



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

FILIPPE CAVALCANTI QUEIROZ PEIXE

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS
METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 EM LESÕES DE
MAMA**

**RECIFE
2016**

FILIPPE CAVALCANTI QUEIROZ PEIXE

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS
METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 EM LESÕES DE
MAMA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do
título de Mestre em Patologia.

Orientador

Profº Drº Jacinto da Costa Silva Neto

Área de Concentração

Patologia

Linha de Pesquisa

Modelos Morfofisiológicos e Imunológicos das Doenças

**RECIFE
2016**

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

P379e Peixe, Filipe Cavalcanti Queiroz.
Expressão imunohistoquímica das metaloproteinases de matriz 2 e 9
em lesões de mama / Filipe Cavalcanti Queiroz Peixe. – 2016.
65 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Neoplasias da mama. 2. Biomarcadores tumorais. 3.
Metaloproteinases da matriz. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador).
II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-062)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA

AUTOR: FILIPE CAVALCANTI QUEIROZ PEIXE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS
METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 EM LESÕES DE MAMA”.**

ORIENTADOR: PROF. DR. JACINTO DA COSTA SILVA NETO

DATA DA DEFESA: 14 DE SETEMBRO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas
Dept^o de Anatomia – CCS/UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Elyda Gonçalves de Lima
Dept^o de Genética – CB/UFPE

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Dept^o de Bioquímica – CB/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Profº. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Profª. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profº. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profº. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Profª. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADORA DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Profª. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Profº. Jacinto da Costa Silva Neto

RECIFE

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças e trilhou minha caminha até aqui;

A minha mãe, por entender minha ausência, me incentivar e dar forças nos momentos de tristeza e naqueles dias difíceis em que mais precisei de um conselho materno.

A minha tia Cristina, que sempre foi uma inspiração na minha vida e, se hoje me torno mestre, a tenho como exemplo de educadora;

Ao meu avô, Homero Queiroz (*in memoriam*), pelo exemplo de homem que foi e sempre será em minha memória;

Aos meus tios e tias, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, em especial tio Wilmar por acompanhar de perto todas as minhas conquistas;

A todos os familiares, por serem a base da pessoa que sou hoje;

Ao meu orientador, Profº Jacinto, pelos ensinamentos e confiança que em mim foi depositada.

À Elyda, que esteve comigo, foi parceira e me auxiliou durante boa parte deste trabalho;

Aos meus amigos, em especial Marcela, Rafa, Rhai, Carol, Bruna e Nessita que estavam comigo em todos os momentos, sejam nas tristezas ou nas alegrias;

Aos profissionais e pacientes do Hospital Barão de Lucena e Hospital das Clínicas, por lidarem com minhas idas incansáveis ao hospital e terem colaborado com a pesquisa;

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação em Patologia, pois sei que minha formação não seria completa sem vocês;

A Sylvania Paz, histotécnica do PosPat, pelo apoio e as longas conversas durante os procedimentos de laboratório;

Aos amigos do mestrado, em especial Lidi, Leo e Madi, pois foram minha família durante as aulas, seminários, estudos e provas;

Aos colegas do LPCM-UFPE em especial Dafne e Giw pelo tempo dedicado em me ajudar nos experimentos;

Aos amigos da UFRPE, pelo carinho e experiências vivenciadas durante a minha última jornada do dia;

Aos membros da pré-banca e da banca de defesa, pelas contribuições no trabalho que foi desenvolvido;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento através da concessão de bolsa de estudo;

Aos que não foram mencionados, mas que colaboraram direta ou indiretamente nessa conquista, meu agradecimento especial.

*“É preciso encontrar as coisas certas da vida
para que ela tenha o sentido que se deseja.
Assim, a escolha de uma profissão também é a arte
de um encontro, porque uma vida só adquire vida
quando a gente empresta nossa vida para o resto da vida.”*
(Vinícius de Moraes)

RESUMO

O câncer de mama é o câncer mais incidente, com exceção do câncer de pele não melanoma, e o maior causador de mortes por câncer em mulheres no mundo. A busca e a utilização dos marcadores tumorais como fatores prognósticos do câncer de mama têm crescido muito nos últimos anos e muitos desses marcadores podem ser localizados em fragmentos de tecido, pelo uso da imunohistoquímica. Dentre os possíveis marcadores estão as metaloproteinases de matriz (MMPs) que são endopeptidases dependentes de zinco e regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização, tornando-se moléculas fundamentais na comunicação entre o tumor e o estroma, exercendo desta maneira, um papel essencial no desenvolvimento e na progressão de malignidades humanas. Estão descritos na literatura diversos tipos de metaloproteinases no entanto, a expressão das MMP-2 e MMP-9 são consideradas possíveis marcadores ao desenvolvimento do câncer de mama. A regulação alterada destas enzimas favorece a degradação da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal, relacionando-se ao rompimento da adesão célula-célula facilitando a liberação de células neoplásicas e invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos, como também favorecendo a angiogênese. Dentro deste contexto, nosso trabalho analisou a expressão imunohistoquímica das MMP-2 e MMP-9 em diferentes tipos de lesões de mama. Foram obtidas 79 amostras parafinadas de tecido mamário, diagnosticadas e arquivadas entre 2009 a 2014, provenientes do Hospital Barão de Lucena e Hospital das Clínicas, onde foi observada baixa expressão das MMP-2 e MMP-9, porém destacando-se uma maior porcentagem na reatividade nas lesões malignas (20%) e invasivas (21%). Apesar desses resultados, não houve uma correlação estatisticamente significativa em nenhum cruzamento da expressão tecidual das MMPs com as variáveis do estudo. Esses resultados nos levam a concluir que novos estudos precisam ser realizados visando esclarecer melhor a relação entre as MMP-2 e MMP-9 com a carcinogênese mamária, bem como estabelecer possíveis aplicações prognósticas e terapêuticas, haja vista a disponibilidade de inibidores de Metaloproteinases de matriz.

Palavras-chave: Neoplasias da Mama. Biomarcadores Tumorais. Metaloproteinases da Matriz.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer except skin cancer nonmelanoma and the largest cause of cancer deaths in women worldwide. The search and the use of tumor markers as prognostic factors for breast cancer have greatly increased in recent years and many of these markers can be found in tissue sections by the use of immunohistochemistry. Among the possible markers the matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc dependent endopeptidases and regulate a wide variety of physiological processes and signaling events, becoming key molecules in the communication between tumor and stromal, in this way, an essential role in the development and progression of human malignancies. Several types of metalloproteinases are described in the literature, however, the expression of MMP-2 and MMP-9 are considered to be potential markers for the development of breast cancer. Altered regulation of these enzymes promotes the degradation of extracellular matrix (ECM) and basement membrane, relating to disruption of cell-cell adhesion facilitating the release of tumor cells and invasion of blood and lymphatic vessels, as well as favoring angiogenesis. In this context, our research analyzed the immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9 in different types of breast lesions. Were obtained 79 paraffin embedded samples of breast tissue, diagnosed and filed between 2009-2014, from the Barão de Lucena Hospital and Hospital das Clinicas, where it was observed low expression of MMP-2 and MMP-9, but highlighting a higher percentage in reactivity in malignant (20%) and invasive (21%) lesions. Despite these results, there was a statistically significant correlation in any crossing of tissue expression of MMPs with the study variables. These results lead us to conclude that further studies need to be conducted to clarify the relationship between MMP-2 and MMP-9 with mammary carcinogenesis and to establish possible prognostic and therapeutic applications, due to the availability of metalloproteinases inhibitors of matrix.

Keywords: Breast Neoplasms. Tumor Biomarkers. Matrix metalloproteinases.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Marcação nuclear e citoplasmática de MMP-2 pela IHQ em Carcinoma Ductal Invasivo (Tipo Negativo). (Fonte: arquivo pessoal)	41
Figura 2 – Marcação nuclear e citoplasmática de MMP-9 pela IHQ em Carcinoma Lobular Invasivo (1) e Carcinoma Ductal Invasivo (2). (Fonte: arquivo pessoal)	42

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1 – Principais classificações histológicas propostas pela OMS (2012) para tumores mamários.	17
Quadro 2 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama.	20
Quadro 3 – Classificação das MMPs baseada nos substratos.	22
Quadro 4 – Classificação das MMPs baseada na estrutura.	23
Quadro 5 - Descrição de artigos selecionados pelo autor referente à avaliação da expressão tecidual pela imunohistoquímica de MMP-2 e MMP-9 em câncer de mama.	27
Tabela 1 - Distribuição das variáveis no total da amostra.	38
Tabela 2 – Expressão Qualitativa de MMP-2 e MMP-9 no total das amostras.	39
Tabela 3 – Expressão Semiquantitativa de MMP-2 e MMP-9 no total das amostras.	39
Tabela 4 – Análise qualitativa da expressão de MMP-2 associada com as variáveis da amostra.	40
Tabela 5 – Análise qualitativa da expressão de MMP-9 associada com as variáveis da amostra.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	Soro Albumina Bovino, do inglês <i>Bovine serum albumin</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Cromogênico Diaminobenzidina
HBL	Hospital Barão de Lucena
HC	Hospital das Clínicas
HER-2	Receptor tipo-2 do fator de crescimento epidérmico humano, do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HRP	Peroxidase, do inglês <i>Horseradish Peroxidase</i>
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki-67	Marcador de proliferação celular
LPCM	Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz, do inglês <i>Matrix metalloproteinase</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
RE	Receptor de Estrógeno
RECK	Proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínio Kasal, do inglês <i>Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs</i>
RP	Receptor de Progesterona
SPSS	Pacote estatístico (<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>)
TIMP	Inibidor tissular de metaloproteinases, do inglês <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UICC	União Internacional Contra o Câncer
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial, do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>
Zn²⁺	Íon Zinco

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	Câncer de Mama: Classificação e Fatores Prognósticos	17
2.2	Metaloproteinases de Matriz (MMPs): Estrutura, Classificação, Ativação e Inibição	21
2.3	Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Câncinogênese	24
2.4	Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Câncer de mama	25
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Geral.....	28
3.2	Específicos.....	28
4	METODOLOGIA.....	29
4.1	Tipo e Local de Estudo	29
4.2	População alvo e período.....	29
4.3	Crítérios de inclusão e exclusão	29
4.4	Definição de variáveis	29
4.5	Método de coleta e análise do material biológico	30
4.5.1	Imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9.....	30
4.6	Coleta dos dados.....	32
4.7	Análise estatística	32
4.8	Aspectos éticos	32
5	RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL.....	33
	INTRODUÇÃO	33
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
	RESULTADOS.....	38
	DISCUSSÃO.....	44
	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
6	CONCLUSÕES.....	51
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICES	59
	Apêndice A - Tabela com cruzamento de informações da expressão de MMP-2 núcleo com as variáveis da amostra.....	59
	Apêndice B - Tabela com cruzamento de informações da expressão de MMP-2 citoplasma com as variáveis da amostra.....	60
	Apêndice C - Tabela com cruzamento de informações da expressão de MMP-9 núcleo com as variáveis da amostra.....	61
	Apêndice D - Tabela com cruzamento de informações da expressão de MMP-9 citoplasma com as variáveis da amostra.....	62
	ANEXOS	63
	Anexo 1 – PARECER DO CEP / CCS / UFPE	63
	Anexo 2 – ARTIGO DE REVISÃO	65

1. APRESENTAÇÃO

O câncer de mama é o câncer mais incidente, excetuando-se o de pele não melanoma, e a maior causa de mortes por câncer em mulheres no mundo. Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2016, é esperado para o Brasil 57.900 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. As regiões brasileiras onde este tipo de câncer é mais frequente, excetuando o câncer de pele não melanoma, são: Sudeste (71,18/ 100 mil), Sul (70,98/ 100 mil), Centro-Oeste (51,30/ 100 mil) e Nordeste (36,74/ 100 mil) (INCA, 2015).

Dentre os principais fatores para o desenvolvimento deste tipo de câncer, estão o envelhecimento, fatores genéticos (hereditariedade e mutações), influências hormonais (menstruação precoce e/ou menopausa tardia, reposição hormonal, uso prolongado de anticoncepcionais) e variáveis ambientais (Johnson-Thompson & Guthrie, 2000; Friedenreich *et al.*, 2001; Ahmad, 2013).

Mais de 80% dos casos de câncer de mama tem origem no epitélio ductal e os originados do epitélio lobular ocupam a segunda posição, porém os tumores podem atingir qualquer conjunto de células da anatomia mamária (Gusterson *et al.*, 2005; Pare *et al.*, 2013).

Para fins diagnósticos o exame clínico e a mamografia constituem o principal método de rastreio da doença atualmente, tendo como objetivo principal a detecção precoce (Elmore *et al.*, 2005). Após a observação do tumor, deve ser realizada a biopsia para diagnóstico final. Essa biopsia pode ser realizada através de Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF), Biopsia de agulha grossa ou Biopsia cirúrgica (Menke *et al.*, 2007).

O tratamento para o câncer de mama pode ser cirúrgico: tumorectomia, com a retirada apenas do tumor; quadrantectomia, retirada de tumor e parte da mama; mastectomia, retirada

total da mama. O tratamento pode ser complementado por radioterapia, quimioterapia e/ou hormonoterapia com a finalidade de oferecer uma melhor sobrevida à paciente (INCA, 2004).

Objetivando o diagnóstico precoce, a utilização dos marcadores tumorais como fatores prognósticos do câncer de mama tem crescido muito nos últimos anos. A maioria desses marcadores foram inicialmente identificados através de estudos moleculares ou bioquímicos, por imunohistoquímica ou hibridização *in situ* em cortes de tecido mamários. Os marcadores tumorais são importantes para diferenciar os tecidos normais daqueles neoplásicos (com boa especificidade) e devem ser de fácil detecção e/ou quantificação. Incluem-se nesta ampla categoria uma variedade de proteínas, algumas das quais estão associadas aos oncogenes e medidores da atividade proliferativa do tumor (Andriolo, 1996; Rosen, 1997; Eisenberg & Koifman, 2001; Zanetti *et al.*, 2011).

