam distribuídas em estádios, geralmente, variam de I a IV. Estes estádios podem ser subclassificados em A e B, para expressar o nível de evolução da doença. CIATTO e colaboradores (1990) avaliou 1877 mulheres com tumores de axila negativa e observaram um melhor prognóstico, estatisticamente significativo em T1, sendo que para T2 e T3 não houve diferença significativa no prognóstico quando comparados T2 com T3 e com T4.

Segundo o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), o sistema de estadiamento oferece estratégias para agrupar os pacientes portadores de doenças similares em relação ao prognóstico. No câncer de mama o fator prognóstico mais importante é o comprometimento dos linfonodos axilares pelo tumor, seguido pela positividade para receptores hormonais, além do tamanho do tumor (SINGLETARY; CONNOLLY, 2006).

### **2.3 Marcadores Genéticos de Prognóstico**

Estudos comprovam que diversas doenças que apresentam alterações genéticas têm sua expressão regulada através de fatores ambientais, consideradas atualmente como doenças multifatoriais. O câncer de mama é um exemplo de uma doença multifatorial. A superexpressão de proteínas plasmáticas, marcadores de migração, marcadores de angiogênese, receptores de estrógenos e secreção de enzimas proteolíticas são de significativa importância no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico desta patologia (ANTONIOU et al., 2008).

Os fatores genéticos relacionados com o câncer têm sido intensamente pesquisados e já foram identificadas várias mutações e polimorfismos associados ao câncer de mama (CAMPBELL et al., 2002). A herança genética é poligênica, tendo sido descritos dois principais genes associados ao câncer de mama, o BRCA1, localizado no cromossoma 17 (17q21) e o BRCA2, localizado no cromossoma 13 (13q12-13). Entretanto, menos de 10% de todos os casos de câncer de mama e ovário apresentam características hereditárias, justificando o não rastreamento genético em todas as mulheres, restringindo-se apenas àquelas de alto risco familiar. Nas portadoras de mutação nestes genes, há risco de 80 a 90% de aparecimento de câncer de mama, sendo que em cerca de 50% dos casos o diagnóstico é feito antes dos 50 anos (YEATMAN, 2004; GOMES et al., 2007).

Vários estudos têm sido realizados no sentido de descrever outros genes relacionados ao câncer de mama esporádico ou hereditário. A proteína tirosina quinase transmembranar, é responsável pela tradução de sinais de crescimento celular

(HANAHAN; WEINBERG, 2000). Alterações nos genes do receptor tirosina quinase como mutações pontuais específicas ou amplificação induzem alterações neoplásicas (MULIGAN et al, 1993; SCHIMIDT et al, 1997). O receptor do fator de crescimento de fibroblastos (*FGFR*), família com quatro membros (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* e *FGFR4*) cuja a atividade é mediada pela tirosina quinase, está intimamente relacionado ao crescimento celular, diferenciação, migração, angiogênese e tumorigênese (BURKE et al, 1998).

A presença de polimorfismos no gene *FGFR4* (*fibroblast growth factor receptor 4*), o qual codifica uma proteína transmembrânica tirosina quinase de domínio intracelular, está associada à regulação do ciclo celular. A relação entre a presença do polimorfismo Gly388Arg neste gene e a ocorrência de câncer de mama, bem como sua associação com metástase e menor sobrevida, já foi descrita em trabalhos anteriores (THUSSBAS et al., 2006; SPINOLA et al., 2005). Entretanto, em um estudo de sobrevida em pacientes com câncer de mama linfonodo positivo versus negativo, a presença da mutação não indicou este polimorfismo como um marcador prognóstico relevante (JEZEQUEL et al., 2004). Desta forma, ainda não existe um consenso sobre a importância deste polimorfismo no desenvolvimento da doença. Um estudo que relacionou sobrevida e quimioterapia adjuvante no câncer de mama com o gene *FGFR4* mostrou uma importante relação da mutação Gly388Arg com a progressão do tumor e a resistência à terapia, podendo impactar na necessidade de se encontrar novas condutas estratégicas no tratamento do câncer (THUSSBAS et al., 2006).

Mutações no gene que codifica a enzima metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR*), envolvida no metabolismo da homocisteína, têm demonstrado relação com o desenvolvimento de doenças neoplásicas. Mutações no gene *MTHFR* comprometem os processos de metilação, síntese e reparo do DNA. A enzima *MTHFR* reduz o 5,10-MTHF em 5-MTHF, o qual participa como cofator na metilação da homocisteína em metionina. A incorporação de um grupamento de ATP na metionina resulta na formação da s-adenosilmetionina (*SAM*), a qual é responsável pela doação do radical metil à molécula de DNA. A presença de mutações no gene *MTHFR* implica, portanto, na diminuição da metilação do DNA e no aumento da instabilidade cromossômica. Desta forma, o gene da *MTHFR* torna-se hoje um dos genes candidatos à predisposição ao

câncer. A C677T consiste na principal mutação neste gene e aparece descrita na literatura associada à menor sobrevivência no câncer de mama (CAMPBELL et al., 2002; CHOU et al., 2006; XU et al., 2007). Ainda referente ao alelo 677T, este foi descrito estar associado ao maior risco de câncer de mama em mulheres acima de 55 anos de idade (ERICSON et al., 2009).

Estudos recentes sugerem que mutações no gene *MTHFR* e ingestão de ácido fólico podem modificar a suscetibilidade ao câncer (GAO et al., 2009; ERICSON et al., 2009). Entretanto não há provas de que a falta de folato está associada com o risco do câncer de mama (LEWIS et al., 2006), sendo necessários estudos adicionais para elucidar esta questão.

Já as mutações no gene da hemocromatose (*HFE*), o qual está relacionado ao desenvolvimento da Hemocromatose Hereditária, desencadeiam uma sobrecarga de ferro sérico. As propriedades pró-oxidativas do ferro podem levar a uma instabilidade genômica, podendo desencadear eventos carcinogênicos (KONDRASHOVA et al., 2006). Um dos mecanismos propostos consiste no fato de que a reatividade da molécula de ferro pode causar danos no DNA, seja pela supressão da defesa da célula, ou pela conversão do óxido nítrico, uma molécula pró-apoptótica, em uma molécula anti-apoptótica (GUNEL-OZCAN et al., 2006).

As mutações C282Y e H63D são as principais encontradas no gene *HFE*, cuja ocorrência varia entre as diferentes populações. Observa-se que as frequências mais altas são observadas em populações caucasianas, sendo de 0,50% para a mutação C282Y, e 12,6% para a mutação H63D (PIETRAPEROSA et al., 2003). Estudos têm demonstrado que estas mutações possuem associação com o câncer de mama (GUNEL-OZCAN et al., 2006; KALLIANPUR et al., 2004). No entanto, outros estudos não observaram esta associação, sugerindo que existe uma variabilidade populacional com relação ao encontro destas mutações (KONDRASHOVA et al., 2006).

Dentre os oncogenes responsáveis pelo controle fisiológico de divisão e diferenciação celular, um dos mais estudados é o HER/neu, também descrito como HER2, localizado no cromossoma 17q, o qual codifica uma glicoproteína transmembrânica com atividade tirosina quinase, responsável pela sinalização do crescimento celular. Mutações ou eventos epigenéticos neste oncogene resultará em



uma maior expressão do HER2 e, no câncer de mama, a superexpressão do HER2 configura como um indicador de mau prognóstico (BORG et al., 1989; REVILLION et al., 1998; ARIGA et al., 2005).

Em um estudo com 152 pacientes com câncer de mama, foi observado que 18% apresentaram o receptor HER2 elevado no plasma sanguíneo ao diagnóstico, em contraste a 37% que apresentaram a elevação quando foi diagnosticada a metástase. Dessa forma, a média de sobrevida livre de doença para as pacientes com receptor plasmático HER2 positivo foi significativamente menor em relação às pacientes com HER2 negativo, caracterizando o HER2 como um importante marcador durante o curso da doença, principalmente para avaliar a presença de metástases e otimizar o tratamento (FEHM et al., 2004).

A detecção do HER2 torna-se importante, visto que atualmente existem terapias alvo específicas aprovadas e que têm como objetivo diminuir os efeitos tóxicos do tratamento, além de prolongar a sobrevida da paciente, pois o mecanismo de ação deste medicamento atua no bloqueio da transdução de sinais na angiogênese necessários para o desenvolvimento das metástases (JOHNSON; SEIDMAN, 2005).

As alterações genéticas mais freqüentemente associadas às neoplasias humanas são as mutações no gene supressor de tumor *TP53*, localizado no cromossomo 17p12, que codifica a proteína p53. Diversos estudos relataram que a presença abundante da proteína p53, codificada pelo gene supressor de tumor *TP53* localizado no cromossomo 17p12, consiste em um importante marcador molecular relacionado à agressividade do tumor e ao mau prognóstico da doença (ASKMALM et al., 2004; CHOI et al., 2008). Nas técnicas de imunistoquímica a proteína p53 selvagem tem meia vida curta, portanto não detectável na técnica com anticorpo monoclonal. Porém quando o gene encontra-se mutado, observa-se um acúmulo da proteína por diminuição da sua depuração, passando a ser detectada por esta técnica (CAVALCANTI-JUNIOR et al., 2002).

## **2.4 Outros Marcadores Prognósticos**

### **2.4.1 Capacidade Proliferativa**

A avaliação da capacidade proliferativa dos cânceres de mama tem valor prognóstico. Em geral, o aumento da capacidade proliferativa está associado a um pior prognóstico. Existem vários métodos usados para avaliar a capacidade proliferativa dos cânceres de mama, abrangendo índice mitótico (do ponto de vista da avaliação histológica), estimativa da proporção de células na fase S do ciclo celular por citometria de fluxo, e coloração de imunoistoquímica para proteínas nucleares expressas em células que são ativamente proliferativas (antígenos KI67 ou Mib1) (KAUSCH et al., 2003).

### **2.4.2 Receptores Hormonais**

Mais da metade dos cânceres de mama apresenta a proteína nuclear receptora de estrogênio. Uma proporção ligeiramente menor também possui receptores de progesterona. A presença dessas proteínas, determinada através da reação de imunoistoquímica, vem sendo utilizada como um indicador prognóstico e como um previsor da resposta à terapia hormonal. Mulheres cujos cânceres possuem receptores hormonais apresentam uma sobrevida livre de doença e uma sobrevivência global mais longa do que aquelas portadoras de cânceres em estágio primário negativas para esses receptores (CASTAGNETTA et al., 2002).

Mulheres no climatério com câncer de mama, sem comprometimento axilar, apresentam pior prognóstico em relação ao intervalo livre de doença quando apresentam associação de tumor pouco diferenciado com receptor de estrogênio negativo, p53 e HER2 positivos (ASKMALM et al., 2004; ARIGA et al., 2005).

### **2.4.3 Triplo Negativo**

Por décadas, os carcinomas da mama invasivo foram classificadas de acordo com o tipo histológico, grau e expressão dos receptores hormonais. Entretanto, recentemente com o sucesso da terapia adjuvante alvo em ensaios clínicos, a caracterização da expressão do HER2 tem tornado uma importante ferramenta no prognóstico do câncer de mama.

A atual classificação dos pacientes com câncer de mama inclui três grupos: os tumores receptores hormonais positivos que são tratados com quimioterapia e hormonioterapia; os tumores com superexpressão de HER2 que, além da terapia adjuvante, podem beneficiar-se da terapia alvo com trastuzumab; e, por fim, aqueles com receptor hormonal negativo e HER2 negativo, para os quais a quimioterapia é a única modalidade de tratamento sistêmico disponível (LACROIX et al., 2004; REIS-FILHO et al., 2005). Os tumores com receptores hormonais negativos e HER2 negativo, caracterizam um raro subtipo de câncer chamado triplo negativos, com características clínicas e histológicas específicas, que necessita de novas e efetivas estratégias para melhor predizer o prognóstico (NISHIMURA, R; 2008).

Tem sido demonstrado que as pacientes que apresentam o fenótipo triplo negativo apresentam uma pior evolução clínica devido a um comportamento mais agressivo da doença (NILSEN et al., 2004; BRETON et al., 2005), um potencial metastático diferenciado (HICKS et al., 2006) e um prognóstico pobre, apesar de responder aos tratamentos quimioterápicos neoadjuvante e adjuvante (ROUZIER et al., 2005). Os triplos negativos são responsáveis por 10-17% de todos os carcinomas da mama (CAREY et al, 2007).

Os tumores que afetam frequentemente as pacientes mais jovens, caracterizam-se pela falta de expressão de receptores hormonais, pela presença da mutação no gene TP53 em até 85% do casos, e receptor HER2 negativo, além de apresentarem níveis elevados de proliferação celular (Ki67) (SORLIE et al, 2001; ARRIOLA et al., 2007).

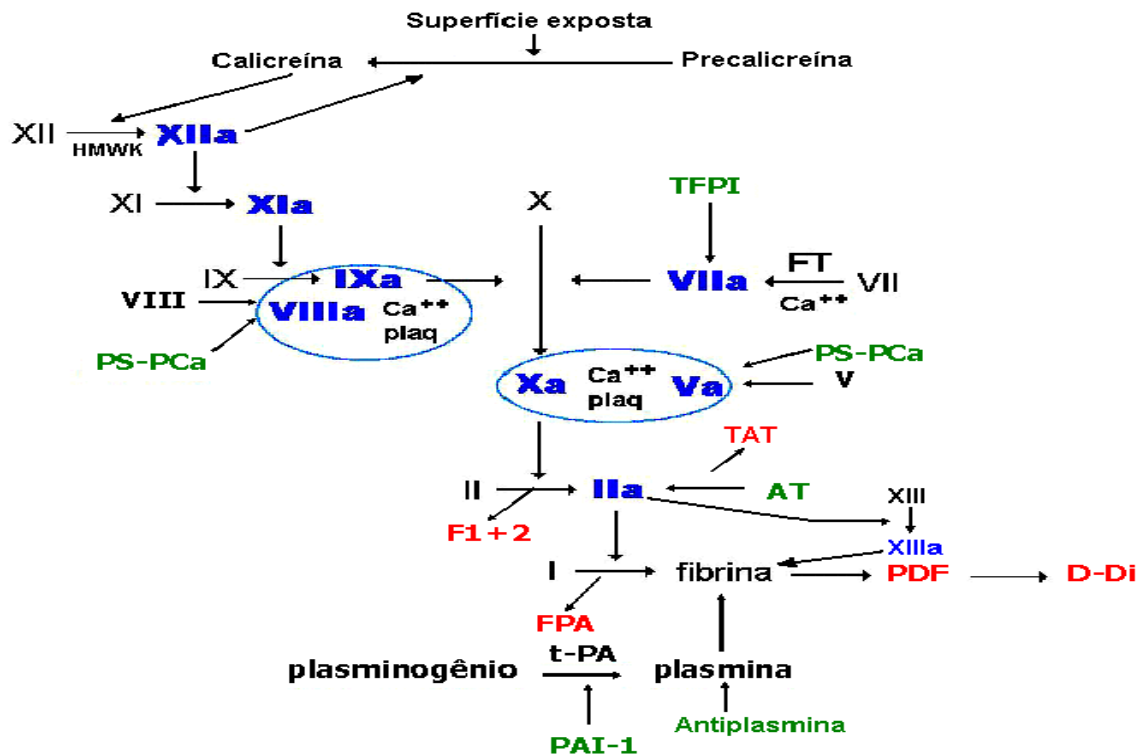
Os tumores triplo negativo acometem os pacientes mais jovens (<50 anos), são mais prevalentes em mulheres Afro-americanas, apresentam risco maior de recorrência

entre o primeiro e terceiro anos e a maioria das mortes ocorrem nos primeiros 5 anos, após o tratamento (MORRIS et al., 2007). Em estudo de 10 anos de seguimento de pacientes com tumores triplo-negativo e tumores com outros fenótipos, observou-se que pacientes com tumores triplo negativo, apresentam significativamente menor sobrevivência após o primeiro evento metastático quando comparados com os não triplo negativo (DENT et al., 2007; RAKHA et al., 2007). Trivers e colaboradores (2009), em um estudo epidemiológico de pacientes com câncer de mama triplo negativo, observaram que este tipo de tumor está mais associado à raça negra, idade jovem (entre 20-54 anos), obesidade (sobrepeso) e ter dado à luz recentemente.

## 2.5 Sistema Hemostático

O complexo processo hemostático envolve a interação entre vasos, plaquetas, fatores procoagulantes e anticoagulantes e, ainda, sistema fibrinolítico. À luz do conhecimento atual, a ativação do mecanismo hemostático deve ser entendida sob dois ângulos: ativação *in vivo* e *in vitro*.

O modelo clássico da cascata da coagulação apresenta uma série de reações seqüenciais envolvendo plaquetas, os fatores de coagulação, os cofatores, e os anticoagulantes naturais (Figura 1). De acordo com este modelo, pode ser produzida uma grande quantidade de trombina, por meio da ativação da via extrínseca (dependente de fator tissular) e/ou intrínseca (dependente do contato com uma superfície carregada negativamente). Entretanto, tal modelo explica apenas as interações que ocorrem entre fatores da coagulação *in vitro*, suportando avaliações laboratoriais, porém não explica satisfatoriamente os mecanismos hemostáticos fisiopatológicos *in vivo*. Além do mais, o modelo não explica por que certos pacientes apresentam uma tendência hemorrágica, bem como não fornece informação segura sobre quais pacientes vão sangrar (HOFFMAN, 2003).



**Figura 1** - Representação esquemática da cascata de coagulação *in vitro* e fibrinólise. Os inibidores da cascata de coagulação e da fibrinólise estão representados em cor verde: Inibidor do fator tissular (TFPI), proteína C ativada (PCa), proteína S (PS), antitrombina (AT), inibidor do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e antiplasmina. Os marcadores de hipercoagulabilidade estão representados em vermelho: fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), complexo trombina-antitrombina (TAT), fiibrinopeptídeo A (FPA), produtos de degradação da fibrina (PDF) e dímero-D (D-Di). Os fatores da coagulação ativados estão representados em cor azul: XIIIa, XIa, IXa, VIIIa, VIIa, Xa, Va, IIa e XIIIa.

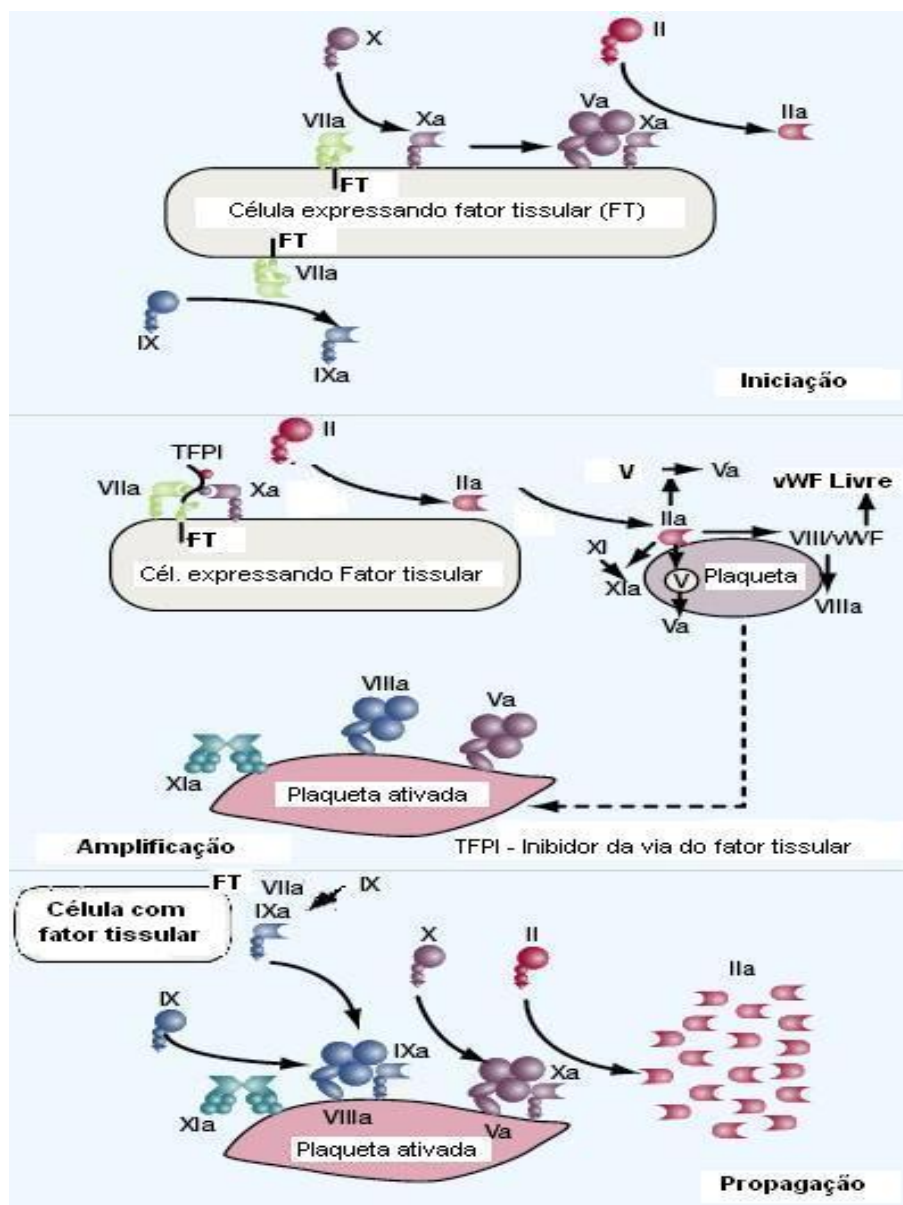
Em uma tentativa de explorar o complexo sistema hemostático sob outro ângulo, foram desenvolvidos modelos conceituais e experimentais que permitiram um maior entendimento de como o sistema hemostático realmente funciona *in vivo* em condições normais. Assim foi desenvolvido um novo modelo hemostático baseado em interações dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas, cujo entendimento vem explicar muitas das questões que permaneciam obscuras pela tradicional teoria da cascata da coagulação.

O modelo atual (Figura 2), baseado em superfícies celulares, estabelece que o processo de coagulação ocorre em uma série de três etapas simultâneas que acontecem sobre diferentes superfícies celulares. A primeira etapa (fase de iniciação) ocorre sobre uma superfície celular que expõe fator tissular. Na segunda etapa (fase de

amplificação), plaquetas e cofatores são ativados para produzir trombina em larga escala. Finalmente, a terceira etapa (fase de propagação) ocorre sobre a superfície de plaquetas e resulta na produção de grande quantidade de trombina, resultando também em grande quantidade de fibrina (HOFFMAN, 2003).

A Figura 2 mostra o modelo atual da hemostasia *in vivo*, no qual fator VII é ativado por se ligar ao fator tissular exposto em uma superfície celular (células endoteliais e monócitos principalmente), cujo complexo (FT-FVIIa) é capaz de ativar o fator X (Xa), o qual em presença de fator Va, é capaz de transformar protrombina em quantidades pequenas de trombina. O complexo FT-FVIIa ativa também o fator IX (IXa) (fase de iniciação). Por outro lado, na fase de amplificação, a trombina formada vai exercer suas várias funções que incluem ativação plaquetária, clivagem do complexo FvW-FVIII resultando na liberação de fator von Willebrand e de fator VIII livres, ativação dos cofatores V em Va e VIII em VIIIa, além da ativação do fator XI em XIa. Na fase de propagação, IXa combina com seu cofator FVIIIa sobre a superfície de plaquetas ativadas. Uma vez formado, o complexo FIXa/FVIIIa ativa o FX em FXa, que imediatamente combina com seu cofator Va. O complexo FXa/FVa então converte grandes quantidades de protrombina em trombina, resultando na clivagem de fibrinogênio para monômeros de fibrina, que se polimerizam em presença do FXIIIa (ativado por trombina), resultando em um coágulo estável de fibrina (HOFFMAN, 2003).

