

***Flávio Amorim Machado***

**Avaliação da densidade vascular pelo  
CD-34 no carcinoma ductal *in situ* da  
mama comparando os tipos  
comedo e não comedo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área: Ginecologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Ricardo P. Rodrigues

**Botucatu  
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Machado, Flávio Amorim

Avaliação da densidade vascular pelo CD-34 no carcinoma ductal *in situ* da mama comparando os tipos comedo e não comedo / Flávio Amorim Machado.  
– Botucatu : [s.n.], 2006.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2006.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo P. Rodrigues

Assunto CAPES:

1. Carcinoma *in situ*. 2. Câncer. 3. Mama – Câncer – Cirurgia. 4. Neovascularização.

CDD 618.19

Palavras chave: Angiogênese; Carcinoma ductal *in situ*; CD-34; Densidade vascular; Mama.



*A Deus, essa força de luz soberana  
que orienta o nosso saber no sentido da  
justiça, lealdade, amor e fraternidade.*

*A minha esposa amada, Tatiana  
Amorim, por ter me acompanhado e  
ajudado de forma doce e incansável  
nesta caminhada.*

*A minha adorada mãe, Nina e ao  
meu saudoso pai, Flavio (in  
memoriam) exemplos de caráter, amor,  
perseverança e responsáveis por minha  
educação.*

*Aos meus tios Ricardo e Hélia  
por terem me apoiado, orientado e  
incentivado em diversos desafios que  
se transformaram em conquistas.*

---



*Ao Prof. Dr. José Ricardo P. Rodrigues,  
meu querido orientador, que acreditou na  
conclusão do meu trabalho e demonstrou ser um  
grande amigo.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Rosemeire P. de Oliveira,  
grande amiga e incentivadora da  
concretização deste sonho.*

---



*As pacientes que participaram desta pesquisa sem as quais nada seria possível.*

*Ao Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) centro de excelência no tratamento humanizado do câncer e núcleo de pesquisas.*

*Ao Prof. Dr. João Carlos Sampaio Goes, por permitir a realização do meu trabalho no IBCC.*

*Aos patologistas do IBCC: Prof. Dr. João Guidugli Neto e, em especial, a Prof. Dra. Débora K. Zveibil, pela análise imunohistoquímica e orientação na metodologia da pesquisa.*

*Aos docentes da Pós graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, pelo grande aprendizado.*

*À Sra Marilda Marques Bordignon Rodrigues, pela atenção e carinho.*

*À Dra. Terezinha Vendramini Mariano, que me auxiliou na feliz escolha do orientador da minha pesquisa.*

---

*À Profa. Dra. Lídia Raquel de Carvalho professora titular do Departamento de Bioestatística da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela grande auxílio nas Análises Estatísticas.*

*A Profa. Dra. Maria Lúcia Toralles Pereira (in memoriam) pelos ensinamentos na área de pedagogia didática.*

*Aos meus preceptores do IBCC, pelas instruções e aprimoramentos na minha formação em mastologia.*

*Aos funcionários da seção de pós-graduação, em especial, a Regina Célia Spadin, pela forma carinhosa que me recebe, todas as vezes que retorno a Botucatu.*

*Aos funcionários da biblioteca da UNESP, sempre prestativos e eficientes.*

*À Sra Neuza Magalhães M. Santos, bibliotecária da Universidade Estadual de Feira de Santana, pelo auxílio no levantamento bibliográfico.*

---

*A Adnice Ruiz Pedro e Abílio Manoel Batista Pinto, pelos trabalhos de diagramação, arte e apresentação dos textos.*

*Aos meus sogros Rogério e Yara e à minha cunhada Larissa, pelo incentivo e apoio.*

*Aos meus familiares gaúchos e baianos que estiveram o tempo todo torcendo pela conclusão do meu mestrado.*

*Ao amigo Luciano Ramos por assumir as minhas atividades enquanto estive afastado do nosso serviço para conclusão desta dissertação.*

*Enfim a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.*

---



---

Lista de Abreviaturas .....	14
Lista de Figuras .....	16
Lista de Quadros .....	18
Lista de Tabelas .....	20
Resumo .....	22
Summary .....	24
1. Introdução .....	26
1.1. Câncer de mama – aspectos gerais .....	27
1.2. Carcinoma ductal <i>In situ</i> .....	29
1.3. Angiogênese em câncer de mama .....	36
1.4. Angiogênese e carcinoma ductal <i>In situ</i> .....	46
2. Objetivo .....	48
3. Materiais e Métodos .....	50
3.1. Seleção dos casos .....	51
3.2. Tratamentos cirúrgicos realizados .....	52
3.3. Características histológicas do tumor .....	52
3.4. Estudo imuno-histoquímico.....	54
3.4.1. Marcação dos cortes histológicos com CD-34 .....	54
3.4.2. Contagem de vasos de área contendo tumor e área de tecido mamário normal .....	57
3.5. Classificação da densidade vascular média .....	57
3.6. Análise estatística .....	58
4. Resultados .....	59
4.1. Média de idade nos grupos A e B .....	60
4.2. Comparação do tratamento cirúrgico entre os grupos A e B: cirurgia conservadora X mastectomia .....	61
4.3. Freqüência dos tipos histológicos de carcinoma ductal <i>in situ</i> ....	62
4.4. Média da densidade vascular média dos grupos A e B nas áreas de tecido mamário normal .....	63
4.5. Média da densidade vascular média entre as áreas de tecido mamário normal e carcinoma ductal <i>in situ</i> do grupo A .....	64

---

---

4.6. Média da densidade vascular média entre as áreas de tecido mamário normal e carcinoma ductal <i>in situ</i> do grupo B .....	64
4.7. Média da densidade vascular média dos grupos A e B em áreas de tecido mamário com carcinoma ductal <i>in situ</i> .....	65
4.8. Percentual entre baixa e alta densidade vascular nos grupos A e B .....	66
4.9. Média da densidade vascular média entre os grupos histológicos do grupo B .....	66
5. Discussão .....	68
5.1. Discussão da Metodologia .....	74
5.1.1. Seleção dos casos .....	74
5.1.2. Tratamentos cirúrgicos realizados .....	74
5.1.3. Características histológicas do tumor .....	74
5.1.4. Estudo imunohistoquímico e classificação da densidade vascular .....	75
5.1.5. Análise estatística .....	78
5.2. Discussão dos Resultados .....	79
5.2.1. Frequência de idade nos grupos A e B .....	79
5.2.2. Tratamento cirúrgico realizado nos grupos A e B: Cirurgia conservadora X mastectomia .....	80
5.2.3. Frequência dos tipos histológicos .....	81
5.2.4. Proporção da média da densidade vascular média dos grupos A e B nas áreas de tecido mamário normal .....	81
5.2.5. Proporção da média da densidade vascular média entre as áreas de tecido mamário normal e carcinoma ductal <i>in situ</i> nos grupos A e B .....	82
5.2.6. Proporção da média da densidade vascular média entre os grupos A e B nas áreas com CDIS .....	83
5.2.7. Percentual entre baixa e alta densidade vascular nos grupos A e B .....	84
5.2.8. Proporção da média da densidade vascular Média entre os subtipos histológicos do grupo B .....	84
6. Conclusões .....	87
7. Referências Bibliográficas .....	89
Anexos .....	103

---



<b>AA</b>	Ausência de avaliação
<b>bFGF</b>	Fator de crescimento fibroblástico fundamental
<b>BLS</b>	Biopsia do linfonodo sentinela
<b>CDIS</b>	Carcinoma ductal <i>In situ</i>
<b>CMM</b>	Contagem Média dos microvasos
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DVM</b>	Densidade vascular média
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>GH</b>	Grau histológico
<b>HB-EGF</b>	Fator de crescimento epitelial fixador de heparina
<b>c-erbB-2</b>	Sub produto do HER 2
<b>HER 2/NEU</b>	Gene que codifica uma lipoproteína transmembrana com atividade intrínseca de tirosina quinase homologa ao receptor do fator de crescimento epidérmico
<b>IBCC</b>	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento insulina similar 1
<b>IVL</b>	Invasão vascular linfática
<b>LN</b>	Linfonodo
<b>MCM</b>	Maxima contagem dos microvasos
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>NSABP</b>	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>SG</b>	Sobrevida global
<b>SLD</b>	Sobrevida livre de doença
<b>TT</b>	Tamanho do tumor
<b>UKCCCR</b>	UK Coordinating Committee on Cancer Research
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>VNPI</b>	Índice prognóstico de Van Nuys
<b>VPF</b>	Fator de permeabilidade vascular

---



<b>Figura 1</b>	À esquerda lâminas com cortes histológicos de carcinoma ductal <i>in situ</i> confeccionadas com tecido mamário fixado em blocos de parafina, coradas com Hematoxilina-Eosina. À direita, em detalhe, blocos de parafina exibindo os registros das pacientes .....	52
<b>Figura 2</b>	À esquerda carcinoma ductal <i>in situ</i> tipo comedo revelando área de necrose no interior do ducto. À direita, em maior aumento, observam-se células malignas com grandes núcleos hiper cromáticos, pleomórficos e irregulares .....	53
<b>Figura 3</b>	À esquerda, carcinoma ductal <i>in situ</i> não comedo, tipo cribriforme. Células do tumor parecem preencher os ductos; entretanto, cuidadosa inspeção revela múltiplos pequenos espaços redondos no interior. À direita, em maior aumento, proliferação homogênea das células do tumor, com perda de células mioepiteliais. Os nucléolos são aumentados de volume, mas retém uma forma uniforme, redonda ou oval .....	53
<b>Figura 4</b>	Expressão positiva para CD-34. Coloração pela Hematoxilina-Eosina; 200X .....	56
<b>Figura 5</b>	Proporção numérica de faixa etária entre os grupos A e B .	61
<b>Figura 6</b>	Proporção numérica de cirurgias realizadas no grupo A e no grupo B .....	62
<b>Figura 7</b>	Percentual dos tipos histológicos do Carcinoma Ductal <i>In situ</i> .....	63
<b>Figura 8</b>	Contagem média de vasos segundo tipo e amostra histológica .....	65
<b>Figura 9</b>	Média e desvio-padrão referentes à densidade vascular dos subtipos do grupo B .....	67



<b>Quadro 1</b>	Nomenclatura das lesões proliferativas intraductais segundo De Luca .....	29
<b>Quadro 2</b>	Nomenclatura das lesões intraductais segundo Tavassoli	30
<b>Quadro 3</b>	Relação de trabalhos que associam neovascularização e agressividade do tumor .....	43