Devido a grande heterogeneidade dos tumores mamários, a identificação de marcadores específicos, que possam predizer quais os tumores de mama apresentam o pior prognóstico e que contribuam para uma melhor conduta terapêutica, torna-se um grande desafio (Perou *et al.*, 2000; Pare *et al.*, 2013).

Com a finalidade de fornecer novos marcadores úteis para diagnóstico, prognóstico e monitoramento do câncer, bem como novos alvos terapêuticos para traçar perfis moleculares, devido ao seu baixo custo (em comparação a técnicas moleculares) e fácil reprodutividade, a identificação e caracterização de moléculas pela imunohistoquímica torna-se bastante promissora. (Vizoso *et al.*, 2007; Niemiec *et al.*, 2012).

Nesse sentido as metaloproteinases de matriz (MMPs) tornam-se fortes candidatas a marcadores preditivos do câncer por estarem intimamente relacionadas com a perda de adesão celular e consequente progressão da malignidade tumoral (Duffy *et al.*, 2000). Consequentemente, a quantificação destas enzimas pode tornar-se uma importante ferramenta prognóstica do câncer de mama. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo principal

correlacionar a expressão de MMP-2 e MMP-9 com os graus de lesões neoplásicas e classificação dos tumores mamários. Para isso, foi feito uma análise tecidual pela técnica de imunohistoquímica das MMP-2 e MMP-9 e a sua expressão foi associada com diferentes variáveis relacionadas às lesões de mama.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de Mama: Classificação e Fatores Prognósticos

Os carcinomas representam a maioria das neoplasias malignas da mama e podem ser divididos, de acordo com a penetração ou não da membrana basal, em invasor e *in situ*, respectivamente. A localização e características particulares dos tumores também são levadas em consideração para a classificação, podendo ser dividido em lobular, ductal, medular, mucinoso, papilífero, inflamatório e tubular (Tavassoli & Devilee, 2003; Gobbi, 2012; Ahmad, 2013; Pare *et al.*, 2013).

Podemos observar no Quadro 1 os tipos histológicos mais comuns e importantes, segundo a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Quadro 1 – Principais classificações histológicas propostas pela OMS (2012) para tumores mamários

Tumores epiteliais	Não-invasores	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
		Carcinoma Ductal <i>in situ</i> com doença de Paget
		Carcinoma Lobular <i>in situ</i>
	Invasores	Carcinoma Ductal invasor
		Carcinoma Lobular invasor
		Carcinoma Medular
		Carcinoma Mucinoso
		Carcinoma Papilífero Invasivo
		Carcinoma Tubular
		Carcinoma Adenóide Cístico
		Carcinoma Secretor (juvenil)
		Carcinoma Apócrino
Carcinoma com apresentação clínica não usual	Carcinoma inflamatório	
	Carcinoma na gravidez e na lactação	
	Carcinoma oculto com metástases axilares	
Tumores mistos (epitelial e mesenquimal)	Tumor filodes	
Tumores Mesenquimais	Angiosarcoma	
	Fibrossarcoma	
	Leiomiossarcoma	
	Condrossarcoma	
	Osteosarcoma	
	Hemangiopericitoma	
	Dermatofibrossarcoma protuberante	
Tumores de pele na mama	Melanoma Maligno	
	Carcinoma Escamocelular	
	Carcinoma Basocelular	
Tumores Linfóides	Linfoma não-Hodgkin	
	Plasmocitoma	
	Infiltração por Leucemia	
	Doença de Hodgkin	

Somado a classificação histológica, os fatores prognósticos, que são definidos como parâmetros que podem ser mensurados no momento do diagnóstico/classificação, servem para prever a sobrevida, acompanhar a doença, bem como a evolução da terapêutica. A atualização e identificação de novos fatores promissores são de suma importância científica, clínica e conseqüentemente auxilia no bem-estar da paciente em tratamento (Donegan, 1979; Aaltomaa *et al.*, 1992; Abreu & Koifman, 2002; Ahmad, 2013).

Apesar da alta heterogeneidade dos tumores de mama em relação à morfologia, são discutidos no meio científico que perfis histológicos semelhantes apresentam diferentes prognósticos e respostas terapêuticas. Dentro deste contexto, pesquisadores traçaram perfis moleculares desses tumores, levando em consideração os receptores hormonais (RE e RP), HER-2 e Ki-67, justificando essas divergências prognósticas e terapêuticas das pacientes com câncer de mama.

A definição e relações existentes de alguns fatores prognósticos mais usados atualmente encontram-se a seguir:

- Estadiamento do Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) – Indicadores morfológicos, de baixo custo e fácil identificação que definem o tamanho do tumor (T), comprometimento de linfonodos axiliares (N) e presença de metástases (M). Seus parâmetros são regidos pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e estão relacionados com a sobrevida da paciente (Carter *et al.*, 1989; Leis, 1993; UICC, 2002; UICC, 2006).
- Grau Histológico e Grau Nuclear - O potencial de malignidade do tumor avaliando sua maior ou menor capacidade de ocorrer metástases e o grau de diferenciação celular é indicado por esses parâmetros. Estes indicadores sendo utilizados de forma consistente através de protocolos padronizados proporcionam importantes informações prognósticas

(Elston & Ellis, 1991; Burke & Henson, 1997; Roberti, 1997; Abreu & Koifman, 2002; Lopes *et al.*, 2006).

- Receptores Hormonais – Através da imunohistoquímica, são detectados os receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), que estão localizados no núcleo do epitélio normal da mama e nas células neoplásicas. Estes estão relacionados com a diferenciação tumoral, taxa de proliferação celular e outras características prognósticas. A boa resposta a terapias hormonais e aumento da sobrevida das pacientes está associado à presença desses receptores nas células do tumor. (Esteban *et al.*, 1994; Pichon *et al.*, 1996; Hupperets *et al.*, 1997; Menke *et al.*, 2007).
- HER-2 – Receptor tipo-2 do fator de crescimento epidérmico humano é uma glicoproteína transmembrana com atividade semelhante ao receptor do fator de crescimento. Na literatura este marcador possui algumas grafias diferentes: c-erbB-2; cerbB-2; C-erbB-2; HER-2; HER-2/neu; ERBB2; erbB2; erbB-2; neu/ c-erbB-2; oncogene neu; proteína neu. Sua superexpressão está relacionada com maior grau histológico, maior agressividade tumoral, redução da sobrevida e aumento da recorrência e mortalidade das pacientes. Quanto a resistência aos tratamentos, os dados da literatura apesar de conflitantes evidenciam associações significativas (Cianfrocca & Goldstein, 2004; Wolff *et al.*, 2007; Cirqueira *et al.*, 2011).
- Ki-67 - O antígeno Ki-67 é um marcador de proliferação celular que está presente somente em células que estão em divisão celular (fases G1, S, G2 e M do ciclo celular). Tumores que apresentam mais de 10% de células positivas têm um alto índice proliferativo que

reflete uma maior agressividade tumoral, apresentando um pior prognóstico aos pacientes.

(Cheang *et al.*, 2009)

Atualmente são conhecidos na literatura seis subtipos moleculares: luminal A, luminal B, superexpressão de HER2, basalóide, mama-normal símile e Claudin-low (Perou *et al.*, 2000; Rouzier *et al.*, 2005; Cianfrocca & Gradishar, 2009; Geyer *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2009; Weigelt & Reis-Filho, 2009; Vuduc *et al.*, 2010; Cirqueira *et al.*, 2011).

No Quadro 2, observamos os perfis moleculares associados aos cânceres de mama, relacionado positividade e negatividade para receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) e superexpressão para HER-2.

Quadro 2 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama (adaptado de Cirqueira *et al.*, 2011)

Subtipo molecular	Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- Ki-67 < 14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- Ki-67 ≥ 14%
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+
Basalóide (Triplo-negativo)	RE-, RP-, HER2-,
Normal símile	Negatividade para os marcadores tumorais usuais
Claudin-low	RE e/ou RP-, HER2- e Baixa expressão de moléculas de adesão

HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona

De acordo com o perfil molecular, o subtipo Luminal A é o que apresenta, dentre os demais subtipos, o melhor prognóstico para a paciente. Possuem receptores hormonais positivos, que na maioria dos casos estão associados com melhores respostas terapêuticas. Por não apresentarem amplificação e/ou superexpressão de HER-2, estão associados com baixo grau histológico e menor agressividade tumoral. No subtipo Luminal B, as pacientes apresentam taxas de proliferação celular maiores que ao subtipo Luminal A, tendo então um prognóstico pior quando comparado esses dois perfis. Também é significativamente associado

a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença (Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2003; Sotiriou *et al.*, 2003; Cheang *et al.*, 2009; Weigel & Dowsett, 2010).

As pacientes com o perfil de superexpressão de HER-2 apresentam o segundo pior prognóstico dentre os demais. É relatado na literatura que a positividade para o HER-2 parece estar associada à resistência às terapias hormonais. Já o perfil Triplo-negativo é o que apresenta pior prognóstico. Este subtipo está associado a menor sobrevida e é caracterizado por alto grau histológico, alta taxa de mitose e resistência a terapias hormonais (Sørlie *et al.*, 2001; Cianfrocca & Goldstein, 2004; Cheang *et al.*, 2008; Irvin & Carey, 2008; Chacón & Costanzo, 2010; Rakha *et al.*, 2010).

2.2 Metaloproteinases de Matriz (MMPs): Estrutura, Classificação, Ativação e Inibição

A Matriz Extracelular (MEC), que tem como principal função o suporte estrutural da célula devido à presença de macromoléculas como colágeno, glicoproteínas não-colagênicas, fibras elásticas e proteoglicanos, serve também como fonte de informações do microambiente tumoral. Algumas moléculas e fatores de crescimento que atuam cooperativamente para regular uma ampla variedade de processos celulares fisiológicos também estão intimamente relacionados com a carcinogênese. Na degradação e remodelamento da MEC, algumas famílias de proteinases, que incluem as serina-proteases, cisteína-proteases e MMPs também estão envolvidas no desenvolvimento de processos tumorais (Ramirez & Rifkin, 2003; Place *et al.*, 2011).

As MMPs são endopeptidases dependentes de Zn^{2+} com capacidade de degradar componentes da MEC. Sua estrutura comum é composta por uma sequência sinalizadora N-terminal (pré-domínio), um domínio pró-peptídico, responsável pela latência da enzima e um

domínio catalítico com um sítio de ligação do íon zinco (Zn^{2+}). Além disso, a maioria das MMPs são constituídas por regiões de articulação ou ligação e um domínio de hemopexina que determina seu substrado (Roy *et al.*, 2009; Cathcart *et al.*, 2015).

As MMPs foram inicialmente classificadas de acordo com a especificidade do substrato em collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases, e MMP-tipo membrana (Quadro 3).

Quadro 3 – Classificação das MMPs baseada nos substratos (adaptado de Egeblad & Werb, 2002).

Grupo	MMP	Substratos principais
Colagenases	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18	Colágenos tipos I, II, III, VII, VIII and X e gelatinas
Gelatinases	MMP-2, MMP-9	Colágenos tipos IV, V, VII, X, gelatina, elastina e fibronectina
Estromelisinases	MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-12	Colágenos tipos III, IV, IX e X, proteoglicanos, fibronectina, laminina, gelatinas e caseína.
Matrilisinases	MMP-7, MMP-26	Colágeno tipo IV, proteoglicanos, fibronectina, laminina, proteoglicanos e VE-caderina.
MMP-tipo membrana	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-25	Tenascina-c, fibronectina e laminina

Porém, devido a uma ampla variedade de substratos, uma nova classificação baseada em sua estrutura foi proposta. Com isso, as MMPs atualmente são divididas em oito classes distintas (Quadro 4) e cada grupo apresenta uma estrutura comum (Egeblad & Werb, 2002; Cathcart *et al.*, 2015).

Gross & Lapiere (1962) foram os primeiros a observar a ação das MMPs. Eles observaram que uma determinada enzima degradava as fibras colágenas presentes na cauda de girinos. Ao longo dos anos diversos pesquisadores estudaram as ações das MMPs e concluíram que essas enzimas regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização, participando também na progressão tumoral e metástases (Shay *et al.*, 2015).

As MMPs são secretadas em sua forma inativa, denominadas pró-MMPs, e suas atividades são reguladas pela expressão gênica, ativadores deste precursor e inibidores da forma ativa. Sua expressão é induzida por fatores de crescimento, indução célula-célula e célula-matriz, como também por estímulos extracelulares. A ativação catalítica das MMPs é

realizada por outras MMPs ativas ou por serinoproteases, ocorrendo principalmente no meio extracelular. Por serem enzimas, suas atividades são especificamente inibidas pelos TIMPs (Inibidores tissulares de metaloproteinases), constituído por um grupo de quatro tipos: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (Egeblad & Werb, 2002; Roy *et al.*, 2009; Kessenbrock *et al.*, 2010).

Quadro 4 – Classificação das MMPs baseada na estrutura (adaptado de Cathcart *et al.*, 2015).

Classe	MMP	Nome
MMPs de domínio mínimo	MMP-7 MMP-26	Matrilisina Matrilisina-2
MMPs com domínio de hemopexina simples	MMP-1 MMP-3 MMP-8 MMP-10 MMP-12 MMP-13 MMP-19 MMP-20 MMP-22 MMP-27	Colagenase-1 Estromelisina-1 Colagenase-2 (Colagenase de neutrófilo) Estromelisina-2 Metaloelastase Colagenase-3 - Enamelisina CMMP -
MMPs de ligação à gelatina	MMP-2 MMP-9	Gelatinase A Gelatinase B
MMPs secretadas ativadas por furina	MMP-11 MMP-28	Estromelisina-3 Epilisina
MMP com inserção semelhante à vitronectina	MMP-21	Homólogo de XMMP
MMPs transmembranares	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-24	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP
MMPs ancoradas por GPI	MMP-17 MMP-25	MT4-MMP MT6-MMP
MMP transmembranar tipo II	MMP-23	CA-MMP (Arranjo de cisteína)

A gelatinase A (MMP-2) é secretada tanto por células tumorais como por células normais (fibroblastos e células endoteliais). A ativação do pró-MMP-2 ocorre pela MMP-14 (MT1-MMP) que ancorada na superfície celular e auxiliada pelo TIMP-2 cliva o domínio peptídico ativando a MMP-2. A gelatinase B (MMP-9) também secretada por células tumorais como normais, como neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais, são liberados na forma inativa (pró-MMP-9), podendo ser ativada pelo plasminogênio e TIMP-1 (Nagase *et al.*, 2008; Kohka *et al.*, 2013)

Os TIMPs inibem especificamente as MMPs, assim como a RECK (proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínio Kasal), que pode inibir diretamente MMP-2, MMP-9 e MMP-14. A RECK também pode inibir processos catalíticos que levam a ativação da pró-MMP-2 como também a inibição da liberação do pró-MMP-9 (Takashi *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2010).

