

**FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE
PORTO ALEGRE – FFFCMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL**

***DETECÇÃO DE INVASÃO VASCULAR EM BIÓPSIA POR AGULHA GROSSA DE
CARCINOMA DE MAMA ATRAVÉS DA TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA COM
DUPLO MARCADOR CD34 E PANCITOQUERATINA AE1/AE3***

LUCIANE POLETTO ANTUNES

Porto Alegre

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

- À doutora Maira Caleffi, meu exemplo e minha guia, que me ensinou a Mastologia, orientou-me nessa etapa do mestrado e mantêm-se presente em minhas superações diárias.
- À doutora Márcia Silveira Graudenz, que com sua vivacidade e capacidade inspiradora, foi de vital importância para o cumprimento das etapas do mestrado. Agradeço pela confiança em mim depositada e pela dedicação na realização desta dissertação.
- À Rosalva, técnica do Laboratório de Patologia do Programa de Pós-graduação, pela indispensável ajuda na execução deste trabalho e por sua tranquilidade em meio às turbulências e ansiedades dos alunos do mestrado.
- À Terezinha, técnica do Laboratório de Patologia do Programa de Pós-graduação, pela ajuda, pelos bate-papos agradáveis e pelo saboroso cafezinho.
- À querida Nice, pela disposição e presteza nas infinitas reivindicações.
- Aos colegas de mestrado, pelo agradável convívio nas aulas.
- Aos colegas Ademar José Bedin Jr., Juliana Machado Zignani e Eduardo Coelho Dias que souberam compreender minhas ausências. Agradeço pela amizade.
- Aos meus pais Audi e Neiva, que sempre me apoiaram com palavras de incentivo e carinho e que serviram de exemplos pela convicção nos ideais e pela persistência na concretização dos sonhos.
- Ao querido Spencer, que me incentiva, diariamente, com sua força e determinação, diante das diversas nuances da vida.

SUMÁRIO

1- LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	05
2- INTRODUÇÃO.....	06
3- REVISÃO DA LITERATURA.....	09
3.1. INVASÃO VASCULAR.....	09
3.2. DIAGNÓSTICO DO CARCINOMA DE MAMA.....	15
3.3. TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE INVASÃO VASCULAR.....	15
3.3.1. HEMATOXILINA E EOSINA.....	15
3.3.2. IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	17
3.3.3. DUPLO MARCADOR IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	21
3.4. TRATAMENTO DA INVASÃO VASCULAR.....	23
3.5. RADIOTERAPIA E RECONSTRUÇÃO MAMÁRIA.....	25
4- OBJETIVOS.....	28
5- REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	29
6- ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	45
7- ANEXO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	74
8- ARTIGO EM INGLÊS.....	80
9- ANEXO DO ARTIGO EM INGLÊS.....	108
10- ANEXO 1- TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	114
11- ANEXO 2- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	116

1. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA: ou ADN: ácido desoxirribonucléico

H&E: hematoxilina e eosina

IHQ: imuno-histoquímica ou imunoistoquímica

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IBCSG: International Breast Cancer Study Group

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

RNA: ou ARN: ácido ribonucléico

CDI: carcinoma ductal invasor

CLI: carcinoma lobular invasor

CDI/CLI: carcinoma ductal e lobular invasor

2. INTRODUÇÃO:

O câncer de mama é uma das maiores causas de morbi-mortalidade em todo o mundo. No Brasil, é a neoplasia de maior incidência nas mulheres e a principal causa de morte por câncer.^[42] Nas últimas décadas o número de casos tem aumentado e, de acordo com um relatório do 30º Congresso sobre Câncer de Mama de 2002, em Dalas, a incidência mundial dessa doença está projetada para ser de 1,45 milhão de casos novos em 2010, significando um aumento de 82% sobre a incidência de 1990.^[51] Conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa brasileira para 2005 é de 49.470 casos novos, ou seja, 53 casos para cada 100.000 mulheres.^[42]

No Rio Grande do Sul, a mortalidade cresceu 80% nos últimos vinte anos. Embora uma das causas apontadas para a alta mortalidade seja o atraso no diagnóstico, é necessário que novos estudos explorem a história natural da doença e os novos tratamentos direcionados ao tipo específico do tumor em questão.^[42]

Diante do diagnóstico do câncer de mama, devemos considerar alguns marcadores que estão associados à sobrevida global ou à sobrevida livre de doença, denominados fatores prognósticos. A avaliação dos fatores prognósticos se confirma como um excelente espelho sobre o comportamento biológico de um tumor. Pode nos orientar quanto à melhor forma de abordagem, seja cirúrgica ou através de terapias diversas, e, também, pode restringir o emprego de terapêuticas mais agressivas, beneficiando a paciente e melhorando seu bem estar.^[6, 21, 23, 28, 62]