Este novo modelo da hemostasia, baseado em superfícies celulares, permite um melhor entendimento sobre o processo *in vivo*, ao mesmo tempo em que apresenta uma maior consistência com observações clínicas de vários distúrbios da coagulação.



**Figura 2 - Modelo atual da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares *in vivo* adaptado de HOFFMAN (2003): fases de iniciação, de amplificação e de propagação.**

O fator tissular (FT) descrito como o primeiro iniciador da cascata de coagulação, consiste na forma protéica da tromboplastina tecidual, identificada como um pequeno receptor na superfície celular e transmembrana, composto de 261 a 263 aminoácidos, em uma única cadeia polipeptídica, com três diferentes domínios.

Durante o processo de formação de fibrina são gerados peptídeos no plasma, os quais constituem marcadores de hipercoagulabilidade. Estes são constituídos por: a) fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), resultante da ação do complexo protrombinase sobre a protrombina; b) complexo trombina-antitrombina (TAT), resultante da ação neutralizadora da antitrombina sobre a trombina; c) fibrinopeptídeo A, resultante da ação da trombina sobre o fibrinogênio e d) dímero-D, resultante da ação da plasmina sobre a fibrina. Os níveis de dímero-D geralmente aumentam junto com o aparecimento dos complexos trombina-antitrombina (TAT) e do fragmento 1+ 2 que resulta da conversão da protrombina em trombina, embora em pacientes distintos as elevações dos níveis desses marcadores possam variar consideravelmente (BUTENAS et al., 1999).

Os mecanismos reguladores da cascata da coagulação são responsáveis pela inibição dos fatores bioquímicos ativados, evitando a coagulação excessiva e a formação inadequada de fibrina, conseqüentemente, a trombose. Os inibidores fisiológicos da coagulação compreendem o inibidor da via do fator tissular (TFPI), proteína C (PC), proteína S (PS) e antitrombina (AT), cujos mecanismos de ação estão apresentados na Figura 1. O mecanismo de ação dos inibidores PS e PC consiste na inativação dos fatores Va e VIIIa na cascata de coagulação; enquanto a AT exerce sua ação anticoagulante formando um complexo com a trombina (complexo trombina anti-trombina –TAT) (VAN et al., 1997; DUCHEMIN et al., 2008).

Uma vez formado o coágulo, este deve ser removido para que o fluxo sanguíneo seja restabelecido, o que depende da dissolução do coágulo pelo sistema fibrinolítico do qual faz parte o plasminogênio. Este sob a ação de ativadores fisiológicos altamente específicos, o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA), é convertido à plasmina. Esta cliva seqüencialmente uma série de ligações das moléculas de fibrina, liberando produtos de degradação da fibrina (PDF) e peptídeos promovendo a lise do coágulo. Entretanto, estes ativadores têm sua atividade controlada por inibidores constituídos principalmente pelo inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1). Uma vez formada, a plasmina não somente é capaz de degradar coágulos de fibrina (fibrinólise), mas também de degradar o fibrinogênio nativo (fibrinogenólise). Após a degradação da fibrina pela



plasmina ocorre formação de fragmentos denominados dímeros-D, conforme observado na Figura 1 (WEITZ et al., 2002).

## **2.6 Carcinogênese e Hipercoagulabilidade**

Em condições fisiológicas, a função normal do sistema hemostático é mantida por meio do equilíbrio da ação de forças pró e anti-coagulantes do organismo. Em pacientes com câncer, este delicado balanço pode ser rompido (EICHINGER et al., 2003), sendo a trombose a complicação mais comum em pacientes com câncer, a qual pode ser a primeira manifestação subjacente à doença maligna. Os pacientes com câncer e episódios tromboembólicos, em geral, apresentam uma sobrevida menor do que aqueles sem episódios tromboembólicos (SORENSEN et al., 2000).

O câncer em atividade é um potente fator independente e aditivo para as condições de hipercoagulabilidade adquirida. A incidência anual de trombose venosa profunda (TVP) e embolismo pulmonar (EP) entre pacientes com câncer tem sido estimada em 0,5%, sendo de 10 a 20 vezes maior para os pacientes com câncer de ovário avançado, pâncreas, mama, pulmão e tumores de cérebro, além de doenças mieloproliferativas (LINENBERGER; WITTKOWSKY, 2005).

Está bem estabelecido que os fatores componentes da hemostasia tais como, proteínas da coagulação e da fibrinólise, além das plaquetas, apresentam um importante papel no crescimento e progressão do câncer. Entretanto, a formação de fibrina por si só constitui um fator essencial para a angiogênese, assegurando o fornecimento de oxigênio às células tumorais. Assim estas podem proliferar, migrar, além da capacidade de proteólise e permeabilidade vascular, e comprometimento nos mecanismos apoptóticos (BOGENRIEDER; HERLYN, 2003).

Uma associação de neoplasia e episódios trombóticos conduziu ao isolamento de substâncias de tumores humanos com atividade procoagulante, classificadas em duas categorias: fator tissular e câncer procoagulante (CAINE et al., 2002). Níveis elevados de fator tissular estão associados com a progressão clínica do câncer e constituem um marcador prognóstico desfavorável (BULLER et al., 2007).

A exacerbação da expressão do fator tissular em células tumorais e endoteliais é resultante da ativação do oncogene K-ras e perda do gene supressor de tumor p53, bem como por citocinas inflamatórias como interleucina-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (GRIGNANI; MAIOLO, 2000). Estas citocinas também podem influenciar a função dos leucócitos, plaquetas e células endoteliais, resultando em diminuição da expressão de trombospondina sobre as células endoteliais, comprometendo o mecanismo de ativação da proteína C e aumentando a expressão de moléculas de adesão (RICKLES; FALANGA, 2001).

Conforme revisado por Buller (2007), o fator tissular induz a expressão do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e diminui a produção de trombospondina, resultando em maior angiogênese, adesão e migração das células tumorais, além da redução da capacidade apoptótica destas células. O fator tissular constitui o principal ativador do sistema hemostático, favorecendo o crescimento e progressão do câncer, já que a fibrina constitui um elemento essencial para angiogênese.

Ainda segundo Buller em 2007, o câncer procoagulante, uma cisteína protease expressa sobre a superfície de muitas células tumorais, pode diretamente induzir ativação do fator X independente do complexo fator tissular-fator VIIa que usualmente ativam o mecanismo hemostático, resultando na produção de trombina com conseqüente formação de fibrina.

Células tumorais podem expressar também muitas proteínas fibrinolíticas, como ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA), ativador do plasminogênio tissular (tPA), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e tipo 2 (PAI-2), prevalecendo o efeito antifibrinolítico destas proteínas, resultando em acúmulo de fibrina, favorecendo a invasão tumoral, proliferação celular e metástases (KWAAN, 1992). Por outro lado, o excesso de trombina gerado em decorrência da ativação do mecanismo hemostático, além de gerar maior quantidade de fibrina, ativa também plaquetas. A ativação de plaquetas conduz a liberação de fatores de crescimento tais como, VEGF, fator de crescimento derivado das plaquetas, e fator de crescimento de fibroblastos. Estes fatores em conjunto contribuem para a angiogênese e inibem a apoptose (DETMAR, 2000).

A patogênese do sangramento ou das complicações coagulopáticas das doenças malignas envolve a interação de múltiplas variáveis podendo resultar em importantes alterações de testes que avaliam a função hemostática. Assim, tem sido descrita uma associação entre a presença do câncer e uma diminuição do tempo de tromboplastina parcial ativado, além da elevação dos níveis plasmáticos de diversos fatores de coagulação como fibrinogênio, fatores V, VII, IX e XI e dos níveis dos produtos de degradação fibrina. A hiperplasia megacariocítica associada à trombose tem sido também freqüentemente observada em pacientes com câncer de pulmão, ovário, mama, estômago e doença de Hodgkin (CAINE et al., 2002).

A expressão do FT pode ser correlacionada com a diminuição da diferenciação do tumor (RAK et al., 2006). Entretanto, dados referentes à importância do fator tissular em células tumorais como pró-coagulante devem ser interpretados com cautela, uma vez que a expressão funcional e antigênica é fortemente dependente da origem de tecido maligno e pode mudar quando as células são manipuladas *in vitro* (CAINE et al., 2002).

Algumas substâncias também foram obtidas de vários tumores humanos as quais podem agregar plaquetas diretamente. É postulado que proagregantes plaquetários podem induzir a formação de coágulos no endotélio vascular e estimular a ativação hemostática em pacientes com câncer. Outro mecanismo proposto para o aumento da ativação plaquetária nas malignidades inclui a produção de trombina tumor-induzida, produção de ADP pelas células tumorais e elevação nos níveis de fator de von Willebrand (FvW) (LASSER et al., 2006) .

Linenberger e colaboradores em 2005, demonstraram evidência de ativação no sistema hemostático em pacientes com tumores derivados de mucinas (adenocarcinomas), através do achado de níveis plasmáticos elevados de FDP/dímero-D, aumento do número de plaquetas e diminuição nos níveis plasmáticos de antitrombina (AT) e proteína C (PC). Já nos tumores sólidos, leucemias e linfomas foram observados níveis elevados de TF, TFPI, F1+2, TAT, FPA e FDP/dímero-D.

Em um estudo com 140 pacientes com câncer da mama, sendo 102 carcinomas invasivos, observou-se níveis plasmáticos de dímero-D significativamente mais elevados nos carcinomas invasivos em relação às doenças benignas e carcinomas *in*

*situ*. O aumento do dímero-D também foi observado, diretamente relacionado com a presença de nódulos axilares comprometidos, revelando o dímero-D como um fator preditivo positivo para envolvimento linfonodal e predizendo a presença de invasão linfovascular (BLACKWELL et al., 2000).

Erman e colaboradores em 2004 realizaram um estudo com 43 pacientes em câncer de mama, receptores hormonal positivo, as quais faziam uso de Tamoxifeno 20mg/dia como terapia adjuvante. Foram realizados marcadores como TFPI, dímero-D, trombomodulina (TM) entre outros. Os resultados apresentaram uma significativa diminuição para o TFPI, enquanto os valores de dímero-D e TM apresentaram-se normais. Como a função do TFPI é de modular a ativação da cascata de coagulação antagonizando o efeito do fator tissular, estes autores concluíram que as alterações da coagulação e seu mecanismo durante a terapia com Tamoxifeno, estão relacionados com a diminuição dos inibidores da coagulação.

Marcadores hemostáticos laboratoriais refletem diretamente a patogenia das neoplasias. As anormalidades detectadas consistem no aumento dos níveis de fator tissular (o maior ativador do fator VII), fator 4 plaquetário (marcador de ativação das plaquetas), marcadores de geração de trombina ou fibrina (F 1+2, TAT, FPA, t-PA) (CAINE et al., 2002).

O processo de angiogênese encontra-se intimamente ligado ao processo de hemostasia.

Durante o crescimento do tumor, invasão e metástase, ambos os processos são regulados pelas mesmas substâncias fisiológicas. Foi demonstrada uma importante relação entre interleucina-6 (IL)-6 e produtos de degradação de fibrina e dímero-D no prognóstico do câncer de mama metastático. Foi observado também um aumento nos níveis de dímero-D plasmático diretamente relacionado à progressão do tumor e redução da sobrevida no câncer de mama metastático (BENOY et al., 2005).

Resultados elevados para as dosagens de peptídeos tais como FPA, F1+2 e TAT têm sido demonstrados de forma significativa em pacientes com tumores sólidos e leucemias agudas (EICHINGER et al., 2003).

Mielicki e colaboradores (1999), em um estudo com 35 pacientes com câncer, 25 em estágios iniciais (I+II) e 10 em estágio avançado (III), avaliaram os níveis de câncer

procoagulante através de marcadores como: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e concentração dos complexos trombina-antitrombina (TAT). Foi observado um aumento significativo na concentração plasmática do TAT tanto nos pacientes com estágios iniciais como nos estágios avançados, entretanto, a atividade de TP e os resultados do TTPA não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle normal (MIELICKI et al., 1999; MIELICKI, 2001).

As metástases ósseas que são observadas no câncer de mama são associadas à hipercalcemia decorrente da destruição da medula óssea. A hipercalcemia está associada à estimulação da agregação plaquetária. Neste processo pode ser observado um ciclo entre células residuais do tumor que estimulam osteoclastos envolvidos no processo de reabsorção óssea, promovendo o crescimento tumoral. Portanto, a agregação plaquetária, e a formação da trombina são importantes eventos observados neste mecanismo (BOUCHARABA et al., 2004).

O fator tissular tem sido obtido de vários tumores humanos relacionando-se diretamente com a agregação plaquetária (CAINE et al., 2002). Outros mecanismos propostos para a ativação plaquetária associados ao câncer incluem: geração de trombina induzida por tumor, produção de adenosina difosfato (ADP) pelas células tumorais e aumento dos níveis de Fator de von Willebrand e de fator de necrose tumoral (TNF), o qual está aumentado em 50% dos pacientes com câncer (EICHINGER et al., 2003).

Uma sugestão valiosa para controlar a progressão do tumor e o risco de trombose pode ser obtida pelo monitoramento múltiplo de variáveis hemostáticas em pacientes com câncer (PINHO; COUTINHO, 2005).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar em mulheres com câncer de mama, receptor hormonal negativo, em um período de dois anos, possíveis alterações nos níveis plasmáticos de dímero-D e fator tissular e a presença de mutações nos genes da *MTHFR*, *HFE* e *FGFR4* associando-as com marcadores de prognóstico já estabelecidos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o mecanismo hemostático em pacientes com câncer de mama por meio de níveis plasmáticos de dímero-D e fator tissular;
- Relacionar os achados dos marcadores hemostáticos com a evolução da doença durante o tratamento de pacientes com câncer de mama;
- Relacionar os resultados da imunoistoquímica com os marcadores dímero-D e fator tissular;
- Investigar a presença de polimorfismos/mutações nos genes *MTHFR*, *FGFR4* e *HFE* e sua possível associação com o câncer de mama.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Casuística

Este estudo de caráter prospectivo, envolveu 32 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama, submetidas à procedimento cirúrgico para extirpação do tumor, com receptor hormonal negativo, ausência de metástases confirmada por métodos convencionais e com uma média de idade de  $48,50 \pm 8,36$  anos. Como grupo controle, foram selecionadas 63 mulheres aparentemente saudáveis, com faixa etária média de  $46,87 \pm 9,47$ , as quais atenderam aos critérios estabelecidos no questionário de exclusão (APÊNDICE A). Estas mulheres apresentavam idade entre 40 e 70 anos, com história pessoal negativa de câncer ou trombose, e familiar de câncer em parentes de primeiro grau. Estas também não estavam em uso de terapia de reposição hormonal ou uso de anticoncepcional e não estavam grávidas. Todas as participantes eram residentes no município de Itajaí – Santa Catarina, tendo sido o recrutamento das mesmas realizado segundo os critérios descritos abaixo.

O valor preditivo amostral, não pode ser calculado devido a vários fatores, incluindo-se o tempo limitado de coleta de dados e a característica do tumor estudado, focado em pacientes receptor hormonal negativo, mais raro no carcinoma ductal invasivo. Portanto, decidiu-se desenvolver o presente estudo em uma amostra de “conveniência”, porém, salientando-se que este estudo terá continuidade no acompanhamento das pacientes em um período de 5 anos.

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) (ANEXO A) e da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO B). As pacientes e componentes do grupo controle foram cuidadosamente esclarecidas dos objetivos do trabalho. As amostras foram obtidas somente após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B).

#### **4.1.1 Critérios de Inclusão**

O grupo de estudo foi composto por pacientes com diagnóstico de câncer de mama com as seguintes características:

- Carcinoma ductal invasivo; - Graduação histológica GI a GIII; - Sem metástases; - Receptores hormonais para estrogênio e progesterona negativos.

As participantes foram selecionadas na Unidade de Oncologia CEPON, por equipe especializada em oncologia da cidade de Itajaí – SC, no período de 2006-2007.

#### **4.1.2 Planejamento Experimental**

Neste estudo prospectivo, as pacientes foram submetidas à coleta de sangue, em três momentos: logo após o diagnóstico; oito meses após o diagnóstico, ao final da quimioterapia de primeira linha; e vinte e quatro meses após diagnóstico inicial. Estudos hemostáticos compreendendo dímero-D e fator tissular foram realizados nas amostras obtidas nos três momentos, caracterizando um estudo longitudinal. Na primeira amostra, foram também realizados testes moleculares para pesquisa de mutação/polimorfismo.

A coleta das participantes do grupo controle foi realizada em paralelo à coleta das pacientes e em um único momento, quando obedecidos os critérios de seleção.

#### **4.2 Amostras Biológicas**

As pacientes foram submetidas à coleta de sangue pelo sistema Vacutainer<sup>®</sup> (5 mL em K3EDTA e 5 mL em citrato de sódio 0,105 M). As amostras coletadas em citrato de sódio foram centrifugadas e o plasma foi aliquoteado em volumes de 200 microlitros em tubos do tipo Eppendorf<sup>®</sup> e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . No momento da realização da análise, as amostras foram descongeladas, procedendo-se à metodologia de Enzima Imuno Ensaio (ELISA) para avaliação dos níveis plasmáticos de dímero-D e



Fator Tissular. As amostras com EDTA foram encaminhadas ao setor de Biologia Molecular para extração do DNA e posterior realização da pesquisa das mutações/polimorfismos previstos no projeto.

### **4.3 Método**

#### **4.3.1 Parâmetros Hemostáticos**

##### *a) Determinação do dímero-D*

A determinação quantitativa de dímero-D em amostras de plasma humano citratado foi realizada pelo método enzima imuno-ensaio (ELISA), utilizando anticorpos monoclonais anti-dímero-D acoplados à superfície de uma placa. Após a ligação do antígeno e da lavagem daqueles que não se ligaram, um segundo anticorpo monoclonal de camundongo anti dímero-D com peroxidase foi adicionado o qual se liga aos determinantes antigênicos formando um *sandwich*. Em seguida, uma segunda lavagem foi feita para a remoção dos anticorpos livres que não se ligaram. A enzima peroxidase ligada ao segundo anticorpo reagiu então com o substrato cromogênico orto-fenilenodiamina (OPD) na presença de peróxido de hidrogênio. Após interrupção da reação com um ácido forte, a intensidade de cor produzida foi diretamente proporcional à concentração de dímero-D na amostra. O ensaio foi realizado utilizando a metodologia IMUNOCLONE D-Dimer ELISA (America Diagnóstica<sup>®</sup> INC, Stanford, CT), e o resultado determinada por meio de curva padrão construída a partir de diluições do plasma calibrador com concentração conhecida, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. Valor de referência: < 500 ng/mL.

Esta determinação foi realizada em três momentos distintos nas pacientes com câncer de mama: logo após o diagnóstico do câncer de mama (CA1), ao término da quimioterapia (CA2) e após 24 meses do diagnóstico do câncer de mama (CA3). Para o

grupo controle os níveis plasmáticos de dímero-D foram determinados em apenas um momento.

#### *b) Determinação do Fator Tissular (TF)*

A determinação do TF foi realizada no plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico IMUNBIND<sup>®</sup> TF ELISA (American Diagnóstica Inc., Stamford, USA), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, já descrito para o Dímero-D, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

A curva de calibração foi construída de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o calibrador fornecido, obtendo-se os pontos de 0; 50; 100; 200; 500; 1000pg/mL. A leitura, em 450nm, foi realizada utilizando-se o equipamento Spectra Max-340 (Molecular Devices<sup>®</sup>) e a concentração de TF das amostras foi obtida através da equação:  $y=0,0021x+0,2828$  ( $R^2 = 0,9919$ ). O valor de referência ainda não foi estabelecido na literatura.

Esta determinação foi realizada em três momentos distintos nas pacientes com câncer de mama: logo após o diagnóstico do câncer de mama (CA1), ao término da quimioterapia (CA2) e após 24 meses do diagnóstico do câncer de mama (CA3). Para o grupo controle os níveis plasmáticos de fator tissular foram determinados em apenas um momento.

### **4.3.2. Parâmetros Moleculares**

O preparo dos reagentes para as análises moleculares está descrito no ANEXO C.

#### **4.3.2.1 Extração de DNA**

As amostras de DNA foram obtidas a partir de 300 µL de sangue total colhido em EDTA, submetidas ao processo de extração segundo o protocolo descrito no ANEXO D, e, posteriormente, foram estocadas em temperatura de 2-8°C até sua utilização.

#### **4.3.2.2. Pesquisa dos Polimorfismos e Mutações**

Os polimorfismos e as mutações foram pesquisados através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática (RFLP), realizada em ambiente separado por áreas para evitar contaminação. Para isto, foram utilizadas as seqüências de oligonucleotídeos e as respectivas condições de amplificação conforme descritas na Tabela 1. Foi utilizado para a amplificação do material o termociclador MJ Research®, modelo PTC-100 (USA). Seguindo-se à digestão enzimática, os fragmentos foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados com solução de nitrato de prata (SAMBROOK, 1989).

**Tabela 1 – Seqüência de oligonucleotídeos e condições de amplificação utilizados na PCR de fragmentos do gene *MTHFR*, *FGFR4* e *HFE***

| Gene                               | Seqüência de oligonucleotídeos    | Condições de amplificação |             |           |
|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------|-----------|
| <b><i>MTHFR</i></b>                | S: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'  | 94°                       | 3 minutos   | 40 ciclos |
|                                    | A: 5'-AGGACGGTTCGGTGAGAGTG-3'     | 94°                       | 1 minuto    |           |
|                                    |                                   | 65°                       | 30 segundos |           |
|                                    |                                   | 72°                       | 1 minuto    |           |
|                                    |                                   | 72°                       | 10 minutos  |           |
| <b><i>FGFR4</i></b>                | S: 5'-GACCGCAGCAGCGCCCGAGGCCAG-3' | 95°                       | 7 minutos   | 40 ciclos |
|                                    | A: 5'-CAGAAGCTCTCCCGCTTCCCTCT-3'  | 94°                       | 1 minuto    |           |
|                                    |                                   | 67°                       | 1 minuto    |           |
|                                    |                                   | 72°                       | 1 minuto    |           |
|                                    |                                   | 72°                       | 10 minutos  |           |
| <b><i>HFE</i><br/><i>C282Y</i></b> | S: 5'-TGGCAAGGGTAAACAGATCC-3'     | 96°                       | 2 minutos   | 40 ciclos |
|                                    | A: 5'-CTCAGGCACTCCTCTCAACC-3'     | 96°                       | 30 segundos |           |
|                                    |                                   | 56°                       | 1 minuto    |           |
| <b><i>HFE</i><br/><i>H63D</i></b>  | S: 5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3'     | 72°                       | 1 minuto    | 40 ciclos |
|                                    | A: GCCACATCTGGCTTGAATT-3'         | 72°                       | 10 minutos  |           |

S: oligonucleotídeo senso

A: oligonucleotídeo antisenso

**Tabela 2 - Preparo das reações de PCR e digestão para a *MTHFR* (C667T), *FGFR4* (Gly388Arg) e *HFE* (C828Y e H63D)**

|                              | C677T              | Gly388Arg            | C282Y               | H63D                |
|------------------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Condições de PCR</b>      |                    |                      |                     |                     |
| Água tipo I                  | 15,1 µL            | 18,7 µL              | 14,8 µL             | 15,7 µL             |
| Tampão                       | 2,0 µL             | 2,4 µL               | 2,0 µL              | 2,0 µL              |
| dNTPs                        | 2,0 µL             | 1,5 µL               | 1,5 µL              | 1,5 µL              |
| Oligo S                      | 0,1 µL             | 1,3 µL               | 0,5 µL              | 0,5 µL              |
| Oligo A                      | 0,1 µL             | 1,3 µL               | 0,5 µL              | 0,5 µL              |
| Enzima Taq DNA polimerase    | 0,2 µL             | 0,3 µL               | 0,10 µL             | 0,15 µL             |
|                              |                    | (Platinum)           |                     |                     |
| DNA extraído                 | 0,5 µL             | 1,3 µL               | 0,5 µL              | 0,5 µL              |
| <b>Condições de Digestão</b> |                    |                      |                     |                     |
| Água tipo I                  | 7,0 µL             | 5,8 µL               | 10,3 µL             | 10,3 µL             |
| Tampão                       | 2,0 µL             | 1,5 µL               | 2,0 µL              | 2,0 µL              |
| Enzima de restrição          | 7 µL <i>Hinf</i> I | 7,0 µL <i>Bstn</i> I | 0,7 µL <i>RSA</i> I | 0,7 µL <i>Bcl</i> I |
| Produto de PCR               | 10 µL              | 7,5 µL               | 7,0 µL              | 7,0 µL              |

S: senso, A: antisenso.