TIMPs são capazes de efetuar fortes ligações com as MMPs ativas com a formação de complexos inibitórios. Além disso, o TIMP-1 liga-se especificamente a pró-MMP-9 e o TIMP-2 a pró-MMP-2 formando complexos que leva a estabilização do mecanismo de ativação das MMP-9 e MMP-2 respectivamente. TIMP-2 também inibe a MMP-14 que é fundamental para a ativação da MMP-2 (Visse & Nagase, 2003; Dong *et al.*, 2010).

Além de inibidores específicos das MMPs, os TIMPs participam na ativação de algumas MMPs. Como mencionado anteriormente, o TIMP-1 atua na ativação da MMP-9 mediante formação de um complexo. A ativação da MMP-2 pode ser mediante a formação de um complexo, porém através do TIMP-2. Assim, os TIMPs atuam tanto na diminuição do crescimento tumoral como também na progressão neoplásica (Egeblad & Werb, 2002; Visse & Nagase, 2003).

2.3 Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Câncer

Para que ocorra a evolução maligna tumoral com consequente invasão, um acontecimento fundamental é a migração das células neoplásicas do epitélio que rompem a membrana basal, que delimita o tecido conjuntivo. Este processo ocorre devido ao aumento na secreção das enzimas que degradam a MEC e regulação alterada da proteólise (Bonnas *et al.*, 2014).

As MMPs estão envolvidas na degradação da matriz extracelular e da membrana basal, mediante clivagem do colágeno tipo IV, no rompimento da adesão célula-célula devido à

clivagem das E-caderinas (glicoproteínas transmembranas dependentes de cálcio que desempenham papel nas junções intercelulares) e integrinas, facilitando a liberação de células neoplásicas isoladas e invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos com consequente metástase. Assim, as MMPs exercem um papel essencial no desenvolvimento e na progressão maligna do câncer (Gould Rothberg & Bracken, 2006; Onder *et al.*, 2008; van Roy & Berx, 2008; Roy *et al.*, 2009; Rhim *et al.*, 2012).

Devido à clivagem de proteínas extracelulares, as MMPs estimulam a liberação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e auxiliadas por moléculas de adesão aceleram o processo de angiogênese. O VEGF é um potente e seletivo fator mitogênico para o endotélio. Ele produz uma rápida e completa resposta angiogênica e um aumento da permeabilidade capilar. Produzido e secretado por uma série de células normais, ele tem expressão marcada em células tumorais, incluindo no câncer de mama (Boudreau & Myers, 2003; Jobim *et al.*, 2009).

2.4 Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Câncer de mama

A avaliação da expressão de MMPs como ferramenta prognóstica vem sendo estudada ao longo dos anos devido a sua fácil identificação no soro e no tecido tornando assim possível sua detecção, quantificação e monitoramento. Estando associada com diversos fatores prognósticos pré-definidos. Além disso, diferentes estudos relatam uma correlação positiva da maior expressão tecidual de MMPs com a evolução do câncer de mama, tornando-se também uma boa ferramenta prognóstica (Valdivia *et al.*, 2011).

É relatado na literatura (Quadro 5) a expressão das MMP-2 e MMP-9 associadas aos tumores de mama por meio da técnica de imunohistoquímica para detecção tecidual. Xu *et al.* (2013) relataram que a expressão de MMP-2 foi significativamente maior em lesões malignas

de mama do que em lesões benignas. Já Cupić *et al.* (2011) relataram uma forte expressão de MMP-9 em tumores primários que se repetiram após 24 meses e uma menor expressão nos tumores que recorreram antes de 24 meses do diagnóstico inicial. Zeng *et al.* (2013) reforçaram os estudos e relataram que, além da associação com lesões malignas, a superexpressão de MMP-9 estaria associada também a uma pior sobrevida global para as pacientes com câncer de mama.

Em 2012, Niemiec *et al.* sugeriram que os mecanismos de remodelação do estroma e carcinogênese poderiam diferir entre os subtipos de câncer de mama. Com isso, Zhao *et al.* e Liu *et al.* ambos em 2013 relataram que pacientes triplo-negativo apresentava elevada expressão de MMP-9 resultando em pior prognóstico de câncer de mama. Quanto à disseminação sistêmica, Daniele *et al.* (2010) confirmaram que a expressão de MMP-2 e MMP-9 foi significativamente mais elevada no câncer de mama metastático em comparação com câncer não metastático, tanto na detecção tecidual como sorológica.

Dentro deste contexto e devido ao câncer de mama ser um problema de saúde pública mundial, apresentando taxas de morbimortalidade e reincidências altas, se torna necessário o desenvolvimento de métodos e identificação de marcadores que auxiliem na detecção precoce, na escolha do tratamento específico e no esclarecimento de sua patogenia complexa e multifatorial. A avaliação da expressão das MMPs, pela técnica de imunohistoquímica, pode contribuir nestes esclarecimentos, devido a sua fácil reprodutibilidade na prática clínica e diagnóstica. Consequentemente, a quantificação destas enzimas pode tornar-se uma importante ferramenta prognóstica para o câncer de mama devido a sua íntima relação com a perda de adesão celular e consequente progressão da malignidade tumoral.

Quadro 5 - Descrição de artigos selecionados pelo autor referente à avaliação da expressão tecidual pela imunohistoquímica de MMP-2 e MMP-9 em câncer de mama.

	Objetivo do estudo	Métodos	Resultado/Conclusão	País	Autor/Ano
MMP-9	Analisar a expressão dos perfis da proteína N-acetiltransferase 10 (Naa10p / ARD1) e MMP-9 no câncer de mama em humano de e avaliar seus possíveis valores de prognóstico.	RT-PCR e Tissue Microarray (IHQ) em amostras novas e antigas; Curva de Sobrevida Análise multivariada - Avaliação dos valores prognóstico.	Expressão maior de MMP-9 em tecidos de câncer de mama em comparação com os não cancerosos MMP-9 (+) - pior sobrevida global	China	Zeng <i>et al.</i> 2013
	Investigar a expressão de CD147 e MMP9 em pacientes com câncer de mama tipo basal-like (BLBC), de modo a determinar se estes podem ser correlacionados com o prognóstico de BLBC.	IHQ para CD147 e MMP-9	Pacientes com BLBC tem uma elevada expressão de CD147 e MMP9; BLBC está relacionada com um mau prognóstico.	China	Liu <i>et al.</i> 2013
	Investigar a expressão de CD147 e MMP9 em pacientes com câncer de mama triplo-negativo (TNBC), de modo a determinar se estes podem ser correlacionados com o mau prognóstico de TNBC.	IHQ para CD147 e MMP-9	Pacientes com TNBC tem uma elevada expressão de CD147 e MMP9. Os níveis de CD147 e MMP-9 são positivamente correlacionados com invasão, metástase. Pacientes com elevada expressão de CD147 e MMP-9 tinham mau prognóstico comparados com pacientes de baixa expressão.	China	Zhao S <i>et al.</i> 2013
	Avaliar a expressão de MMP-9 em amostras de carcinoma mamário primário e recorrente	Tissue Microarray (IHQ) em carcinomas mamários primários e recorrentes	Forte expressão de MMP-9 foi observada em tumores primários que se repetiram após 24 meses e menor expressão nos tumores que recorreram antes de 24 meses do diagnóstico inicial	Croácia	Cupić <i>et al.</i> 2011
MMP-2 e MMP-9	Avaliar a expressão de MMP-2 e MMP-9 em linfonodo sentinela e no soro de pacientes com câncer de mama, a fim de avaliar o seu significado clínico e utilidade como marcadores tumorais de diagnóstico.	IHQ para MMP-2 e MMP-9 em amostras de pacientes com câncer de mama metastático, não-metastático e controle Zimografia para detecção no soro.	Expressão de MMP-2 e MMP-9 foram significativamente mais elevados no câncer de mama metastático, em comparação com câncer não metastático e no grupo controle, tanto no tecido como soro.	Itália	Daniele <i>et al.</i> 2010
	Determinar a presença de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em amostras obtidas a partir de pacientes com câncer de mama primário.	IHQ para VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em amostras obtidas a partir de pacientes com câncer de mama primário.	Não houve correlação significativa entre a quantidade de VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e comprometimento linfático.	Brasil	Jobim <i>et al.</i> 2009
MMP-2	Correlação entre parâmetros de perfusão (por MSCT) e da expressão do factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) e MMP-2 em câncer da mama.	MSCT para visualização de parâmetros de perfusão IHQ e Western blotting para VEGF e MMP-2, com material a partir de pacientes com câncer de mama primário.	Os níveis de VEGF e de MMP-2 por IHQ foi significativamente maior no grupo de câncer da mama do que o grupo de tumor benigno; Existe uma correlação entre parâmetros de perfusão, VEGF e MMP-2, que pode ser útil para a detecção de lesões mamárias, diagnóstico qualitativo de câncer de mama e avaliação do tratamento do câncer de mama.	China	Xu <i>et al.</i> 2013
	Correlacionar os imunofenótipos, Ki-67, microvascularização, Ep-CAM/P-cadherin e MMP-2 com a adesão celular e promoção da invasão em início invasivo do câncer de mama ductal.	IHQ para os marcadores	Expressão de MMP-2 em leucócitos do estroma com menos frequência; Sugeriram que os mecanismos de remodelação do estroma e carcinogênese podem diferir entre os subtipos de câncer de mama.	Polônia	Niemiec <i>et al.</i> 2012

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar associação entre a expressão de MMP-2 e MMP-9 com os graus de lesões neoplásicas.

3.2 Específicos

- Classificar os tumores mamários de acordo com os tipos histológicos, perfil de receptores hormonais (RE e RP), HER-2 e Ki-67, e subtipos moleculares;
- Analisar qualitativamente e semiquantitativamente a expressão imunohistoquímica de MMP-2 e MMP-9 nas amostras teciduais de mama;
- Associar a expressão de MMP-2 e MMP-9 aos tumores benignos e malignos de mama;
- Associar a expressão de MMP-2 e MMP-9 aos tipos histológicos, subtipos moleculares, perfil de receptores hormonais (RE e RP), HER-2 e Ki-67;

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo e Local de Estudo

O estudo é do tipo observacional, analítico transversal. As análises do material biológico foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e as amostras foram obtidas no Hospital Barão de Lucena (HBL) e no Hospital das Clínicas (HC), todos localizados em Recife - PE.

4.2 População alvo e período

O estudo é composto por 97 amostras de tecido de mama, que foram resgatadas no período de 2014 a 2016. As amostras em bloco parafina estavam arquivadas no setor de Anatomia Patológica dos hospitais e eram provenientes de pacientes do sexo feminino diagnosticadas com lesões mamárias no período de 2009 a 2014.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Critério de Inclusão: material parafinado de amostras tumorais mamárias de mulheres diagnosticadas no serviço de mastologia do HBL e HC.

Critérios de Exclusão: Amostras de tumores mamários em bloco parafina com danos, mal emblocados e/ou mal conservados, ou ainda com material insuficiente.

4.4 Definição de variáveis

As variáveis foram definidas de acordo com as informações coletadas dos laudos histopatológicos e imunohistoquímicos das pacientes. Foram coletadas informações sobre Idade, Tipo histológico e Perfil dos Receptores Hormonais (RE e RP), HER-2 e Ki-67 das pacientes. Assim, foram definidas as seguintes variáveis:

1. Tipo de Lesão: Benigno ou Maligno;
2. Tipo Histológico: 1. Ductal, 2. Lobular, 3. Outros (medular, tubular, apócrino, mucinoso, etc...);
3. Comprometimento da membrana basal: 1. *in situ*, 2. Invasivo;
4. Receptor de Estrógeno (RE): 1. Positivo, 2. Negativo
5. Receptor de Progesterona (RP): 1. Positivo, 2. Negativo
6. HER-2: 1. Positivo, 2. Negativo
7. Ki-67: 1. Positivo ($\geq 14\%$), 2. Negativo ($< 14\%$)
8. Subtipo Molecular: Luminal A (receptores hormonais positivos e HER-2 negativo), Luminal B (receptores hormonais e HER-2 positivos), superexpressão de HER-2 (receptores hormonais negativos e HER-2 positivo) e Triplo-negativo (receptores hormonais e HER-2 negativos);

4.5 Método de coleta e análise do material biológico

As amostras parafinadas com representação de tumores de mama foram obtidas no Setor de Anatomia Patológica dos hospitais acima citados. Para cada amostra em bloco parafinado foram confeccionadas 4 lâminas com 2 cortes por microtomia de 5µm de espessuras para realização das análises das expressões de MMP-2 e MMP-9 através da imunohistoquímica, seguindo protocolo de rotina do laboratório LPCM, descrito a seguir.