<b>Tabela 1</b>	Índice prognóstico de Van Nuys .....	33
<b>Tabela 2</b>	Média e desvio-padrão da idade segundo grupo .....	60
<b>Tabela 3</b>	Distribuição de freqüências das pacientes segundo grupo e faixa etária .....	60
<b>Tabela 4</b>	Distribuição de freqüências das pacientes segundo tipo histológico e tratamento cirúrgico .....	61
<b>Tabela 5</b>	Distribuição da freqüência de ocorrência dos tipos histológicos de CDIS .....	62
<b>Tabela 6</b>	Média da densidade vascular média dos grupos A e B em tecido mamário normal .....	63
<b>Tabela 7</b>	Média da densidade vascular média da área de tecido mamário normal e área de tecido mamário com CDIS dos casos pertencentes ao grupo A .....	64
<b>Tabela 8</b>	Média da densidade vascular média da área de tecido mamário normal e área de tecido mamário com CDIS dos casos pertencentes ao grupo B .....	64
<b>Tabela 9</b>	Média da densidade vascular média dos grupos A e B em tecido mamário com CDIS .....	65
<b>Tabela 10</b>	Distribuição da freqüência da baixa e alta densidade vascular nos grupos A e B .....	66
<b>Tabela 11</b>	Média e desvio-padrão referentes à densidade vascular média do grupo B .....	66

---



Em nosso estudo avaliamos a densidade vascular pelo CD-34 no carcinoma ductal *in situ* da mama comparando os tipos comedo e não comedo. Foram selecionados 52 casos de CDIS divididos em dois grupos, segundo o tipo histológico. Grupo A: 30 casos tipo comedo e Grupo B: 22 casos tipo não comedo. Os subtipos histológicos encontrados no grupo B foram: cribriforme, papilífero, sólido e micropapilífero. A média de idade do grupo A foi de 52,7 e de 61,9 para o grupo B. As pacientes avaliadas foram tratadas cirurgicamente pela mastectomia ou setorectomia. A densidade vascular média foi calculada, para cada caso, em área de tecido mamário normal e em área de CDIS, pela média de vasos contados em três campos de microscopia óptica com aumento de 200X. Para a contagem dos microvasos foi aplicada a reação imunohistoquímica com marcador de endotélio CD-34. A densidade vascular média foi classificada como baixa ou alta, tendo como ponto de corte a Médiana, que foi de 15,3 para o grupo com CDIS e 7 para o grupo com tecido mamário normal. Valores encontrados abaixo ou acima das Medianas foram considerados como baixa ou alta densidade vascular, respectivamente. A análise estatística utilizou a análise de variância para o cálculo da variável densidade vascular média e a análise de perfil para a contagem de vasos. O nível de significância utilizado foi de 5%. Houve diferença com significância estatística da média da densidade vascular média quando comparamos a área de tecido mamário normal com a área de carcinoma ductal *in situ* nos grupos A e B. Também houve diferença com significância estatística quando comparamos a média da densidade vascular média entre os grupos A e B em área de tecido mamário apresentando carcinoma ductal *in situ*. No grupo A, a média da densidade vascular média foi maior que no grupo B. Não houve diferença estatisticamente significativa da média da densidade vascular média entre os subtipos histológicos do grupo B.

**Palavras-chave:** Angiogênese; Carcinoma ductal *in situ*; CD-34; Densidade vascular; Mama.

---



Our study evaluated vascular density by CD34 in breast ductal carcinoma *in situ* comparing comedo and non-comedo types. Fifty two CDIS cases were divided into two groups according to histological type. Group A: 30 comedo type cases, and Group B: 22 non-comedo cases. The histological subtypes found in Group B were: cribriform, papilliferous, solid, and micropapilliferous. The mean age of Group A was 52.7 and Group B was 61.9. Patients were surgically treated by mastectomy or sectorectomy. Mean vascular density was calculated for each case, in normal mammary tissue area and CDIS area by mean number vessels from three optical microscope fields at 200X. Endothelial CD-34 marker immunohistochemical reaction was used to count micro-vessels. Mean vascular density was classified as low or high with the Médian as cut-off point which was 15.3 for the CDIS group and 7 for the normal mammary tissue group. Values below or above the Médians were considered as low or high vascular density respectively. Analysis of Variance was used to calculate mean vascular density and profile analysis for vessel counts. A significance level of 5% was used. There was significant difference in mean vascular density between normal mammary tissue area and area with *in situ* ductal carcinoma in Groups A & B. There was also significant difference in mean vascular density between Groups A & B for areas with *in situ* ductal carcinoma. Group A mean vascular density was higher than Group B. There was no significant difference in mean vascular density between histological subtypes in Group B.

**Key Words:** Angiogenesis; Ductal Carcinoma *in situ*; CD-34; vascular density; breast.

---



## **1.1. CÂNCER DE MAMA – ASPECTOS GERAIS**

A Organização Mundial de Saúde estima que, por ano, ocorram cerca 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo, o que torna este câncer mais comum entre as mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE - 2006). As estimativas do Ministério da Saúde apontam que ocorrerão 472.050 casos novos de câncer no Brasil em 2006. O principal câncer a acometer a população brasileira é o câncer de pele não melanoma, com a estimativa de 116000 casos novos em 2006; seguido por ordem de frequência pelas neoplasias malignas da mama, próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e colo do útero, com previsão de 49000, 47000, 27000, 25000, 23000 e 19000 casos novos, respectivamente. (MINISTÉRIO DA SAÚDE - 2006).

A distribuição regional no Brasil do câncer de mama não é uniforme. Na região Sudeste é o câncer mais frequente entre as mulheres, com risco estimado de 71 casos por 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também apresenta a maior incidência entre as mulheres das regiões Sul - 69/100.000; Centro-oeste - 38/100.000; Nordeste - 38/100.000 e 15/100.000 mulheres na região Norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE - 2006).

Além da alta taxa de incidência, a mortalidade por câncer de mama ainda se apresenta com índices elevados. A taxa de mortalidade padronizada por idade, por 100.000 mulheres, aumentou de 5,77 em 1979

---

para 9,74 em 2000 e 10,40 em 2003 (RODRIGUES., 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2003). Enquanto a taxa de mortalidade aumenta no Brasil, em vários países do mundo, como os EUA, Canadá, Itália, Reino Unido, Dinamarca e Noruega a diminuição da mortalidade tem sido observada. Esta diferença é atribuída ao estadiamento da patologia no momento do diagnóstico. Com base nos dados disponíveis de Registros Hospitalares, no Brasil, cerca de 60% dos tumores de mama são diagnosticados em estágio III ou IV (MINISTÉRIO DA SAÚDE - 2006).

O rastreamento mamográfico tem como objetivo o diagnóstico do câncer de mama nos estádios iniciais. A mamografia é o método considerado padrão para o rastreamento com capacidade de diagnosticar microcalcificações e nódulos mamários. O achado de microcalcificações está relacionado com lesões proliferativas intraductais, incluindo o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (MONROW, et al., 2002).

No carcinoma ductal *in situ*, ou seja, patologia com proliferação intraductal e sem invasão estromal, o índice de sobrevida em 16 anos, em pacientes tratadas adequadamente, é de 95% (CLAUS, et al., 2001; BASEGIO & BASEGIO, 2006). O que pode ocorrer nestes casos é um supertratamento, em virtude da controvérsia que envolve o manejo destas lesões. Daí a necessidade de se estabelecer critérios para prognóstico, bem como alternativas terapêuticas que sejam eficazes sem, no entanto, causar grandes efeitos colaterais para as pacientes.

---





classificadas em dois tipos: comedo e não comedo. Nas lesões do tipo comedo, observa-se extensa necrose envolvendo os espaços celulares. As células são grandes, apresentam pleomorfismo nuclear, com numerosas figuras de mitose. O material necrótico está freqüentemente calcificado facilitando a sua detecção pela mamografia. Acredita-se que a infiltração linfoplasmocitária periductal traduza um sinal incipiente de microinvasão do estroma. Desta forma, apresenta características citológicas de maior agressividade por ter maior índice de proliferação celular, maior probabilidade de evoluir rapidamente para tumor invasor e o encontro de microinvasão pode ser mais comum (SOUZA.,2000; LEONARD & SWAIN., 2004; BASEGIO & BASEGIO, 2006). As lesões do tipo não comedo não apresentam necrose, as calcificações são inconsistentes, microfocais, e sua citologia caracteriza-se como de baixo grau (BASEGIO & BASEGIO, 2006). O CDIS do tipo não comedo pode se apresentar por diferentes padrões histológicos: sólido, papilífero, micropapilífero, cribriforme, intra-cístico (ROSEN, 1999).

O CDIS é considerado lesão heterogênea sob o ponto de vista histológico. Assim, várias classificações histológicas foram postuladas ao longo dos anos, conforme crescia o número de diagnósticos desta patologia. LAGIOS, (1996) dividiu o CDIS em três grupos: alto, intermediário e baixo grau nuclear. Em 1997 e 2000 foram publicadas as conclusões de duas reuniões ocorridas nos EUA sobre o tema CDIS (Consensus Conference on the Classification of the Ductal Carcinoma *In situ*) onde foram definidos os aspectos anátomo-patológicos a serem utilizados pelo

---

patologista no que se refere a esta lesão, sendo importantes tanto para o diagnóstico, de suas várias formas, como para planificação terapêutica. Nesta classificação o grau nuclear foi dividido em baixo, intermediário e alto grau; a necrose foi quantificada em comedonecrose, e tipo não comedo; polarização celular, outro parâmetro considerado, foi baseada na orientação radial das células; o padrão arquitetural, conforme relatado anteriormente, foi considerado como comedo, cribriforme, papilífero, micropapilífero, sólido e intra-cístico (SOUZA., 2000; BASEGIO & BASEGIO, 2006). No tipo cribriforme a orientação radial das células neoplásicas forma lúmen glandular; no papilífero observam-se grandes colunas de tecido fibroso no interior dos ductos; no sólido há preenchimento completo dos ductos com células neoplásicas e no micropapilífero existem projeções papilares digitiformes no interior dos ductos dilatados (LEONRD & SWAIN, 2004).

Outros autores em Nottingham, Inglaterra, desenvolveram uma classificação para CDIS, baseada, primariamente, na presença ou na ausência de necrose. São três as categorias: comedo puro, CDIS com necrose e CDIS sem necrose (LOGULLO & FRANCO, 2006). A Organização Européia para Investigação e Tratamento do Câncer (EORT), propôs uma classificação dos CDIS baseada, primeiramente, na diferenciação citonuclear em: CDIS bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou indiferenciado (ROSEN, 1999).