#### 4.4 Análise Estatística

As curvas de sobrevida foram obtidas por meio do método de Kaplan Meier (Log-rank). Como os valores de dímero-D e fator tissular não seguiram uma distribuição normal, estes foram apresentados em mediana e diferença interquartílica. Para comparações dos resultados de dímero-D e fator tissular entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann Whitney, enquanto ANOVA foi utilizado para comparação dos resultados entre três grupos. A análise de correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar os testes de Dímero-D e fator tissular. Para todas as análises foram utilizados os valores de dímero-D ao diagnóstico (CA1), exceto quando se compararam os níveis destes

marcadores entre sobreviventes e não sobreviventes (**Figura 5B**) e entre mulheres com e sem metástases (**Figura 7B**). Neste caso, foram utilizados os valores de dímero-D obtidos mais próximos ao óbito (CA1, CA2 ou CA3). O mesmo procedimento foi adotado para as respectivas análises em relação ao fator tissular (**Figuras 10B e 12B**).

Para investigar a associação entre o desenvolvimento de metástase/óbito e variáveis clínicas de prognóstico foi utilizado um modelo de regressão logística univariado com intervalo de confiança de 95%. O mesmo modelo foi também aplicado para se investigar associação entre níveis de dímero-D e as variáveis clínicas de prognóstico tais como fenótipo triplo negativo, metástase/óbito, idade, status linfonodal, tamanho do tumor, presença de HER2 e p53, e Ki67>25%.

Quanto às análises moleculares, para testar a hipótese de independência entre os grupos de estudo, foi utilizado o teste de qui-quadrado. Para testar a associação entre o desenvolvimento do câncer de mama e a presença de mutação, foi utilizado o modelo de regressão logística múltipla com um intervalo de confiança de 95%. O cálculo das probabilidades foi obtido a partir do modelo de regressão logística múltiplo, substituindo as variáveis independentes por zero (quando ausente) e 1 (quando presente). A partir disso, calculou-se a probabilidade de ocorrência da variável dependente (metástase/óbito).

Para todas as hipóteses testadas foi considerado o nível de probabilidade de erro  $p < 0,05$ .

Foi utilizado o programa GrafPad Prism versão 4.00 for. Windows (GraphPad Software, San. Diego Califórnia, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Aspectos clínico-patológicos

As características clínico-patológicas das pacientes estudadas estão apresentadas na **Tabela 3**. Oito óbitos foram observados no decorrer do estudo, sendo cinco até o momento da segunda coleta e três ao final do estudo, perfazendo um total de 25%. Como não havia a informação sobre o *status* menopausal de todas as mulheres com câncer de mama, a idade de 50 anos foi adotada como o limite acima do qual as mulheres foram consideradas em menopausa, conforme descrito na literatura (PANSINI et al., 2008). Assim, dezessete mulheres estavam em pré-menopausa (53,13%) e 15 em pós-menopausa (46,87%). Com relação ao tipo e grau histológico, todos os carcinomas eram ductais invasivos (100%) e com pouca diferenciação (GIII 71,85%) foram predominantes. Os tumores foram também classificados segundo o tamanho, de T1 a T4, sendo o mais freqüente o T2 (53,12%). Por outro lado, pacientes com tumores com comprometimento linfonodal foram ligeiramente mais freqüentes (53,13%). Quando observados os resultados imunoistoquímicos, a maioria das pacientes apresentou negatividade tanto para o HER2 (53,13%) como para o p53 (71,85%), bem como uma maior capacidade de proliferação por meio da avaliação do Ki67 (Ki67>25% em 62,60% das pacientes). É importante salientar que, à época da seleção das pacientes, não havia disponibilidade do teste de FISH para confirmar os resultados inconclusivos para HER2, resultando em um subgrupo de sete pacientes (21,87%) com HER2 indeterminado.

Quanto ao subtipo triplo negativo, 17 pacientes (53,13%), foram classificadas nesta categoria. Das oito pacientes que vieram à óbito, cinco eram triplo negativo (62,5%), ou seja, 29,41% do total de 17 pacientes com esta característica. As outras três mulheres que vieram à óbito eram não triplo, ou seja, 20% do total de 15 sem esta característica.

Cumprido ressaltar que foram observados dois abandonos de tratamento durante o estudo.

**Tabela 3 - Características clínico-patológicas das pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, atendidas no CEPON, na cidade de Itajaí-SC no período de 2006 a 2009**

|                           |           |             |
|---------------------------|-----------|-------------|
| <b>Pacientes</b>          | <b>32</b> | <b>100%</b> |
| Sobreviventes             | 22        | 68,75%      |
| Óbitos                    | 08        | 25,00%      |
| Abandonos                 | 02        | 6,25%       |
| <b>Metástase</b>          |           |             |
| Positivo                  | 12        | 37,50%      |
| Negativo                  | 18        | 56,25%      |
| Abandonos                 | 02        | 6,25%       |
| <b>Status menopausal</b>  |           |             |
| Pré-menopausa             | 17        | 53,13%      |
| Pós-menopausa             | 15        | 46,87%      |
| <b>Tipo Histológico</b>   |           |             |
| Carcinoma Ductal Invasivo | 32        | 100%        |
| <b>Grau Histológico</b>   |           |             |
| GI                        | 02        | 6,25%       |
| GII                       | 07        | 21,90%      |
| GIII                      | 23        | 71,85%      |
| <b>Tamanho do Tumor</b>   |           |             |
| T1                        | 03        | 9,38%       |
| T2                        | 17        | 53,12%      |
| T3                        | 08        | 25,00%      |
| T4                        | 04        | 12,50%      |
| <b>Linfonodos</b>         |           |             |
| Negativos                 | 15        | 46,87%      |
| Positivos                 | 17        | 53,13%      |
| <b>Imunoistoquímica</b>   |           |             |
| HER2 (+++) Positivo       | 08        | 25,00%      |
| HER2 (++) Indeterminado   | 07        | 21,87%      |
| HER2 (+ ou -) Negativo    | 17        | 53,13%      |
| P53 Positivo              | 09        | 28,15%      |
| P53 Negativo              | 23        | 71,85%      |
| Ki 67 < 25%               | 12        | 27,50%      |
| Ki 67 >25%                | 20        | 62,50%      |

A **Tabela 4** mostra os resultados referentes à análise de regressão logística univariada entre o aparecimento de metástase/óbito e as variáveis clínicas de prognóstico como triplo negativo, idade (referência de 50 anos), comprometimento de linfonodos, grau de diferenciação, presença de HER2 e p53, e proliferação de Ki67, utilizando 25% como ponto de corte. Exceto para a variável de prognóstico p53, que se mostrou associada ao aparecimento de metástase/óbito (OR=6,00; p=0,03), as outras variáveis não se mostraram associadas com este evento.

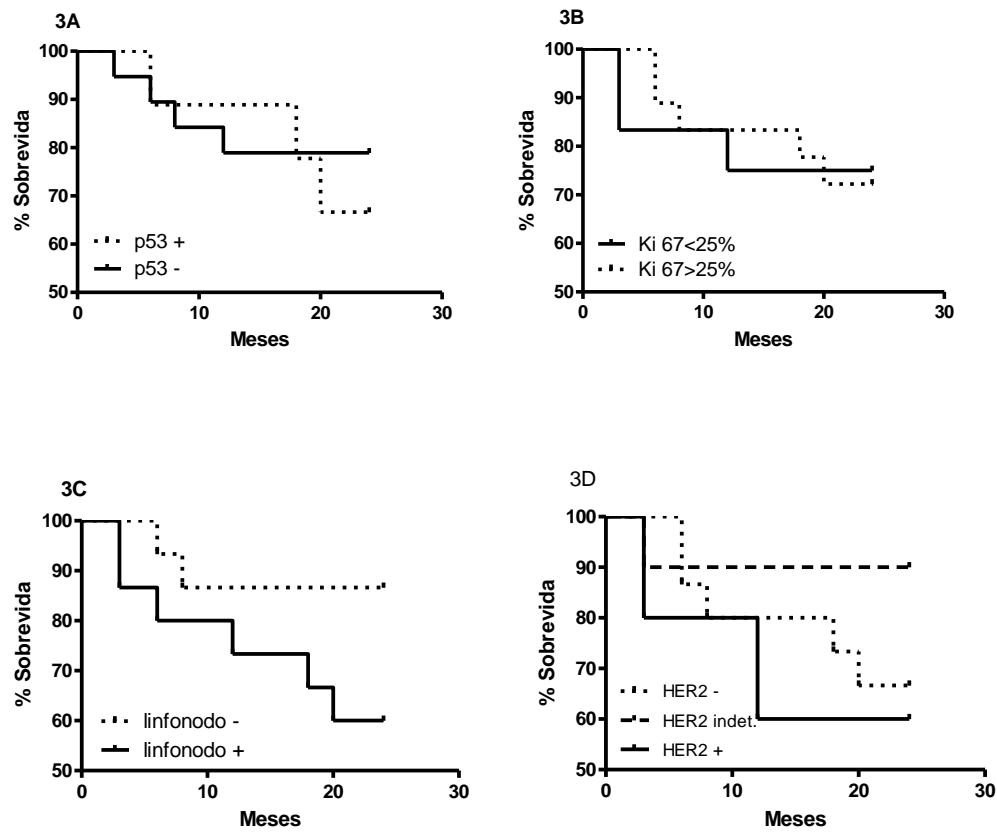
**Tabela 4 - Análise de regressão logística univariada entre metástase/óbito e variáveis de prognóstico**

| <b>Variáveis de prognóstico</b> | <b>Valor de p</b> | <b>Odds ratio</b> | <b>IC 95%</b> |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| <b>Triplo negativo</b>          | 0,2946            | 0,4545            | 0,10 – 1,98   |
| <b>Idade</b>                    | 0,8953            | 1,10              | 0,26 – 4,54   |
| <b>Linfonodos</b>               | 0,1937            | 2,66              | 0,60 – 11,70  |
| <b>Grau de diferenciação</b>    | 0,4850            | 0,52              | 0,83 – 3,25   |
| <b>HER2</b>                     | 0,35              | 2,40              | 0,37 – 15,27  |
| <b>p53</b>                      | 0,03*             | 6,00              | 1,13 – 31,73  |
| <b>Ki67</b>                     | 0,19              | 2,66              | 0,60 – 11,70  |

\* Indica diferença significativa.

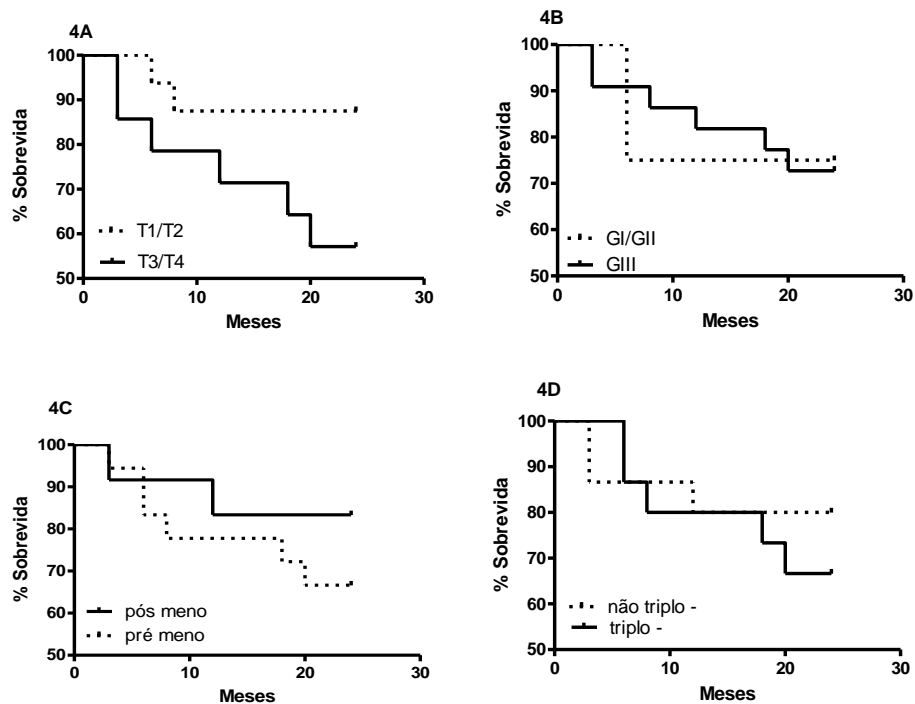
A **Figura 3** mostra as curvas de sobrevida em função das variáveis de prognóstico: p53 (**3A**), Ki67 (**3B**), *status* linfonodal (**3C**) e expressão de HER2 (**3D**). Quando analisadas individualmente, nenhuma variável influenciou significativamente a sobrevida das pacientes com câncer de mama.





**Figura 3** – Curva de sobrevivida de Kaplan Meier em relação às variáveis de prognóstico. 3A – p53 ( $p=0,575$ ), 3B – Ki 67 ( $p=0,961$ ), 3C – *status* linfonodal ( $p=0,109$ ), 3D – expressão do receptor HER2 ( $p=0,318$ ).

A **Figura 4** mostra as curvas de sobrevivida em função das variáveis de prognóstico: tamanho do tumor (**4A**), grau de diferenciação (**4B**), *status* menopausal (**4C**) e triplo negativo (**4D**). Quando analisadas individualmente, as variáveis grau de diferenciação do tumor, *status* menopausal (idade) e o fenótipo triplo negativo não influenciaram significativamente a sobrevivida das pacientes do presente estudo. Entretanto, foi observada uma tendência à menor sobrevivida em mulheres com tumores maiores ( $p=0,067$ ).



**Figura 4 – Curva de sobrevivida de Kaplan Meier em relação às variáveis de prognóstico. 4A – Tamanho do tumor ( $p=0,067$ ), 4B – Grau histológico do tumor ( $p=0,944$ ), 4C – Status menopausal ( $p=0,345$ ), 4D – Triplo negativo ( $p=0,488$ ).**

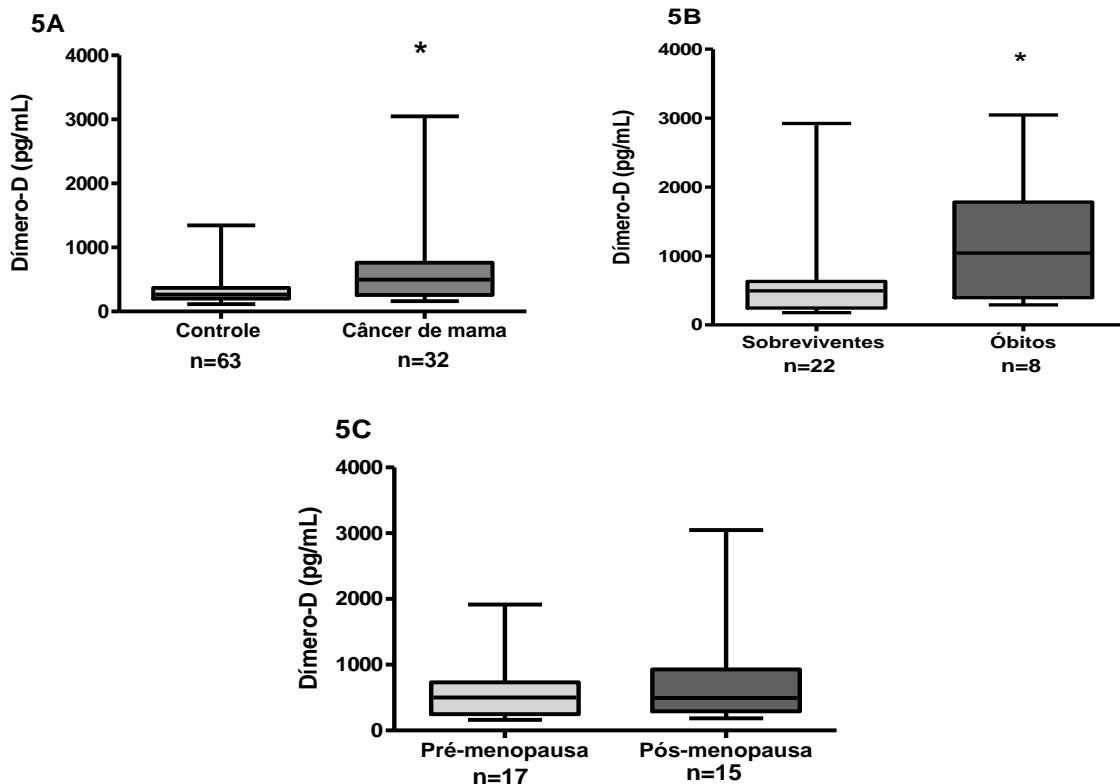
## 5.2 Aspectos hemostáticos

### 5.2.1 Dímero-D

Os níveis plasmáticos de dímero-D em mulheres com câncer de mama, no momento do diagnóstico (primeira coleta) expressos em mediana e diferença interquartílica, foram tabulados de acordo com as variáveis clínicas. Quando comparado o grupo de pacientes com câncer de mama *versus* o grupo controle, foi observada uma diferença significativa nos níveis plasmáticos de dímero-D entre os dois grupos ( $p=0,0002$ ). As medianas e diferenças interquartílicas do dímero-D em pacientes com câncer de mama e no grupo controle foram 498,8 pg/mL (257,3-760,2) e 263,3,7 pg/mL (202,8-366,8), respectivamente (**Figura 5A**).

Quando foi avaliada a sobrevida em função do dímero-D entre as pacientes com câncer de mama, os resultados mostraram medianas de 495,4 pg/mL (245,6-631,6) para as pacientes sobreviventes *versus* 1042,0 pg/mL (394,5-1783) para os óbitos, apresentando uma diferença significativa ( $p=0,047$ ; **Figura 5B**).

A comparação entre os níveis de dímero-D para as mulheres que já se encontravam em menopausa não apresentou diferença significativa em relação às mulheres que não estavam em menopausa, com uma mediana de 502,2 pg/mL (247,2-730,9) para pré-menopausa e 495,4 pg/mL (290,7-928,0) para pós-menopausa ( $p=0,820$ ; **Figura 5C**).



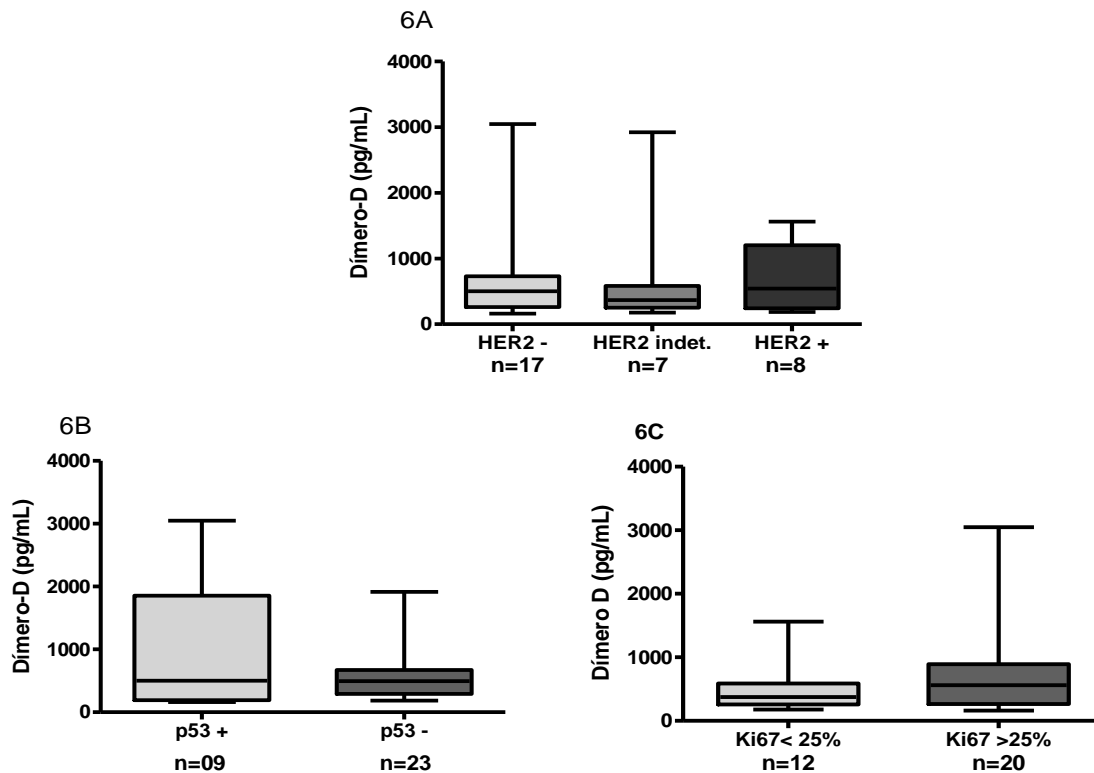
**Figura 5** – Níveis plasmáticos de dímero-D em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, relacionado às diferentes variáveis clínicas. 5A – Câncer de mama *versus* grupo controle ( $p=0,0002$ ); 5B – Mulheres com câncer de mama sobreviventes *versus* óbitos ( $p=0,047$ ) e 5C – Mulheres com câncer de mama em pré-menopausa *versus* pós-menopausa ( $p=0,820$ ).

\* Indica diferença significativa entre os grupos.

A mediana dos níveis plasmáticos do dímero-D em pacientes com tumor de mama com receptor negativo para HER2 foi de 502,2 pg/mL (261,3-730,9). Para resultados de HER2 (++) considerados indeterminados, a mediana do dímero-D foi 368,1 pg/mL (250,2-582,6), enquanto para pacientes com expressão do oncogene HER2 positivo (+++), a mediana foi 543,1 pg/mL (241,1-1203), não tendo sido observada diferença significativa entre os três grupos ( $p=0,825$ ) (**Figura 6A**).

Quanto à variável p53, o valor da mediana para dímero-D foi de 502,2 pg/mL (190,7-1856,0) em mulheres apresentando positividade para p53 *versus* 495,4 pg/mL (290,7-672,4) para mulheres com p53 negativo, sendo que esta diferença não foi significativa ( $p=0,834$ ; **Figura 6B**).

Considerando o marcador de proliferação celular Ki67, as pacientes foram classificadas em dois grupos, Ki67<25% e Ki67>25%. O primeiro grupo apresentou uma mediana de dímero-D igual a 376,3 pg/mL (257,3-588,8), enquanto o segundo grupo apresentou uma mediana de 561,0 pg/mL (265,4-893,3), não tendo sido observada diferença significativa entre os grupos ( $p=0,250$ ; **Figura 6C**).