4.5.1 Imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9

As amostras parafinadas dos tumores mamários foram cortadas com 5µm de espessura e fixadas em lâminas silanizadas (Starfrost®), o material foi desparafinado em xilol e reidratado com uma série decrescente de álcool. Após desparafinização, foram lavadas em água corrente e em tampão fosfato de sódio (PBS) (pH 7,2) por 5 minutos cada. A

recuperação antigênica foi realizada com tampão de citrato (10mM com pH 6) em panela de pressão elétrica por 2 minutos. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente até esfriarem. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e metanol (1:1) por 30 minutos e em seguida as lâminas foram lavadas outra vez em água corrente e em PBS (dois banhos de 5 minutos). O bloqueio para inibir a ligações inespecíficas foi realizado com solução de soro albumina bovino (BSA) a 1% (SIGMA®) durante 1 hora em câmara úmida. A incubação com os anticorpos primários (anticorpos monoclonais de rato MMP-2 (1:400) e MMP-9 (1:400); Santa Cruz Biotechnology®) foi realizada também usando câmara úmida, por 2 horas em estufa a 37°C. Foi utilizado o sistema de revelação livre de biotina e conjugado com enzima HRP (Reveal Polyvalent HRP. SPB-999. Spring Bioscience©) por 20 minutos cada reagente, em temperatura ambiente. Entre estas etapas as lâminas foram lavadas em PBS com dois banhos de 5 minutos. A reação foi revelada com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™), por mais ou menos um minuto, e as lâminas foram lavadas em água destilada e contra-coradas com hematoxilina. Após lavagem em água corrente, as lâminas foram desidratadas em série crescente de álcool e xilol e montadas com entellan e lamínula.

Após a reação as lâminas foram analisadas e fotografadas por sistema de captura de microimagem Axion Image 2 (Carl Zeiss®). A análise da reatividade foi qualitativa, realizada através da observação do núcleo e do citoplasma das células neoplásicas, utilizando para isso os seguintes escores: positivo (reatividade em 10% ou mais células), negativo (menos de 10% de células). Os casos positivos também foram classificados, dependendo da proporção de células reativas, em +, ++ e +++ (+: de 10% a 25% das células; ++: de 26 a 50% e +++: acima de 51% de reatividade).

4.6 Coleta dos dados

As informações dos laudos histopatológicos e da reatividade imunohistoquímica dos receptores hormonais, HER-2 e Ki-67, assim como da avaliação da expressão tecidual das MMP-2 e MMP-9 foram transcritos para uma planilha de dados do Excel®

4.7 Análise estatística

A análise de dados foi realizada por meio do software estatístico SPSS versão 20.0, onde inicialmente realizou-se uma análise descritiva percentual dos dados com o objetivo de caracterizar a amostra em estudo. Foram utilizados os testes Qui-quadrado de Independência e Teste Exato de Fisher na tentativa de encontrar possíveis associações entre a expressão de MMP-2 e MMP-9 e as variáveis. Estas análises foram realizadas tanto para a expressão qualitativa, quanto para expressão semiquantitativa. Para todo o estudo, o nível de 5% de significância foi adotado ($p\text{-valor} < 0,05$).

4.8 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 28508614.9.0000.5208 – Anexo 1) obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

5. RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9 EM LESÕES DE MAMA

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o câncer mais incidente, excluindo-se o câncer de pele não melanoma, e o maior causador de mortes por câncer em mulheres no mundo. Segundo estimativas para o ano de 2016 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados no Brasil 57.960 casos novos de câncer de mama. [1]

A classificação histológica das lesões de mama baseia-se primeiro no potencial maligno dessas lesões, podendo estar ou não associado com a penetração da membrana basal. A localização e características particulares dos tumores também são levadas em consideração sendo grande parte dos casos de câncer de mama de origem no epitélio ductal (mais de 80%) e o segundo mais incidente de origem no epitélio lobular. A avaliação de receptores de estrógenos (RE), progesterona (RP), o proto-oncogene HER-2 e o Ki-67, fornecem uma classificação molecular (imunofenótipos). De acordo com esta classificação, informações relacionadas com a diferenciação tumoral, taxa de proliferação celular, agressividade e resposta a terapias hormonais podem ser extraídas do tecido analisado. De acordo com alguns autores a taxa de sobrevida das pacientes se associam a presença ou ausência dos receptores hormonais nas células do tumor e a superexpressão do HER-2 está relacionada com maior grau histológico, maior agressividade tumoral, redução da sobrevida e aumento da recorrência e mortalidade dos pacientes. [2-9]

Fatores prognósticos, como marcadores tumorais também são utilizados para fornecer informações sobre o potencial de malignidade do tumor avaliando sua capacidade de ocorrer metástases e o grau de diferenciação celular. Muitos desses marcadores foram inicialmente identificados através de estudos moleculares ou bioquímicos e podem ser localizados em

cortes de tecido, pelo uso da imunohistoquímica, ou pela hibridização *in situ*. Eles são importantes para diferenciar bem os tecidos normais daqueles neoplásicos (com uma boa especificidade) e devem ser de fácil detecção e/ou quantificação. Incluem-se nesta ampla categoria uma variedade de proteínas, algumas das quais estão associadas aos oncogenes e medidores da atividade proliferativa do tumor. [10-12]

Devido a grande heterogeneidade dos tumores mamários, a identificação de marcadores específicos que possam prever quais os tumores de mama com pior prognóstico e que levem a uma melhor conduta terapêutica para a paciente torna-se um grande desafio. Com o objetivo de fornecer novos marcadores úteis para diagnóstico, prognóstico e monitoramento do câncer, bem como novos alvos terapêuticos para traçar perfis moleculares, devido ao seu baixo custo e fácil reprodutibilidade, a identificação e caracterização de moléculas pela imunohistoquímica torna-se bastante promissora. [13-15]

A matriz extracelular (MEC), que tem como principal função o suporte estrutural devido a presença de macromoléculas como colágeno, glicoproteínas não colagênicas, fibras elásticas e proteoglicanos, serve também como fonte de informações do microambiente tumoral. Algumas moléculas e fatores de crescimento que atuam cooperativamente para regular uma ampla variedade de processos celulares fisiológicos também estão intimamente relacionadas com a carcinogênese no tecido mamário. Na degradação e remodelamento da MEC algumas famílias de proteinases, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) são de suma importância também no desenvolvimento de processos tumorais. [16-21]

As MMPs são endopeptidases dependentes de Zn^{2+} que degradam componentes da MEC e regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização, tornando-se moléculas fundamentais na comunicação entre o tumor e o estroma. Desta maneira, exerce um papel essencial no desenvolvimento e na progressão maligna do câncer. No câncer, a regulação alterada da proteólise, favorece a degradação da MEC e invasão da

membrana basal. No processo de invasão neoplásica, além da degradação da matriz extracelular e da membrana basal, mediante clivagem do colágeno tipo IV, as MMPs estão envolvidas no rompimento da adesão célula-célula devido à clivagem das E-caderinas e integrinas, facilitando a liberação de células neoplásicas isoladas e invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos. Devido à clivagem de proteínas extracelulares, as MMPs também estimulam a liberação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e auxiliadas por moléculas de adesão aceleram o processo de angiogênese. [22-25]

É descrito na literatura a expressão de MMP-2, MMP-9 associadas aos tumores de mama por meio da técnica de imunohistoquímica para detecção tecidual e estudos sugerem que esta identificação das MMPs serve como uma boa ferramenta prognóstica no acompanhamento do câncer. Dentro deste contexto e devido ao câncer de mama ser um problema de saúde pública mundial, apresentando taxas de morbimortalidade e reincidências altas, se torna necessário o desenvolvimento de métodos que auxiliem na detecção precoce, na escolha do tratamento específico e no esclarecimento de sua patogenia complexa e multifatorial. A avaliação da expressão das MMPs, pela técnica de Imunohistoquímica, pode contribuir nestes esclarecimentos, devido ao seu baixo custo e fácil reprodutibilidade na prática clínica e diagnóstica. Consequentemente, a quantificação destas enzimas pode tornar-se uma importante ferramenta prognóstica no desenvolvimento do câncer de mama devido a sua íntima relação com a perda de adesão celular e consequente progressão da malignidade tumoral. [26-32]

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e amostras biológicas

Foram selecionados 97 amostras em bloco parafina de tecido de mama, que estavam arquivadas no setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas e Hospital Barão de Lucena, ambos em Recife-PE. Estes tecidos são provenientes de pacientes do sexo feminino que foram diagnosticadas com lesões mamárias no período de 2009 a 2014. As informações referentes a classificação histológica, receptores hormonais, HER-2 e Ki-67 foram obtidas nos laudos gerados pelo próprio hospital. A análise da expressão tecidual de MMP-2 e MMP-9 foi feita através da imunohistoquímica.

O presente trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 28508614.9.0000.5208) obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Imunohistoquímica

Para cada amostra parafinada de tecido mamário foram feitos cortes de 5µm e fixados em lâminas silanizadas (Starfrost®). O material foi desparafinizado em xilol e reidratado com uma série decrescente de álcool. Após desparafinização, foram lavadas em água corrente e em tampão fosfato de sódio (PBS) por 5 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão de citrato (10mM com pH 6) em panela de pressão elétrica por 2 minutos. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente até esfriarem. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e metanol (1:1) por 30 minutos e em seguida as lâminas foram lavadas outra vez em água corrente e em PBS (dois banhos de 5 minutos). O bloqueio para inibir a ligações inespecíficas foi realizado com solução de soro albumina bovino (BSA) a 1% (SIGMA®) durante 1 hora em câmara úmida.

A incubação com os anticorpos primários (anticorpos monoclonais de rato MMP-2 (1:400) e MMP-9 (1:400); Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foi realizada também usando câmara úmida, por 2 horas em estufa a 37°C. Foi utilizado o sistema de revelação livre de biotina e conjugado com HRP (Reveal Polyvalent HRP. SPB-999. Spring Bioscience©) por 20 minutos cada solução, em temperatura ambiente. Entre estas etapas as lâminas foram lavadas em PBS com dois banhos de 5 minutos. A reação foi revelada com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) (+/- 1 minuto) e as lâminas foram lavadas em água destilada e contra-coradas com hematoxilina. Após lavagem em água corrente, as lâminas foram desidratadas em série crescente de álcool e xilol e montadas com entelan e lamínula.

Após a reação as lâminas foram analisadas e fotografadas por sistema de captura de microimagem Axion Image 2 (Carl Zeiss®). A análise da reatividade foi qualitativa, realizada através da observação do núcleo e do citoplasma das células neoplásicas, utilizando para isso os seguintes escores: positivo (reatividade em 10% ou mais células), negativo (menos de 10% de células). Os casos positivos também foram classificados de forma semiquantitativa, dependendo da proporção de células reativas, em +, ++ e +++ (+: de 10% a 25% das células; ++: de 26 a 50% e +++: acima de 51% de reatividade).

Análise Estatística

A análise de dados foi realizada por meio do software estatístico SPSS versão 20.0. Foram utilizados os testes Qui-quadrado de Independência e Teste Exato de Fisher para as correlações entre a expressão de MMP-2 e MMP-9 e as variáveis. Para todo o estudo, o nível de 5% de significância foi adotado (p-valor < 0,05).

RESULTADOS

A idade média das pacientes foi de 54,99 e das 97 amostras de tecido de mama obtidas, 12 (12,4%) eram de lesões benignas e 85 (87,6%) malignas. Lesões invasivas representavam 86,3% e o tipo histológico mais frequente foi o ductal, representando 89,2% do total de lesões. Na tabela 1 estão caracterizadas todas as variáveis do nosso estudo.

Tabela 1 - Distribuição das variáveis no total da amostra.

Variáveis	Total
Idade (anos)	Média = 54,99 ($\pm 15,16$)
Tipo de Lesão, n (%)	
Benigna	12 (12,4%)
Maligna	85 (87,6%)
	97 (100%)
Tipo Histológico, n (%)	
Ductal	74 (89,2%)
Lobular	3 (3,6%)
Outro	6 (7,2%)
	83 (100%)
Invasividade, n (%)	
In situ	13 (13,7%)
Invasivo	82 (86,3%)
	95 (100%)
Receptor de Estrógeno, n (%)	
Positivo	36 (60%)
Negativo	24 (40%)
	60 (100%)
Receptor de Progesterona, n (%)	
Positivo	35 (58,3%)
Negativo	25 (41,7%)
	60 (100%)
HER-2, n (%)	
Positivo	5 (8,8%)
Negativo	52 (91,2%)
	57 (100%)
Ki-67, n (%)	
Positivo ($\geq 14\%$)	30 (85,7%)
Negativo ($< 14\%$)	5 (14,3%)
	35 (100%)
Tipo Molecular, n (%)	
Luminal	18 (31,0%)
Luminal A	5 (8,6%)
Luminal B	13 (22,4%)
Superexpressão de HER-2	5 (8,6%)
Tripla Negativo	17 (29,3%)
	58 (100%)

A análise da expressão imunohistoquímica das MMP-2 e MMP-9 só foi possível em 79 amostras, devido a má fixação e preservação do tecido. Esta análise, tanto qualitativa quanto semiquantitativa estão listadas nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2 – Expressão Qualitativa de MMP-2 e MMP-9 no total das amostras.

	Negativo	Positivo	Total
MMP-2, n (%)			
Expressão nuclear	63 (79,7%)	16 (20,3%)	79
Expressão citoplasmática	67 (84,8%)	12 (15,2%)	(100%)
MMP-9, n (%)			
Expressão nuclear	77 (97,5%)	2 (2,5%)	79
Expressão citoplasmática	77 (97,5%)	2 (2,5%)	(100%)

Tabela 3 – Expressão Semiquantitativa de MMP-2 e MMP-9 no total das amostras.

	Negativo	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+++)	Total
MMP-2, n (%)					
Expressão nuclear	63 (79,7%)	11 (13,9%)	4 (5,1%)	1 (1,3%)	79
Expressão citoplasmática	67 (84,8%)	11 (13,9%)	1 (1,3%)	0 (0%)	(100%)
MMP-9, n (%)					
Expressão nuclear	77 (97,5%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	0 (0%)	79
Expressão citoplasmática	77 (97,5%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	0 (0%)	(100%)

MMP-2

A análise qualitativa da expressão de MMP-2 associada com as variáveis do estudo estão descritas na Tabela 4. De acordo com os tipos de lesões, a expressão nuclear de MMP-2 apresentou positividade maior nos casos malignos (20,5%) em comparação aos casos benignos (16,7%), sendo observada também uma marcação mais expressiva nestes casos, com 6,9% de reatividade moderada ou forte e ausência nos casos benignos.