Silverstein, et. al., (1995), baseando-se em critérios anátomo-patológicos e também no quadro evolutivo das pacientes por eles

---



al.,1981). A maioria dos estudos clínicos envolvendo CDIS com características micropilares e baixo grau nuclear encontraram as excisões sem margens suficientes (LAGIOS & PAGE.,2000). Também é comum a discussão sobre os graus nucleares vizinhos 1 ou 2 e 2 ou 3.

Compreender o carcinoma *in situ* da mama tem sido um desafio constante devido as suas diversas apresentações e classificações, bem como as várias opções terapêuticas. Não é possível conhecer o CDIS sem uma base histológica, já que as enfermidades assim denominadas, antes do advento da mamografia, eram uniformemente do tipo palpável e, geralmente de alto grau. Os casos eram reconhecidos por biópsias de nódulos palpáveis ou de derrames mamilares suspeitos. Na última década do século XX houve um crescimento do diagnóstico das lesões menores, que, em geral, eram de baixo grau (LAGIOS, 1990; PAGE, et al., 1995 e SILVERSTEIN, et al., 1996). Separando alguns subtipos especiais de CDIS, existe um conhecimento fundamental que as lesões de baixo grau com menos de 3,0cm de diâmetro, podem ser tratadas de forma adequada com uma ressecção ampla cuidadosa. A partir de 3,0cm de diâmetro e alto grau, o tratamento mais adequado é a mastectomia.

Houve um grande número de publicações a cerca de proteínas receptoras, oncogenes, genes supressores de tumor, ploidia e atividade proliferativa do CDIS a partir de 1997. Inicialmente, havia uma expectativa de que estas investigações pudessem identificar subgrupos de CDIS com um risco maior de transformação invasora ou recidiva local após o

---

tratamento conservador, sobretudo nas pacientes de maior risco. Em parte estas expectativas se cumpriram, principalmente ao demonstrar uma correlação entre os oncogenes e os produtos genéticos específicos e os subtipos de CDIS reconhecidos por análise morfológica convencional como de alto grau, CDIS tipo comedo ou ambos. A associação mais clara entre um oncogene e um subtipo de CDIS se observa com o oncogene HER2/NEU e o seu produto c-erbB-2, o qual está associado principalmente aos subtipos de CDIS caracterizados por células grandes com alto grau nuclear (LEAL, et al., 1995; SIMPSON & PAGE., 1995 e STEEG et al., 1996). A proteína p53, estudada principalmente por técnicas de imunoperoxidase nas lesões não invasivas, também está correlacionada com os subtipos de grau nuclear alto (PAGE, et al, 1982). O'MALLEY, et al., (1994) demonstraram que a expressão amplificada da proteína p53 estava limitada principalmente ao CDIS do tipo comedo de alto grau. Outros autores têm documentado relações similares entre o CDIS de alto grau, o HER2 e a p 53 (BARNES et al,1992; STEEG, et al.,1996). Proteínas receptoras de estrógeno e progesterona se apresentam nos subtipos de CDIS tanto de alto como de baixo grau (WILBUR & BARROWS, et al., 1993). Estudos sugerem que há uma associação entre o alto grau nuclear e a condição de receptores negativos similar à observada em muitos carcinomas invasivos de alto grau (LAGIOS & PAGE., 2000). Assim, os subtipos de CDIS caracterizados por tipos celulares grandes e alto grau nuclear tendem a ser positivos para HER2/NEU, proteína p53, negativos para receptores de estrógeno, aneuplóides e podem demonstrar uma fração maior de fase S. Estes

---

subtipos também estão associados a necrose do tipo comedo, desmoplasia estromal periductal e um aumento difuso da densidade dos microvasos (GUIDI et al., 1994). Ademais, outros marcadores biológicos estão associados aos CDIS tipo comedo, alto grau nuclear e risco aumentado de recorrência (SCHWARTZ et al 1999).

### **1.3. ANGIOGÊNESE EM CÂNCER DE MAMA**

A vascularização dos tumores foi reconhecida pela observação da dilatação de vasos por Fallopio desde 1600 e pelo aumento do número de vasos em tumores, verificado por Hunter em 1828. No entanto, foram os estudos sistemáticos de Goldman (1907) e Lews (1927) que revelaram a seqüência natural da vascularização dos tumores (FOX & HARRIS, 2004).

Quando se origina um tumor primário, geralmente, ele é avascular. Neste estado, o volume do tumor é menor que alguns milímetros cúbicos. O aporte de nutrientes e oxigênio para as células do tumor se dá pela difusão a partir de vasos sanguíneos normais localizados abaixo do epitélio. Os estudos experimentais revelam que estas lesões pré-vasculares se encontram em estado de equilíbrio entre a proliferação e a morte celular (HANAHAN & FOLKMAN 1996; FOLKMAN., 2000). O primeiro indício de neovascularização de um câncer de mama *in situ* pode ser o surgimento de uma delgada camada de novos vasos sanguíneos periductais. Estudos

---

experimentais de tumores em ratos revelaram que o desenvolvimento da angiogênese é um processo independente que evolui durante a progressão da carcinogênese e, que no rato, começa no estado pré-maligno (KANDEL et al, 1994; HANAHAN & FOLKMAN, 1996; FOLKMAN, 2000). No câncer de mama humano se observa uma expressão aumentada das proteínas angiogênicas: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico fundamental (bFGF) e dos Mediadores angiogênicos: timidina fosforilase e fator tissular. Nos fibroblastos observa-se uma regulação para cima do mRNA do VEGF em resposta à hipoxia. Assim, as células do estroma mamário podem estar envolvidas no fenótipo angiogênico do câncer de mama (HLATKY et al.,1994; ANAN et al.,1996; FOX et al., 1996; YOSHIJI et al., 1996). O fenótipo angiogênico pode se expressar por uma alteração no equilíbrio entre os reguladores positivos (bFGF, VEGF) e os reguladores negativos (trombospodina-1, prolactina de 16 kDa, interferons alfa e beta, fator plaquetário 4, angiostatina, endostatina, interleucina-12) (DICKSON & LIPPMAN., 1992; VOEST et al.,1995; HANAHAN & FOLKMAN., 1996;). Os reguladores positivos da angiogênese associados com uma superexpressão do câncer de mama devem se opor a uma série de fatores negativos (WOJTOWICZ et al.,1994), ou seja, a alteração fenotípica pode ser estimulada pela atividade carcinogênica, um estímulo epitelial com uma resposta do estroma mamário. A expressão do VEGF no câncer de mama com axila negativa possui valor prognóstico (GASPARINI et al., 1997). No entanto, a atividade angiogênica de um tumor representa a somatória de Mediadores favoráveis e contrários a

---

neovascularização e a determinação quantitativa de um fator angiogênico isolado nem sempre possui valor prognóstico (RICE et al, 2002).

À medida que surgem novos capilares, também há o crescimento de células do tumor ao redor dos vasos neoformados. Um vaso capilar pode estar rodeado de três ou mais camadas de células neoplásicas. A replicação de novos capilares permite a expansão rápida da massa do tumor (FOLKMAN.,1995). Um câncer de mama com o volume de 1cm<sup>3</sup> ou mais pode apresentar uma coloração branca ao exame macroscópico parecendo ser avascular, no entanto o exame microscópico do tumor revela uma fina rede vascular entrelaçada com células neoplásicas. Os vasos sangüíneos microscópicos podem ter difícil visualização em corte histológico parafinado de 4µm de espessura devido à compressão da luz vascular. No entanto, as características das células endoteliais se ressaltam com anticorpos contra o fator de Von Willebrand ou CD-34 (FOLKMAN., 2000). A estimulação do crescimento do tumor depois do começo da neovascularização é atribuída à perfusão das suas células por um novo aporte de sangue que permite a oferta de oxigênio e nutrientes e a eliminação de catabólitos. É possível que seja importante o efeito parácrino das células endoteliais sobre o crescimento das células do tumor (HAMADA et al., 1993). Estudos *in vitro* indicam que as células neoplásicas crescem preferencialmente ao redor dos vasos capilares apesar da ausência de fluxo sanguíneo (NICOSIA et al., 1986). As células endoteliais também produzem fatores de crescimento, como o fator de crescimento insulina símile 1 (IGF-1), bFGF, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-BB), fator de

---

crescimento epitelial fixador de heparina (HB-EGF) e fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos. Como um tumor neovascularizado sofre a ação de fatores de crescimento e sobrevivência, o bloqueio completo da neovascularização, Médiante um inibidor da angiogênese poderia determinar o desaparecimento destes fatores (HOLMGREEN et al., 1995; O'REILLY et al., 1997)

Em tumores animais e humanos a indução de angiogênese está correlacionada com a redução significativa da apoptose (CAID & TANIGAWA., 1997). Observa-se uma diminuição do crescimento do tumor associada ao bloqueio da angiogênese (LI et al., 1991); ao passo que alguns casos de câncer que não recebem tratamento e alcançam grandes volumes, apresentam um crescimento indolente que parece estar limitado pela diminuição da atividade angiogênica. Este conceito está sustentado por estudos experimentais com fibrosarcomas, em murinos, onde foi utilizado a angiostatina. A inoculação em ratos de células transfectadas que expressam níveis elevados de angiostatina dão origem a tumores de crescimento lento (uma inibição do crescimento tumoral de 77% em comparação com células neoplásicas sem transfecção de angiostatina, durante o mesmo período) (O'REILLY et al., 1997).

A invasão do tumor é facilitada pela neovascularização. No entanto, é possível ocorrer uma invasão microscópica do câncer de mama *in situ* antes que haja a neovascularização. Assim, uma fina fileira de células malignas pode formar uma ponte através da membrana basal de um ducto

---

acometido pelo tumor (WEIDNER et al., 1991). Após a formação de novos vasos, a invasão do tecido conjuntivo vizinho ocorre de maneira acelerada e os cordões de células neoplásicas seguem a trajetória dos vasos neoformados (NICOSIA et al., 1986). As células endoteliais microvasculares estimuladas por proteínas angiogênicas (bFGF, VPF/VEGF) aumentam a expressão das enzimas proteolíticas, como a colagenase IV, o que contribui para aumentar a capacidade invasora das células endoteliais e das células do tumor. Baseado nestes dados acredita-se que o tratamento antiangiogênico poderia inibir a capacidade invasora do tumor (SMOLIN & HYNDIUK., 1971; LIOTTA et al., 1980; MIGNATTI et al., 1989; RAY & STETLER-STEVENSON., 1994).