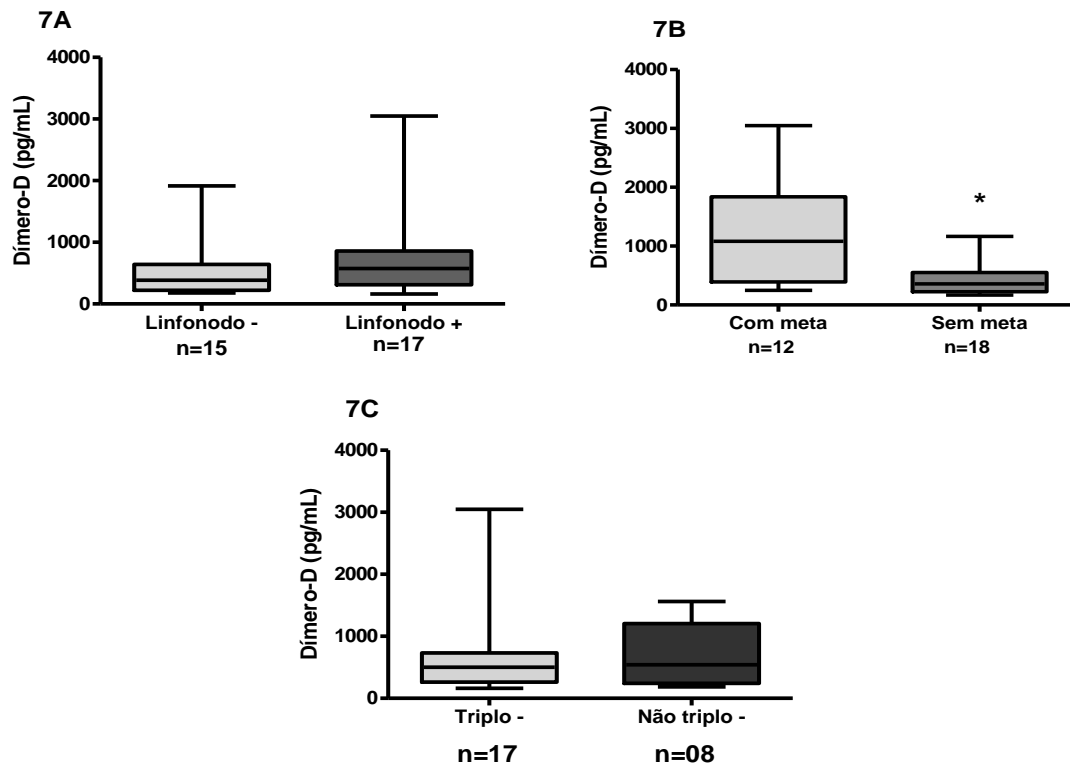
**Figura 6-** Níveis plasmáticos de dímero-D em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo e características imunoistoquímicas. 6A – Pacientes com variação na expressão de HER2 ( $p=0,825$ ); 6B – Pacientes com p53 positivo ou negativo ( $p=0,834$ ); 6C – Pacientes com Ki67<25% ou Ki67>25% ( $p=0,250$ ).

Quando analisados os resultados de dímero-D para pacientes com e sem comprometimento de linfonodos, foi encontrada uma mediana de 384,5 pg/mL (221,9-641,0) para as pacientes que apresentaram linfonodos negativos, e uma mediana de 576,4 pg/mL (310-858,7) para mulheres com linfonodos positivos, não sendo esta diferença significativa ( $p=0,249$ ; **Figura 7A**).

Em um total de 12 pacientes que apresentavam metástases, sendo que oito destas evoluíram para óbito, os valores de mediana para dímero-D foram de 1082 pg/mL (393,2-1837), os quais apresentaram diferença significativa quando comparados aos valores de mediana do grupo de mulheres que não apresentou metástase (mediana = 358,5 pg/mL; 226,1-551,5;  $p=0,007$ ) (**Figura 7B**).

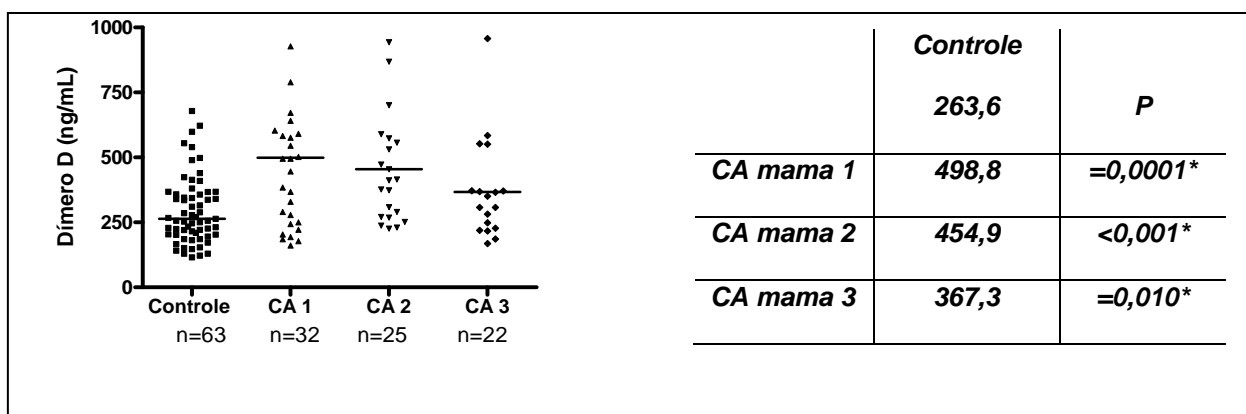
Quanto ao subgrupo triplo negativo, as pacientes apresentaram dímero-D com um valor de mediana de 502,2 pg/mL (261,3-730,9), enquanto para as mulheres que

apresentaram tumores não triplo negativo foi encontrada uma mediana de 543,1 pg/mL (241,4-1.203,0), não tendo sido observada diferença significativa entre os grupos ( $p=0,976$ ) (**Figura 7C**). As pacientes que apresentavam o resultado de HER2 indeterminados ( $n=7$ ) foram excluídas da análise estatística do grupo triplo negativo.



**Figura 7** – Níveis plasmáticos de dímero-D em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo. 7A – Mulheres com linfonodos positivos ou negativos ( $p=0,249$ ). 7B – Mulheres com evolução metastática ou sem metástase ( $p=0,007$ ); e 7C – Mulheres com tumor triplo negativo *versus* não triplo ( $p=0,976$ ). \*Indica diferença significativa entre os grupos.

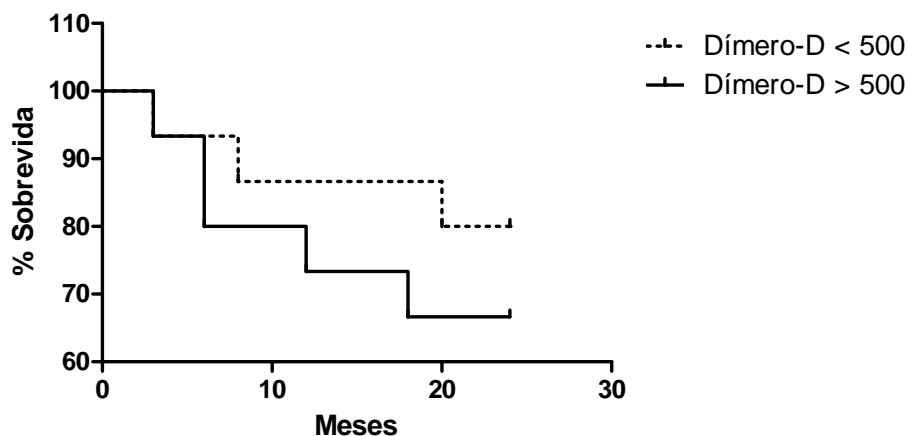
Quando foram comparadas as medianas de dímero-D observadas para os grupos controle, para pacientes com câncer de mama no momento do diagnóstico (CA1), ao término dos oito meses de quimioterapia (CA2) e dois anos após o diagnóstico (CA3), estas diferiram significativamente entre os valores do grupo controle e todos os outros grupos ( $p=0,0001$ ;  $p<0,001$  e  $p=0,010$ , respectivamente; **Figura 8**). Porém, não foi observada diferença significativa entre os grupos CA1 *versus* CA2 ( $p=0,921$ ), CA1 *versus* CA3 ( $p=0,359$ ) e CA2 *versus* CA3 ( $p=0,225$ ).



**Figura 8** – Medianas de dímero-D do grupo controle e nos três momentos da coleta de sangue.

\* Indica diferença significativa entre os grupos.

A curva de sobrevida das pacientes com câncer de mama em relação aos níveis plasmáticos de dímero-D, distribuídos em valores inferiores e superiores a 500,0 ng/mL (valor de referência para o analito), em um período de 24 meses pode ser observada na **Figura 9**. Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa ( $p=0,404$ ) em relação à sobrevida entre as mulheres com dímero-D superior ou inferior a 500,0 ng/mL.



**Figura 9**– Curva de sobrevida em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, em relação às determinações do dímero-D, Kaplan Meier ( $p=0,404$ ).

A **Tabela 5** mostra os resultados de uma análise de regressão logística univariada entre os níveis de dímero-D em relação às variáveis clínicas de prognóstico como triplo negativo, presença metástase/óbito, idade < 50 anos, comprometimento de linfonodos, tamanho do tumor, presença de HER2 (+++) e p53, e Ki67 >30%. Conforme mostrado abaixo, as variáveis de prognóstico não apresentaram relação com os níveis plasmáticos de dímero-D (p=ns).

**Tabela 5 – Análise de regressão logística univariada entre dímero-D e variáveis de prognóstico.**

|                          | Valor de <i>p</i> | Odds ratio  | IC 95%       |
|--------------------------|-------------------|-------------|--------------|
| <b>Triplo negativo</b>   | 0,224             | 2,38        | 0,588-9,646  |
| <b>Metástase/óbitos</b>  | 0,612             | 1,47        | 0,335-6,430  |
| <b>Idade</b>             | 0,866             | 1,12        | 0,287-4,412  |
| <b>Status linfonodal</b> | 0,388             | 1,84        | 0,461-7,312  |
| <b>Tamanho tumor</b>     | 0,194             | <b>2,67</b> | 0,608-11,703 |
| <b>HER2</b>              | 0,268             | 2,50        | 0,495-12,635 |
| <b>P53</b>               | 0,776             | 1,25        | 0,268-5,826  |
| <b>Ki 67</b>             | 0,368             | 1,84        | 0,461-7,312  |

### **5.2.2 Fator tissular (FT)**

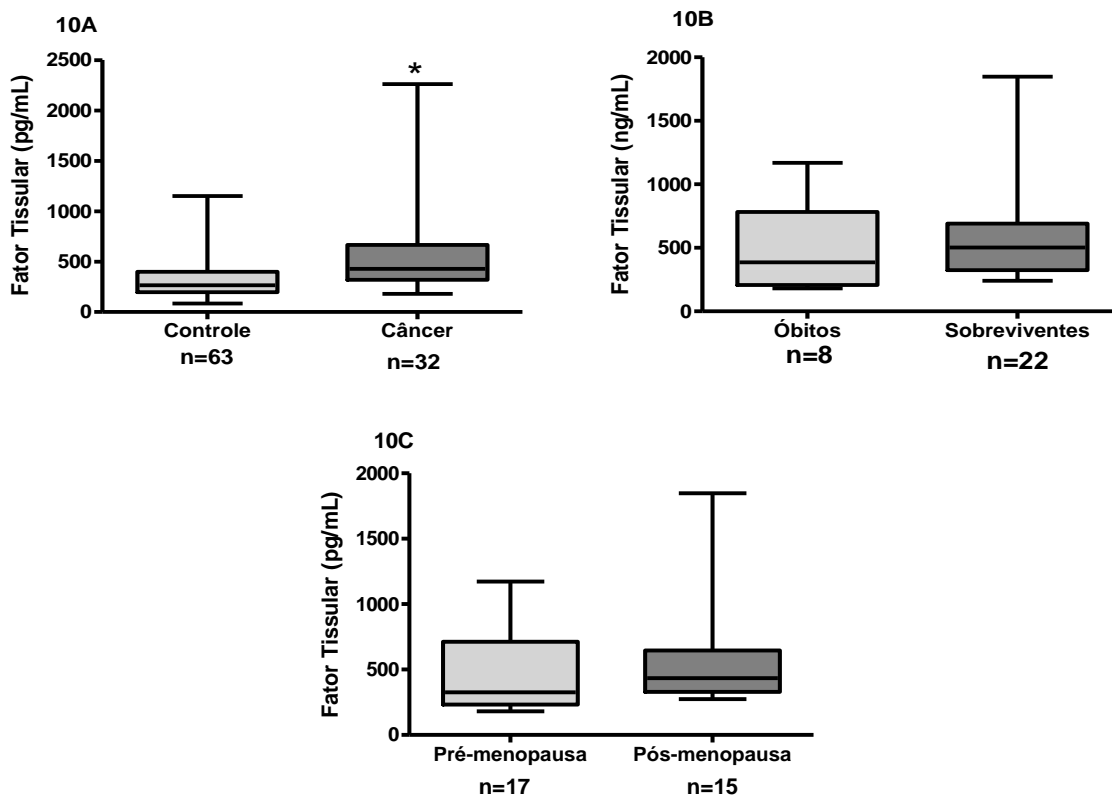
Os níveis de FT nas mulheres com câncer de mama, expressos como mediana e diferença interquartilica, também foram tabulados de acordo com as variáveis clínicas. Quando comparado o grupo de pacientes com câncer de mama *versus* o grupo controle, foi encontrada uma diferença significativa entre os dois grupos (p=0,0002). Os valores plasmáticos para o FT em pacientes com câncer de mama no momento do diagnóstico e no grupo controle foram 428,3 pg/mL (320,4-665,1) e 266,3 pg/mL (195,9 - 398,2), respectivamente (**Figura 10A**).

Quando foi avaliada a sobrevida em função do FT entre as pacientes com câncer de mama, os resultados mostraram medianas de 502,5 pg/mL (324,0-691,2) para as



pacientes sobreviventes *versus* 386,1 pg/mL (207,2-782,5) para os óbitos, não apresentando uma diferença significativa ( $p=0,313$ ; **Figura 10B**).

A comparação entre as dosagens de FT plasmático para o grupo em estudo que se encontrava em menopausa não apresentou diferença significativa em relação ao grupo sem menopausa, com uma mediana de 325,7 pg/mL (233,2-712,5) para pré-menopausa e 433,4 pg/mL (328,4-645,4) para pós-menopausa ( $p= 0,307$ ; **Figura 10C**).



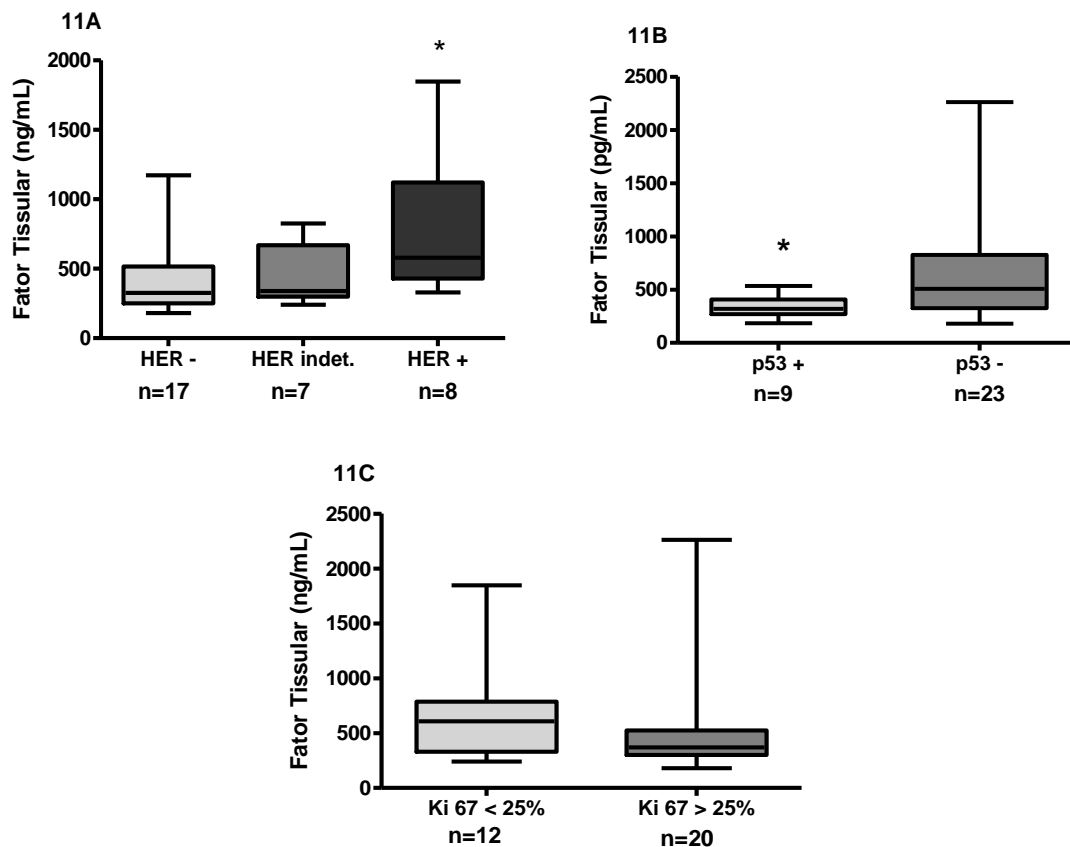
**Figura 10** – Níveis plasmáticos de fator tissular em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, relacionado às diferentes variáveis clínicas. 10A – Câncer de mama *versus* grupo controle ( $p=0,0002$ ); 10B – Mulheres com câncer de mama sobreviventes *versus* óbitos ( $p=0,313$ ) e 10C – Mulheres com câncer de mama em pré-menopausa *versus* pós-menopausa ( $p=0,307$ ). \* Indica diferença significativa entre os grupos.

A mediana dos níveis plasmáticos de FT em pacientes com tumor de mama receptor hormonal negativo com HER2 negativo (triplo negativo) foi de 325,7 pg/mL (250,2-515,4). Para resultados de HER2 considerados indeterminados (++) , a mediana do FT foi 338,8 pg/mL (298,8-669,8), enquanto para pacientes com expressão do

oncogene HER2 positivo (+++), a mediana foi 579,4 pg/mL (429,0-1120), foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p=0,050$ ) (**Figura 11A**).

Quanto à variável p53, o valor da mediana para os níveis de FT foi de 320,0 pg/mL (269,5-407,7) em mulheres apresentando positividade *versus* 507,9 pg/mL (325,7-825,2) para mulheres com ausência deste marcador, sendo que esta comparação apresentou diferença significativa ( $p=0,023$ ; **Figura 11B**).

Considerando o marcador de proliferação celular Ki67, as pacientes foram classificadas em dois grupos,  $Ki67 < 25\%$  e  $Ki67 > 25\%$ . O primeiro grupo apresentou uma mediana de FT igual a 606,9 pg/mL (331-786,4), enquanto o segundo grupo apresentou uma mediana de 370,5 pg/mL (300,3-524,6), não tendo sido observada diferença significativa entre os grupos ( $p=0,098$ ; **Figura 11C**).



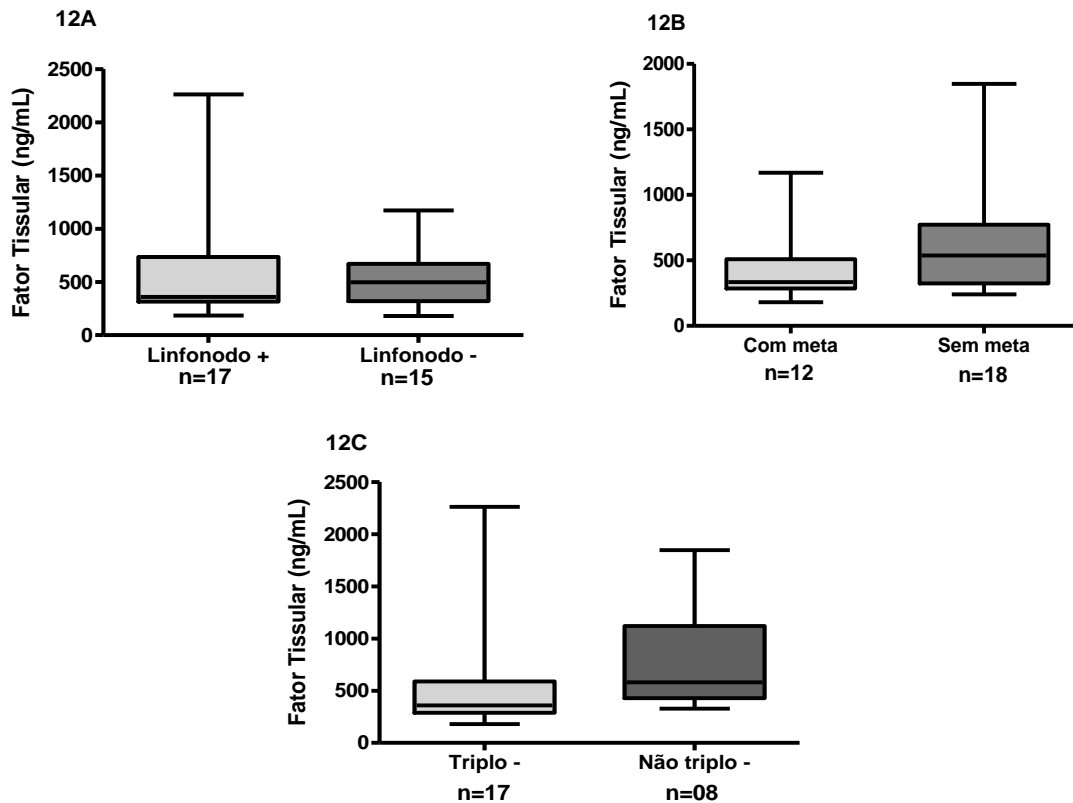
**Figura 11** – Níveis plasmáticos de fator tissular em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo e características imunohistoquímicas. 11A – Pacientes HER-2 negativo, HER-2 indeterminado ou HER-2 positivo ( $p=0,050$ ); 11B – Pacientes com p53 positivo ou negativo ( $p=0,023$ ); 11C – Pacientes com  $Ki67 < 25\%$  ou  $Ki67 > 25\%$  ( $p=0,098$ ).

\*Indica diferença significativa entre os grupos.

Quando analisados os resultados de FT plasmático para pacientes com e sem comprometimento de linfonodos, foi encontrada uma mediana de 497 pg/mL (320,2-669,8) para as pacientes que apresentaram linfonodos negativos, e uma mediana de 359,1 pg/mL (315-735,3) para mulheres com linfonodos positivos, não sendo a diferença significativa ( $p=0,909$ ; **Figura 12A**).

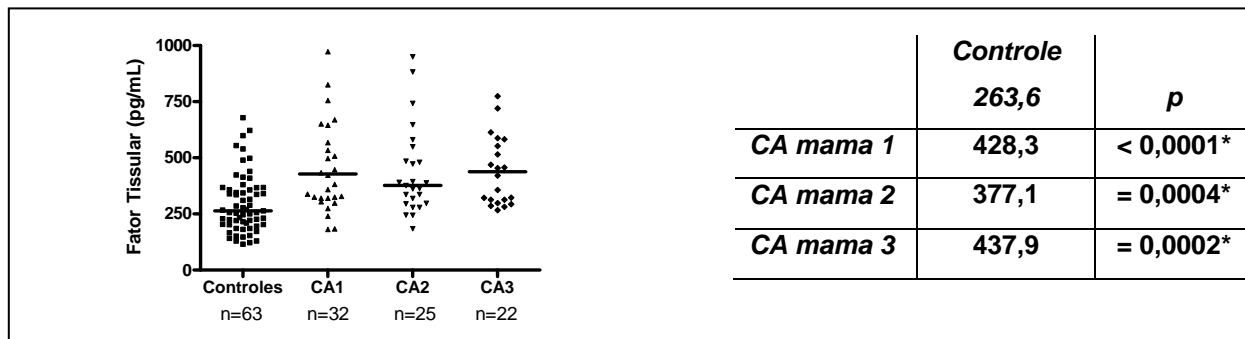
Em um total de 12 pacientes que apresentou metástases, das quais 8 evoluíram para óbito, os valores de mediana para FT foram de 333,6 pg/mL (285,7-508,7), os quais não apresentaram diferença significativa quando comparados aos valores de mediana do grupo de mulheres sem metástase (mediana = 538,1 pg/mL; 324,5-772,7;  $p = 0,103$ ; **Figura 12B**).