Quando comparados pelo tipo histológico, a positividade nuclear para MMP-2 foi equivalente (~20%) em tipos ductais e em tipos menos frequentes, como o mucinoso. O tipo lobular apresentou positividade maior (33,3%) em comparação ao tipo histológico ductal (14,3%) na expressão citoplasmática de MMP-2.

Tabela 4 – Análise qualitativa da expressão de **MMP-2** associada com as variáveis da amostra.

Variáveis		MMP-2 núcleo				MMP-2 citoplasma			
		Negativo	Positivo	Total	P-valor	Negativo	Positivo	Total	P-valor
Tipo de Lesão (n=79)	Benigna	5 83,3%	1 16,7%	6 100,0%	0,649**	5 83,3%	1 16,7%	6 100,0%	0,99*
	Maligna	58 79,5%	15 20,5%	73 100,0%		62 84,9%	11 15,1%	73 100,0%	
Tipo Histológico (n=71)	Ductal	49 77,8%	14 22,2%	63 100,0%	0,653**	54 85,7%	9 14,3%	63 100,0%	0,419**
	Lobular	3 100,0%	0 0,0%	3 100,0%		2 66,7%	1 33,3%	3 100,0%	
	Outros	4 80,0%	1 20,0%	5 100,0%		5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	
Invasividade (n=77)	<i>In situ</i>	6 85,7%	1 14,3%	7 100,0%	0,99*	6 85,7%	1 14,3%	7 100,0%	0,99*
	Invasivo	55 78,6%	15 21,4%	70 100,0%		60 85,7%	10 14,3%	70 100,0%	
Receptor de Estrógeno (n=53)	Negativo	20 95,2%	1 4,8%	21 100,0%	0,71*	19 90,5%	2 9,5%	21 100,0%	0,99*
	Positivo	24 75,0%	8 25,0%	32 100,0%		29 90,6%	3 9,4%	32 100,0%	
Receptor de Progesterona (n=53)	Negativo	20 90,9%	2 9,1%	22 100,0%	0,277*	19 86,4%	3 13,6%	22 100,0%	0,68*
	Positivo	24 77,4%	7 22,6%	31 100,0%		29 93,5%	2 6,5%	31 100,0%	
HER-2 (n=51)	Negativo	41 87,2%	6 12,8%	47 100,0%	0,457*	42 89,4%	5 10,6%	47 100,0%	0,99*
	Positivo	3 75,0%	1 25,0%	4 100,0%		4 100,0%	0 0,0%	4 100,0%	
Ki-67 (n=29)	Negativo (<14%)	4 80,0%	1 20,0%	5 100,0%	0,446*	4 80,0%	1 20,0%	5 100,0%	0,32*
	Positivo (<14%)	22 91,7%	2 8,3%	24 100,0%		23 95,8%	1 4,2%	24 100,0%	
Tipo Molecular (n=52)	Luminal A	4 80,0%	1 20,0%	5 100,0%	0,101**	4 80,0%	1 20,0%	5 100,0%	0,671**
	Luminal B	9 90,0%	1 10,0%	10 100,0%		10 100,0%	0 0,0%	10 100,0%	
	Luminal	11 64,7%	6 35,3%	17 100,0%		15 88,2%	2 11,8%	17 100,0%	
	Super HER2	3 75,0%	1 25,0%	4 100,0%		4 100,0%	0 0,0%	4 100,0%	
	Triplo Negativo	16 100,0%	0 0,0%	16 100,0%		14 87,5%	2 12,5%	16 100,0%	

*Teste exato de Fisher **Teste Qui-quadrado de Independência ***Não foi possível calcular.

A positividade nuclear da MMP-2 foi mais evidente nos casos em que houve comprometimento da membrana basal / lesões invasivas, apresentando 21,4% em comparação aos casos *in situ* (14,3%). A marcação também foi mais expressiva nos casos invasivos, apresentando 7,1% de reatividade moderada ou forte nos casos invasivos e nas lesões *in situ* não houve este grau de reatividade.

A marcação nuclear positiva para MMP-2 (figura 1) foi mais evidente nos casos de positividade para os receptores hormonais. Foram observados 25% de positividade nas amostras RE+ e 22,6% nas amostras RP+, em comparação a 4,8% e 9,1% respectivamente nas amostras negativas para os receptores hormonais. Também foi observada uma marcação nuclear de maior intensidade nos casos positivos para estes receptores, sendo 15,6% de marcação de intensidade moderada/forte para os casos de RE+ e 12,9% desta mesma intensidade de marcação para os casos RP+. Para a marcação citoplasmática de MMP-2, não houve diferença quando comparado ao perfil dos RE, porém houve uma maior marcação nos casos de RP- (13,6%) comparados aos casos de RP+ (6,5%).

Quando levamos em consideração o HER-2, a marcação nuclear para MMP-2 foi mais expressiva nos casos HER-2+ (25%) em comparação aos casos de HER-2- (12,8%). O inverso foi observado na análise de marcação citoplasmática, sendo positivos 10,6% dos casos HER-2- e não havendo marcação para os casos HER-2+.

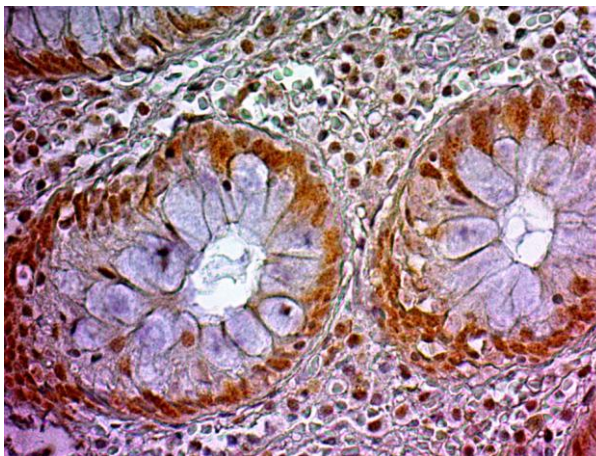


Figura 1 - Marcação nuclear e citoplasmática de MMP-2 pela IHQ em Carcinoma Ductal Invasivo (Tripo Negativo).
(Fonte: arquivo pessoal)

Lesões que apresentavam o Ki-67 negativo mostraram uma positividade maior para o MMP-2 (20%) em comparação as lesões com o Ki-67 positivo. Porém, não foram observadas reatividades moderadas (++) ou forte (+++), apenas marcação fraca (+).

A análise da marcação nuclear para MMP-2 nos subtipos moleculares mostrou uma maior positividade do subtipo Superexpressão de HER-2 (25%), seguido do Luminal A (20%), Luminal B (10%) e o Triplo Negativo não apresentou marcação positiva. Quanto à marcação citoplasmática, o subtipo molecular com maior positividade foi o Luminal A (20%), seguido do Triplo Negativo (12,5%), no entanto os subtipos Luminal B e Superexpressão de HER-2 não se observou marcação.

A análise qualitativa da expressão de MMP-9 associada com as variáveis do estudo estão descritas na Tabela 5. Todas as marcações para MMP-9 (figura 2) foram fracas (+) ou moderadas (++), não apresentando marcação de intensidade forte (+++). Foi observado positividade apenas nos casos malignos, apresentando 2,7% de marcação. De acordo com o tipo histológico, somente lesões de origem ductal apresentaram marcação, sendo observados 3,1% de positividade na marcação nuclear e 1,6% nas marcações citoplasmáticas. Da mesma forma, apenas lesões invasivas apresentaram positividade para o marcador.

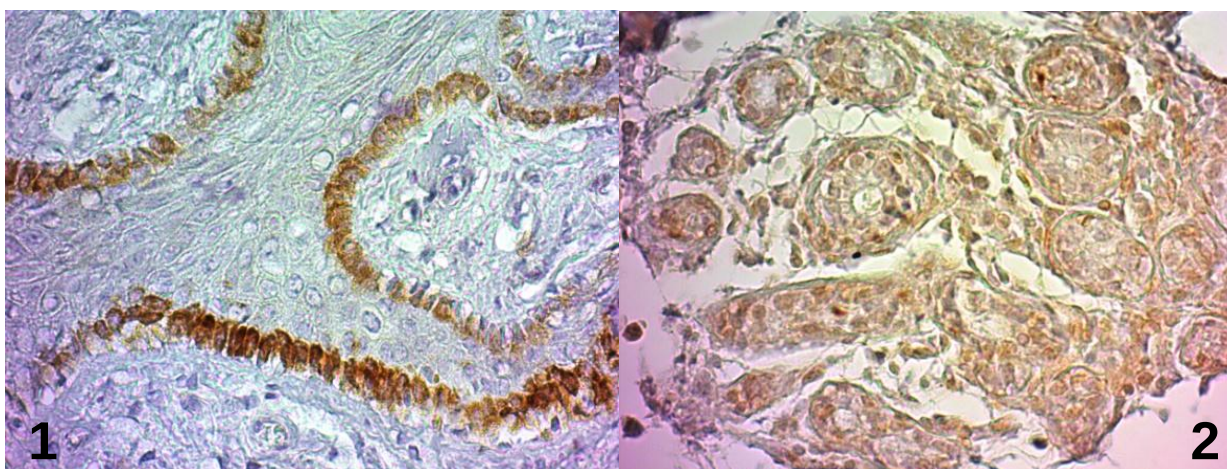


Figura 2 - Marcação nuclear e citoplasmática de MMP-9 pela IHQ em Carcinoma Lobular Invasivo (1) e Carcinoma Ductal Invasivo (2). (Fonte: arquivo pessoal)

Tabela 5 – Análise qualitativa da expressão de **MMP-9** associada com as variáveis da amostra.

Variáveis		MMP-9 núcleo				MMP-9 citoplasma			
		Negativo	Positivo	Total	P-valor	Negativo	Positivo	Total	P-valor
Tipo de Lesão (n=79)	Benigna	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	0,99*	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	0,99*
	Maligna	72 97,3%	2 2,7%	74 100,0%		72 97,3%	2 2,7%	74 100,0%	
Tipo Histológico (n=71)	Ductal	62 96,9%	2 3,1%	64 100,0%	0,879**	63 98,4%	1 1,6%	64 100,0%	0,939**
	Lobular	3 100,0%	0 0,0%	3 100,0%		3 100,0%	0 0,0%	3 100,0%	
	Outros	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%		5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	
Invasividade (n=77)	<i>In situ</i>	6 100,0%	0 0,0%	6 100,0%	0,99*	6 100,0%	0 0,0%	6 100,0%	0,99*
	Invasivo	69 97,2%	2 2,8%	71 100,0%		70 98,6%	1 1,4%	71 100,0%	
Receptor de Estrógeno (n=53)	Negativo	22 100,0%	0 0,0%	22 100,0%	0,99*	22 100,0%	0 0,0%	22 100,0%	0,99*
	Positivo	30 96,8%	1 3,2%	31 100,0%		30 96,8%	1 3,2%	31 100,0%	
Receptor de Progesterona (n=53)	Negativo	22 95,7%	1 4,3%	23 100,0%	0,43*	23 100,0%	0 0,0%	23 100,0%	0,99*
	Positivo	30 100,0%	0 0,0%	30 100,0%		29 96,7%	1 3,3%	30 100,0%	
HER-2 (n=51)	Negativo	46 97,9%	1 2,1%	47 100,0%	0,99*	46 97,9%	1 2,1%	47 100,0%	0,99*
	Positivo	4 100,0%	0 0,0%	4 100,0%		4 100,0%	0 0,0%	4 100,0%	
Ki-67 (n=29)	Negativo (<14%)	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	***	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	***
	Positivo (<14%)	25 100,0%	0 0,0%	25 100,0%		25 100,0%	0 0,0%	25 100,0%	
Tipo Molecular (n=52)	Luminal A	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	0,682*	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	0,682**
	Luminal B	10 100,0%	0 0,0%	10 100,0%		10 100,0%	0 0,0%	10 100,0%	
	Luminal	15 93,8%	1 6,3%	16 100,0%		15 93,8%	1 6,3%	16 100,0%	
	Super HER2	4 100,0%	0 0,0%	4 100,0%		4 100,0%	0 0,0%	4 100,0%	
	Triplo Negativo	17 100,0%	0 0,0%	17 100,0%		17 100,0%	0 0,0%	17 100,0%	

*Teste exato de Fisher **Teste Qui-quadrado de Independência ***Não foi possível calcular.

Lesões que apresentaram RE+ e RP- apresentaram marcação nuclear para a MMP-9, sendo 3,2% e 4,3% de positividade, respectivamente. Já no citoplasma, somente foi observado positividade em lesões RE+ (3,2%) e RP+ (3,3%). A positividade também somente foi observada nas lesões negativas para o HER-2 (2,1%) e nenhuma marcação foi observada quando comparamos lesões Ki-67 positivas e negativas. Na análise dos tipos moleculares, apenas houve positividade no grupo de lesões onde não foi possível diferenciar em Luminal A e B, apresentando marcação citoplasmática de 6,3%.

DISCUSSÃO

Devido à falta de algumas informações dos laudos das pacientes, como perfil dos receptores hormonais, HER-2 e Ki-67, houve uma limitação da quantidade de casos analisados no cruzamento das variáveis com a expressão das MMPs. Estas informações são de suma importância para conduta terapêutica da paciente, bem como para estudos de casos por profissionais de saúde. Estes laudos incompletos refletem uma falha na qualidade do serviço de saúde oferecido à população e favorecem um atendimento ineficaz as pacientes em tratamento de câncer de mama. É observado nos hospitais públicos que grande parte das mulheres diagnosticadas com câncer de mama não possui resultados imunohistoquímicos no prontuário. [33] Este problema ocorre principalmente pela falta de recurso do próprio hospital que impossibilitam resultados auxiliares para o acompanhamento das pacientes em tratamento para o câncer de mama e, apesar de alguns hospitais terceirizarem este serviço, este ainda possui falhas. [34]

A manipulação das amostras biológicas deve seguir um protocolo bastante rigoroso, desde a sua coleta até o seu arquivamento. Falhas em algumas dessas etapas, principalmente na forma que este material é acondicionado (fixação e emblocamento em parafina), favorecem um material de má qualidade para análise. A não preservação de tecido de algumas amostras

do nosso estudo pode ter sido reflexo de uma má manipulação do material biológico pelo serviço dos hospitais envolvidos no estudo. Apesar da técnica de IHQ, que é de baixo custo, ter um grande papel na prática clínica para o diagnóstico de lesões mamárias, como relatado por Liu *et al.* (2014) [35], qualquer erro de manipulação (seja nas lavagens, reagentes, tempo de incubação alterado, etc) também pode comprometer a marcação do tecido.