Evidências experimentais e clínicas sugerem que o processo de formação de metástases também depende da angiogênese (DICKSON & LIPPMAN., 1992). Para que o tumor possa formar metástases, deve atravessar várias barreiras e responder a fatores de crescimento específicos (NICOLSON., 1997). Em animais experimentais, só se encontram células neoplásicas circulantes após a neovascularização do tumor primário (LIOTTA et al., 1980). O aumento da angiogênese também se correlaciona com a quantidade de células neoplásicas que chegam na circulação em humanos (MCCULLOCH et al., 1995). Os fatores angiogênicos derivados dos tumores (bFGF, VEGF) induzem a ativação do plasminogênio e das colagenases nas células endoteliais proliferantes e contribuem com a degradação da membrana basal (MOSCATELLI et al., 1981; NAGY et al., 1981). A dependência angiogênica das metástases também é avaliada pela

---

supressão do crescimento metastático em ratos tratados com inibidores de angiogênese específicos para o endotélio, como a angiostatina e a endostatina. Nestes ratos as metástases permanecem latentes em tamanho microscópico. A latência se observa apesar dos inibidores não exercerem efeito sobre as células neoplásicas *in vitro* (O'REILLY et al., 1996). Dados clínicos correlatos também sugerem que o potencial metastático poderia depender da angiogênese. Em tumores humanos a neovascularização pode ser determinada quantitativamente através da medida da densidade vascular. Por este método já foi observada uma correlação direta e significativa entre a densidade máxima dos microvasos e evolução com metástases em casos de câncer de mama invasivo (WEIDNER et al., 1991).

RICE & QUINN (2002) propuseram que um acúmulo gradual de alterações genéticas durante a progressão de um tumor muito provavelmente se acompanha de um aumento gradual da capacidade angiogênica das suas células. Para que a neovascularização evolua é necessário um intercâmbio entre o tumor, células inflamatórias e endoteliais, fatores de crescimento e a matriz extracelular.

A correlação entre a angiogênese e a progressão da neoplasia também se documentou em tumores animais (ZICHE & GULLINO., 1982). Por exemplo, um câncer de mama primário pode produzir uma proteína angiogênica e as metástases formadas posteriormente podem produzir até seis proteínas angiogênicas (RELF et al., 1997 ).

---

WEIDNER et al (1991), foram os primeiros a afirmar que a determinação quantitativa da densidade dos vasos sanguíneos microscópicos era um indicador prognóstico independente do risco de metástases e mortalidade por câncer de mama. Nos cortes histológicos, os vasos sanguíneos microscópicos foram destacados Médiante coloração com um anticorpo contra o fator de Von Willebrand. Em estudos posteriores, foram utilizados outros marcadores endoteliais, como o CD31 (HORAK et al., 1992). Sem estes marcadores endoteliais torna-se muito difícil identificar os vasos sanguíneos microscópicos nos cortes histológicos convencionais de 4µm de espessura. Estes autores também observaram que os vasos sanguíneos microscópicos não se distribuíam de forma homogênea, ou seja, existiam áreas do tumor com maior densidade. A determinação da quantidade dos vasos sanguíneos nestas áreas se associa com um maior valor preditivo de sobrevida global.

O quadro 3 reúne uma série de trabalhos que demonstraram uma associação positiva entre a angiogênese e a agressividade do tumor. Já os seis últimos trabalhos não reproduziram estes achados. No entanto, como se pode observar nos comentários, estes estudos apresentaram limitações na sua metodologia, como tempo de segmento, seleção de pacientes, ausência da análise da sobrevida global e sobrevida livre de doença.

---





A maioria dos estudos efetuados depois dos resultados publicados por WEIDNER et al (1991) revela que quanto maior a contagem de vasos sanguíneos microscópicos em áreas de maior densidade vascular, menor a sobrevida global. A diminuição da sobrevida geralmente se correlaciona com o aumento do risco de metástase. Algumas das possíveis explicações biológicas para esta correlação são as seguintes: a) O aumento da densidade vascular facilitaria a passagem de células neoplásicas para a circulação geral; b) A quantidade de células malignas angiogênicas é diretamente proporcional à probabilidade de um tumor primário gerar metástases; c) A capacidade de células do tumor produzirem fatores angiogênicos se associa com a maior probabilidade de crescimento rápido; d) Alguns fatores angiogênicos (bFGF, VEGF) aumentam a probabilidade das células neoplásicas ingressarem na circulação; e) As células endoteliais do leito vascular do tumor liberam citocinas (interleucina-6) que podem facilitar as metástases (MOTRO et al., 1990; TAM et al., 1994; CHIU et al., 1996; RELF et al., 1997).

O'REILLY et al (1997), no entanto, demonstram que não há correlação entre a densidade dos microvasos e a evolução clínica, o que determina um conflito de opiniões acerca da angiogênese.

Apesar da avaliação da angiogênese ser considerada um fator de prognóstico promissor em carcinoma da mama, os resultados obtidos em diferentes séries têm sido controversos, provavelmente pelas dificuldades de reprodutibilidade na quantificação dos vasos neoformados.

---

Três anticorpos são mais comumente utilizados para identificar os microvasos a serem quantificados: fator Von Willebrand, CD-31 e CD-34. O primeiro foi utilizado nos trabalhos originais e, posteriormente, considerado menos efetivo que o CD-31 e CD-34 para identificação dos vasos. Entretanto alguns estudos demonstraram que o CD-31 era o anticorpo com menor desempenho para este fim e que o melhor marcador era o CD-34. Outro fator que dificulta a reprodutibilidade das séries é a variedade de metodologias utilizadas na interpretação das reações imunohistoquímicas utilizadas na determinação da densidade vascular (UZZAN et al., 2004).

#### **1.4 ANGIOGÊNESE E CARCINOMA DUCTAL *IN SITU***

Apesar de existirem inúmeras publicações relacionando angiogênese e carcinoma ductal invasivo, a literatura é pobre em pesquisas sobre neovascularização em CDIS. Em relação aos marcadores de endotélio utilizados, não há uniformidade entre os autores, sendo aplicados o fator de Von Willebrand, CD-31 e CD-34. Também observamos variação no método de contagem dos vasos, embora a seleção da área de contagem tenha obedecido ao critério de seleção que considera a área de maior número de microvasos observada na microscopia óptica com um menor aumento (20X ou 40X), descrita por WIDNER (1991). GUIDI et al (1994), utilizando o fator de Von Willebrand como marcador de endotélio e um método semiquantitativo de contagem de vasos, onde a densidade vascular foi

---

mensurada no intervalo de 1+ a 3+ , observaram uma maior associação entre o CDIS tipo comedo e a densidade vascular classificada como 3+. Também observaram aumento da densidade vascular em áreas de tecido mamário que apresentavam desmoplasia do estroma. BROWN et al (1999) analisaram a expressão do RNA mensageiro para os seguintes fatores angiogênicos: Fator de Permeabilidade Vascular (VPF) e Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VGEF). Encontraram um aumento da expressão do RNA-m para estes fatores nos casos de carcinoma invasivo, carcinoma ductal *in situ* e em linfonodos contendo células neoplásicas. Observaram ainda que a neovascularização do estroma que envolve os ductos contendo células neoplásicas precede a invasão, sugerindo uma interação entre as células neoplásicas, estromais e endoteliais, Mediada pelas citocinas.

TEO et al (2002) avaliaram a neovascularização de 355 casos de CDIS acompanhados por um período de dez anos. Encontraram 32 casos de recorrência, sendo 20 casos na forma *in situ* e 12 na forma invasiva. Utilizaram como marcador de endotélio o fator de Von Willebrand e CD-34. Ao avaliarem a densidade vascular média observaram um aumento da vascularização da área com CDIS em relação à área de tecido normal. Também concluíram que o aumento da densidade vascular, mensurada pelo CD-34, teve correlação com o aumento de risco de recorrência.

---



Avaliar a densidade vascular pelo CD-34 no carcinoma ductal *in situ* da mama comparando os tipos comedo e não comedo.

---



### 3.1. SELEÇÃO DOS CASOS

Foram selecionados, retrospectivamente, 223 laudos de carcinoma ductal *in situ* da mama, provenientes do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC). Estes casos foram escolhidos a partir do levantamento dos laudos de Anatomia Patológica, de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico, catalogados no período entre 1990 a 2004. O diagnóstico de cada caso de CDIS foi realizado pela análise histológica através de microscopia óptica, com coloração de Hematoxilina-Eosina. Para a confirmação do diagnóstico foram selecionados os blocos de parafina e as respectivas lâminas confeccionados na data do diagnóstico (figura 1). Cada caso foi avaliado pelo Serviço de Anatomia Patológica do IBCC sendo excluídos aqueles que apresentavam áreas de microinvasão ou contaminação do bloco de parafina por fungos, totalizando 52 casos que obedeciam aos critérios de inclusão da pesquisa onde todos os tumores apresentavam carcinoma ductal *in situ* puro.

---





### **3.4. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO**

As lâminas obtidas dos blocos de parafina foram submetidas a estudo imunohistoquímico utilizando-se anticorpos monoclonais contra o CD-34. Foram realizadas duas reações para cada caso:

- Área com tecido normal – grupo controle.
- Área com tumor – grupo com CDIS.
- A avaliação imunohistoquímica foi realizada em duas etapas:

#### **3.4.1. Marcação dos cortes histológicos com CD-34**

A técnica de marcação consistiu na pesquisa imunohistoquímica dos 52 casos, avaliando-se a área de tecido normal e a área com tumor. O anticorpo utilizado neste estudo foi o CD-34. A reação para marcação de CD-34 foi realizada pelo método indireto da avidina-biotina-peroxidase, tendo sido as reações nas lâminas coradas pela diaminobenzidina e contracoradas pela hematoxilina de Harris (ZVEIBIL, 1995).

---

Na técnica indireta de imunoperoxidase, o anticorpo primário é incubado com o tecido, seguindo-se esta reação o uso de um anticorpo secundário biotilado ou ligado a fosfatase alcalina, adicionando-se a seguir o complexo streptavidina biotina-peroxidase ou fosfatase alcalina peroxidase. A incubação do anticorpo primário é feita em geladeira durante toda à noite (*over night*). Após isto, foram realizadas a coloração com o uso do substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração com a hematoxilina de Harris. As lâminas foram então montadas com lamínula usando-se bálsamo do Canadá para todos os casos (ZVEIBIL, 1995) (Figura 4).