Quanto ao subgrupo triplo negativo, as pacientes apresentaram FT com um valor de mediana de 359,0 pg/mL (289-589), enquanto para as mulheres que apresentaram tumores não triplo negativo foi observada uma mediana de 579,4 pg/mL (429-1120), tendo sido observada tendência ao aumento de fator tissular para o grupo de mulheres não triplo negativo ( $p=0,058$ ) (**Figura 12C**). As pacientes que apresentavam o resultado de HER2 indeterminados ( $n=7$ ) foram excluídas da análise estatística do triplo negativo.



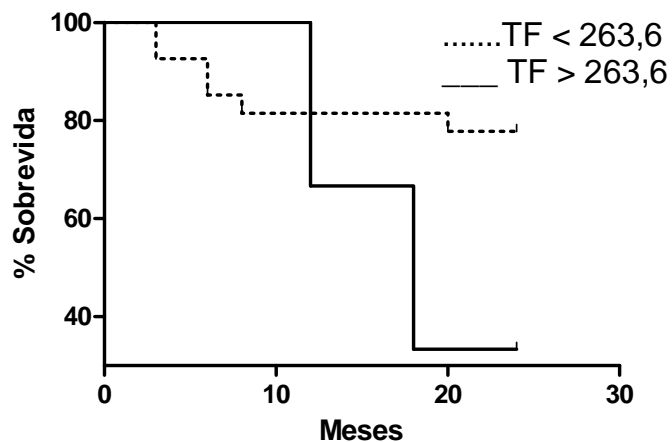
**Figura 12** – Níveis plasmáticos de fator tissular em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo. 12A – Mulheres com linfonodos positivos ou negativos ( $p=0,909$ ). 12B – Mulheres com metástase e sem metástase ( $p=0,103$ ); e 12C – Mulheres com tumor triplo negativo *versus* não triplo ( $p=0,058$ ).

Quando foram comparadas as medianas de FT observadas para os grupos controle, para pacientes com câncer de mama no momento do diagnóstico (CA1), ao término dos oito meses de quimioterapia (CA2) e 24 meses após o diagnóstico (CA3), estas diferiram significativamente entre os valores do grupo controle *versus* CA1, CA2 e CA3 ( $p<0,0001$ ;  $p=0,0004$  e  $p=0,0002$ , respectivamente), conforme mostrado na **Figura 13**. Todavia, não foram observadas diferenças entre CA1 *versus* CA2 ( $p=0,515$ ), CA1 *versus* CA3 ( $p=0,771$ ) e CA2 *versus* CA3 ( $p=0,657$ ).



**Figura 13** – Medianas de FT em controles e pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo nos três momentos de coleta CA1= ao diagnóstico, CA2= 8 meses após diagnóstico e CA3= 2 anos após diagnóstico. \* Indica diferença significativa entre os grupos.

A curva de sobrevida das pacientes com câncer de mama em relação aos níveis de FT distribuídos em valores inferiores a 263,6 ng/mL e superiores a 263,6 ng/mL, em um período de 24 meses, pode ser observado na **Figura 14**. O valor de referência para determinação plasmática de FT não está estabelecido na literatura, portanto, foi estabelecido o valor de 263,6 ng/mL como ponte de corte, pois este foi o valor da mediana no grupo controle. Entretanto, não foi observada diferença significativa ( $p=0,138$ ).



**Figura 14** – Curva de sobrevida de Kaplan Meier em pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, em relação aos níveis plasmáticos do fator tissular ( $p=0,138$ ).

A **Tabela 6** mostra os resultados da análise de correlação de Spearman entre as variáveis hemostáticas, dímero-D (DD) e fator tissular (FT), nos três momentos da coleta de sangue. No entanto, estas variáveis não apresentaram correlação em nenhum momento da coleta.

**Tabela 6 – Análise de correlação estatística entre a determinação do dímero-D e o fator tissular**

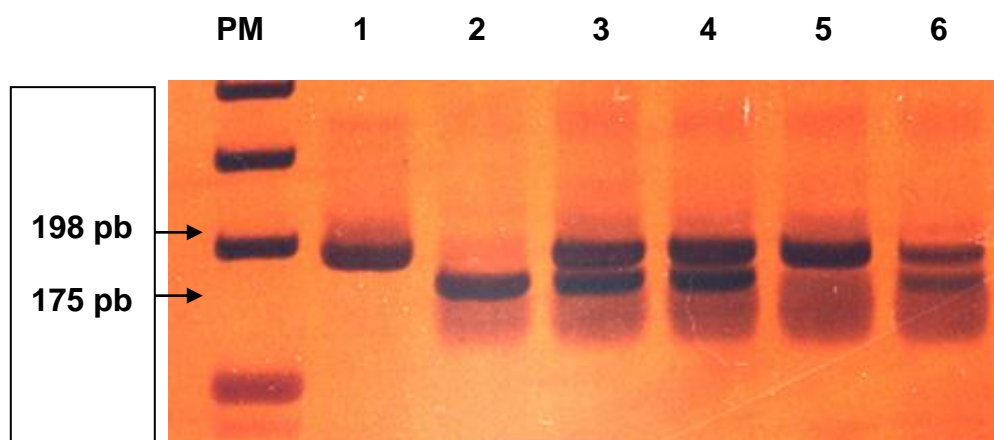
| <i>Teste Hemostáticos</i> | <i>R</i> | <i>IC 95%</i> | <i>p</i> |
|---------------------------|----------|---------------|----------|
| DD1 <i>versus</i> FT1     | - 0,1354 | 0,466 - 0,228 | 0,452    |
| DD2 <i>versus</i> FT2     | 0,2356   | 0,178 – 0,579 | 0,249    |
| DD3 <i>versus</i> FT3     | 0,0029   | 0,421 – 0,425 | 0,989    |

DD1= dímero-D-primeira coleta; DD2=dímero-D-segunda coleta; dímero-D-terceira coleta; FT1= fator tissular-primeira coleta; FT2= fator tissular-segunda coleta; FT3= fator tissular-terceira coleta.

### 5.3 Aspectos moleculares

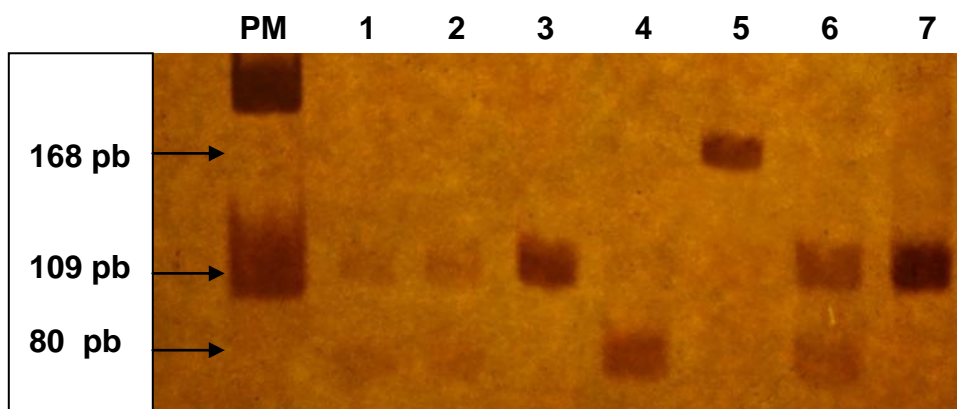
As **Figuras 15 a 18** representam a análise eletroforética realizada para interpretação dos genótipos através da técnica de PCR-RFLP em mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo.

A **Figura 15** mostra o padrão de digestão na presença ou ausência da mutação C677T. O produto de PCR gera um fragmento de 198 pb, que após digestão, na presença da mutação, gera fragmentos de 175 e 23 pb (sendo este último fragmento perdido durante corrida eletroforética).



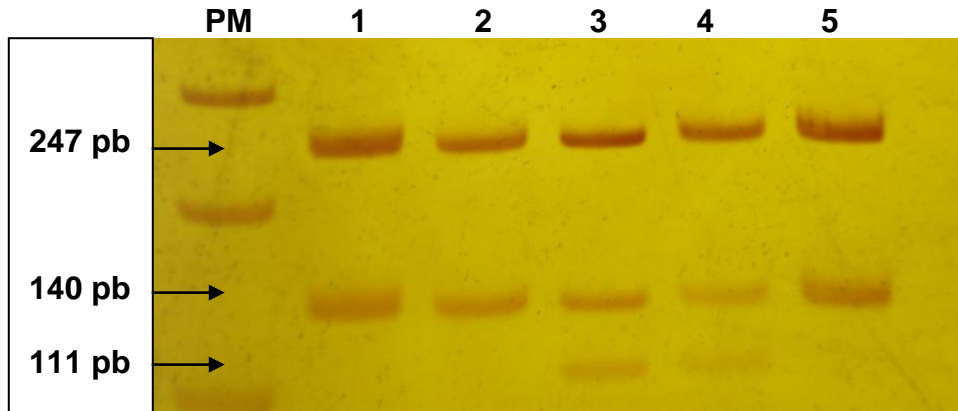
**Figura 15** - Gel de poliácridamida demonstrando a pesquisa da mutação C677T no gene da *MTHFR*. PM – padrão de peso molecular; 1 e 5 – indivíduos sem mutação; 2 – indivíduo homozigoto para a mutação; 3, 4 e 6 – indivíduos heterozigotos para a mutação.

A **Figura 16** representa o padrão de digestão na presença ou ausência do polimorfismo Gly388Arg no gene do *FGFR4*. O fragmento de 168 pb gera, após digestão enzimática, fragmentos de 109, 37 e 22 pb nos indivíduos sem o polimorfismo, enquanto que a presença em homozigose gera fragmentos de 80, 37, 29 e 22 pb, sendo os três últimos perdidos durante a eletroforese.



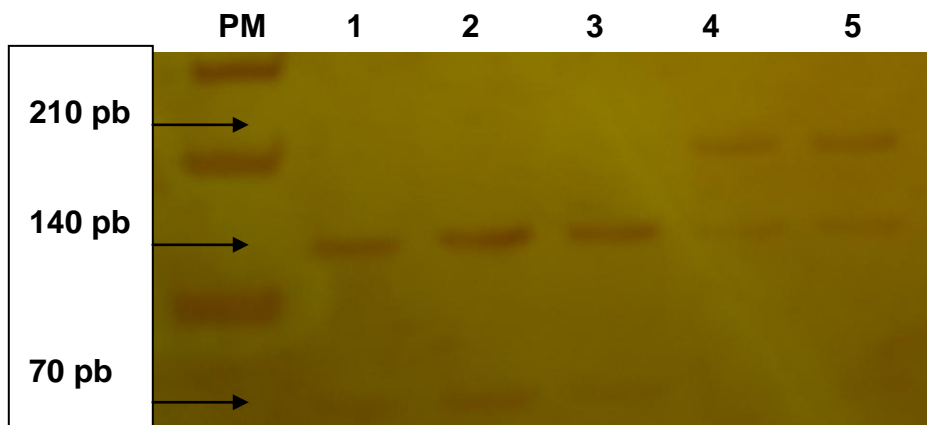
**Figura 16** - Gel de poliácridamida demonstrando a pesquisa do polimorfismo Gly388Arg no gene do *FGFR4*. PM – padrão de peso molecular; 1, 2 e 6 - indivíduos heterozigotos para o polimorfismo; 3 e 7 - Indivíduo sem o polimorfismo; 4 – Indivíduo homozigoto para o polimorfismo; 5 – Fragmento de PCR sem digestão.

A **Figura 17** ilustra a presença ou ausência da mutação C282Y no gene *HFE*. O produto inicial de 580 pb gera, após digestão enzimática, fragmentos de 247 e 140 pb em indivíduos sem a mutação, enquanto que a presença em homozigose gera fragmentos de 247, 111 e 29 pb, sendo o último perdido na corrida eletroforética.



**Figura 17** - Gel de poliacrilamida demonstrando a pesquisa da mutação C282Y no gene da *HFE*.  
PM – padrão de peso molecular; 1, 2 e 5 – indivíduos sem a mutação; 3 e 4 – indivíduos heterozigotos para a mutação.

A **Figura 18** demonstra o padrão de digestão enzimática da mutação H63D no gene *HFE*. O produto de PCR de 210 pb não é digerido na presença da mutação, enquanto que em indivíduos sem a mutação são gerados fragmentos de 140 e 70 pb.



**Figura 18** - Gel de poliacrilamida demonstrando a pesquisa da mutação H63D no gene da *HFE*.  
PM – padrão de peso molecular; 1, 2 e 3 – indivíduos sem a mutação; 4 e 5 – indivíduos com a mutação em heterozigose.



A fim de investigar se a presença das mutações/polimorfismos estava relacionada ao desenvolvimento da doença, foi realizada análise estatística comparando-se a frequência destas alterações entre as mulheres do grupo controle e as mulheres com câncer de mama.

Para o gene do *FGFR4*, foi observada uma diferença significativa entre o grupo controle e o câncer de mama ( $p=0,032$ , **Tabela 7**), mostrando uma menor frequência do polimorfismo Gly388Arg no grupo de pacientes. Entretanto, não foi observada diferença significativa na frequência das mutações C677T (**Tabela 8**) e C282Y (**Tabela 9**), entre os dois grupos estudados. Para todos os casos foram comparados os modelos de herança dominante ( $p1$ ) e recessiva ( $p2$ ). A frequência da mutação H63D no modelo de doença recessiva foi significativamente maior para o grupo de pacientes ( $p=0,046$ ).

**Tabela 7 – Frequência do polimorfismo Gly388Arg no gene *FGFR4* entre os grupos estudados**

| <b>Genótipos Gly388Arg</b> | <b>Controle<br/>n (%)</b> | <b>Câncer<br/>mama<br/>n (%)</b> | <b>p1</b> | <b>p2</b> |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------|-----------|
| Ausência da mutação        | 19 (37%)                  | 18 (62%)                         |           |           |
| Presença em heterozigose   | 26 (51%)                  | 10 (35%)                         | 0,032*    | 0,205     |
| Presença em homozigose     | 06 (12%)                  | 01(3%)                           |           |           |
| <b>Total</b>               | <b>51 (100%)</b>          | <b>29 (100%)</b>                 |           |           |

*p1= ausência de mutação versus mutação em heterozigose e homozigose, p2= ausência de mutação e heterozigose versus homozigose.*

**Tabela 8 - Frequência da mutação C677T no gene *MTHFR* entre os grupos estudados**

| <b>Genótipo C677T</b>    | <b>Controle<br/>n (%)</b> | <b>Câncer de<br/>mama<br/>n (%)</b> | <b>p1</b> | <b>p2</b> |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|
| Ausência da mutação      | 24 (51%)                  | 09 (31%)                            |           |           |
| Presença em heterozigose | 18 (38%)                  | 15 (52%)                            | 0,087     | 0,408     |
| Presença em homozigose   | 05 (11%)                  | 05 (17%)                            |           |           |
| <b>Total</b>             | <b>47 (100%)</b>          | <b>29 (100%)</b>                    |           |           |

*p1= ausência de mutação versus mutação em heterozigose e homozigose, p2= ausência de mutação e heterozigose versus homozigose.*

**Tabela 9 – Frequência da mutação C282Y no gene *HFE* entre os grupos estudados**

| <b>Genótipo C282Y</b>    | <b>Controle<br/>n (%)</b> | <b>Câncer de<br/>mama<br/>n (%)</b> | <b>p1</b> | <b>p2</b> |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|
| Ausência da mutação      | 44 (94%)                  | 29(100%)                            |           |           |
| Presença em heterozigose | 03 (6%)                   | 00 (0%)                             | 0,165     | -         |
| Presença em homozigose   | 00 (0%)                   | 00 (0%)                             |           |           |
| <b>Total</b>             | <b>47 (100%)</b>          | <b>29 (100%)</b>                    |           |           |

*p1= ausência de mutação versus mutação em heterozigose e homozigose, p2= ausência de mutação e heterozigose versus homozigose.*

**Tabela 10 – Frequência da mutação H63D no gene *HFE* entre os grupos estudados**

| <b>Genótipo H63D</b>     | <b>Controle<br/>n (%)</b> | <b>Câncer de<br/>mama<br/>N (%)</b> | <b>P1</b> | <b>p2</b> |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|
| Ausência da mutação      | 37 (79%)                  | 19 (65%)                            |           |           |
| Presença em heterozigose | 09 (19%)                  | 06 (21%)                            | 0,204     | 0,046*    |
| Presença em homozigose   | 01 (2%)                   | 04 (14%)                            |           |           |
| <b>Total</b>             | <b>47 (100%)</b>          | <b>29(100%)</b>                     |           |           |

*p1= ausência de mutação versus mutação em heterozigose e homozigose, p2= ausência de mutação e heterozigose versus homozigose.*

Os resultados descritos na **Tabela 11** correspondem à análise de regressão logística comparando a presença das mutações/polimorfismo C677T, H63D e Gly388Arg em relação às variáveis de prognóstico. Para a mutação C677T foram observadas associações significativas com as variáveis metástase/óbito ( $p=0,023$ ), comprometimento de linfonodos ( $p=0,0001$ ), HER2 ( $p=0,002$ ) e Ki67 ( $p=0,011$ ); para a mutação H63D foi encontrada associação com o comprometimento de linfonodos ( $p=0,010$ ) e a presença da mutação no gene da p53 ( $p<0,001$ ), já com relação ao polimorfismo Gly388Arg observa-se uma associação com a evolução de metástase/óbito ( $p=0,003$ ) e com a elevação do marcador Ki67 ( $p=0,001$ ).

**Tabela 11 – Regressão logística múltipla entre as mutações e variáveis clínicas**

|                  | <b>Meta/óbito</b> | <b>Linfonodo</b> | <b>HER2</b> | <b>P53</b> | <b>Ki67</b> |
|------------------|-------------------|------------------|-------------|------------|-------------|
| <b>C677T</b>     | P=0,023*          | p=0,0001*        | P=0,002*    | p=0,593    | p=0,011*    |
| <b>H63D</b>      | P=0,170           | p=0,010*         | P=0,844     | p<0,001*   | p=0,956     |
| <b>Gly388Arg</b> | P=0,003*          | p=0,365          | P=0,289     | p=0,365    | p=0,001*    |

\*Indica diferença significativa entre os grupos.

Em uma análise de probabilidade das mutações influenciarem no desenvolvimento de metástase/óbito (**Tabela 12**), foi observado que o polimorfismo mutação Gly388Arg no gene *FGFR4* tem uma probabilidade de 40,65% de influenciar individualmente na evolução de metástase/óbito, sendo as demais probabilidades C677T e H63D de 35% e 22,4%, respectivamente. Quando as mutações apresentam-se associadas, esta probabilidade pode ser potencializada, como no caso de C677T e Gly388Arg (Probabilidade=50,4%); ou diminuída como C677T e H63D, apresentando uma probabilidade de 30%.

**Tabela 12 – Probabilidade de a mutação influenciar no desenvolvimento de metástase/óbito individualmente e associada**

| <b>Mutação</b>   | <b>Probabilidade</b> | <b>Associação</b>           | <b>Probabilidade</b> |
|------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|
| <b>C677T</b>     | <b>35%</b>           | <b>C677T + H63D</b>         | <b>30%</b>           |
| <b>H63D</b>      | <b>22,4%</b>         | <b>C677T+ Gly388Arg</b>     | <b>50,4%</b>         |
| <b>Gly388Arg</b> | <b>40,65%</b>        | <b>Gly388Arg + H63D</b>     | <b>35,2%</b>         |
| <b>-</b>         | <b>-</b>             | <b>C677T+Gly388Arg+H63D</b> | <b>44,6%.</b>        |

#### 5.4 Variantes relacionadas ao óbito

A **Tabela 13** mostra o conjunto dos dados referentes às oito pacientes que evoluíram para óbito, decorrente de metástase. Pode ser observado que cinco (62,5%) apresentavam idade até 50 anos, sete (87,5%) grau histológico GIII, sete (87,5%) com comprometimento linfonodal, cinco (62,5%) HER2 negativo (triplo negativo), três (37,5%) com mutação para p53, cinco (62,5%) com expressão de Ki67 > 30% , cinco (62,5%) com dímero-D acima de 500,0 ng/mL e 5 (62,5%) com FT acima da mediana apresentada pelo grupo controle (266,3 ng/mL).

Quanto aos parâmetros moleculares, três foram heterozigotas e duas homozigotas para a mutação C677T perfazendo um total de cinco eventos para esta mutação, ou seja, 62,5% dos óbitos. Para a mutação H63D três (37,5%) mulheres que evoluíram para óbito apresentavam esta mutação em heterozigose, enquanto para o polimorfismo Gly388Arg foram observados quatro (50%) casos também em heterozigose. Das sete mulheres que foram tipadas para todas as mutações, foi observado que cinco (71,4%) apresentavam mais de uma mutação genética entre aquelas estudadas.

**Tabela 13 – Características clínicas, hemostáticas e moleculares das pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo que evoluíram para óbito no período de 24 meses**

|   | Idade | Grau | Linf. | HER2  | p53 | Ki67 | Dí-D | FT   | C677T   | H63D    | Gly388Arg |
|---|-------|------|-------|-------|-----|------|------|------|---------|---------|-----------|
| 1 | 51    | GIII | Pos   | Neg   | Neg | 40%  | 329  | 247  | Ausente | Ausente | Ausente   |
| 2 | 48    | GIII | Pos   | Pos   | Neg | 10%  | 1295 | 1169 | Hetero  | Hetero  | Ausente   |
| 3 | 50    | GII  | Pos   | Neg   | Pos | 90%  | 3047 | 433  | Hetero  | Hetero  | Hetero    |
| 4 | 60    | GIII | Pos   | Pos   | Neg | 10%  | 591  | 328  | Homo    | Ausente | Hetero    |
| 5 | 29    | GIII | Pos   | Neg   | Pos | 75%  | 161  | 359  | Hetero  | Hetero  | Hetero    |
| 6 | 41    | GIII | Pos   | Neg   | Pos | 60%  | 789  | 184  | ND      | ND      | Ausente   |
| 7 | 48    | GIII | Neg   | Neg   | Neg | 90%  | 1916 | 181  | Ausente | Ausente | Ausente   |
| 8 | 55    | GIII | Pos   | Indet | Neg | 10%  | 291  | 339  | Homo    | Ausente | Hetero    |

ND = Não determinado

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Aspectos clínicos

As características clínicas observadas nas pacientes investigadas no presente estudo e descritas na **Tabela 3** estão de acordo com os dados descritos na literatura, ou seja, o câncer de mama receptor hormonal negativo incide com maior freqüência em mulheres mais jovens (média de idade de 48,5 anos), sendo este tipo de câncer predominantemente ductal invasivo (TESCHENDORFF et al., 2007). Quando adotado o limite de 50 anos para a menopausa, cerca de 53,13% das mulheres se encontravam em pré-menopausa. Todas as pacientes apresentaram carcinomas ductais invasivos e o grau histológico GIII ocorreu em 71,85% das pacientes, avaliadas, portanto, com pior prognóstico.

Quanto ao envolvimento axilar, 46,87% das pacientes não apresentaram envolvimento axilar. Entretanto, 20-30% das mulheres sem envolvimento axilar apresentarão metástase à distância, após o tratamento locoregional, provavelmente devido à existência de micrometástases antes do tratamento (BENOY et al., 2005).

Em um estudo para avaliar a presença da mutação p53, em 205 pacientes com câncer de mama, linfonodos axilares negativos, foi encontrada uma positividade de 11% para p53 em mulheres que apresentavam receptor de estrogênio negativo e grau III, sendo estas achados correlacionados ao pior prognóstico (ASKMALM et al., 2004).