Todas as correlações da expressão de MMP-2 e MMP-9 com as variáveis deste estudo não foram estatisticamente significativas (p -valor $>0,05$), ou seja, mudanças nas variáveis não promoveram mudanças significativas na expressão das MMP-2 e MMP-9 para as amostras analisadas no nosso estudo.

A maior porcentagem de marcação para MMP-2 observada em casos malignos, em comparação com os benignos, está de acordo com os resultados obtidos por Xu *et al.* (2013) [31]. Nossos resultados para MMP-9 também estão de acordo com Zeng *et al.* (2013) [32]. Eles relataram que, além da associação com lesões malignas, a superexpressão de MMP-9 estaria associada também a uma pior sobrevida global para as pacientes com câncer de mama.

A positividade de marcação nas lesões invasivas do nosso estudo está de acordo com trabalhos realizados para evidenciar a associação da expressão de MMP-2 e MMP-9 com a ocorrência de metástases. [27] O primeiro passo para a disseminação sistêmica é a degradação da matriz extracelular e membrana basal com consequente invasão do tecido conjuntivo, sendo este evento principalmente regulado pelas MMPs. Daniele *et al.* (2010) [27] confirmaram que a expressão de MMP-2 e MMP-9 foram significativamente mais elevadas no câncer de mama metastático em comparação com câncer não metastático, tanto na detecção tecidual como sorológica.

Del Casar *et al.* (2009) [36] avaliaram a expressão de MMPs em comparação com tipos histológicos. Neste estudo foi observada uma maior expressão de MMP-2 nos tipos lobulares e tubular/papilar e de MMP-9 nos tipos ductais. Nossos resultados reforçaram

estudos anteriores onde também mostrou uma positividade maior na marcação de MMP-2 em casos lobulares e menos frequentes em outros tipos histológicos. Nosso trabalho também reforça a hipótese que o tipo ductal apresenta maior marcação para MMP-9.

Pacientes que apresentam positividade para os receptores hormonais nas células tumorais têm o melhor prognóstico e vão responder bem as terapias hormonais. Em geral, a presença de RE e RP caracterizam tumores de crescimento mais lento e menos agressivos, podendo se relacionar também com um maior período de recorrência da doença. [8] Nossos resultados mostraram positividade nuclear para MMP-2 e positividade citoplasmática para MMP-9 em lesões com receptores hormonais positivos. Em 2013, Zeng *et al.* [32] relataram também uma maior positividade de expressão de MMP-9 em lesões com positivities para os RE e RP. Em um recente estudo, Catteau *et al.* (2016) [37] mostrou que a expressão estromal de MMP-2 estava mais evidente em carcinomas ductais invasivos (CDI) que apresentavam receptores hormonais positivos.

Ainda de acordo com Catteau *et al.*, sua análise da positividade da MMP-2 e comparação com a expressão de HER-2 no estroma de CDI mostrou um aumento discreto na marcação em lesões negativas para HER-2. Zeng *et al.*, 2013 [32] também observou este mesmo padrão de marcação para MMP-9 e nossos resultados estão de acordo com os autores, exceto pela marcação nuclear de MMP-2, onde foi observado uma maior expressão em lesões positivas para o HER-2. Segundo a literatura, as lesões de mama com superexpressão de HER-2 estão associadas com uma maior agressividade tumoral e taxas de recorrências mais altas. Logo, nossos resultados da expressão de MMP-2 e MMP-9, baseado na positividade de HER-2 sugerem que esta expressão não acompanha a agressividade tumoral de mama.

A positividade do marcador de proliferação celular Ki-67, reflete uma maior agressividade tumoral, apresentando um pior prognóstico aos pacientes. Nosso estudo mostrou que lesões com baixos índices de Ki-67 apresentavam uma maior positividade apenas

para a MMP-2. Os resultados do nosso trabalho estão em desacordo com estudos de Nakopoulou *et al.* (2003) [38], Zhao *et al.* (2013) [29] e Tang *et al.* (2014) [39], que mostram uma forte relação de altos índices de Ki-67 com a superexpressão de MMP-2 e MMP-9 em câncer de mama.

Em 2012, Niemiec *et al.* [15] sugeriram que os mecanismos de remodelação do estroma e carcinogênese podem diferir entre os subtipos de câncer de mama. Com isso Zhao *et al.* (2013) [29] e Liu *et al.* (2013) [30] relataram que pacientes com o subtipo triplo-negativo apresentava elevada expressão de MMP-9 e esta associava-se com um mau prognóstico de câncer de mama. Já os resultados de Sullu *et al.* (2011) [40] mostram subtipos que não eram triplo-negativo apresentavam superexpressão de MMP-2 e MMP-9, sendo a superexpressão de MMP-2 relatado por Niemiec *et al.* (2012) [15] e Catteau *et al.* (2016) [37] associados aos subtipos luminais. Em nosso estudo foi observado marcações expressivas de MMP-2 nos subtipos de superexpressão de HER-2, Luminal A e Triplo-negativo. Já para MMP-9 a marcação foi mais evidente em subtipos Luminais. Estas divergências de resultados sugerem uma maior atenção para estas associações e estudos posteriores devem ser realizados para esclarecer quais subtipos apresentam uma maior expressão das MMPs.

CONCLUSÃO

Foi observada uma baixa expressão das MMP-2 e MMP-9 nas lesões de mama analisadas, porém as lesões malignas e invasivas obtiveram uma maior positividade na expressão. Tipos histológicos como lobular e outros menos frequentes apresentaram maior positividade na marcação de MMP-2 e o tipo ductal apresentou maior marcação para MMP-9. Marcações de MMP-2 foram mais expressivas nos subtipos de Superexpressão de HER-2, Luminal A e Triplo-negativo, já para MMP-9 a marcação foi mais evidente em subtipos Luminais.

Apesar de o nosso trabalho apresentar limitações quanto à quantidade de casos e não apresentar associações estatisticamente significativas em nenhum cruzamento da expressão tecidual das MMP-2 e MMP-9 com as variáveis do estudo, tendências importantes de aumento desta expressão nas lesões com características mais agressivas e invasivas foram observadas.

REFERÊNCIAS

- 1- INCA – **Instituto Nacional do Câncer**. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. [Acesso: www.inca.gov.br.], 2015.
- 2- WOLFF, A.C. et al. American Society of Clinical Oncology. College of american pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 1, p. 118-45, 2007.
- 3- CIRQUEIRA, M.B. et al. Molecular subtypes of breast câncer. **FEMINA**, v. 39. n. 10, 2011.
- 4- GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48. n. 6. p. 463-474, 2012.
- 5- OMS – **Organização Mundial de Saúde**. Publicações disponíveis em: www.who.int. Acesso em: 2014
- 6- AHMAD, A. Pathways to Breast Cancer Recurrence. **ISRN Oncology**, v. 2013, ID 290568, 16 p, 2013.
- 7- CHACÓN, R. D.; COSTANZO, M. V. Triple-negative breast Câncer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 2, a. S3, 2010.
- 8- VODUC, K.D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 10, p. 1684-91, 2010.
- 9- PARE, R. et al. Breast cancer precursors: diagnostic issues and current understanding on their pathogenesis. **Pathology**, v. 45, n. 3, p. 209-13, 2013.
- 10- GEYER, F.C; MARCHIÒ, C; REIS-FILHO, J.S. The role of molecular analysis in breast cancer. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 77-88, 2009.
- 11- LOPES, L.A.F. et al. Prognostic value of histological and nuclear grades and mitotic index for patients with stages II and III breast carcinoma with positive axillary lymphnodes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 3, p. 245-251, 2006.

- 12- ZANETTI, J.S; OLIVEIRA, L.R; RIBEIRO-SILVA, A. Câncer de mama: de perfis moleculares a células tronco. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 9, n. 1, p. 277-292, 2011.
- 13- RAKHA, E; REIS-FILHO, J; ELLIS, I. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.
- 14- WEIGEL, M.T; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n. 4, p. 245-62, 2010
- 15- NIEMIEC, J.A. et al. Relationships between immunophenotype, Ki-67 index, microvascular density, Ep-CAM/P-cadherin, and MMP-2 expression in early-stage invasive ductal breast cancer. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 20, n.6, p. 550-60, 2012.
- 16- VIZOSO, F.J. et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast Cancer. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 6, p. 903-11, 2007.
- 17- ROY, R; YANG, J; MOSES, M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31, p. 5287-97, 2009.
- 18- PLACE, A.E; HUH, S.J; POLYAK, K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 227, 2011
- 19- RHIM, A.D. et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. **Cell**, v. 148, n. 1-2, p. 349-61, 2012.
- 20- BONNANS C, CHOU J, WERB Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 12, p; 786-801, 2014.
- 21- CATHCART, J; PULKOSKI-GROSS, A; CAO, J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. **Genes Dis**, v. 2, n. 1, p. 26-34, 2015.
- 22- VAN ROY, F; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 23, p. 3756-88, 2008.
- 23- KESSENBROCK. K; PLAKS, V; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.
- 24- KHOKHA, R; MURTHY, A; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 9, p. 649-65, 2013.
- 25- SHAY, G; LYNCH, C.C; FINGLETON, B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. **Matrix Biol**. v. 44-46, p. 200-6, 2015.
- 26- JOBIM, F.C. et al. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10, p. 979-87, 2009.

- 27- DANIELE, A. et al. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymphnode and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer. **Anticancer Res.** v. 30, n. 9, p 3521-7, 2010.
- 28- CUPIC, D.F. et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 in primary and recurrent breast carcinomas. **Coll Antropol**, v. 35, s. 2, p. 7-10, 2011.
- 29- ZHAO, S. et al. High expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of triple-negative breast cancer (TNBC) patients. **Med Oncol**, v. 30, n. 1, p. 335, 2013.
- 30- LIU, Y. et al. CD147, MMP9 expression and clinical significance of basal-like breast cancer. **Med Oncol**. v. 30, n. 1, p. 366, 2013.
- 31- XU, N. et al. Clinical study of tumor angiogenesis and perfusion imaging using multi-slice spiral computed tomography for breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14 n. 1, p. 429-33, 2013
- 32- ZENG, Y. et al. Inverse correlation between Naa10p and MMP-9 expression and the combined prognostic value in breast cancer patients. **Med Oncol**, v. 30, n. 2, p. 562, 2013.
- 33- GEBRIM, L.H; QUADROS, L.G. Breast cancer screening in Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 28, n. 6, p. 319-323, 2006.
- 34- ANDRADE, A. C., et al. The lack of immunohistochemistry assays reveals health disparities between two groups of breast cancer patients. **African Journal of Breast Cancer**, v. 1, n. 3, p. 24-29, 2014.
- 35- LIU, H. Application of immunohistochemistry in breast pathology: a review and update. **Arch Pathol Lab Med**. v. 138, n. 12, p. 1629-42, 2014.
- 36- DEL CASAR, J.M. et al. Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumor stromal fibroblasts and those at the invasive front of breast carcinomas. **Breast Cancer Res Treat**. v. 116, n. 1, p. 39-52, 2009.
- 37- CATTEAU, X; SIMON, P; NOËL, J. Stromal expression of matrix metalloproteinase 2 in cancer-associated fibroblasts is strongly related to human epidermal growth factor receptor 2 status in invasive breast carcinoma. **Mol Clin Oncol**, v. 4, n. 3, p. 375-378, 2016.
- 38- NAKOPOULOU, L. et al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. **Breast Cancer Res Treat**, v. 77, n. 2, p. 145-55, 2003.
- 39- TANG, D. et al. Expression and correlation of matrix metalloproteinase-9 and heparanase in patients with breast cancer. **Med Oncol**, v. 31, n. 7, p. 26, 2014.
- 40- SULLU, Y. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. **Pathol Res Pract**, v. 207, n. 12, p. 747-53, 2011.

6. CONCLUSÕES

- Foi observada uma baixa expressão das MMP-2 e MMP-9 nas lesões de mama analisadas;
- Nas lesões malignas e invasivas foi observada uma maior positividade na expressão das MMP-2 e MMP-9;
- Tipos histológicos como lobular e outros menos frequentes apresentaram maior positividade na marcação de MMP-2 e o tipo ductal apresentou maior marcação para MMP-9;
- Marcações de MMP-2 foram mais expressivas nos subtipos de Superexpressão de HER-2, Luminal A e Triplo-negativo. Já para MMP-9 a marcação foi mais evidente em subtipos Luminais;
- Não houve uma correlação estatisticamente significativa em nenhum cruzamento da expressão tecidual das MMPs com as variáveis do estudo;

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esses resultados nos levam a concluir que novos estudos precisam ser realizados visando esclarecer melhor a relação entre as MMP-2 e MMP-9 com a carcinogênese mamária, bem como estabelecer possíveis aplicações prognósticas e terapêuticas, haja vista a disponibilidade de inibidores de metaloproteinases de matriz.