---



### **3.4.2. Contagem de vasos de área contendo tumor e área de tecido mamário normal**

A técnica de contagem se iniciou com a identificação da área com maior número de microvasos através de um rastreamento do corte histológico em microscopia óptica em pequeno aumento (40X). Ainda com o pequeno aumento, foram selecionadas duas áreas adjacentes à primeira, que também apresentavam um número aumentado de vasos. A seguir foram contados os vasos destas três áreas com maior aumento (200X). O primeiro campo a ser contado foi aquele identificado no pequeno aumento como o de maior vascularização. A densidade vascular foi obtida pela média aritmética da contagem dos três campos (MARTIN et al., 1997; ALVES et al., 1999). Desta forma, para cada caso, ficou definida a densidade vascular média do tecido mamário normal e do carcinoma ductal *in situ*.

### **3.5. CLASSIFICAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR MÉDIA**

A densidade vascular média foi classificada como baixa ou alta, tendo como ponto de corte a Médiana calculada a partir do conjunto de valores encontrados para cada caso, de acordo com os trabalhos de GUIDI et al. (2002); LUDOVINI et al. (2003). Em nosso trabalho consideramos a Médiana de 15,3 para o grupo com CDIS e 7 para o grupo controle.

---

Valores encontrados abaixo ou acima das Medianas foram considerados como baixa ou alta densidade vascular, respectivamente.

### **3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a variável densidade vascular média foi utilizada a análise de variância e para a contagem de vasos foi utilizada a análise de perfil, pois havia interesse em se comparar tipo histológico e amostra histológica.

Para a variável idade, onde foram comparadas as médias, foi utilizado o teste t de Student, e para a comparação de proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado, já para a variável tipo de cirurgia foi utilizado o teste Exato de Fisher.

O nível de significância utilizado foi de 5%.

---





















O câncer de mama representa um grave problema de saúde pública ocupando o segundo lugar entre as neoplasias no Brasil, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma. Além disso, a mortalidade por câncer de mama ainda permanece alta ao contrário de alguns países onde se tem observado uma diminuição desta mortalidade. A expectativa para 2006 aponta 48.930 novos casos, com um risco estimado de 52 casos em cada 100 mil mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A probabilidade de cura, sem dúvida, está diretamente relacionada à precocidade do diagnóstico.

O rastreamento mamográfico tem proporcionado o diagnóstico precoce do câncer de mama. A mamografia é responsável por aumento significativo no diagnóstico do carcinoma ductal *in situ* da mama. O diagnóstico e o tratamento do carcinoma mamário em sua etapa inicial, não invasiva, proporciona um índice de cura de aproximadamente 100% (DE LUCA, 2006). No entanto, o conhecimento e a evolução desta patologia permanecem controversos.

Em relação ao tratamento cirúrgico, tanto a mastectomia quanto as cirurgias conservadoras podem ser utilizadas. As variáveis que norteiam esta modalidade terapêutica são a extensão da lesão, grau nuclear e arquitetura do tumor. As duas primeiras variáveis não podem ser influenciadas pelo tratamento, enquanto que a última é determinada pela intervenção cirúrgica. A extensão de margem cirúrgica ideal é de 10mm para alguns autores (SCHWARTZ, et. al., 1999), enquanto que outros definem

---

margem ideal como 5mm, baseado no acompanhamento de pacientes submetidas a setorectomia, com margens cirúrgicas de 5mm e mama irradiada, que não apresentaram aumento no índice de recidiva local após 5 anos de seguimento (LAGIOS & PAGE., 2000).

A linfadenectomia axilar não deve ser realizada em lesões não invasivas. Veronesi et. al. (2005) encontraram 9 casos de metástases em 508 biópsias de linfonodo sentinela (1,8%), sendo que em cinco pacientes só havia micrometástase (<2mm). Oito pacientes foram submetidas a dissecação axilar completa e em nenhuma delas foi encontrado linfonodo axilar positivo adicional. A biópsia do linfonodo sentinela não deve ser considerada como procedimento de rotina no tratamento do CDIS, no entanto, casos de CDIS com programação cirúrgica de mastectomia, com risco de microinvasão no resultado final da anatomia patológica, principalmente, em tumores grandes ou extensas áreas de microcalcificações, a abordagem axilar pode estar indicada.

A radioterapia pode ser utilizada após as cirurgias conservadoras como tratamento adjuvante tendo como objetivo o controle loco-regional da doença. Apesar das lesões proliferativas intraductais constituírem uma gama de patologias pré-malignas, a sua recidiva pode se manifestar como carcinoma ductal *in situ* ou invasivo. Estudos prospectivos randomizados demonstraram uma diminuição da recidiva local com a utilização da radioterapia após a cirurgia conservadora (setorectomia 31,7%, setorectomia e radioterapia 15,7%). Porém não houve diferença na

---

sobrevida global (NOFECH-MOZES et al., 2005). Veronesi (1995) observou o índice de recidiva local de 7% em seguimento de oito anos para pacientes submetidas apenas a quadrantectomia. O índice prognóstico de Van Nuys, proposto por Silverstein (1995) auxilia na decisão do melhor tratamento loco-regional.

A terapia adjuvante sistêmica para o CDIS é baseada no sucesso do tamoxifeno utilizado no tratamento de tumores RE positivo. A redução da taxa de recidiva local em tumores invasivos com RE positivo e axila negativa foi de 2,7% para 0, 53% (LEONARD & SWAIN, 2004). Duas séries randomizadas e prospectivas avaliaram o efeito do tamoxifeno em pacientes com CDIS. Enquanto o estudo do NSABP B-24 demonstrou redução, estatisticamente significativa, na recidiva local e nenhuma modificação na sobrevida global, o outro estudo UKCCCR não demonstrou benefício em ambos aspectos. Assim, antes de iniciar a adjuvância sistêmica com tamoxifeno, é importante avaliar cuidadosamente os riscos, em particular as doenças cardiovasculares, e realizar pesquisa de receptor de estrógeno (RE).

Apesar do CDIS apresentar um prognóstico favorável, os índices de recorrência determinam variações em relação à escolha terapêutica, mesmo porque esta recidiva pode se apresentar na forma de carcinoma invasivo em 50% dos casos. Existem inúmeros fatores prognósticos em câncer de mama descritos na literatura, sendo o comprometimento de linfonodos axilares um dos mais importantes na

---

avaliação do carcinoma ductal invasivo (ROSEN, 1999). No entanto, este fator não pode ser aplicado ao CDIS em virtude de estar presente em apenas 1,8% dos casos (VERONESI et al., 2005). Assim, os marcadores moleculares assumem importância relevante na avaliação prognóstica do CDIS, sendo os receptores hormonais e o HER 2/NEU os mais importantes. Outros marcadores como a proteína p53 e a densidade vascular têm sido destacados (LEONARD & SWAIN., 2004).

A neovascularização é necessária para o crescimento de tumores a partir de um determinado volume, assim como para a sua progressão. Este processo é regulado por uma gama de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos controlados pelas células neoplásicas e estromais. A caracterização de marcadores endoteliais específicos no CDIS tem importância não apenas como fator prognóstico, mas também como orientação terapêutica na utilização de agentes anti-angiogênicos (NOFECHE-MOZES et al., 2005). Os marcadores são importantes ao destacarem o endotélio dos microvasos, permitindo a mensuração quantitativa ou qualitativa da angiogênese.

Em 1991, Weidner e colaboradores propuseram que a atividade angiogênica do câncer de mama era definida e mensurada pela densidade dos microvasos e que tinha um potencial valor prognóstico. Este trabalho estimulou pesquisadores a avaliarem o valor prognóstico e aperfeiçoarem a metodologia. Os resultados de inúmeras pesquisas sugerem que o câncer de mama apresenta uma atividade angiogênica

---

heterogênea e que os tumores com maior vascularização são mais agressivos e mais freqüentemente associados a resultados de pior prognóstico (UZANN, et. al., 2004) Em seu trabalho original, Weidner (1991) utilizou o fator de Von Willebrand como marcador do endotélio dos microvasos. Posteriormente foram utilizados o CD-31 e o CD-34, sendo que o último tem demonstrado ser o mais sensível na detecção de células endoteliais (LUDOVINI, et. al., 2003). TEO et. al (2003) também demonstraram em sua publicação a superioridade do CD-34 em relação ao fator de Von Willebrand em predizer o risco de recorrência no CDIS.

Ao contrário, alguns autores não correlacionaram a densidade vascular com o valor prognóstico do câncer de mama. O desencontro dos dados se deve a soma de variáveis relevantes no que se refere a metodologia aplicada às pesquisas: o marcador aplicado nos cortes histológicos para destacar o endotélio, a determinação da área de contagem de vasos no tumor, o método de contagem dos microvasos, a experiência do observador e o ponto de corte utilizado na análise estatística, quando empregados de formas variadas dificultam a reprodutibilidade uniforme dos resultados encontrados (FOX & HARRIS., 2004).

Embora as pesquisas relacionadas a angiogênese e câncer de mama sejam abundantes, no que se refere às lesões proliferativas intraductais, a escassez de trabalhos prevalece.

---

## **5.1 DISCUSSÃO DA METODOLOGIA**

### **5.1.1. Seleção dos casos**

De 223 casos de CDIS foram considerados somente 52 casos que preenchiam os critérios histológicos para carcinoma ductal *in situ* puro. Os casos restantes foram excluídos por apresentar áreas de invasão ou microinvasão da membrana basal ou contaminação dos blocos de parafina por fungos. Estas dificuldades são encontradas em trabalhos retrospectivos, diminuindo a chance de aproveitamento de um maior número de casos.

### **5.1.2 Tratamentos cirúrgicos realizados**

O tratamento cirúrgico não foi considerado variável relevante neste estudo, porém observamos uma equivalência entre a mastectomia e a setorectomia, sendo que nos casos de CDIS tipo comedo a mastectomia foi mais freqüente, conforme observado nas citações da maioria dos pesquisadores (SILVERSTEIN, 1998; LEONARD & SWAIN, 2004).

### **5.1.3. Características histológicas do tumor**

Os casos selecionados foram divididos em dois grupos: grupo A, comedo e grupo B, não comedo. No grupo B foram encontrados os subtipos: sólido, papilífero, micropapilífero e cribriforme. Os casos de CDIS intra-cístico encontrados apresentavam áreas de microinvasão, portanto não foram incluídos. Esta divisão seguiu os critérios histológicos consensuais a respeito das lesões proliferativas intraductais (LOGULLO & FRANCO, 2006).