A associação entre a proteína p53 com o prognóstico de pacientes com câncer de mama, axila negativa, também foi estudada por Iwaya e cols (1997). Estes investigadores relataram uma diferença significativa para a superexpressão da p53 entre mulheres que apresentaram recidiva precoce de câncer de mama e aquelas que não apresentaram, propondo o p53 como um indicador de recorrência precoce no câncer de mama. A associação entre o HER2 e a presença da mutação p53, com mau prognóstico, tem sido descrito na literatura em carcinomas ductais, no processo de invasão em carcinomas ductais (MENEZES et al., 2006). No presente estudo, a

mutação da p53 foi observada em 28,15% das pacientes, e o HER2 positivo em 25% dos casos, porém nenhuma mulher com a mutação p53 apresentou concomitantemente expressão do HER2.

O marcador de proliferação celular Ki67, relacionado ao processo de crescimento do tumor, tem sido associado a outros marcadores de prognóstico como o p53 e o HER-2 (ARIGA et al., 2005). Como o Ki67, proteína presente no núcleo, está diretamente relacionado com a proliferação celular nos processos malignos, tem sido proposto que o bloqueio de sua expressão, com conseqüente inibição da proliferação e aumento da apoptose, se constitua em interessante alternativa terapêutica (KAUSCH et al., 2003). Entre os carcinomas receptores hormonais negativos do presente estudo, 62,5% dos tumores apresentaram Ki67 com um índice de proliferação celular superior a 25%. Deve-se ressaltar que das pacientes que evoluíram para óbito, 62,5% apresentaram Ki67 superior a 25%.

É importante ressaltar que, no período de 24 meses, foram observados oito óbitos decorrentes de complicações relacionadas à metástases, ou seja, 24% de óbitos. Tal fato caracteriza uma evolução prognóstica desfavorável quando se compara à evolução de tumores receptores hormonais positivos (TESCHENDORFF, et a, 2007).

Os óbitos ocorridos no decorrer do presente estudo foram todos conseqüentes à evolução da doença, envolvendo metástases pulmonar, cerebral e óssea. Das 15 mulheres com câncer de mama que não apresentavam linfonodos comprometidos apenas um caso veio à óbito (6,25%), enquanto das 17 com comprometimento linfonodal, sete (41,2%) vieram à óbito no período estudado (24 meses). Uma outra análise interessante se refere à idade. Das 17 mulheres em pré menopausa, cinco (29,4%) vieram à óbito, enquanto apenas três (18,7%) faleceram no período pós menopausa. Das 12 mulheres com Ki67 abaixo de 25%, apenas três (18,7%) vieram à óbito, enquanto cinco (29,4%) faleceram no mesmo período investigado. Apenas uma paciente apresentou grau histológico GII, sendo as demais GIII, enquanto 62,5% das mulheres que evoluíram para o óbito eram triplo-negativo (**Tabela 13**).

Uma análise univariada utilizando um modelo de regressão logística, analisou a presença de metástase/óbito, em função das variáveis de prognóstico (**Tabela 4**). Com exceção da variável p53, constatou-se que as variáveis triplo negativo, idade (referência

50 anos), comprometimento de linfonodos, grau de diferenciação do tumor, HER2 e o marcador de invasão Ki67 >25%, não se mostraram associadas à evolução da doença, quando se considerou o desenvolvimento de metástase/óbito como variável dependente. Para a variável p53 foi observada uma “odds ratio” igual a 6,00 ( $p=0,03$ ; IC95% 1,13-31,73), o que equivale a uma chance de 6 vezes maior de mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo, com p53 positivo, apresentarem metástase/óbito quando se compara com mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo, porém, com p53 negativo. Deve-se ressaltar que este modelo permite avaliar o quanto uma variável clínica está associada à variável dependente (metástase/óbito). Assim, pode-se concluir que o marcador imunohistológico p53 possui potencial valor na estimativa da sobrevida.

Extrapolando os resultados das análises mostrados na **Tabela 4**, pode-se admitir que as variáveis de prognóstico, exceto o p53, não apresentaram potencial valor na estimativa da sobrevida, nas condições do presente estudo. No entanto, atribui-se à limitação do tamanho do grupo amostral a perda da capacidade de associação entre estas variáveis.

Uma outra análise dos dados apresentada neste estudo consiste na interpretação das curvas de sobrevida, as quais foram plotadas para as mulheres que vieram à óbito ( $n=8$ ), em função das variáveis de prognóstico: p53 (**Figura 3A**), Ki67 (**Figura 3B**), status linfonodal (**Figura 3C**), expressão de HER2 (**Figura 3D**), tamanho do tumor (**Figura 4A**), grau de diferenciação (**Figura 4B**), status menopausal (**Figura 4C**) e triplo negativo (**Figura 4D**). Segundo os resultados obtidos para as curvas de sobrevida, as características analisadas nas **Figuras 3 e 4** (se presentes ou não), não afetaram significativamente a sobrevida no decorrer de dois anos (24 meses). Dessa forma, pode-se admitir que as variáveis acima não se mostraram como um fator decisivo de prognóstico desfavorável, nas condições deste estudo. Este fato contraria achados da literatura que relatam a associação destas variáveis com o prognóstico pior do câncer de mama. Entretanto, deve-se considerar, como um fator limitante, para a completa interpretação de nossos dados, o curto espaço de tempo de acompanhamento das pacientes (apenas 24 meses), bem como o número reduzido da amostra estudada. Cumpre ressaltar, no entanto, que apesar das limitações citadas



acima, foi observada uma tendência de menor sobrevida naquelas com tumores maiores ( $p=0,067$ ), com significância ao nível de 10%.

Apesar do número limitado de casos analisados no presente estudo, estes achados reforçam o valor prognóstico desfavorável das características citadas acima, considerando idade inferior a 50 anos, comprometimento linfonodal, triplo negativo, GIII e expressão de ki67 >25%, que foram fatores mais prevalentes entre as pacientes que vieram à óbito. Por outro lado, a ausência de tais características não sinaliza para uma sobrevida livre de doença, o que é compatível com a idéia de que o desenvolvimento do câncer de mama e sua evolução é multifatorial e dependente de interações e mecanismos diversos.

O câncer de mama constitui uma complexa doença genética caracterizada pelo somatório de múltiplas alterações moleculares e condições ambientais (RAKHA e cols., 2008). Os métodos de rotina disponíveis para a avaliação desta doença ainda são insuficientes para traduzir a complexidade e heterogeneidade genotípica, fenotípica e clínica dos diversos tumores, e que poderão impactar desfavoravelmente a resposta ao tratamento. No entanto, o número limitado de mulheres participantes deste estudo, possivelmente, contribuiu para a ausência de associações significativas nas análises realizadas, principalmente em relação às curvas de sobrevida (apenas 8 óbitos ao longo de 24 meses de acompanhamento).

Segundo Rouzier e cols. (2005), os estudos com o grupo triplo negativo, ou seja, receptores hormonais negativos e HER2 negativo, são de grande importância pois caracterizam um fenótipo mais agressivo e um pior prognóstico, além da escassez de estratégias de tratamento, revelando esta condição patológica como a mais limitada (RAKHA et al., 2007). Apesar dos tumores triplo negativo apresentarem um potencial metastático diferenciado e um prognóstico pior, algumas pacientes respondem aos tratamentos quimioterápicos neo-adjuvantes e adjuvantes (NILSEN et al., 2004; BRETON et al., 2005).

No presente estudo, a curva de sobrevida de Kaplan Meier não apresentou diferença significativa entre os grupos triplo negativo e não triplo negativo; porém, é importante salientar que todas as pacientes apresentavam a característica de receptor

hormonal negativo, e daquelas que vieram à óbito, 62,5% eram triplo negativo, sinalizando para uma condição prognóstica desfavorável.

Cumprido ressaltar, no entanto, que são conflitantes os resultados de prevalência de metástase em linfonodos de pacientes com fenótipo triplo negativo, tendo sido descrito que não existe relação entre o tamanho do tumor e presença de linfonodo metastático (HAFFY et al., 2006; DENT et al., 2007; RAKHA et al., 2007). Por outro lado, também é descrita uma relação inversa entre mulheres com câncer de mama fenótipo triplo negativo e metástase em linfonodos (TISCHKOWITZ et al., 2007). Estes achados não foram confirmados no presente estudo, uma vez que as mulheres triplo negativo que vieram à óbito tiveram como *causa mortis* complicações decorrentes de metástases.

Sob a ótica do complexo sistema hemostático, perturbações hemostáticas têm sido associadas frequentemente com o desenvolvimento de tumores, mais precisamente desde 1865, quando Armand Trousseau descreveu, pela primeira vez, fenômenos trombóticos em pacientes com câncer. É possível que a síndrome de Trousseau se justifique pela presença dos mesmos elementos descritos na Tríade de Virchow, ou seja, estase venosa, alterações vasculares e hipercoagulabilidade sanguínea. Além desses fatores, substâncias procoagulantes liberadas das massas tumorais como microvesículas contendo fator tissular e inibidores da fibrinólise (inibidor do ativador do plasminogênio-PAI-1), poderiam inibir a fibrinólise, favorecendo a deposição de fibrina (DVORACK; RICKLES, 2006). Ao longo do tempo, este conhecimento foi consolidado por numerosos outros relatos (GLASSMAN, 1997; LORETO et al., 2000; FALANGA, 2005). De fato, tem sido relatado que anormalidades hemostáticas estão presentes em até 90% em pacientes com tumores metastáticos, incluindo níveis plasmáticos elevados de dímero-D, complexos trombina-antitrombina, fator tissular e outras (DVORACK; RICKLES, 2006).

À luz do conhecimento de que fatores hemostáticos participam também dos processos de inflamação e de angiogênese, há um crescente corpo de evidências envolvendo a associação entre o sistema da coagulação/fibrinolítico e a biologia do câncer e angiogênese (WOJTUKIEWICZ et al., 2001; WOJTUKIEWICZ et al., 2004). É atualmente aceito que o sistema hemostático (coagulação e fibrinólise) está associado

com angiogênese, crescimento tumoral, invasão e desenvolvimento de metástase (DIRIX et al., 2002; YIGIT et al., 2008). Também é aceito que o aparecimento de metástases indica prognóstico pior, sinalizando para uma sobrevida global mais curta. Partindo desta premissa, é possível que a avaliação de parâmetros hemostáticos possa constituir uma importante ferramenta para monitorar a evolução do câncer, notadamente aspectos prognósticos. Dessa forma, o uso de marcadores de hipercoagulabilidade associados a outros marcadores prognósticos já estabelecidos, podem compor novas estratégias no monitoramento e no aparecimento de metástases (BLACKWELL et al., 2000, BENOY et al., 2005).

Segue abaixo a interpretação dos resultados obtidos no presente estudo, no que tange aos aspectos hemostáticos.

## **6.2 Aspectos hemostáticos**

### **6.2.1 Dímero-D**

Para que ocorra a progressão do tumor existem três fatores inter-relacionados: crescimento, invasão e metástase. Para que estes eventos se desenvolvam é necessária uma remodelação do estroma, invasão linfática e vascular, além de um estado de hipercoagulabilidade. A crescente formação de fibrina em decorrência da ativação exacerbada do mecanismo hemostático em pacientes com câncer favorece o processo de angiogênese, com um papel fundamental na formação do novo vaso. Portanto, sendo o dímero-D um produto resultante da degradação da fibrina, a determinação deste analito pode ser um importante marcador prognóstico na progressão da doença (KILIC et al., 2007).

No presente estudo, os níveis plasmáticos de dímero-D nas pacientes com câncer de mama mostraram-se significativamente superiores aos observados em mulheres controles ( $p=0,0002$ ), o que vem corroborar com a relação entre o câncer e o sistema hemostático (**Figura 5A**). O estado de hipercoagulabilidade em pacientes com

câncer está amplamente descrito na literatura (GLASSMAN, 1997; DVORAK; RICKLES, 2006; RAK et al., 2006; YIGIT et al., 2008) e o dímero-D tem sido citado como um importante preditor desta condição (BLACKWELL et al., 2000; KIM et al., 2004).

Os níveis de dímero-D nas pacientes com câncer foram significativamente diferentes quando comparados àqueles apresentados pelas mulheres do grupo controle ( $p=0,0002$ ), refletindo um estado de hipercoagulabilidade nas mulheres com a doença já no momento do diagnóstico, dado que os valores de dímero-D utilizados neste cálculo foram aqueles obtidos na primeira coleta de sangue (DD1) (**Figura 5A**). Torna-se oportuno, no entanto, ressaltar que ao mesmo tempo em que os valores de DD1 refletem uma ativação precoce do mecanismo hemostático (já elevados ao diagnóstico), estes não foram úteis para sinalizar o posterior desenvolvimento de metástases, ou seja, não foram preditores de recidiva/óbito. Dentro desse contexto, torna-se pertinente acrescentar que quando foram comparados os resultados de dímero-D (da primeira coleta) das mulheres com câncer de mama que sobreviveram *versus* os resultados das que não sobreviveram, também da primeira coleta (número de óbitos=8), não foi observada diferença significativa (medianas de 495,4 e 690,2, respectivamente;  $p=0,25$ ) (dados não mostrados em figuras). No entanto, neste mesmo estudo, quando analisada a relação entre os níveis plasmáticos deste marcador com a ocorrência de óbito, utilizando os resultados dos níveis de dímero-D mais próximos a este evento (DD2 ou DD3), observou-se que as pacientes que evoluíram para óbito apresentaram níveis plasmáticos de dímero-D significativamente superiores aos níveis de dímero-D apresentados pelas sobreviventes ( $p=0,047$ ; **Figura 5B**). Considerando que os óbitos foram decorrentes de metástases, pode-se associar a elevação dos níveis de dímero-D com a progressão do câncer de mama. Isso posto, pode-se admitir que o dímero-D não foi capaz de funcionar como um marcador de prognóstico ao diagnóstico do câncer de mama, todavia, foi capaz de refletir o agravamento da doença traduzida por um estado de hipercoagulabilidade com deposição de fibrina e iminente óbito. Admite-se que o dímero-D possa ser um importante marcador da neovascularização do tumor (SALGADO et al., 2002; BLACKWELL et al., 2004), bem como da progressão da doença, estando níveis elevados de dímero-D correlacionados à redução da sobrevida em pacientes com câncer de mama metastático (BENOY et al., 2005).

Os níveis de dímero-D não se mostraram significativamente diferentes entre as pacientes com câncer de mama em pré-menopausa *versus* as pacientes em pós-menopausa ( $p=0,820$ ; **Figura 5C**). Não foi encontrada na literatura correlação entre dímero-D e menopausa. Entretanto, a literatura tem descrito um aumento dos níveis plasmáticos de marcadores de hipercoagulabilidade durante o uso de terapia de reposição hormonal (TRH). Após iniciar a TRH, mulheres que apresentam fatores de risco genéticos e adquiridos desenvolvem uma predisposição à ativação da coagulação sanguínea (FABIAN; KILMER, 2002). Uma limitação do presente trabalho consiste na ausência de informação sobre o uso ou não da TRH, impedindo qualquer análise nesse sentido.

Quando foram analisados os resultados imunoistoquímicos das variáveis p53 e Ki67, em função dos níveis plasmáticos de dímero-D, não foram observadas diferenças significativas (**Figuras 6B**,  $p=0,834$  e **6C**,  $p=0,250$ , respectivamente), apesar dos marcadores histoquímicos já estarem estabelecidos como importantes marcadores de prognóstico. Porém, a associação individual desses marcadores com os níveis de dímero-D não foi observada.

A amplificação do HER-2 no câncer de mama tem sido associada ao aumento da angiogênese, hipóxia e aumento dos marcadores de degradação da fibrina. Blackwell e colaboradores (2004) sugerem que estes achados podem ser importantes preditores do prognóstico e de procedimentos terapêuticos. No entanto, no presente estudo não foi observada diferença significativa entre a superexpressão de HER2 e o aumento nos níveis de dímero-D (**Figura 6A**,  $p=0,825$ ).

Segundo Blackwell e cols., 2000, os níveis plasmáticos de dímero-D mostraram-se relacionados à invasão linfovascular, estadió clínico avançado e envolvimento de linfonodos, em um estudo com 425 pacientes com câncer de mama metastático, sugerindo que o dímero-D possa ser um marcador clinicamente importante de invasão linfovascular e metástase em tumores prematuros (BLACKWELL et al., 2000).

Níveis plasmáticos elevados de dímero-D têm sido também relacionados com a progressão do tumor e redução da sobrevida em câncer de mama metastático (BENOY et al., 2005). No entanto, a avaliação realizada no presente estudo, não foi capaz de diferenciar aquelas mulheres com invasão de linfonodos (**Figura 7A**,  $p=0,249$ ), embora

o grupo de mulheres com linfonodos comprometidos tenha apresentado níveis deste marcador discretamente elevados em relação ao grupo sem comprometimento linfonodal, indicando uma maior ativação do sistema hemostático no primeiro grupo.

Quando se associa a presença de metástases (recidiva) durante o estudo de acompanhamento por 24 meses, aos níveis de dímero-D (últimos resultados obtidos para esse marcador), pode ser observada uma elevação nos níveis desse marcador nas pacientes que evoluíram para metástase (12 apresentaram recidiva) (**Figura 7B**;  $p=0,007$ ), ou seja, pode-se admitir que quanto maior a invasão, maior a exacerbação da ativação do mecanismo hemostático, configurando um estado de hipercoagulabilidade com deposição fibrina. O aparecimento de metástase está associado ao processo de remodelação do tumor, e como este está associado à formação de fibrina, pode-se inferir que a progressão do tumor está relacionada a uma condição de hipercoagulabilidade traduzida por níveis elevados de dímero-D conforme descrito por Benoy e cols. (2005).

No presente estudo, foram observadas 18 pacientes com a classificação triplo negativo. Apesar dos tumores triplo negativos apresentarem prognóstico pior, quando analisada a relação entre triplo negativo e níveis plasmáticos de dímero-D não foram observadas diferenças significativas (**Figura 7C**,  $p=0,976$ ), ou seja, não foi possível inferir sobre maior ativação do mecanismo hemostático neste restrito número de pacientes com tal fenótipo.

A Figura 8 mostra as medianas de dímero-D nos três momentos estudados. Pode-se observar que o grupo controle diferiu significativamente em relação aos resultados obtidos de pacientes no momento do diagnóstico ( $p>0,0001$ ), ao término dos 8 meses de quimioterapia ( $p=0,001$ ) e 24 meses após o diagnóstico ( $p=0,010$ ) para os níveis deste marcador. Estes resultados remetem à idéia de que o mecanismo hemostático se encontrava mais ativado no momento do diagnóstico do câncer, ativação essa minimizada ao término dos 8 meses de quimioterapia. Após 24 meses de diagnóstico, os valores de dímero-D se mostraram ainda mais reduzidos, no entanto, ainda permaneciam mais elevados que os valores observados no grupo controle. Esta redução gradual nos níveis deste marcador deve possivelmente refletir refletindo a

melhora clínica da maioria das mulheres, revelada por diminuição da ativação do sistema hemostático por estímulos tumorais.

Os nossos dados vêm corroborar com achados da literatura que relatam uma estreita associação entre níveis de dímero-D e evolução da doença (SALGADO et al., 2002; BLACKWELL et al., 2004).

A **Figura 9** evidencia a relação entre os níveis de dímero-D e a sobrevida das mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo mostrada em uma curva de sobrevida de Kaplan Meier, através da qual pode-se observar o número de óbitos em função dos valores deste marcador, ao longo de 24 meses de acompanhamento destas pacientes. Não foi observada diferença significativa quando se comparou a percentagem de sobrevida das pacientes em função de valores de dímero-D superior ou inferior a 500,0 ng/mL ( $p=0,404$ ). Uma outra análise foi realizada considerando os valores de dímero-D superior ou inferior à 263,6 ng/mL (mediana do grupo controle), em relação a percentagem de sobrevida das pacientes em função deste novo ponto de corte. Também não foi observada diferença significativa ( $p=0,297$ ) (dados não mostrados), em relação a percentagem de sobrevida e o novo ponto de corte.

Apesar desta ausência de diferença significativa, pode-se observar que dos oito óbitos ocorridos, cinco (62,5%) foram de mulheres com níveis plasmáticos de dímero-D superiores a 500,0 ng/mL contra três (37,5%) que apresentaram níveis deste marcador inferiores a 500,0 ng/mL, indicando ocorrer simultaneamente ativação do mecanismo hemostático com deposição de fibrina e progressão da doença (**Tabela 13**). Esta idéia é reforçada por dados obtidos por outro tipo de análise (Mann-Whitney), conforme mostrado na **Figura 5B**. As mulheres que sobreviveram ao câncer de mama no período avaliado (24 meses) apresentaram níveis de dímero-D significativamente mais reduzidos em relação aos níveis das mulheres que evoluíram para óbito ( $p=0,047$ ). Cumpre ressaltar também que mulheres com câncer de mama e presença de metástase apresentaram também níveis de dímero-D significativamente mais elevados do que mulheres sem metástase ( $p=0,006$ ; **Figura 7B**). Considerando a presença de metástase como fator altamente desfavorável às pacientes, pode-se então admitir a estreita associação entre níveis elevados de dímero-D e evolução desfavorável da doença.

A relação entre sobrevida ou presença de doença ativa com metastáse e níveis plasmáticos de dímero-D foi descrita por diferentes autores como Benoy e cols. (2005) e Kilic e cols. (2007). No entanto, em estudo recente, não foi observada diferença significativa para os níveis plasmáticos de dímero-D entre pacientes com câncer de mama receptor hormonal positivo e controles, mesmo quando avaliadas características de comprometimento linfonodal (YIGIT et al., 2008).

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 5** obtidos por meio de uma regressão logística univariada, considerando os níveis de dímero-D como variável independente, em relação às diversas variáveis clínicas de prognóstico, não foi possível constatar qualquer associação entre estas. Mais uma vez, o número limitado de casos estudados deve justificar a não observância de associação entre o dímero-D e variáveis de prognóstico já bem estabelecidas pela literatura.

Assim os resultados obtidos apontam para o fato de que, apesar de mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo apresentarem níveis significativamente mais elevados de dímero-D do que mulheres sem câncer, níveis normais de dímero-D não permitem inferir sobre sobrevida livre de doença. No entanto, níveis elevados deste marcador parecem sinalizar para a necessidade de maior atenção às pacientes no sentido de uma rigorosa investigação à procura de metástases.

### **6.2.2 Fator Tissular (FT)**

O FT, expresso pelas células tumorais, participa do desenvolvimento de metástase possivelmente ativando o mecanismo hemostático. Estudos recentes indicam o envolvimento deste marcador com a angiogênese e crescimento do tumor (MACKMAN, 2009).

Níveis plasmáticos elevados de FT estão associados com a progressão clínica da doença, bem como a um diagnóstico desfavorável. Assim, Versteeg e cols (2008) descreveram uma importante relação entre FT e Fator VII ativado (Vlla) com o crescimento do tumor. Sabe-se que células tumorais podem expressar fator tissular



(MACKMAN, 2008) e proteínas componentes do sistema fibrinolítico, tais como uPA, tPA, PAI-1 e PAI-2 (KWAAN, 1992). Todavia, em pacientes com câncer parece prevalecer um estado de hipofibrinólise, favorecendo a manutenção da fibrina, contribuindo para o crescimento tumoral.

Os níveis plasmáticos de FT nas pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo foram significativamente mais elevados quando comparados aos níveis obtidos para o grupo controle (**Figura 10A**,  $p=0,0002$ ). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa quando os níveis deste marcador foram comparados entre pacientes que evoluíram para óbito e que sobreviveram (**Figura 10B**,  $p=0,313$ ). O *status* menopausal (**Figura 10C**), e Ki67 (**Figura 11C**) não afetaram significativamente os níveis de FT, enquanto pacientes com a variável HER2 positivas mostraram níveis significativamente elevados (**Figura 11A**,  $p=0,050$ ). Já a variável p53 parece afetar contrariamente os níveis deste marcador, já que aquelas mulheres com p53 positivo apresentaram níveis significativamente mais baixos de FT do que as mulheres com p53 negativo (**Figura 11B**,  $p=0,023$ ).