REFERÊNCIAS

- AALTOMAA, S; LIPPONEN, P; ESKELINEN, M. Demographic prognostic factors in breast cancer. **Acta Oncol**, v. 31, p. 635-40, 1992.
- ABREU, E; KOIFMAN, S. Prognostic factors in women breast câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.1, p. 113-31, 2002.
- AHMAD, A. Pathways to Breast Cancer Recurrence. **ISRN Oncology**, v. 2013, ID 290568, 16 p, 2013.
- ANDRADE, A. C., et al. The lack of immunohistochemistry assays reveals health disparities between two groups of breast cancer patients. **African Journal of Breast Cancer**, v. 1, n. 3, p. 24-29, 2014.
- ANDRIOLO A. Marcadores tumorais. **Rev Bras Med**, v. 53, p. 641-53, 1996.
- BONNANS C, CHOU J, WERB Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 12, p; 786-801, 2014.
- BOUDREAU, N; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast Cancer Res**, v. 5, e. 3, p.140-6, 2003.
- BURKE, H; HENSON, D. Histologic grade as a prognostic factor in breast carcinoma. **Cancer**, v. 80, n. 9, p. 1703-5, 1997.
- CARTER, C; ALLEN, C; HENSON, D. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast câncer cases. **Cancer**, v. 63, n. 1, p. 181-7, 1989.
- CATHCART, J; PULKOSKI-GROSS, A; CAO, J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. **Genes Dis**, v. 2, n. 1, p. 26-34, 2015.
- CATTEAU, X; SIMON, P; NOËL, J. Stromal expression of matrix metalloproteinase 2 in cancer-associated fibroblasts is strongly related to human epidermal growth factor receptor 2 status in invasive breast carcinoma. **Mol Clin Oncol**, v. 4, n. 3, p. 375-378, 2016.
- CHACÓN, R. D.; COSTANZO, M. V. Triple-negative breast Câncer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 2, a. S3, 2010.
- CHEANG, M. C. U. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 5, p, 1368-76, 2008.
- CHEANG, M.C.U. et al. Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 10, p. 736-50, 2009.
- CIRQUEIRA, M.B. et al. Molecular subtypes of breast câncer. **FEMINA**, v. 39. n. 10, 2011.

CIANFROCCA, M; GOLDSTEIN, L.J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**, v. 9, n; 6, p. 606-16, 2004.

CIANFROCCA M; GRADISHAR W. New molecular classifications of breast cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 59 n. 5, p. 303-13, 2009.

CLARK, J.C. et al. RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 3-4, p. 675-83, 2007.

CUPIĆ, D.F. et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 in primary and recurrent breast carcinomas. **Coll Antropol**, v. 35, s. 2, p. 7-10, 2011.

DANIELE, A. et al. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymphnode and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer. **Anticancer Res**. v. 30, n. 9, p 3521-7, 2010.

DEL CASAR, J.M. et al. Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumor stromal fibroblasts and those at the invasive front of breast carcinomas. **Breast Cancer Res Treat**. v. 116, n. 1, p. 39-52, 2009.

DONEGAN, WL. Staging methods, primary treatment options and results In: Donegan WL, Spratt JS, editors. Cancer of the breast. 2 ed. Philadelphia: Saunders; 1979. p. 221.

DONG, Q. et al. Expression of the reversion- inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs and matrix metalloproteinase-14 in neuroblastoma and the role in tumour metastasis. **Int J Exp Pathol**. v. 91. n. 4, p. 368-73, 2010.

DUFFY, M.J. et al. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Res**, v. 2, n. 4, p. 252-7, 2000.

EGEBLAD, M; WERB, Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. **Nature Reviews/Cancer**, v.2, p.161-74, 2002.

EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais (Revisão da Literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 377-88, 2001.

ELMORE, J.G. et al. Screening for breast cancer. **JAMA**, v. 293, p. 1245-1256, 2005.

ELSTON, C.W; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403-10, 1991.

ESTEBAN, J.M. et al. Quantitative immunohistochemical assay for hormonal receptors: technical aspects and biological significance. **J Cell Biochem Suppl**, v. 19, p. 138-45, 1994.

FRIEDENREICH, C.M; BRYANT, H. E; COURNEYA, K.S. Case-Control Study of Lifetime Physical Activity and Breast Cancer Risk. **Am J Epidemiol**, v. 154, n. 4, p. 336-47, 2001.

GEBRIM, L.H; QUADROS, L.G. Breast cancer screening in Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 28, n. 6, p. 319-323, 2006.

GEYER, F.C; MARCHIÒ, C; REIS-FILHO, J.S. The role of molecular analysis in breast cancer. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 77-88, 2009.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48. n. 6. p. 463-474, 2012.

GOULD, R.B.E; BRACKEN, M.B. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 100, n. 2, p. 139-48, 2006

GUSTERSON, B. et al. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast cancer research**, v. 7, n. 4, p.143-8, 2005.

GROSS, J; LAPIERE, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 48, p. 1014-22, 1962.

HUBER, K.E; CAREY, L.A; WAZER, D.E. Breast câncer molecular subtypes in patients with locally advanced disease: impact on prognosis, patterns of recurrence, and response to therap. **Seminars in Radiation Oncology**, vol. 19, n. 4, p. 204-10, 2009.

HUPPERETS, P.S. et al. The prognostic significance of steroid receptor activity in tumor tissues of patients with primary breast cancer. **Am J Clin Oncol**, v.20, p. 546-51, 1997.

INCA – **Instituto Nacional do Câncer**. Controle do Câncer de Mama – Documento de Consenso. [Acesso: www.inca.gov.br.], 2004.

INCA – **Instituto Nacional do Câncer**. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. [Acesso: www.inca.gov.br.], 2015.

UICC - **International Union Against Cancer**. TNM Classification of Malignant Tumours, 6 ed. Sobin LH, Wittekind Ch., eds. New York: Wiley; 2002.

UICC - **International Union Against Cancer**. Prognostic Factors in Cancer, 3 ed. Gospodarowicz MK, O’Sullivan B, Sobin LH, eds. New York: Wiley; 2006.

IRVIN JR., W.J; CAREY, L.A. What is triple-negative breast cancer? **Eur J Cancer**, v. 44, n. 18, p. 2799-805, 2008,

JOBIM, F.C. et al. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10, p. 979-87, 2009.

JOHNSON-THOMPSON, M. C.; GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 1224-29, 2000.

KESSENBROCK. K; PLAKS, V; WERB, Z. Matrix metalloproteínases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.

KHOKHA, R; MURTHY, A; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 9, p. 649-65, 2013.

LEIS JR., H.P. Parametros pronosticos para el cancer de mama. In : Bland KI, Copeland III EM, editores. La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. Buenos Aires : **Editorial Medica Panamericana**; 1993. p.427.

LIU, H. Application of immunohistochemistry in breast pathology: a review and update. **Arch Pathol Lab Med**. v. 138, n. 12, p. 1629-42, 2014.

LIU, Y. et al. CD147, MMP9 expression and clinical significance of basal-like breast cancer. **Med Oncol**. v. 30, n. 1, p. 366, 2013.

LOPES, L.A.F. et al. Prognostic value of histological and nuclear grades and mitotic index for patients with stages II and III breast carcinoma with positive axillary lymphnodes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 3, p. 245-251, 2006.

MENKE, C.H. et al. Rotinas em Mastologia. 2ª Ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2007

NAGASE, H; VISSE, R; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 562-73, 2006.

NAKOPOULOU, L. et al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. **Breast Cancer Res Treat**, v. 77, n. 2, p. 145-55, 2003.

NIEMIEC, J.A. et al. Relationships between immunophenotype, Ki-67 index, microvascular density, Ep-CAM/P-cadherin, and MMP-2 expression in early-stage invasive ductal breast cancer. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 20, n.6, p. 550-60, 2012.

OMS – **Organização Mundial de Saúde**. Publicações disponíveis em: www.who.int. Acesso em: 2014

ONDER, T.T. et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer Res**, v. 68, n. 10, p. 3645-54, 2008.

PARE, R. et al. Breast cancer precursors: diagnostic issues and current understanding on their pathogenesis. **Pathology**, v. 45, n. 3, p. 209-13, 2013.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, 2000.

PICHON. M.F. et al. Prognostic value of steroid receptors after long-term follow- up of 2257 operable breast cancers. **Br J Cancer**, v. 73, p. 1545-51, 1996.

PLACE, A.E; HUH, S.J; POLYAK, K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 227, 2011

RAMIREZ, F; RIFKIN, D.B. Cell signaling events: a view from the matrix (Review). **Matrix Biol**, v. 22, n. 2, p. 101-7, 2003.

RAKHA, E; REIS-FILHO, J; ELLIS, I. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.

RHIM, A.D. et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. **Cell**, v. 148, n. 1-2, p. 349-61, 2012.

ROBERTI, N.E. The role of histologic grading in the prognosis of patients with carcinoma of the breast. **Cancer**, v. 80, n. 9, p. 1708-16, 1997.

ROSEN, P.P. **Breast Pathology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 16, p. 5678-85, 2005.

ROY, R; YANG, J; MOSES, M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31, p. 5287-97, 2009.

SHAY, G; LYNCH, C.C; FINGLETON, B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. **Matrix Biol**. v. 44-46, p. 200-6, 2015.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, 2001.

SØRLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 14, p. 8418-23, 2003.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 18, p. 10393-8, 2003.

SULLU, Y. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. **Pathol Res Pract**, v. 207, n. 12, p. 747-53, 2011.

TANG, D. et al. Expression and correlation of matrix metalloproteinase-9 and heparanase in patients with breast cancer. **Med Oncol**, v. 31, n. 7, p. 26, 2014.

TAKAHASHI, C. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 22, p. 13221-6, 1998.

TAVASSOLI, F.A; DEVILEE, P. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003

VALDIVIA, A. et al. Co-expression of metalloproteinases 11 and 12 in cervical scrapes cells from cervical precursor lesions. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 7, p. 674-82, 2011.

VAN ROY, F; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 23, p. 3756-88, 2008.

VISSE, R; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, n. 8, p. 827-39, 2003.

VIZOSO, F.J. et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast Cancer. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 6, p. 903-11, 2007.

VODUC, K.D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 10, p. 1684-91, 2010.

WEIGELT, B; REIS-FILHO, J.S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? **Nat Rev Clin Oncol**, v. 6, n. 12, p. 718-30, 2009.

WEIGEL, M.T; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n. 4, p. 245-62, 2010

WOLFF, A.C. et al. American Society of Clinical Oncology. College of american pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 1, p. 118-45, 2007.

XU, N. et al. Clinical study of tumor angiogenesis and perfusion imaging using multi-slice spiral computed tomography for breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14 n. 1, p. 429-33, 2013

ZANETTI, J.S; OLIVEIRA, L.R; RIBEIRO-SILVA, A. Câncer de mama: de perfis moleculares a células tronco. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 9, n. 1, p. 277-292, 2011.

ZENG, Y. et al. Inverse correlation between Naa10p and MMP-9 expression and the combined prognostic value in breast cancer patients. **Med Oncol**, v. 30, n. 2, p. 562, 2013.

ZHAO, S. et al. High expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of triple-negative breast cancer (TNBC) patients. **Med Oncol**, v. 30, n. 1, p. 335, 2013.

APÊNDICES

Apêndice A - Tabela com cruzamento de informações da expressão de MMP-2 núcleo com as variáveis da amostra.

Variáveis		Análise Semiquantitativa					P-valor	Análise Qualitativa			
		MMP-2 núcleo				Total		MMP-2 núcleo		Total	P-valor
		Negativo	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+++)			Negativo	Positivo		
Tipo de Lesão (n=79)	Benigna	5	1	0	0	6	0,928**	5	1	6	0,649**
		83,3%	16,7%	0,0%	0,0%	100,0%		83,3%	16,7%	100,0%	
	Maligna	58	10	4	1	73		58	15	73	
		79,5%	13,7%	5,5%	1,4%	100,0%		79,5%	20,5%	100,0%	
Tipo Histológico (n=71)	Ductal	49	9	4	1	63	0,968**	49	14	63	0,653**
		77,8%	14,3%	6,3%	1,6%	100,0%		77,8%	22,2%	100,0%	
	Lobular	3	0	0	0	3		3	0	3	
		100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Outros	4	1	0	0	5		4	1	5	
		80,0%	20,0%	0,0%	0,0%	100,0%		80,0%	20,0%	100,0%	
Invasividade (n=77)	In situ	6	1	0	0	7	0,91**	6	1	7	0,99*
		85,7%	14,3%	0,0%	0,0%	100,0%		85,7%	14,3%	100,0%	
	Invasivo	55	10	4	1	70		55	15	70	
		78,6%	14,3%	5,7%	1,4%	100,0%		78,6%	21,4%	100,0%	
Receptor de Estrógeno (n=53)	Negativo	20	1	0	0	21	0,234**	20	1	21	0,71*
		95,2%	4,8%	0,0%	0,0%	100,0%		95,2%	4,8%	100,0%	
	Positivo	24	3	4	1	32		24	8	32	
		75,0%	9,4%	12,5%	3,1%	100,0%		75,0%	25,0%	100,0%	
Receptor de Progesterona (n=53)	Negativo	20	1	0	1	22	0,173**	20	2	22	0,277*
		90,9%	4,5%	0,0%	4,5%	100,0%		90,9%	9,1%	100,0%	
	Positivo	24	3	4	0	31		24	7	31	
		77,4%	9,7%	12,9%	0,0%	100,0%		77,4%	22,6%	100,0%	
HER-2 (n=51)	Negativo	41	3	2	1	47	0,583**	41	6	47	0,457*
		87,2%	6,4%	4,3%	2,1%	100,0%		87,2%	12,8%	100,0%	
	Positivo	3	1	0	0	4		3	1	4	
		75,0%	25,0%	0,0%	0,0%	100,0%		75,0%	25,0%	100,0%	
Ki-67 (n=29)	Negativo (<14%)	4	1	0	0	5	0,446*	4	1	5	0,446*
		80,0%	20,0%	0,0%	0,0%	100,0%		80,0%	20,0%	100,0%	
	Positivo (<14%)	22	2	0	0	24		22	2	24	
		91,7%	8,3%	0,0%	0,0%	100,0%		91,7%	8,3%	100,0%	
Tipo Molecular (n=52)	Luminal A	4	1	0	0	5	0,213**	4	1	5	0,101**
		80,0%	20,0%	0,0%	0,0%	100,0%		80,0%	20,0%	100,0%	
	Luminal B	9	1	0	0	10		9	1	10	
		90,0%	10,0%	0,0%	0,0%	100,0%		90,0%	10,0%	100,0%	
	Luminal	11	1	4	1	17		11	6	17	
		64,7%	5,9%	23,5%	5,9%	100,0%		64,7%	35,3%	100,0%	
	Super HER2	3	1	0	0	4		3	1	4	
		75,0%	25,0%	0,0%	0,0%	100,0%		75,0%	25,0%	100,0%	
Triplo Negativo	16	0	0	0	16	16	0	16			
	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%			

*Teste exato de Fisher **Teste Qui-quadrado de Independência

Apêndice B - Tabela com cruzamento de informações da expressão de MMP-2 citoplasma com as variáveis da amostra.