---

#### **5.1.4. Estudo imunohistoquímico e classificação da densidade vascular**

Como critério de avaliação da angiogênese elegemos a densidade vascular, amplamente utilizada por diversos pesquisadores, para mensuração da neovascularização, tanto no câncer invasivo quanto nas lesões intraductais (GUIDI et al., 1994; LUDOVINI et al., 2003 ). Como marcador molecular para destacar o endotélio dos microvasos e proporcionar a sua contagem, WEIDNER (1991) propôs o fator de Von Willebrand em seu trabalho original. Posteriormente, outros pesquisadores também utilizaram este marcador para mensurar a neovascularização em câncer de mama (GUIDI et al., 1994; FOX HARRIS., 2004; NOFECH-MOZES et al., 2005). Além deste marcador, o CD-31 e o CD-34 foram aplicados em outras pesquisas (GUIDI et al., 1994; ALVES et al., 1999; SAPINO et al., 2001; KIDWAI et al., 2002). HANSEN et al. (1998) publicaram estudo que se propôs avaliar as diferenças de métodos de avaliação da neovascularização em câncer de mama. Afirmaram que as colorações utilizando os três marcadores moleculares foram eficazes, embora o fator Von Willebrand tenha corado menos os vasos de menor calibre em comparação com os outros marcadores. Também observaram que o CD-31 e o CD-34 são similares ao apresentar alta especificidade em corar as células endoteliais de cortes histológicos com a presença de carcinoma ductal invasivo. No entanto, segundo estes autores, o CD-31 ocasionalmente cora as células inflamatórias, o que pode camuflar as células endoteliais em alguns casos. Este evento também foi observado e relatado por GUIDI et al.

---

(2002). Em nossa pesquisa utilizamos o CD-34, defendido por muitos autores por apresentar maior sensibilidade nas reações imunohistoquímicas que identificam o endotélio vascular (HANSEN et al., 1998; ALVES et al., 1999; TEO et al., 2003).

Em relação à seleção da área de contagem dos microvasos, bem como do método aplicado para quantificar a densidade vascular, utilizamos os critérios mais freqüentemente apontados na literatura, que são baseados no estudo clássico de WEIDNER (1991). Este pesquisador avaliou a neovascularização utilizando o campo de maior contagem para mensurar a densidade de microvasos.

Em nossa pesquisa, inicialmente detectamos a área com o maior número de vasos, observado à microscopia óptica, com o aumento de 40X. Ainda com o pequeno aumento, selecionamos duas áreas adjacentes à primeira, que também apresentavam um número aumentado de vasos. A seguir contamos os vasos destas áreas através de um aumento de 200X. A densidade vascular média foi então obtida pela média aritmética das três contagens. ALVES et al., (1999), afirmaram que não há diferença estatística significativa entre o índice determinado pelo campo de maior número de microvasos como àquele determinado pela contagem média dos três campos. Entretanto, Martim et al. (1997) demonstraram que esta abordagem pode ser diferente de acordo com o anticorpo utilizado. Usando o CD-34, houve uma melhor associação de angiogênese e sobrevida tanto com o campo de maior contagem como na contagem média dos três campos.

---

Os diferentes métodos de mensurar a densidade vascular representam uma dificuldade na reprodução dos resultados em diferentes trabalhos. Além das duas formas de contagem descritas anteriormente, a densidade de microvasos pode ser determinada pela área que representa o maior número de microvasos, comparando os três campos selecionados no aumento de 40X e pela contagem de Chalkley. Este último método utiliza uma grade com 25 pontos aplicada à óptica do microscópio. A contagem dos microvasos é feita nas três áreas do tumor com maior vascularização. Há uma menor variação dos resultados entre diferentes observadores quando este método é aplicado. A acurácia da avaliação da densidade vascular é semelhante quando o método de contagem empregado é o de Chakley ou o método da média de densidade de três campos (HANSEN et al., 1998; GUIDI et al., 2002; LUDOVINI et al., 2003).

HANSEN et al.(1998) se referem ao método da contagem média dos três campos como o que mais se aproxima ao método de Chakley em termos concordância entre os observadores.

Outro problema relativo à quantificação em angiogênese diz respeito aos pontos de corte que, na literatura são bastante variáveis. Da mesma forma que para outros marcadores, por enquanto não existe consenso sobre o “melhor ponto de corte” para angiogênese. Alguns autores encontraram cerca de 80 a 100 microvasos/mm<sup>2</sup> quando se utilizou o fator de Von Wileband como marcador (ALVES et al., 1999).

---

Ao contrário deste autor, GUIDI et al (2002) e LUDOVINI et al. (2003) utilizaram o valor da Médiana como o ponto de corte entre baixa e alta densidade vascular. Os casos que apresentaram o valor da DVM menor que a Médiana foram classificados como baixa densidade vascular, enquanto que os casos que apresentaram o valor da DVM maior que a Médiana foram reconhecidos como alta densidade vascular. Em nosso estudo também utilizamos a Médiana como ponto de corte, conforme proposto pelos autores acima. No grupo controle a Médiana encontrada foi 7, enquanto que no grupo que apresentava CDIS a Médiana foi 15,3. Desta maneira ficou estabelecido o ponto de corte para os dois grupos.

#### **5.1.5. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pela Profa. Dra. Lidia Raquel de Carvalho, professora titular do Departamento de Bioestatística da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP que utilizou para a variável densidade vascular a análise de variância e para a contagem de vasos a análise de perfil. Para a variável idade foi utilizado o teste t de Student, e para a comparação de proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado. Já para a variável tipo de cirurgia foi utilizado o teste Exato de Fisher. O nível de significância utilizado foi de 5%.

---

## 5.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.2.1 Frequência de idade nos grupos A e B

Observamos que a média de idade no grupo A foi de 52,7 anos, enquanto que no grupo B foi de 61,9 anos. De acordo com LEAL et al. (1995) e BASEGIO & BASEGIO (2006), a média de idade do diagnóstico do CDIS é de 54 a 56 anos. Entretanto, Teo et al. (2003) encontraram uma média de idade de 65 anos. Em nosso trabalho, quando comparamos os grupos A e B, observamos uma predominância de mulheres com menos de 50 anos no primeiro grupo. Este dado está de acordo com Lagios & Page (2000) e Leonard & Swain. (2004) ao afirmarem que os tumores que apresentam maior agressividade e pior prognóstico são frequentemente encontrados em mulheres com menos de 50 anos.

O aumento do diagnóstico do CDIS nos últimos anos se relaciona ao emprego da mamografia como método de rastreamento para câncer de mama. A Organização Mundial de Saúde recomenda a realização da primeira mamografia aos 35 anos de idade e as mamografias subsequentes a partir dos 40 anos. No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a primeira mamografia aos 35 anos, mamografias com intervalo bianual a partir dos 40 e anual a partir dos 50 anos. A padronização do rastreamento mamográfico repercute diretamente no estadiamento do câncer de mama no momento do diagnóstico. As microcalcificações, frequentemente associadas ao carcinoma ductal *in situ*, só podem ser

---

detectadas pelo exame de mamografia. Portanto, a realização deste exame em mulheres com menos de 50 anos de idade, proporciona o aumento de diagnóstico do CDIS nesta faixa etária. Em nossa opinião, com o refinamento da técnica de mamografia e melhor qualificação dos observadores, haverá um aumento da incidência de CDIS em pacientes mais jovens, possibilitando assim diminuição das taxas de mortalidade.

### **5.2.2 Tratamento cirúrgico realizado nos grupos A e B: cirurgia conservadora x mastectomia**

Em nossos resultados observamos uma maior frequência de mastectomia no grupo A (60% dos casos). Ao contrário, no grupo B, houve um predomínio de setorectomia (68,2% dos casos). A diferença entre os procedimentos nos dois grupos teve significância estatística. Estes achados são concordantes com a literatura, que propõe a mastectomia como tratamento de escolha nos casos de CDIS de alto grau, tipo comedo, que se apresentam como lesões extensas, portanto com maior risco de recidiva local. O tratamento conservador, por sua vez, deve ser indicado para as pacientes que apresentam melhor prognóstico, com o devido esclarecimento dos riscos de recorrência. (LAGIOS, 1990; SCHWARTZ et. al., 1999; LEONARD & SWAIN., 2004).

Em nossa pesquisa algumas pacientes foram submetidas à avaliação da axila, porém não houve acometimento de linfonodos nos casos avaliados. Atualmente a avaliação da axila em carcinoma ductal *in situ* pode ser feita através da biópsia do linfonodo sentinela em situações especiais,

---

como tumores grandes ou microcalcificações extensas ou ainda quando a conduta cirúrgica for a mastectomia. A linfadenectomia axilar só seria realizada em casos de comprometimento do linfonodo sentinela.

### **5.2.3 Frequência dos tipos histológicos**

Os 52 casos de carcinoma ductal *in situ* puros, encontrados em nosso levantamento, apresentaram a seguinte distribuição histológica: 58% do tipo comedo; 17% cribriforme; 15% papilífero; 6% sólido e 4% micropapilífero. Em concordância com estas proporções, BASEGIO & BASEGIO 2006) referem uma série de 175 casos de CDIS, relacionando o tipo histológico com o tamanho do tumor e microinvasão. Em seu trabalho a frequência do tipo comedo foi de 54%; cribriforme – 17%; micropapilífero – 12%; sólido – 10% e papilífero – 7%. Destes, o tipo histológico mais associado a microinvasão foi o comedo. Em nossa pesquisa não avaliamos esta variável, visto que foi critério de exclusão para seleção dos casos de carcinoma ductal *in situ* puros. Apesar de termos encontrado três casos de carcinoma intracístico, a sua exclusão foi determinada pelo encontro de microinvasão na revisão do diagnóstico.

### **5.2.4 Proporção da média da densidade vascular média dos grupos A e B nas áreas de tecido mamário normal**

Em nossa pesquisa, a média da densidade vascular média nas áreas livres de doença não apresentou diferença estatisticamente

---

significante quando comparamos os grupos A e B. De acordo com RICE & QUINN (2002), para haver o aumento da neovascularização a partir de áreas pré-malignas é necessária a interação entre o tumor, estroma, células endoteliais e inflamatórias e a matriz extracelular, e que os vasos neoformados se originem dos vasos pré-existentes que irrigam o tecido normal.

A concordância entre a densidade vascular média da área com tecido normal em ambos os grupos ratifica a hipótese de não haver aumento de vascularização em tecido mamário normal.