Grignani e Maiolo (2000) descreveram a relação entre a expressão aberrante de FT nas células do endotélio vascular em pacientes com câncer de mama, como sendo resultado da ativação dos oncogenes K-ras e da perda da capacidade supressora do gene *TP53*. Além disso, acredita-se que a via de formação de fibrina é essencial para dar suporte ao processo de angiogênese, garantindo assim a oferta de oxigênio ao tumor (RICKLES et. al., 2003, RAK et.al., 2006).

De acordo com Rickles e Falanga (2001) e também Yu e cols. (2004), existe uma forte associação entre níveis elevados de FT e a progressão clínica do câncer, apresentando, portanto, um prognóstico desfavorável. Dessa forma, pode-se admitir que no câncer existam fatores desencadeantes da expressão de FT, embora em nosso estudo os níveis deste marcador não se mostraram associados à progressão da doença. A ausência de diferença significativa para os níveis de FT entre pacientes que sobreviveram ou não e entre pacientes com e sem metástase (**Figura 12B**) vem corroborar com a idéia de que apesar do FT estar aumentado nas pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo, este marcador parece não ser útil para sinalizar evolução desfavorável.

O fenótipo triplo negativo tem sido descrito como de pior prognóstico (DENT et al., 2007; RAKHA et al, 2007). Entretanto, os níveis de FT se mostraram com tendência à elevação no grupo não triplo negativo (**Figura 12C**,  $p= 0,058$ ).

Quanto ao comprometimento metastático dos linfonodos e presença de metástase, importantes fatores preditores prognósticos, estes não apresentaram relação com os níveis de FT neste estudo (Figuras 12A e 12B).

O presente estudo analisou os níveis plasmáticos de FT durante 24 meses e em três momentos distintos, cujas medianas são apresentadas na **Figura 13**. Foram observadas diferenças significativas para o FT entre o grupo controle e os outros grupos envolvendo as pacientes logo após o diagnóstico (1ª coleta;  $p<0,0001$ ), após quimioterapia adjuvante (2ª coleta;  $p=0,0004$ ) e aos dois anos de acompanhamento após o diagnóstico inicial (3ª coleta;  $p=0,0002$ ). Conforme observado os níveis de FT foram mais elevados ao diagnóstico e permaneceram significativamente elevados em relação ao controle, mesmo após 24 meses de acompanhamento. Apesar da possível melhora clínica da maioria das pacientes, os casos de doença ativa, porventura existentes neste grupo, poderiam explicar a manutenção dos títulos de FT mais elevados ao longo do período avaliado.

Em estudos prévios, o aumento dos níveis plasmáticos de variáveis hemostáticas foi reportado em pacientes com câncer de mama (YIGIT et al., 2008). Entretanto, existem poucos estudos específicos sobre a interação de parâmetros hemostáticos com fatores prognósticos e preditivos, conforme investigados no presente estudo. Os nossos achados permitem inferir que pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo apresentam níveis significativamente elevados de FT em relação ao grupo controle, corroborando com a idéia de que pacientes com câncer apresentam um estado de hipercoagulabilidade já desde o diagnóstico, o que pode explicar em parte os níveis significativamente elevados de dímero-D e a predisposição a eventos trombóticos nesta doença.

A curva de sobrevida apresentada na **Figura 14**, não revelou diferença significativa ( $p=0,138$ ) em relação à percentagem de sobrevida entre mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo com níveis plasmáticos de FT superiores e inferiores a 263,6 ng/mL. Este valor de corte foi estabelecido com base na mediana do

grupo controle, pois não existem valores de referência descrito na literatura para FT. Por não existir um valor de referência para FT, o que inviabilizaria uma correta interpretação dos resultados, não foi realizado o modelo de regressão logística univariado envolvendo o FT e as variáveis de prognóstico.

Quanto à sobrevida, o estudo mostrou três óbitos (37,5%) nas pacientes que apresentavam FT abaixo de 266,3 ng/ml, e cinco óbitos (62,5%) com níveis de FT superior à 266,3 ng/mL. Tal fato remete à idéia de que níveis do FT elevados além de estarem relacionados ao câncer de mama, encontram-se mais frequentemente naquelas pacientes com pior prognóstico (**Tabela 13**).

Não foi observada correlação entre o dímero-D e Fator Tissular (**Tabela 6**). Provavelmente a ativação da cascata de coagulação envolve mecanismos diversos. A associação entre constituintes hemostáticos e angiogênese já está bem estabelecida, sendo esta última favorecida por ativação da coagulação que promoverá a formação da fibrina. A formação da fibrina resultando em níveis elevados de dímero-D parece não ser resultante apenas dos níveis mais elevados de FT. Outros fatores ativadores do sistema hemostático já foram descritos como câncer procoagulante (DVORAK et al., 2006), produzido por células tumorais e que ativam diretamente o fator X, resultando na formação de fibrina e, conseqüentemente, produção de dímero-D. Conforme descrito por Buller e cols (2007), o FT promove o aumento da expressão do VEGF e do K-ras favorecendo a angiogênese, a permeabilidade vascular, o aparecimento de metástase e o crescimento tumoral. Após a deposição de fibrina, há ativação do sistema fibrinolítico, por meio da ação da plasmina sobre a fibrina, gerando inicialmente produtos de degradação de fibrina e, por último, o menor fragmento desta, o dímero-D (BLACKWELL et al., 2000; KILIC, et al., 2007).

Entretanto, torna-se oportuno ressaltar a relação da doença maligna com o FT, principal ativador do sistema hemostático. A expressão de FT, promovendo a atividade procoagulante e a atividade pró-angiogênica, é modulada por mutações oncogênicas do *K-ras* e no gene supressor de tumor *TP53* em células de tumor coloretal humano conforme reportado por Yu e cols. (2005). Estes autores também relataram que lesões oncogênicas provocaram um aumento de liberação de micropartículas contendo FT na circulação, o que poderia facilitar uma coagulopatia sistêmica. Conforme revisado por

RAK e cols. (2006), recentes estudos têm começado a explicar como doenças malignas podem desregular o sistema hemostático, por meio de oncogenes ativados (*K-ras*, *EGFR*, *PML-RAR $\alpha$*  e *MET*) ou através de genes supressores tumorais (*TP53* e *PTEN*). Estas alterações nos genes podem aumentar o risco de trombose por induzir a expressão de FT que é um potente procoagulante, além de aumentar os níveis de PAI-1, um inibidor da fibrinólise. Os autores ainda mencionam que tais genes mutados, frequentemente, interagem com fatores epigenéticos como hipóxia, inflamação, terapia anti-tumoral, contato entre componentes do sangue e células tumorais, além de vesículas procoagulantes provenientes destas células, na circulação.

Com base no exposto para os dois marcadores hemostáticos, parece razoável sugerir que o dímero-D correlaciona melhor com a evolução do câncer de mama receptor hormonal negativo comparado ao FT, embora nenhum dos dois marcadores se mostraram úteis na predição do desfecho, ou seja, os níveis observados ao diagnóstico não foram preditores de metástase/óbito.

Finalmente, uma oportuna complementação ao assunto que vem sendo ora discutido se refere ao real papel da ativação da coagulação e sua relação com oncogenes, na progressão do câncer. Recentes estudos reportaram que o uso da heparina de baixo peso molecular apresenta efeito anti-tumoral (PETRALIA et al., 2005). Isto é consistente com a idéia de que várias proteínas da coagulação possuem importante papel em processos celulares desenvolvendo crescimento tumoral, invasão, metástase e angiogênese (BROWDER et al., 2000). Por exemplo, FT pode favorecer o crescimento tumoral por aumentar a geração local de proteases da coagulação (BOCCACCIO et al, 2005). Estas proteases (FVIIIa, FXa e trombina) ativam vias de sinalização intracelular em células tumorais por meio de clivagem de receptores ativados por proteases (PAR), particularmente PAR-1 e PAR-2 (BELTING et al., 2005). Finalmente, estas alterações podem favorecer a expressão de potentes fatores angiogênicos (VEGF e IL8), supressão de inibidores angiogênicos (trombospondinas 1 e 2), desencadeando genes prosobrevida (Bclxl) e acentuada alteração de propriedades metastáticas e migratórias (BELTING et al., 2005).

Muitas questões importantes para a conduta médica no tratamento do câncer de mama receptor hormonal negativo parecem obscuras. Um importante aspecto ainda a

considerar consiste na potencialidade do uso de Heparina de Baixo Peso Molecular (HBPM) e outros anticoagulantes como adjuvante para as terapias alvo e antiangiogênica em vários tipos de câncer, inclusive no de mama (PETRALIA e cols., 2005).

O presente estudo desenvolvido em mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo teve como vantagem o fato de ter contemplado um subgrupo de pior prognóstico, o triplo negativo, o qual contribui com 10 a 17% de todos os tumores de mama (CAREY et al., 2007). Não foram encontrados estudos similares em nosso meio, cujo tema poderá ter continuidade em estudos posteriores permitindo um maior conhecimento desta complexa, heterogênea e grave doença.

As mulheres selecionadas para compor o grupo controle foram provenientes também da região Sul do país a fim de que pacientes e controles pudessem apresentar características étnicas e sociais similares, aspecto importante para a validação da interpretação dos resultados obtidos. As coletas de sangue das pacientes e controles foram realizadas no mesmo período, anulando o possível efeito do congelamento por diferentes períodos sobre os marcadores hemostáticos.

Porém, como fatores limitantes do estudo e que podem ter impedido o achado de diferenças significativas entre os grupos, bem como ter sido decisivo para a ausência de associação entre variáveis de prognóstico e aparecimento de metástases/óbito e entre variáveis de prognóstico e níveis plasmáticos de dímero-D, ressalta-se o número limitado de mulheres que participaram deste estudo. Além do mais, como doença multifatorial, as mulheres com o câncer de mama possivelmente apresentavam outras características importantes, porém desconhecidas até o momento, não sendo portanto, passível de exclusão. Doenças intercorrentes também não podem ser completamente excluídas.

### **6.3 Aspectos moleculares**

A pesquisa de polimorfismos genéticos pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico, bem como no acompanhamento do câncer da mama, por serem

marcadores de prognóstico (JEZEQUEL et al., 2004) e por estarem associados ao aumento da susceptibilidade ao câncer (SAADAT; NSARI-LARI, 2008).

A importância do polimorfismo Gly388Arg no gene *FGFR4*, das mutações C677T no gene *MTHFR*, C282Y e H63D no gene *HFE*, em pacientes com câncer de mama, foi avaliada através da comparação da frequência destas alterações genéticas entre as pacientes e o grupo de mulheres sem o histórico da doença. Para isto, o grupo controle foi constituído por mulheres oriundas da mesma região de origem das pacientes, com faixas etárias semelhantes, mantendo o mais homogêneo possível o *background* genético a fim de diminuir as variações intra-populacionais.

Comparando a frequência do polimorfismo Gly388Arg no gene *FGFR4* nos dois grupos estudados (**Tabela 7**), observa-se uma maior frequência deste polimorfismo no grupo controle ao utilizar o modelo de dominância ( $p=0,032$ ). No entanto, quando avaliada a homozigose isoladamente, num modelo de herança recessiva, nenhuma diferença foi observada, sugerindo que o polimorfismo Gly388Arg não está associado ao surgimento da doença. Este achado está de acordo com os resultados descritos por Jezequel e cols. (2004) nos quais a presença do polimorfismo não aumenta, em indivíduos hígidos, o risco para câncer de mama.

A frequência da mutação C677T no gene da *MTHFR* não mostrou diferença significativa entre os grupos de mulheres com câncer de mama e os controles (Tabela 8), sugerindo que, isoladamente, esta mutação não apresenta uma associação com o surgimento da doença (CHOU et al., 2006; XU et al., 2007).

Acredita-se que as propriedades pró-oxidativas do ferro possam acarretar uma instabilidade genômica, favorecendo o desenvolvimento de tumores. Assim, as mutações no gene *HFE*, que contribuem para uma maior absorção de ferro pelo organismo, assumiriam potencial importância no desenvolvimento do câncer (GUNEL-OZCAN et al., 2006). Os resultados do presente estudo obtidos na análise da mutação C282Y não corroboraram para fortalecer esta hipótese, já que a incidência destas mutações em mulheres com câncer de mama não diferiu significativamente das mulheres do grupo controle. Entretanto, quando analisada a presença da mutação H63D em um modelo recessivo, observou-se uma maior frequência desta mutação na mulheres com câncer de mama ( $p=0,046$ ) (**Tabela 10**), fortalecendo dados da literatura

que mostram a associação entre esta mutação H63D e a doença (GUNEL-OZCAN et al., 2006; KALLIANPUR et al., 2004). Entretanto, um outro estudo não observou esta associação, sugerindo que exista uma variabilidade populacional com relação ao encontro desta mutação (KONDRASHOVA et al., 2006).

Apesar de ter sido observada forte descendência européia nos dois grupos estudados, sendo selecionadas mulheres oriundas de uma mesma região geográfica, a variabilidade étnica nesta população não pode ser descartada. Considerando que marcadores de origem étnica não foram avaliados, a variação intra-populacional, associada a um grupo amostral pequeno, pode explicar provavelmente a ausência da associação entre algumas mutações/polimorfismos com o câncer de mama, contrapondo os resultados de outros estudos (KALLIANPUR et al., 2004). Entretanto, devido ao fato de que em outros trabalhos estas alterações genéticas não tenham sido relacionadas ao desenvolvimento da doença (KONDRASHOVA et al., 2006), observa-se que ainda existem controvérsias com relação ao impacto da presença destas mutações/polimorfismos no câncer de mama.

Após avaliar a importância das mutações/polimorfismos no desenvolvimento do câncer de mama, foi realizada uma análise de regressão logística múltipla envolvendo as mutações C677T, H63D e Gly388Arg a fim de verificar a implicação destas alterações moleculares no prognóstico da doença e das variantes clínicas (**Tabela 11**). A mutação C282Y não foi incluída na análise devido ao pequeno número de indivíduos que apresentaram esta mutação em homo e heterozigose nos dois grupos.

A mutação C677T mostrou uma associação com a ocorrência de metástase/óbito e, conseqüentemente, com o comprometimento de linfonodos. Estes dados corroboram com os achados de Campbell e cols. (2002), Chou e cols. (2006) e Xu e cols (2007), os quais demonstraram que a presença desta mutação está relacionada a uma menor sobrevida de mulheres com câncer de mama. É importante ressaltar que dos oito óbitos ocorridos desde o início do presente estudo, cinco pacientes (62,5%) apresentaram a mutação, sendo duas delas em homozigose e três em heterozigose.

Foi também observada a associação do polimorfismo Gly388Arg à presença de metástase/óbito. Embora este polimorfismo não tenha se mostrado eficaz como um

marcador de comprometimento linfonodal, conforme já descrito por Jezequel e cols. (2004), alguns trabalhos confirmam sua associação com um pior prognóstico e menor sobrevida da paciente (SPINOLA et al., 2005; THUSSBAS et al, 2006).

Embora não tenha sido encontrada uma relação significativa entre a mutação H63D e metástase/óbito, observou-se uma associação com o comprometimento de linfonodos e com a presença da proteína p53. Sabe-se que a relação desta mutação com o câncer de mama baseia-se no aumento da deposição intracelular de ferro, o qual pode desencadear eventos mutacionais no DNA (KALLIANPUR et al., 2004; GUNEL-OZCAN et al., 2006). Isso explicaria a associação com a p53, uma vez que o aumento desta proteína defectiva na imunohistoquímica é decorrente de mutações no gene *TP53*.

Sabe-se que as alterações no gene *MTHFR*, tendo a C677T com a mutação principal, estão relacionadas a uma diminuição da síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o qual consiste no principal doador de grupamento metil para o DNA (ERICSON et al., 2009). Uma vez comprometida a metilação do DNA, principalmente em regiões promotoras, aumenta-se a chance de oncogenes apresentarem um nível de expressão elevada, desencadeando o evento tumoral. Esta hipótese explicaria a associação observada entre a mutação C677T e a superexpressão do oncogene HER2. É interessante ainda o encontro da relação entre esta mutação e o Ki67. Por constituir-se um marcador de proliferação celular no tumor, observa-se o aumento de sua expressão na presença da mutação (considerando como positivo a sua presença em mais de 30% das células), o que novamente pode justificar a associação com a mutação C677T.

Acredita-se que a associação encontrada entre a mutação Gly388Arg e o aumento da expressão de Ki67 seja indireta, uma vez que esta mutação está relacionada a um pior prognóstico, bem como a presença de Ki67 em valores superiores a 30%. Portanto esta relação já seria esperada, o que foi confirmado através da análise de regressão logística.

Dentre todas as variáveis estudadas, a relação das mutações/polimorfismos com metástase/óbitos torna-se particularmente importante como fator prognóstico da doença. Desta forma, este risco foi expresso através da probabilidade de cada alteração molecular influenciar o evento clínico (**Tabela 12**).



A probabilidade da mutação H63D no gene *HFE* de influenciar metástase/óbito foi menor (22,4%) quando comparado às mutações C677T e Gly388Arg, conforme já havia sido demonstrado na análise de regressão logística. Desta forma, conclui-se que a mutação H63D não está envolvida no prognóstico, mas em eventos mutacionais que podem desencadear a doença.

A mutação C677T no gene da *MTHFR* apresentou uma probabilidade intermediária entre as outras mutações (35%), mas cuja ação em desencadear metástase/óbitos foi potencializada com a presença concomitante da mutação Gly388Arg. Assim, pode-se concluir que o envolvimento do gene da *MTHFR* mutante no pior prognóstico de câncer de mama é indireto, uma vez que as mutações levam à hipometilação em genes que desencadeiam a proliferação celular, o que por sua vez resulta em maior chance de metástase/óbito.

Embora já descrita a associação entre a mutação Gly388Arg no gene *FGFR4* (JEZEQUEL et al., 2004) e o pior prognóstico do câncer de mama, esta relação não havia sido ainda mensurada. No presente trabalho foi possível estabelecer uma probabilidade de risco (40,65%), confirmando que a presença desta mutação por si só aumenta significativamente a chance da paciente desenvolver metástase e conseqüente óbito, tornando-a, portanto, um ótimo marcador de prognóstico da doença (**Tabela 12**). Cumpre ainda ressaltar que o efeito sinérgico das mutações C677T e Gly388Arg correspondem à combinação de maior risco para o desenvolvimento da metástase/óbito no câncer de mama receptor hormonal negativo.

#### **6.4 Perspectivas futuras**

Após todas as considerações acima, vislumbra-se a seguinte indagação: constitui o dímero-D um marcador com potencial valor para monitorar pacientes com câncer de mama receptor hormonal negativo após o diagnóstico inicial?

Pela análise dos dados obtidos no presente estudo, é possível que o monitoramento do dímero-D possa complementar o elenco de técnicas de prognóstico convencionais utilizadas para monitoramento de tais pacientes uma vez diagnosticado o

tumor. Esta assertiva é suportada pelo encontro de níveis significativamente elevados de dímero-D (DD2 ou DD3) nas pacientes quando estas já apresentavam recidiva, embora ao diagnóstico (DD1) este marcador não tenha se mostrado útil para predizer quais mulheres evoluíam ou não para recidiva.

Para responder a indagação acima, é proposto em continuidade ao presente estudo, um outro estudo prospectivo envolvendo um número significativamente maior de pacientes com câncer de mama, recém diagnosticadas, e ainda comprovadamente sem metástases, as quais seriam monitoradas por meio da avaliação do dímero-D em diversos momentos seguindo-se ao diagnóstico inicial.

Uma vez obtidos os valores de dímero-D dentro de um espaço de tempo pré-definido, estes seriam analisados à procura de associação entre os níveis deste marcador e a presença ou ausência de recidiva. Se tal associação se confirmar, é possível que níveis de dímero-D em contínua elevação, possa orientar para a realização de uma anamnese mais rigorosa e complementada pelos métodos convencionais de investigação de recidiva, visando diagnóstico precoce desta condição. A adesão à idéia por parte de mastologistas e oncologistas constitui fator decisivo para o delineamento final do estudo e implementação do mesmo, envolvendo mulheres com câncer de mama receptor hormonal positivo ou negativo.

## 8 CONCLUSÕES

1. Ao diagnóstico, foi confirmado um estado de hipercoagulabilidade, com deposição de fibrina, em mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo, traduzido por níveis plasmáticos elevados de dímero-D e de fator tissular;
2. O dímero-D não foi capaz de funcionar como um marcador de prognóstico ao diagnóstico, todavia, foi capaz de refletir o agravamento da doença traduzida por um estado de hipercoagulabilidade, com deposição de fibrina e iminente óbito;
3. Níveis normais de dímero-D não permitem sugerir sobrevida livre de doença;
4. As variáveis de prognóstico triplo negativo, status menopausal, grau histológico, HER2, p53, Ki67, não afetaram significativamente a percentagem de sobrevida ao longo de 24 meses, embora pacientes com comprometimento linfonodal e o tamanho do tumor tenham apresentado algum impacto na sobrevida;
5. As variáveis de prognóstico não se mostraram associadas ao desenvolvimento de metástases/óbito e nem com os níveis dos marcadores hemostáticos, tais como dímero-D e fator tissular;
6. Os níveis de fator tissular não aumentaram nas mulheres que evoluíram para recidiva/óbito;
7. A mutação H63D em homozigose no gene *HFE* apresentou associação com o câncer de mama e mostrou-se relacionada ao comprometimento de linfonodos e positividade para p53;
8. A mutação C677T no gene *MTHFR* apresentou associação com metástase/óbito, comprometimento de linfonodos, superexpressão de HER2 e Ki67.
9. A presença do polimorfismo Gly388Arg no gene *FGFR4*, se apresenta associado à variável Ki67 e à maior probabilidade de risco de desenvolver metástase/óbito quando comparado às outras alterações genéticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIOU, A.C. et al. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 82, n. 4, p. 937-948, 2008.

ARIGA, R. et al. Correlation of her-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. **Breast J.**, v. 11, n. 4, p. 278-280, 2005.

ARRIOLA, E. et al. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** 2007

ASKMALM, M.S. et al. Mutation and accumulation of p53 related to results of adjuvant therapy of postmenopausal breast cancer patients. **Acta Oncol.**, v. 43, n. 3, p. 235-244, 2004.

BADANO, J. L.; KATSANIS, N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. **Nat Rev Genet.**, v. 3, n.10, p. 779-89, 2002.

BELTING, M., AHAMED, J., RUF, W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and câncer. **Atheroscler Thromb Vasc**, v. 25, p. 1545-1550, 2005.

BENOY, I.H. et al. Relative microvessel area of the primary tumour, and not lymph node status, predicts the presence of bone marrow micrometastases detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with clinically non metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 7, n. 2, p. 210-219, 2005.

BLACKWELL, K. et al. Plasma D-dimer levels in operable breast cancer patients correlate with clinical stage and axillary lymph node status. **J.Clin.Oncol.**, v. 18, n. 3, p. 600-608, 2000.

BLACKWELL, K.L. et al. HER-2 gene amplification correlates with higher levels of angiogenesis and lower levels of hypoxia in primary breast tumors. **Clin.Cancer Res.**, v. 10, n. 12, p. 4083-4088, 2004.

BLOOM, H.J.; RICHARDSON, W.W. 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, n. 3, p. 359-377, 1957.

BOCCACCIO, C., SABATINO, G., MEDICO, E. et al., Th MET oncogene drives a genetic programme linking câncer to hemostasis. **Nature**, v.434, p.396-400, 2005.

BOGENRIEDER, T.; HERLYN, M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. **Oncogene**, v. 22, n. 42, p. 6524-6536, 2003.

BORG, A. et al. HER2/neu amplification and comedo type breast carcinoma. **Lancet**, v. 1, n. 8649, p. 1268-1269, 1989.

BOUCHARABA, A. et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. **J.Clin.Invest.**, v. 114, n. 12, p. 1714-1725, 2004.

BRASIL Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de mama: Documento de Consenso**. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

BRASIL Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estadiamento**. Disponível:[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=54](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=54)>. Acesso em 25 jul 2007.