Variáveis		Análise Semiquantitativa					Análise Qualitativa			
		MMP-2 citoplasma			Total	p-valor	MMP-2 Citoplasma		Total	p-valor
		Negativo	Positivo (+)	Positivo (++)			Negativo	Positivo		
Tipo de Lesão (n=79)	Benigna	5	1	0	6	0,942**	5	1	6	0,99*
		83,3%	16,7%	0,0%	100,0%		83,3%	16,7%	100,0%	
	Maligna	62	10	1	73		62	11	73	
		84,9%	13,7%	1,4%	100,0%		84,9%	15,1%	100,0%	
Tipo Histológico (n=71)	Ductal	54	8	1	63	0,733**	54	9	63	0,419**
		85,7%	12,7%	1,6%	100,0%		85,7%	14,3%	100,0%	
	Lobular	2	1	0	3		2	1	3	
		66,7%	33,3%	0,0%	100,0%		66,7%	33,3%	100,0%	
	Outro	5	0	0	5		5	0	5	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Invasividade (n=77)	In situ	6	1	0	7	0,946**	6	1	7	0,99*
		85,7%	14,3%	0,0%	100,0%		85,7%	14,3%	100,0%	
	Invasivo	60	9	1	70		60	10	70	
		85,7%	12,9%	1,4%	100,0%		85,7%	14,3%	100,0%	
Receptor de Estrógeno (n=53)	Negativo	19	2	0	21	0,99*	19	2	21	0,99*
		90,5%	9,5%	0,0%	100,0%		90,5%	9,5%	100,0%	
	Positivo	29	3	0	32		29	3	32	
		90,6%	9,4%	0,00%	100,0%		90,6%	9,4%	100,0%	
Receptor de Progesterona (n=53)	Negativo	19	3	0	22	0,638*	19	3	22	0,68*
		86,4%	13,6%	0,0%	100,0%		86,4%	13,6%	100,0%	
	Positivo	29	2	0	31		29	2	31	
		93,5%	6,5%	0,0%	100,0%		93,5%	6,5%	100,0%	
HER-2 (n=51)	Negativo	42	5	0	47	0,99*	42	5	47	0,99*
		89,4%	10,6%	0,0%	100,0%		89,4%	10,6%	100,0%	
	Positivo	4	0	0	4		4	0	4	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Ki-67 (n=29)	Negativo	4	1	0	5	0,32*	4	1	5	0,32*
		80,0%	20,0%	0,0%	100,0%		80,0%	20,0%	100,0%	
	Positivo	23	1	0	24		23	1	24	
		95,8%	4,2%	0,0%	100,0%		95,8%	4,2%	100,0%	
Tipo Molecular (n=52)	Luminal A	4	1	0	5	0,671*	4	1	5	0,671**
		80,0%	20,0%	0,0%	100,0%		80,0%	20,0%	100,0%	
	Luminal B	10	0	0	10		10	0	10	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Luminal	15	2	0	17		15	2	17	
		88,2%	11,8%	0,0%	100,0%		88,2%	11,8%	100,0%	
	Super HER2	4	0	0	4		4	0	4	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Triplo Negativo	14	2	0	16		14	2	16	
		87,5%	12,5%	0,0%	100,0%		87,5%	12,5%	100,0%	

*Teste exato de Fisher **Teste Qui-quadrado de Independência

Apêndice C - Tabela com cruzamento de informações da expressão de MMP-9 núcleo com as variáveis da amostra.

Variáveis		Análise Semiquantitativa				Análise Qualitativa				
		MMP-9 núcleo			Total	p-valor	MMP-9 núcleo		Total	p-valor
		Negativo	Positivo (+)	Positivo (++)			Negativo	Positivo		
Tipo de Lesão (n=79)	Benigna	5	0	0	5	0,933**	5	0	5	0,99*
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Maligna	72	1	1	74		72	2	74	
		97,3%	1,4%	1,4%	100,0%		97,3%	2,7%	100,0%	
Tipo Histológico (n=72)	Ductal	62	1	1	64	0,992**	62	2	64	0,879**
		96,9%	1,6%	1,6%	100,0%		96,9%	3,1%	100,0%	
	Lobular	3	0	0	3		3	0	3	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Outro	5	0	0	5		5	0	5	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Invasividade (n=77)	In situ	6	0	0	6	0,917**	6	0	6	0,99*
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Invasivo	69	1	1	71		69	2	71	
		97,2%	1,4%	1,4%	100,0%		97,2%	2,8%	100,0%	
Receptor de Estrógeno (n=53)	Negativo	22	0	0	22	0,99*	22	0	22	0,99*
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Positivo	30	1	0	31		30	1	31	
		96,8%	3,2%	0,0%	100,0%		96,8%	3,2%	100,0%	
Receptor de Progesterona (n=53)	Negativo	22	1	0	23	0,434*	22	1	23	0,43*
		95,7%	4,3%	0,0%	100,0%		95,7%	4,3%	100,0%	
	Positivo	30	0	0	30		30	0	30	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
HER-2 (n=51)	Negativo	46	1	0	47	0,99*	46	1	47	0,99*
		97,9%	2,1%	0,0%	100,0%		97,9%	2,1%	100,0%	
	Positivo	4	0	0	4		4	0	4	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Ki-67 (n=30)	Negativo	5	0	0	5	***	5	0	5	***
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Positivo	25	0	0	25		25	0	25	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Tipo Molecular (n=52)	Luminal A	5	0	0	5	0,682**	5	0	5	0,682*
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Luminal B	10	0	0	10		10	0	10	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Luminal	15	1	0	16		15	1	16	
		93,8%	6,3%	0,0%	100,0%		93,8%	6,3%	100,0%	
	Super HER2	4	0	0	4		4	0	4	
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Triplo Negativo	17	0	0	17	17	0	17			
	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%			

*Teste exato de Fisher **Teste Qui-quadrado de Independência ***Não foi possível calcular.

Apêndice D - Tabela com cruzamento de informações da expressão de MMP-9 citoplasma com as variáveis da amostra.

Variáveis		Análise Semiquantitativa				p-valor	Análise Qualitativa			
		MMP-9 citoplasma			Total		MMP9 citoplasma		Total	p-valor
		Negativo	Positivo (+)	Positivo (++)			Negativo	Positivo		
Tipo de Lesão (n=79)	Benigna	5	0	0	5	0,933**	5	0	5	0,99*
		100,0%	0,0%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Maligna	72	1	1	74		72	2	74	
		97,3%	1,4%	1,4%	100,0%		97,3%	2,7%	100,0%	
Tipo Histológico (n=72)	Ductal	63	0	1	64	0,939**	63	1	64	0,939**
		98,4%	0,00%	1,6%	100,0%		98,4%	1,6%	100,0%	
	Lobular	3	0	0	3		3	0	3	
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Outro	5	0	0	5		5	0	5	
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Invasividade (n=77)	In situ	6	0	0	6	0,99*	6	0	6	0,99*
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Invasivo	70	0	1	71		70	1	71	
		98,6%	0,00%	1,4%	100,0%		98,6%	1,4%	100,0%	
Receptor de Estrógeno (n=53)	Negativo	22	0	0	22	0,99*	22	0	22	0,99*
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Positivo	30	0	1	31		30	1	31	
		96,8%	0,00%	3,2%	100,0%		96,8%	3,2%	100,0%	
Receptor de Progesterona (n=53)	Negativo	23	0	0	23	0,99*	23	0	23	0,99*
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Positivo	29	0	1	30		29	1	30	
		96,7%	0,00%	3,3%	100,0%		96,7%	3,3%	100,0%	
HER-2 (n=51)	Negativo	46	0	1	47	0,99*	46	1	47	0,99*
		97,9%	0,00%	2,1%	100,0%		97,9%	2,1%	100,0%	
	Positivo	4	0	0	4		4	0	4	
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Ki-67 (n=30)	Negativo	5	0	0	5	***	5	0	5	***
		100,0%	0,00%	0,00%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Positivo	25	0	0	25		25	0	25	
		100,0%	0,00%	0,00%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Tipo Molecular (n=52)	Luminal A	5	0	0	5	0,682**	5	0	5	0,682**
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Luminal B	10	0	0	10		10	0	10	
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
	Luminal	15	0	1	16		15	1	16	
		93,8%	0,00%	6,3%	100,0%		93,8%	6,3%	100,0%	
	Super HER2	4	0	0	4		4	0	4	
		100,0%	0,00%	0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	100,0%	
Triplo Negativo	17	0	0	17	17	0	17			
	100,0%	0,00%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%			

*Teste exato de Fisher **Teste Qui-quadrado de Independência ***Não foi possível calcular.

ANEXOS

Anexo 1 – PARECER DO CEP / CCS / UFPE

		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
---	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA PATOGÊNESE MAMÁRIA, SUA ASSOCIAÇÃO COM O HPV E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS POTENCIAIS BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DAS LESÕES

Pesquisador: Jacinto da Costa Silva Neto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 28508614.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 798.811

Data da Relatoria: 26/09/2014

Apresentação do Projeto:

A EMENDA foi apresentada para modificação da metodologia da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Solicita a modificação da metodologia da pesquisa, incluindo a carta de anuência do Setor de Patologia da HC/UFPE e do Hospital Barão de Lucena

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A EMENDA apresentada está adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão adequados.

Recomendações:

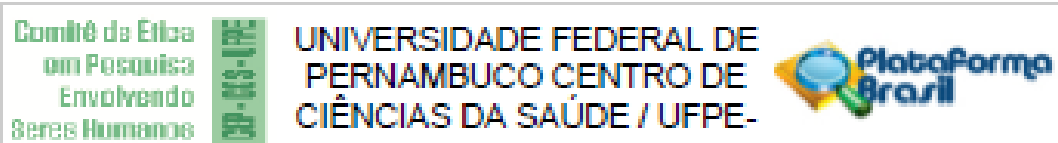
recomendação;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2128-6588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 790.811

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer da EMENDA em questão e o pesquisador está autorizado a modificar a metodologia e a inclusão das cartas de anuência;

RECIFE, 21 de Setembro de 2014

Assinado por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br

Anexo 2 – ARTIGO DE REVISÃO

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.se

Current Molecular Medicine 2016, 16, 1-10

1

REVIEW ARTICLE

Putative Mechanisms of Viral Transmission and Molecular Dysregulation of Mammary Epithelial Cells by Human Papillomavirus: Implications for Breast Cancer

E.G. de Lima¹, C.M.M. do Amaral¹, F.C.Q. Peixe², A.P.A.D. Gurgel¹, J. da Costa Silva Neto² and A.C. de Freitas^{1*}

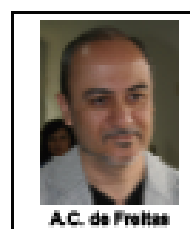
¹Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE), Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo S/N, Recife, 50670-901, Brazil; ²Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo S/N, Recife, 50670-901, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: March 24, 2016
Revised: July 1, 2016
Accepted: July 21, 2016

DOI: 10.2174/156652481606519070
40613400

Abstract: Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Several studies have demonstrated the presence of Human papillomavirus (HPV) DNA in breast cancer samples. However, the role of HPV in breast carcinogenesis is not clear, and the interaction mechanisms between this infectious agent and the breast cancer cell need to be more fully clarified. In this article, we discuss the putative roles of HPV infection in breast carcinogenesis.



A.C. de Freitas

Keywords: Breast cancer, human papillomavirus (HPV), etiological factor, E6 and E7 oncoproteins, HER2, BRCA1, BRCA2.

1. INTRODUCTION

Breast cancer is the most common type of cancer in women worldwide. According to the World Health Organization (WHO), in 2012, 1.67 million new patients were diagnosed with breast cancer and 521,000 people died of the disease [1]. Middle-income countries (such as Canada, USA, Australia and Japan) have a higher survival rate than low-income countries (such as Brazil and Algeria) [2].

The risk factors associated with the development of breast cancer are age, family history, hormonal contraception and treatment after menopause, as well as obesity, smoking, and alcohol consumption. However, these risk factors represent only 20-50% of the cases. Despite decades of research, there is no correlation between genetic susceptibility and the etiology of breast cancer and most of the remaining cases still remain unexplained. This has aroused a great deal of interest among researchers who have sought to find additional factors that might lead to breast cancer [3-5].

As a result, some studies have linked breast cancer to viral infections such as Epstein-Barr virus (EBV),

Mouse mammary tumor virus (MMTV) and Human papillomavirus (HPV) [3, 4]. Several studies have shown the presence of HPV DNA in breast cancer samples [4, 6-33]. In addition, these studies have shown HPV DNA in a range of 11% to 86% of the breast carcinoma [tissue] depending on racial and epidemiological factors, as well as the different methodological approaches adopted [4, 6-34]. Despite this, the role of HPV in the development of breast cancer is still not clear. In the next section, we discuss the possible roles of HPV in breast carcinogenesis.

2. BREAST CANCER

Breast cancer is a heterogeneous disease comprising an increasing number of biological tumor subtypes. The histological types of breast cancer can be divided into non-infiltrating carcinomas (*in situ*) and infiltrating carcinomas. Carcinomas *in situ* (CIS) are characterized by tumor cells located in the ducts or lobules without degradation of the basement membrane or stromal invasion. The CIS can be subdivided generically into lobular carcinoma *in situ* (LCIS) and ductal carcinoma *in situ* (DCIS) [35]. The LCIS is generally characterized by proliferation of small cells of little adherence in one or more terminal ducts and alveoli. Furthermore, LCIS is rarely diagnosed by imaging studies and, for this reason, the loss of E-cadherin is considered for differentiation between

*Address correspondence to this author at the Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Brazil, Cidade Universitária, Postal Code 50-870-901, Recife – Pernambuco, Brazil; E-mail: acf_uppe@yahoo.com.br