#### **5.2.5. Proporção da média da densidade vascular média entre as áreas de tecido mamário normal e carcinoma ductal *in situ* nos grupos A e B**

Ao compararmos a média da densidade vascular média entre a área livre de doença e a área com tumor nos grupos A e B observamos um aumento da neovascularização. WEIDNEIR (1991) já havia demonstrado o crescimento de microvasos em tecido mamário com carcinoma ductal invasivo. Rice et al (2002) observaram que o aumento da vascularização tem início nas lesões pré-malignas a partir da interação das células patológicas, estroma, células endoteliais e células inflamatórias. Desta forma, segundo estes autores, a ação de fatores anti-angiogênicos e fatores angiogênicos produzidos pela matriz celular proporcionam o surgimento de novos microvasos, a partir dos vasos pré-existentes, oferecendo condições de oxigenação e nutrição necessárias para a progressão da doença.

---

O aumento da neovascularização de carcinomas invasivos da mama tem sido amplamente divulgado. Nossa pesquisa demonstra que quando se compara área de tecido mamário com CDIS e área de tecido mamário normal também existe um aumento da neovascularização.

#### **5.2.6. Proporção da média da densidade vascular média entre os grupos A e B nas áreas com CDIS**

Guidi et al (1994), ao avaliarem a densidade vascular em carcinoma ductal *in situ*, correlacionaram o tipo comedo com uma maior contagem de vasos. RICE et al (2002) demonstraram que o potencial invasivo do CDIS tipo comedo foi associado ao aumento da densidade dos microvasos. Ao contrário, Teo et al (2003) afirmaram em sua pesquisa que o aumento da densidade dos microvasos ao redor dos ductos acometidos pelo CDIS não esteve associado ao desenvolvimento de recorrência. SCHNEIDER et al (2005) observaram que a alta densidade vascular em câncer de mama invasivo também foi correlacionada com aumento de metástase à distância, menor tempo livre de doença e menor sobrevida global, demonstrando a agressividade destes tumores relacionada à neovascularização.

Em nosso trabalho, ao compararmos a média da densidade vascular média entre os grupos A e B, nas áreas acometidas por CDIS, verificamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No grupo A, a média da densidade vascular média foi maior que no grupo B, demonstrando uma íntima relação entre neovascularização e tumores agressivos, dados estes de acordo com GUIDI et al(1994) e RICE et al (2002).

---

### **5.2.7 Percentual entre baixa e alta densidade vascular nos grupos A e B**

A partir do cálculo da Médiana, utilizada também por GUIDI et al (2002) e LUDOVINI et al. (2003), como ponto de corte para qualificar a densidade vascular entre baixa e alta, observamos em nosso trabalho, que no grupo A 70% dos casos apresentaram alta densidade vascular, enquanto que no grupo B apenas 22, 7% apresentaram alta densidade dos microvasos. GUIDI et al (2002) detectaram uma diferença significativa entre a presença de invasão linfática quando compararam as pacientes com alta e baixa densidade vascular em casos de câncer invasivo. 53% das pacientes, em seu estudo, apresentavam invasão linfática e tinham alta densidade vascular, enquanto que 38% das pacientes não apresentavam invasão linfática e tinham baixa densidade vascular.

Quando se considera a Médiana como ponto de corte para definir alta ou baixa densidade vascular a correlação entre agressividade do tumor e alta densidade vascular se mantém. Em nossa pesquisa a alta densidade vascular foi mais freqüente em tumores tipo comedo.

### **5.2.8 Proporção da média da densidade vascular média entre os subtipos histológicos do grupo B**

Dos vinte e dois casos de carcinoma ductal *in situ* não comedo apenas cinco apresentaram alta densidade vascular, sendo três do subtipo cribriforme e dois do papilífero. Ao compararmos a média da

---

densidade vascular média entre os subtipos não observamos diferença com significância estatística. A média de DVM não ultrapassou 15,3 (ponto de corte) em nenhum dos subtipos. O risco de microinvasão atribuído a estes espécimes de CDIS tem sido menor do que o apresentado pelo tipo comedo (BASEGIO & BASEGIO, 2006). Acreditamos que as características citológicas e arquiteturais comuns a estes subtipos traduzam mínima agressividade, responsáveis pelo potencial invasivo reduzido e pelo padrão de baixa densidade vascular.

A importância do estudo do carcinoma ductal *in situ* da mama, se deve ao aumento da incidência desta patologia, provavelmente, relacionado ao diagnóstico pelo o exame mamográfico. As campanhas de prevenção secundária contra o câncer de mama, a disponibilização do exame de mamografia para uma parcela maior da população e o refinamento da técnica de realização e interpretação do exame, em conjunto, determinam uma maior frequência de achados mamográficos associados às lesões proliferativas intraductais, em particular, as microcalcificações. Portanto a fisiopatologia, risco de recorrência e formação de metástases devem ser melhor entendidos. As modalidades terapêuticas visando maior segurança para a paciente sem, no entanto, causar grande prejuízo cosmético, merecem melhor padronização.

A nossa proposta foi estudar a angiogênese no carcinoma ductal *in situ* da mama. Apesar da limitação numérica da amostra, foi possível demonstrar a diferença da neovascularização entre as áreas de

---

tecido mamário normal e áreas de CDIS, utilizando o CD-34 como marcador do endotélio vascular. A dificuldade em relação à obtenção de um número maior de casos está relacionada ao fato do estudo ser retrospectivo, que determinou a exclusão de um número considerável de casos. O marcador de endotélio utilizado foi eficaz ao realçar as paredes dos microvasos permitindo a contagem para o cálculo da densidade vascular média.

A avaliação da densidade vascular no CDIS, em nossa pesquisa, se relacionou com a agressividade da doença. Também tem sido considerada como fator prognóstico e preditivo de recorrência desta patologia por outros autores. No futuro, poderá ser utilizada na seleção de pacientes para a terapia com drogas que modulam a neovascularização.

Trabalhos prospectivos analisando a neovascularização nas lesões proliferativas intraductais devem ser realizados no sentido de avaliar a sobrevida global e tempo livre de doença. As diferenças destas variáveis, medidas pela densidade vascular média, também podem ser pesquisadas na comparação das lesões proliferativas intraductais e carcinoma ductal invasivo.

---



Os resultados encontrados em nossa pesquisa nos permitem as seguintes conclusões:

**1)** Houve diferença com significância estatística da média da densidade vascular média quando comparamos a área de tecido mamário normal com a que apresenta carcinoma ductal *in situ* nos grupos A e B;

**2)** Houve diferença com significância estatística quando comparamos a média da densidade vascular média entre os grupos A e B em área de tecido mamário apresentando carcinoma ductal *in situ*. No grupo A, a média da densidade vascular média foi maior que no grupo B;

**3)** O grupo A apresentou maior frequência de alta densidade vascular que o grupo B, com significância estatística;

**4)** Não houve diferença estatisticamente significativa da média da densidade vascular média entre os subtipos histológicos do grupo B;

---



ALVES, F.A.V.; BACCHI, E.C.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-Histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, p.30-46, 1999.

ANAN, K. et al. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. **Surgery**, v. 119, .p. 333-339, 1996.

BARNES, D.M. et al. Overexpression of the c-erb B-2 oncoprotein. Why does this occur more frequently in ductal carcinoma in situ than in invasive mammary carcinoma and is this of prognostic significance?. **J. Eur. Cancer**, n. 28, p. 644-648, 1992.

BASEGIO, D.L.; BASEGIO, U.M. Lesões *in situ* da mama. In: BOFF, R.A.; WISINTAINER, F. **Mastologia moderna: abordagem multidisciplinari**. Caxias do Sul: Mesa Redonda, 2006. cap. 8, p. 119-130.

BASSETT, W. L. et al. **Doenças da mama: diagnóstico e tratamento**. Revinter. Rio de Janeiro: 2000. p. 445- 450.

CAID, I.U.; TANIGAWA, N. Spontaneous apoptosis in inversely related to intratumoral microvessel density in gastric carcinoma . **Res. Cancer.**, n. 57, p. 221-224, 1997.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

---

CHIU, J.J.; SGAGIAS, M.K.; COWAN, K.H. Interleukin 6 acts as paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. **Clin. Cancer Res.**, n. 2, p. 215-221, 1996.

CLAUS, B. E. et al. Pathobiologic Findings in DCIS of the Breast: Morphologic Features, Angiogenesis, HER-2/ *neu* and Hormone Receptors. **Exp. Mol. Pathol.**, v.70, p.303-316, 2001.

DE LUCA, A. L. A Nomenclatura Carcinoma *In Situ* Chega ao Fim. **Rev. Brás. Mastol.**, v.16, n.2, editorial, 2006.

DICKSON, G.B.; LIPPMAN, M.E. Molecular determinants of growth, angiogenesis, and metastases in breast cancer. **Semin. Oncol.**, n. 19, p. 286-298, 1992.

FOLKMAN, J. Angiogéneses en el cáncer de mama. In: BLAND, I.K.; COPELAND, M.E. **La mama: manejo multidisciplinário de las enfermedades benignas y malignas**. 2. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2000. cap. 30, p. 598-616.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis and tissue factor. **Nat. Med.**, n. 2, p. 167-168, 1996.

---

FOX, S.B. et al. The angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor-thymidine phosphorylase is up regulated in breast cancer epithelium and endothelium. **Br. J. Cancer**, v. 73, p. 275-280, 1996.

FOX, S.B.; HARRIS, A. Histological quantitation of tumour angiogenesis. **APMIS**, v. 112, n.7-8, p. 413-430, 2004.

GASPARINI, G. et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, p.139-147,1997.

GUIDI, A.J. et al. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. **J Natl. Cancer Inst.**, v. 86, p. 614-619, 1994.

GUIDI, A. J. et al. Association of Angiogenesis and Disease Outcome in Node-Positive Breast Cancer Patients Treated With Adjuvant Cyclophosphamide, Doxorubicin, and Fluorouracil: A Cancer and Leukemia Group B Correlative Science Study From Protocols 8541/8869. **Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 3, p. 732-742, 2002.

HAMADA, J.I. et al. A paracrine migration-stimulating factor for metastatic tumor cells secreted by mouse hepatic sinusoidal endothelial cells: identification as complement component C3b. **Cancer Res.**, v. 53, p. 4418-4423, 1993.

---

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterna and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353-364, 1996.

HANSEN, S. et al. Angiogenesis in breast cancer: a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density. **Lab. Invest.**, v.78, n.12, p. 1563-1573, 1998.

HLATKY, L. et al. Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. **Cancer Res.**, v. 54, p. 6083-6086, 1994.

HOLMGREN, L.; O'REILLY, M.S.; FOLKMAN, J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nat. Med.**, n.1, p. 149-153, 1995.

HORAK, E.R. et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. **Lancet.**, v. 340, p. 1120-1124, 1992.