BRASIL Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRETON, J. D., et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J. Clin. Oncol.**; v.23; p. 7350–7360, 2005.

BROWDER, T., FOLKMAN, J., PIRIE-SHEPHERD, S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. **J Biol Chem**. V.275, p.1521-1524, 2000.

BULLER, H.R. et al. Cancer and thrombosis: from molecular mechanisms to clinical presentations. **J.Thromb.Haemost.**, v. 5, n. 1, p. 246-254, 2007.

BURKE, D., et al. Fibroblast growth factor receptors: Lessons from the genes. **Trends Biochem Sci**; v. 23; p. 59-62, 1998

BUTENAS, S; VAN'T, V. C.; MANN, K. G. "Normal" thrombin generation. **Blood**, v. 94, n. 7, p. 2169-2178, 1999.

CAINE, G.J. et al. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. **Neoplasia**, v. 4, n. 6, p. 465-473, 2002.

CAMPBELL, I. G. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Breast Cancer Res.**,v. 4, n. 6, p.14, 2002.

CAREY, L. A., et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clin. Cancer Res.**; v. 13; p. 2329–2334, 2007.

CASTAGNETTA, L. A. et al. Tissue content of hydroxyestrogens in relation to survival of breast cancer patients. **Clin.Cancer Res.**, v. 8, n. 10, p. 3146-3155, 2002.

CAVALCANTE JUNIOR, G. B. et al. p53 e as hemopatis malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**.v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.

CHOI, H.K. et al. Enhanced expression of aromatase in p53-inactivated mammary epithelial cells. **Endocr.Relat Cancer**, v. 15, n. 1, p. 139-147, 2008.

CHOU, Y.C. et al. Genetic polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene, plasma folate levels and breast cancer susceptibility: a case-control study in Taiwan. **Carcinogenesis**, v.27, n.11, p. 2295-2300, 2006.

CIATTO, S. et al. Tumor size and prognosis of breast cancer with negative axillary nodes. **Neoplasma**, v.37, n.2, p. 179-184, 1990.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. 1400p

DENT, R. et al Triple-negative breast cancer:clinical features and patterns of recurrence. **Clin.Cancer Res.**, v. 13; p. 4429–4434, 2007

DETMAR, M. Tumor angiogenesis. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 5, n. 1, p. 20-23, 2000.

DIRIX, L.Y. et al. Plasma fibrin D-dimer levels correlate with tumour volume, progression rate and survival in patients with metastatic breast cancer.**Br. J. Cancer**, v. 86, n. 3, p. 389-395, 2002.

DUCHEMIN, J. et al. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. **Thromb.Haemost.**, v. 99,n. 4, p. 767-773, 2008.

DVORAK, FH, RICKLES FR. Malignancy and Haemostasis.In:Cleman RB, Marder, VJ, Clowes, AW, George, JN, Goldhaber, SZ, editors. **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**.5th ed.Philadelphia. Lippincott Company Williams & Wilkins, p.851-73, 2006.

EICHINGER, S. et al. D-dimer levels and risk of recurrent venous thromboembolism. **JAMA**, v. 290, n. 8, p. 1071-1074, 2003.

ERICSON, U., et al. Folate intake, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, and breast cancer risk in women from the Malmö Diet and Cancer cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 18, n. 4, p. 1101-10, 2009.

ERMAN, M. et al. Tamoxifen-induced tissue factor pathway inhibitor reduction: a clue for an acquired thrombophilic state? **Ann. Oncol.**, v. 15, n. 11, p. 1622-1626, 2004.

FABIAN, C.J.; KIMLER, B.F. Chemoprevention of breast cancer: implications for postmenopausal women. **Drugs Aging**, v. 19, n. 1, p. 43-78, 2002.

FALANGA, A. Thrombophilia in cancer. **Semin. Thromb. Hemost.**, v.31, p.104-10, 2005.

FEHM, T., et al. Changes of serum HER2 status during clinical course of metastatic breast cancer patients. **Anticancer Res.**, v. 24, n. 6, p. 4205-4210. 2004.

FRANKS, L.M.; TEICH, N. **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. São Paulo: Roca, 1990.

GAO, C.M., et al. MTHFR polymorphisms, dietary folate intake and breast cancer risk in Chinese women. **J Hum Genet.**, v. 54, n. 7, p. 414-8, 2009.

GIBBS, P. AND TURNBULL, L.W. Textural analysis of contrast-enhanced MR images of the breast. **Magn. Reson. Med.**, v. 50, n. 1, p. 92-98, 2003.

GLASSMAN, AB. Hemostatic abnormalities associated with cancer and its therapy. **Ann. Clin. Lab.Sci.**, v.27, p.391-5, 1997.

GOMES, M.C. et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 103, n. 3, p. 349-353, 2007.

GONÇALVES, A. T. C. et al. Câncer de mama: mortalidade crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 8, p.1785-90, ago. 2007.

GOVIDAN, R.; ARQUETTE, M. A. **Washington manual de oncologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GRIGNANI, G.; MAIOLO, A. Cytokines and hemostasis. **Haematologica**,v.85, n.9, p.967-972, 2000.

GULBEN, K. et al. Prognostic factors affecting locoregional recurrence in patients with stage IIIB noninflammatory breast cancer. **World J. Surg.**, v. 31, n. 9, p. 1724-1730, 2007.

GUNEL-OZCAN, A. et al. HFE H63D mutation frequency shows an increase in Turkish women with breast cancer. **BMC. Cancer**, v. 6, n. 37, p. 1-7, 2006.

HAFFY, B.G. et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple-negative early-stage. **J.Clin.Oncol.** v. 24; p. 5652–5657, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A., The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARRIS, E.E.; SOLIN, L.J. The diagnosis and treatment of ductal carcinoma in situ of the breast. **Breast J.**, v. 6, n. 2, p. 78-95, 2000.

HARTMANN, L. C. et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, n. 3, p. 229-237, 2005.

HICKS, D. G. et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5 / 6, and overexpress HER2 or EGFR. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 30, p. 1097–1104, 2006.

HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Rev.**, v. 17, n. 1, p. S1-S5, 2003.

HUGHES, D.J. Use of association studies to define genetic modifiers of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Fam. Cancer**, v. 7, n. 3, p. 233-44, 2008.

IWAYA, K. et al. Histologic grade and p53 immunoreaction as indicators of early recurrence of node-negative breast cancer. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 1, p. 6-12, 1997.

JEZEQUEL, P. et al. G388R mutation of the FGFR4 gene is not relevant to breast cancer prognosis. **Br. J. Cancer**, v. 90, n. 1, p. 189-193, 2004.

JOHNSON, M. L.; SEIDMAN, A. D. Emerging targeted therapies for breast cancer. **Oncology (Williston.Park)**, v. 19, n. 5, p. 611-618, 2005.

KALLIANPUR, A .R. et al. Increased prevalence of the HFE C282Y hemochromatosis allele in women with breast cancer. **Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 13, n. 2, p. 205-212, 2004.

KAUSCH, I. et al. Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. **Int. J. Cancer**, v. 105, n. 5, p. 710-716, 2003.

KILIC, M. et al. Prognostic value of plasma D-dimer levels in patients with colorectal cancer. **Colorectal Dis.**, v. 10, n. 3, p. 238-41, 2007.

KIM, HK, SONG, KS, LEE, KR, KANG, YH, LEE, YJ, LEE, ES. Comparison of plasma D dimer and thrombus precursor protein in patients with operable breast cancer as a potential predictor of lymph node metastasis. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, v.15, p.9-13, 2004.

KONDRASHOVA, T. V. et al. Frequency of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Russian healthy women and patients with estrogen-dependent cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1762, n. 1, p. 59-65, 2006.

KOUIDOU, S. et al. G:C > A:T mutations and potential epigenetic regulation of p53 in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 106, n. 3, p. 351-360, 2007.

KWAAN, H. C. The plasminogen-plasmin system in malignancy. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 11, n. 4, p. 291-311, 1992.



LACROIX, M. et al. Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 11, p. 497–522, 2004

LANG, J.E. et al. HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 8, n.9, p. 51-2, 2008.

LASSER, G. et al. C1qTNF-related protein-1 (CTRP-1): a vascular wall protein that inhibits collagen-induced platelet aggregation by blocking VWF binding to collagen. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 423-430, 2006.

LEWIS, S. J. et al. Meta-analyses of Observational and Genetic Association Studies of Folate Intakes or Levels and Breast Cancer Risk **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 22, p. 1607 – 1622, 2006.

LINENBERGER, M. L.; WITTKOWSKY, A. K. Thromboembolic complications of malignancy. Part 1: Risks. **Oncology (Williston.Park)**, v. 19, n. 7, p. 853-861, 2005.

LORETO, MF, De MARTINIS, M, CORSI, MP, MODESTI, M, GINALDI, L. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management. **Pathol. Oncol. Res.**, v.6, p.301-12, 2006.

MACKMAN, N. The many faces of tissue factor. **J Thromb Haemost.** v.7, n.1, p.136-9, 2009.

MENEZES, M. V., et al. Protein expression of c-erbB-2 and p53 in normal ducts ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the same breast. **São Paulo Med. J.**, v. 124, n. 3, p. 121-124, 2006.

MENKE, C. H. et al. **Rotinas em mastologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

MIELICKI, W. P. Biochemistry of cancer procoagulant. **Haemostasis**, v. 31, n. 1, p. 8-10, 2001.

MIELICKI, W. P. et al. Activation of blood coagulation and the activity of cancer procoagulant (EC 3.4.22.26) in breast cancer patients. **Cancer Lett.**, v. 146, n. 1, p. 61-66, 1999.

MORRIS, G.J. et al. Differences in breast carcinoma Characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and end results database. **Cancer**; v.110; p. 876–884, 2007.

MULLIGAN, L. M. et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. **Nature**, v. 363, p. 458-460, 1993.

NIELSEN T.O. et al., Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**; v.10; p.5367–5374, 2004.

NISHIMURA, R. Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? **Breast Cancer**. v. 15, n.4, p.303-8, 2008.

OZBAS, S., DAFYDD, H.; PURUSHOTHAM, A. D. Bone marrow micrometastasis in breast cancer. **Br. J. Surg.**, v. 90, n. 3, p. 290-301, 2003.

PANSINI, F. et al. Oxidative stress, body fat composition, and endocrine status in pre- and postmenopausal women. **Menopause.**, v. 15, n. 1, p. 112-118, 2008.

PETRALIA, G. A., LEMOINE, N. R., KAKKAR, A.K., Mechanisms of disease: the impact of antithrombotic therapy in câncer patients. *Nat Clin Pract Oncol*. v.2, p. 236-263, 2005.

PIETRAPERIOSA, A. et al. HFE gene mutations an Apulian population: allele frequencies. **Eur.J.Epidemiol**, v. 18, n. 7, p. 685-689, 2003.

PINHO, V. F.; COUTINHO, E. S. Risk factors for breast cancer: a systematic review of studies with female samples among the general population in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 2, p. 351-360, 2005.

RAK, J. et al. Oncogenes, trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans. **Cancer Res**. v. 66, n. 22, p. 10643-10646, 2006.

RAKHA, E. A. et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer**. v. 109, n. 1, p. 25-32, 2007.

REIS-FILHO, J. S. et al. The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. **Pathol. Res. Pract.**, v. 201, p. 713–725, 2005.

REVILLION, F., BONNETERRE, J.; PEYRAT, J.P. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. **Eur. J. Cancer**, v. 34, n. 6, p. 791-808, 1998.

RICKLES, F. R.; FALANGA, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. **Thromb. Res**. v. 102, n. 6, p. V215-V224, 2001.

ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ROSEN, E.M. et al. HGF/SF in angiogenesis. **Ciba Found. Symp.**, v. 212, p. 215-226, 1997.

ROUZIER, R., et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin. Cancer Res**; v. 11; p. 5678–5685, 2005.

SAADAT, M.; NSARI-LARI, M. Polymorphism of XRCC1 (at codon 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 499, p. 51-60, 2008.

SALGADO, R. et al. Arterio-venous gradients of IL-6, plasma and serum VEGF and D-dimers in human cancer. **Br. J. Cancer**, v. 87, n. 12, p. 1437-1444, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning** – A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHREER, I.; LUTTGES, J. Precursor lesions of invasive breast cancer. **Eur. J. Radiol**, v. 54, n. 1, p. 62-71, 2005.

SELLAHEWA, C., NIGHTINGALE, P.; CARMICHAEL, A. R. Obesity and HER2 overexpression: a common factor for poor prognosis of breast cancer. **Int. Semin. Surg. Oncol.**, v. 5, n. 2, p.1-3, 2008.

SCHMIDT, L. et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. **Nat Genet**, v.16, p. 68-73, 1997.

SINGLETERY, S. E.; CONNOLLY, J. L. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **CA Cancer J. Clin.**, v. 56, n. 1, p. 37-47, 2006.

SORENSEN, H.T. et al. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 25, p. 1846-1850, 2000.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, p. 10869–10874, 2001.

SPINOLA, M. et al. FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prognosis of breast and colorectal cancer. **Oncol. Rep.**, v. 14, n. 2, p. 415-419, 2005.

THUSSBAS, C. et al. FGFR4 Arg388 allele is associated with resistance to adjuvant therapy in primary breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 23, p. 3747-3755, 2006.

TESCHENDORFF, A. E. ,et al. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. **Genome Biology** .,V. 8, n. 157, 2007.

TISCHKOWITZ, M. et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 7; p 134; 2007.

TRIVERS, K. F. et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. **Cancer Causes Control.**, v. 20, n. 7, p.1071-82, 2009.

TROUSSEAU, A. Phlegmasia alba dolens. Clinique medicale de l'hotel-dieu de Paris 2<sup>nd</sup> ed. Paris, France. The Sydenham Society; p.654-672; 1865

VAN, V. et al. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 12, p. 7983-7994, 1997.

VERSTEEG, H. H. et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 190-199, 2008.

VIALE, G. Histopathology of primary breast cancer 2005. **Breast**, v. 14, n. 6, p.487-492, 2005.

XU, X. et al. Polymorphisms of one-carbon-metabolizing genes and risk of breast cancer in a population-based study. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 7, p.1504-1509,2007

WEITZ, I. C. et al. Chemotherapy-induced activation of hemostasis: effect of a low molecular weight heparin (dalteparin sodium) on plasma markers of hemostatic activation. **Thromb. Haemost.**, v. 88, n. 2, p. 213-220, 2002.

WOGAN, G. N. et al. Environmental and chemical carcinogenesis. **Semin.Cancer Biol.**, v. 14, n. 6, p. 473-486, 2004.

WOJTUKIEWICZ, MZ, SIERKO, E, KLEMENT, P, RAK, J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. **Neoplasia**, v.3, p.371-84, 2001.

WOJTUKIEWICZ, MZ, SIERKO, E, RAK, J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. **Semin. Thromb.Hemost.**, v.30,p.5-20, 2004

WÜNSCH FILHO, V.; MONCAU, J. E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995:padrões regionais e tendências temporais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 250-257, 2002.

YEATMAN, T.J. A renaissance for SRC. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 6, p. 470-480, 2004.

YIGIT, E. et al., Relation between hemostatic parameters and prognostic/predictive factors in breast cancer. **Eur J Intern Med.** v.19, n. 8, p. 602-7, 2008.

YU, J. L. et al. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. **J.Semin Thromb Hemost.** v. 30, n. 1, p. 21-30, 2004.

ZHANG et al. White Adipose Tissue Cells Are Recruited by Experimental Tumors and Promote Cancer. **Cancer Res.** v. 69, p. 5259-5266; 2009.

## APÊNDICE A- Questionário de exclusão

### AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E MOLECULAR EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA RECEPTOR HORMONAL NEGATIVO

As pacientes que atenderam estes critérios foram selecionadas como grupo controle.

- Faixa etária entre 40 e 70 anos. Idade \_\_\_\_ anos.
- Não apresentar histórico de câncer.
- Não apresentar histórico de trombose.
- Não apresentar histórico de câncer em parentes de primeiro grau.
- Não estar em uso de terapia de reposição hormonal.
- Não estar tomando anticoncepcional.
- Não estar grávida.

Pesquisadores: Anna Paula Batschauer, Maria das Graças Carvalho (Orientadora), Dr. Marcos Ribeiro (Colaborador).

Eu \_\_\_\_\_, autorizo a coleta do meu sangue para a pesquisa acima citada após as informações recebidas sobre os objetivos do trabalho.

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Data

**APÊNDICE B: Termo de consentimento livre e esclarecido****AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E MOLECULAR EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA RECEPTOR HORMONAL NEGATIVO**

Prezada Sra.

Este estudo tem como objetivo a obtenção de dados para uma melhor compreensão dos mecanismos hematológicos e moleculares envolvidos na evolução do câncer de mama.

Será realizada uma coleta de sangue, obtida através de punção venosa periférica, para a realização dos testes laboratoriais. A coleta seguirá os procedimentos padrões do laboratório de Análises Clínicas.

Informamos que todos os resultados obtidos serão sigilosos, não sendo permitido o acesso de qualquer pessoa estranha ao projeto de pesquisa. Caso você queira participar deste estudo, sua participação será de fundamental importância, autorize-nos a coletar uma amostra de 10 mL de seu sangue, que será utilizada nas análises deste projeto, assinado a autorização abaixo.

Gratos pela sua colaboração,

Pesquisadores: Anna Paula Batschauer, Maria das Graças Carvalho (Orientadora), Dr. Marcos Ribeiro (Colaborador).

**AUTORIZAÇÃO**

Autorizo a coleta de uma amostra de 10mL de meu sangue para ser utilizado em testes laboratoriais relativos ao projeto de pesquisa acima.

---

Nome do paciente


\_\_\_\_\_

Assinatura

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data

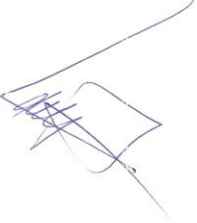
## ANEXO A - CEP UNIVALI


  
UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO,  
EXTENSÃO E CULTURA

**Certificado**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação hematológica e hemostática no prognóstico de pacientes com câncer de mama.", da acadêmica **Fabiana Viana Saraiva**, com a orientação da Professora Anna Paula de Borba Batschauer, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado através do parecer nº 156/2006 pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI.

Itajaí (SC), 25 de abril de 2008.

  
**Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho**  
Pro-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Cultura

  
**Prof. Alfeu Antônio Hausen Beck**  
Coordenador do CEP/UNIVALI

**ANEXO B - CEP UFMG**

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP**Parecer nº. ETIC 355/06****Interessada: Profa. Karina Braga Gomes Borges**  
**Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas**  
**Faculdade de Farmácia-UFMG****DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou *ad referendum*, no dia 14 de janeiro de 2007, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação hematológica e molecular no prognóstico do câncer de mama"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
Presidente do COEP-UFMG



## ANEXO C - Preparo de reagentes

### SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DE DNA

#### **a) SOLUÇÃO DE LISE DE HEMÁCIAS**

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Tris base              | 0,205 g |
| Cloreto de amônio      | 0,77g   |
| Água miliQ estéril qsp | 100 mL  |

Acertar o pH com HCL se necessário

#### **b) SOLUÇÃO DE LISE DE LEUCÓCITOS**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| NAOH                   | 0,8g  |
| SDS                    | 1,0g  |
| Água miliQ estéril qsp | 100mL |

Aquecer a 68°C para dissolver o SDS

#### **c) SOLUÇÃO DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEINAS**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Acetato de Amônio      | 28,75g |
| Água miliQ estéril qsp | 50mL   |

Esterilizar por filtração. Não autoclavar.

#### **d) SOLUÇÃO DE HIRATAÇÃO**

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris base        | 6,055g |
| Água estéril qsp | 50mL   |

Ajustar pH com HCL  
Autoclavar.

#### **e) EDTA 0,5 M pH 8,0**

|                 |        |
|-----------------|--------|
| EDTA            | 9,305g |
| Água mili Q qsp | 50mL   |

#### **f) TE(LOW) pH 8,0 - SOLUÇÃO DE USO**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Tris HCL               | 0,5 mL |
| EDTA 0,5               | 0,1 mL |
| Água miliQ estéril qsp | 50mL   |

#### **g) ÁLCOOL 70%**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Álcool etílico absoluto | 70,0mL |
| Água miliQ estéril qsp  | 100 mL |

#### **h) ÁLCOOL 95%**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Álcool absoluto        | 95mL  |
| Água miliQ estéril qsp | 100mL |

#### **i) SDS 10%**

|     |     |
|-----|-----|
| SDS | 10g |
|-----|-----|

Água miliQ estéril qsp 100ml  
Aquecer a 68°C para dissolver o SDS

**SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PREPARO DO GEL PARA ELETROFORESE****a) TBE 5X**

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Tris base            | 54 g    |
| Ácido bórico         | 27,5 g  |
| EDTA 0,5M pH 8,0     | 20 mL   |
| Água bidestilada qsp | 1000 mL |

Conservar à temperatura ambiente.

**b) SOPA PRIMITIVA 6% (PAGE 6%)**

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Acrilamida           | 58 g    |
| Bisacrilamida        | 2,0 g   |
| TBE 5X até completar | 200 mL  |
| Água bidestilada qsp | 1000 mL |

Usar máscara e óculos para o manuseio.  
Conservar resfriado.

**c) PERSULFATO 10%**

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Persulfato de amônio | 30 g   |
| Água                 | 300 mL |

Misturar o persulfato e água.  
Não respirar em cima da mistura – tóxico.  
Conservar resfriado.

**d) TBE 1%**

|                      |         |
|----------------------|---------|
| TBE 5X               | 200 mL  |
| Água bidestilada qsp | 1000 mL |

Conservar à temperatura ambiente.

**SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO DO GEL DE ACRILAMIDA PELO NITRATO DE PRATA****a) SOLUÇÃO FIXADORA**

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| Etanol pa.       | 5 mL              |
| Ácido acético    | 250 µl (15 gotas) |
| Água bidestilada | qsp 45 mL         |

Conservar à temperatura ambiente.

**b) SOLUÇÃO CORANTE = NITRATO DE PRATA 0,2%**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| AgNO <sub>3</sub> | 15 g  |
| Água bidestilada  | 50 mL |

Conservar à temperatura ambiente.

**c) SOLUÇÃO REVELADORA****1. Solução de NaOH**

|                |       |
|----------------|-------|
| NaOH           | 1,5 g |
| Água destilada | 50 mL |

**2 . Solução de uso**

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Solução de NaOH | 45 mL  |
| Formaldeído     | 150 µl |

## ANEXO D - Protocolo de preparo da extração de DNA

**a)** Pipetar em um tubo tipo Eppendorf®.

300 µL de sangue total

900 µL de solução de lise de hemácias

**b)** Incubar o material por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo invertido 5 a 6 vezes durante a incubação e posteriormente centrifugado a 14.000 rpm (13.000/16.000 g) por 2 minutos à temperatura ambiente.

**c)** Desprezar o sobrenadante e adicionar mais 600 µL de solução de lise, repetir o procedimento acima descrito.

**d)** Homogeneizar para ressuspender o *pellet* e adicionar 300 µL da solução de lise nuclear e o homogeneizado. Cerca de 150 µL da solução de precipitação de proteínas são adicionados e misturados em aparelho vórtex por 20 a 30 segundos.

**e)** Centrifugar novamente o material a 14.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente e transferir o sobrenadante para outro tubo contendo 300 µL de isopropanol.

**f)** Homogenizar por inversão a mistura e centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos.

**g)** Desprezar o sobrenadante e adicionar 300 µL de etanol a 70%, com inversão do tubo várias vezes.

**h)** Centrifugar novamente o tubo a 14.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente.

**i)** Desprezar o sobrenadante rapidamente e manter o tubo aberto à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos para secar o precipitado. Após este tempo, adicionar 50 µL de solução de hidratação.

**j)** Manter os tubos à temperatura ambiente por cerca de 12 horas.

**k)** As amostras foram estocadas em temperatura de 2-8°C até sua utilização.