KANDEL, J. et al. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrossarcoma. **Cell**, v. 66, p. 1095-1104, 1991.

---

KIDWAI, N.; DESHPANDE, C.; BADVE, S. Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. **J. Pathol.**, v. 196, p. 364-366. 2002.

LAGIOS, M.D. Ductal carcinoma in situ. Pathology and treatment. **Surg. Clin. North Am.**, v.70, p. 853-871, 1990.

LAGIOS, M.D. Ductal carcinoma in situ: Biological and therapeutic implications of classification. **Breast J.**, v. 2, n. 1, p. 32-34, 1996.

LAGIOS, M.D.; PAGE, D.L. Carcinoma *in situ* de la glándula mamaria: carcinoma ductal *in situ*, enfermedad de Paget, carcinoma lobulillar *in situ*. In: BLAND, I.K.; COPELAND, M.E. **La mama**: manejo multidisciplinario de la enfermedades benignas y malignas. 2. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2000. cap. 12, p. 267-289.

LEAL, C.B. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erb B-2 protein. **Cancer**, n. 75, p. 2123 – 2131, 1995.

LEONARD, D.G.; SWAIN, M.S. Ductal Carcinoma In Situ, Complexities and Challenges. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.96, n.1, 2, p. 906-920, 2004.

---

LI, L.; NICOLSON, G.L.; FIDLER, I.J. Direct in vitro lysis of metastatic tumor cells by cytokine-activated murine vascular endothelial cells. **Cancer Res.**, n. 51, p. 245-254, 1991.

LIOTTA, L.A. et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. **Nature**, n. 284, p. 67-68, 1980.

LOGULLO, F.A.; FRANCO, M. Carcinoma ductal in situ: Classificação e recomendações ao patologista cirúrgico. **Rev. Brás. Mastol.**, 2006; n. 2, p. 89-95.

LUDOVINI, V. et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 81, n. 2, 2003, p. 159-168.

MARTIN, L. et al. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. **Br. J. Cancer**, n. 76, p. 1046-1050, 1997.

MCCULLOCH, P.; CHOY, A.; MARTIN, L. Association between tumor angiogenesis and tumor cell shedding into effluent venous blood during breast cancer surgery. **Lancet**, n. 346, p. 1334-1335, 1995.

MIGNATTI, P. et al. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: Requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. **J. Cell Biol.**, n. 108, p. 671-682, 1989.

---

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Cancer-Inca-Comprev. **Estimativa da incidência e mortalidade por cancer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa06/index.html>>:. Acesso em 02 set. 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Cancer-Inca-Comprev. **Estimativa da incidência e mortalidade por cancer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa06/index.html>>:. Acesso em: 20 out. 2006.

MORROW, M. et .al. Standard for the Management of Ductal Carcinoma *In situ* of the Breast (DCIS). *CA – A Cancer Journal for Clinicians*. 2002. vol. 52. n. 5. p. 256-276.

MOSCATELLI, D.; GROSS, G.L.; RIFKIN, D.B. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. **J. Cell Biol.**, v. 91, p.201a, 1981.

MOTRO, B. et al. Pattern of interleukin 6 gene expretion in vivo suggests a role of this cytokine in angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 87, p. 3092-3096, 1990.

NAGY, J.A. et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role of leaky blood vessels and fibrin deposition. **Biochim. Biophys. Acta**, n. 948, p. 305-326, 1989.

---

NICOLSON, G.L. Cancer metastasis. **Sci. Am.**, n. 240, p. 66-76, 1979.

NICOSIA, R.F.; TCHAO, R.; LEIGHTON, J. Interactions between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot culture. **Clin. Exp. Metastasis**, n. 4, p. 91-104, 1986.

NOFECH-MOZES, S. et al. Prognostic and Predictive Molecular Markers in DCIS. **Adv. Anat. Pathol.**, v. 12, n. 5, p. 256-264, 2005.

O`MALLEY, F.P. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast with apocrine cytology. Definition of a borderline category. **Hum. Pathol.**, n. 25, p. 164-168, 1994

O`REILLY, M.S. et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, n. 88, p. 277-285, 1997.

O`REILLY. M.S. et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. **Nat. Med.**, n. 2, p. 689-692, 1996.

PAGE, D.L. et al. Intraductal carcinoma of the breast. Follow-up after biopsy only. **Cancer**, n. 49, p. 751-758, 1982.

PAGE, D.L. et al. Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in situ of the breast treated by biopsy only. **Cancer**, n. 76, p. 1197-1200, 1995.

---

RAY, J.M.; STETLER-STEVENSON, W.F. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. **Eur. Respir. J.**, n. 7, p. 2062-2072, 1994.

RELF, M. et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. **Cancer Res.**, n. 57, p.963-969, 1997.

RICE, A.J.; STEWARD, A.M.; QUINN, C.M. Trombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, p. 921-92, 2002.

RICE, A. Quinn, C M. Angiogenesis, thrombospondin, and ductal carcinoma in situ of the breast. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, p. 569-574, 2002.

RODRIGUES, J.R.P. Fatores prognósticos em Câncer de mama em mulheres pré e pós-menopausa. **Rev. Brás. Ginecol. Obstet.** , v. 21, n. 9, Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72031999000900011&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72031999000900011&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 28 out 2006. doi: 10.1590/S0100-72031999000900011.

---

ROSEN, P.P. et al. Lobular carcinoma in situ of the breast: Preliminary results of treatment by ipsilateral mastectomy and contralateral breast biopsy. **Cancer**, n. 47, p. 813 – 819, 1981.

ROSEN, P.P. **Breast pathology**. Philadelphia: Lippincott: Williams e Williams, 1999. 1 Cd-Rom.

SAPINO, A.; BONGIOVANNI, M.; CASSONI, P. Expression of CD-31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. **J. Pathol.**, v. 194, p. 254-261, 2001

SCHNEIDER, B.P.; MILLER, K.D. Angiogenesis of breast cancer. **Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1782-1790, 2005

SCHWARTZ, F. et al. The Consensus Conference on the Treatment of In Situ ductal Carcinoma of the Breast, April 22-25, 1999. **Hum. Pathol.**, v.31, p.131-139, 2000.

SCOTT, M.A. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast-reproducibility of histologic subtype analysis. **Hum. Pathol.**, v. 28, p.967-973, 1997.

SILVERSTEIN, M.J. et al. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast (see comments). **Cancer**, v. 77, p. 2267-2274, 1996.

---

SILVERSTEIN, M.J. et al. Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. **Lancet**, v. 6, n. 345, p. 1154-1157, 1995.

SILVERSTEIN, M.J. Ductal carcinoma in situ of the breast. **BMJ**, v. 12, n. 317, p. 734-739, 1998.

SIMPSON, J.F.; PAGE, D.L. Pathology of preinvasive and excellent-prognosis breast cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, n. 7, p. 501 – 505, 1995.

SMOLIN, G.; HYNDIUK, R.A. Lymphatic drainage from vascularized rabbit cornea. **Am. J. Ophthalmol.**, n. 72, p.147-151, 1971.

SOUZA, G.A. Mama: Carcinoma ductal In situ. **J. Sogesp**, v.22, n 3, p.159-162, 2000.

STEEG, P.S. et al. Molecular analysis of premalignant and carcinoma in situ lesions of the human breast. **Am. J. Pathol.**, n. 149, p. 733-738, 1996.

TAM, I. et al. Cell-adhesion disrupting action of interleukin 6 in human ductal breast carcinoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 91, p. 3329-3333, 1994.

TAVASSOLI, F.A. Ductal Carcinoma *In situ*: Introduction of the concept of Ductal Intraepithelial Neoplasia. **Mod. Pathol.**, v.11, n. 2, p. 140-154, 1998.

---

TEO, B.N. et al. Angiogenesis and invasive recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. **Eur. J. Cancer**, n. 39, p. 38-44, 2003.

UZZAN, B. et al. A system Review of the Literature and Meta-Analysis. Microvessel Density as a Prognostic Factor in Women with Breast Cancer. 2004. *Cancer Research*, vol. 64. n. 9. p. 2941 – 2955.

VERONESI, P. et al. Sentinel Lymph node biopsy for localised ductal carcinoma in situ?. **Breast**, v. 14, n. 6, p. 520-2. 2005

VERONESI, U. et al. Local recurrences and distant metastases after conservative breast cancer treatments: Partly independent events [ see comments]. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.87, p.19-27, 1995.

VOEST, E.E. et al. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 561-586, 1995.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p. 1-8, 1991.

WILBUR, D.C.; BARROWS, G.H. Estrogen and progesterone receptor and c-erbB-2 oncoprotein analysis in pure in situ breast carcinoma: An immunohistochemical study. **Mod. Pathol.**, v. 6, p. 114-120,1993.

---

WOJTOWICZ, S. et al. Phase I of batimastat (BB-99), a novel matrix metalloproteinase inhibitor in patients with advanced cancer. **J. Immunother.**, v.16, p. 249, 1994.

YOSHIJI, H. et al. Expression of vascular endothelial growth factor its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. **Cancer Res.**, v. 56, p. 2013-2016, 1996.

ZICHE, M.; GULLINO, P.M. Angiogenesis and neoplastic progression in vitro. **J. Natl. Cancer Inst.**, n. 69, p. 483-487, 1982. ZVEIBIL, K. D. **Avaliação do conteúdo de DNA em carcinomas invasivos da mama por meio de análise de imagem**: interação de fatores prognósticos citométricos com a avaliação morfológica e imuno-histoquímica. 1995. 187f. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

---





Anexo 2 – Justificativa de Alteração do título.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

FACULDADE DE MEDICINA

Seção de Pós-Graduação

Via: .....
Para: .....
Rub: .....

BOTUCATU, SP - RUIÃO JUNIOR - CEP 13066-970 - FONE (0xx14) 3411-6022

JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Avaliação Imunoistoquímica do Fator VIII e CD – 34 no Carcinoma Ductal *In Situ* da Mama", aprovado pelo CEP em 13/08/2003, teve seu título alterado para "Avaliação da densidade vascular pelo CD 34 no carcinoma ductal *in situ* da mama comparando os tipos comedo e não comedo", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, 17 / 12 / 2006

Nome/Assinatura do(a) autor(a) Flávio Amorim Machado

Nome/Assinatura do(a) orientador (a) José Ricardo P. Rodrigues

Programa de Pós Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – FMB – UNESP

Preceitos formulados em 2 vias e protocolar no respectivo CEP

icado por: Dr. Edison Mantovani Barbosa  
denador do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP do IBCC