São considerados como fatores prognósticos as características demográficas (idade, menopausa, etnia), as características do tumor (tamanho tumoral, subtipo patológico, grau histológico, estado linfonodal, invasão vascular), os marcadores biológicos (oncogenes

vascular previamente à cirurgia e, portanto, melhor selecionar os casos que farão reconstrução mamária, evitando o uso de expansores de pele.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. INVASÃO VASCULAR:

De acordo com as diretrizes de Page e Anderson, de 1987, a invasão vascular é definida como a presença de êmbolo tumoral no interior dos vasos peritumorais, sem haver distinção entre vasos linfáticos ou sanguíneos.^[68] A constatação de invasão linfática associa-se ao aumento da recorrência da doença e a invasão de vasos sanguíneos correlaciona-se com o desenvolvimento de metástases à distância e pior prognóstico.^[1, 61, 63]

Conforme a literatura atual, a invasão vascular está presente em aproximadamente 28% a 59% dos casos.^[20, 33, 102]

Em uma avaliação retrospectiva feita por Davis BW et al., em 1987, com 1510 pacientes com carcinoma de mama, constatou-se invasão vascular em 59% dos casos. A taxa de sobrevida livre de doença em 4 anos foi significativamente menor nessas pacientes ($P < 0,0001$).^[20]

Estudos de acompanhamento clínico têm demonstrado, repetidamente, que a presença de invasão vascular, bem como o estado do nódulo linfático axilar, o tamanho do tumor, o tipo histológico e o grau histológico, representam indicadores prognósticos independentes e poderosos. Esses fatores prognósticos tradicionais devem ser considerados como padrão ouro quando qualquer novo fator é considerado.^[29, 44, 52, 53, 62, 78]

A invasão vascular mostra-se como um parâmetro prognóstico independente para sobrevida global e sobrevida livre de doença.^[66, 79] Sua presença representa pior prognóstico.^[13, 33] Um estudo feito por Kato J et. al., em 2003, com 509 pacientes, mostrou que a invasão vascular e a angiogênese devem ser consideradas como fatores prognósticos no carcinoma primário de mama.^[44]

Em um estudo feito por Shen J et al., publicado em 2005, com pacientes que tiveram recorrência tumoral após cirurgia conservadora da mama, definiu-se como alto risco os casos com linfonodos metastáticos, envolvimento da pele ou invasão vascular na cirurgia prévia. ^[80] A constatação da invasão vascular como fator para recorrência local, após cirurgia conservadora de carcinoma mamário, também foi demonstrada no trabalho de Voogd AC et al., em 2001. Também foi encontrado aumento de recorrência local após mastectomia radical, como em outros estudos randomizados. ^[95]

Dinshaw KA et al, em 2005, publicaram um estudo envolvendo 1022 mulheres da Índia, com câncer de mama em estágio I e II, que realizaram cirurgia conservadora. A invasão vascular foi o fator independente mais forte de sobrevida global, sobrevida livre de doença e recorrência local. O tempo médio de acompanhamento dessas pacientes foi de 53 meses. ^[22]

Em uma coorte, conduzida por Truong PT et

axilar, como a invasão vascular como fatores preditivos independentes ($p < 0.0001$ e $p = 0.0036$, respectivamente).^[102] A Tabela 1 demonstra esses resultados:

Tabela 1. Impacto de vários fatores na análise univariada de sobrevida.

	Número de pacientes	Taxa de sobrevida em 12 anos (%)	<i>p</i>
Idade ao diagnóstico			0,0786
<40 anos	190	68	
40-60 anos	693	74	
>60 anos	375	72	
Tamanho tumoral			<0,0001
<2cm	679	85	
2-5cm	432	61	
>5cm	147	55	
Palpável ao exame físico			<0,0001
Sim	1012	70	
Não	246	91	
Linfonodos metastáticos			<0,0001
Sim	504	58	
Não	754	83	
RE positivo			<0,0001
Sim	923	75	
Não	335	65	
RP positivo			0,001
Sim	791	75	
Não	467	68	
Grau nuclear			<0,0001
I	111	91	
II	648	75	
III	499	67	
Invasão linfovascular			<0,0001
Sim	347	57	
Não	911	79	
Número de linfonodos positivos			<0,0001
0	754	83	
1-3	276	74	
4-9	134	44	
>9	93	38	

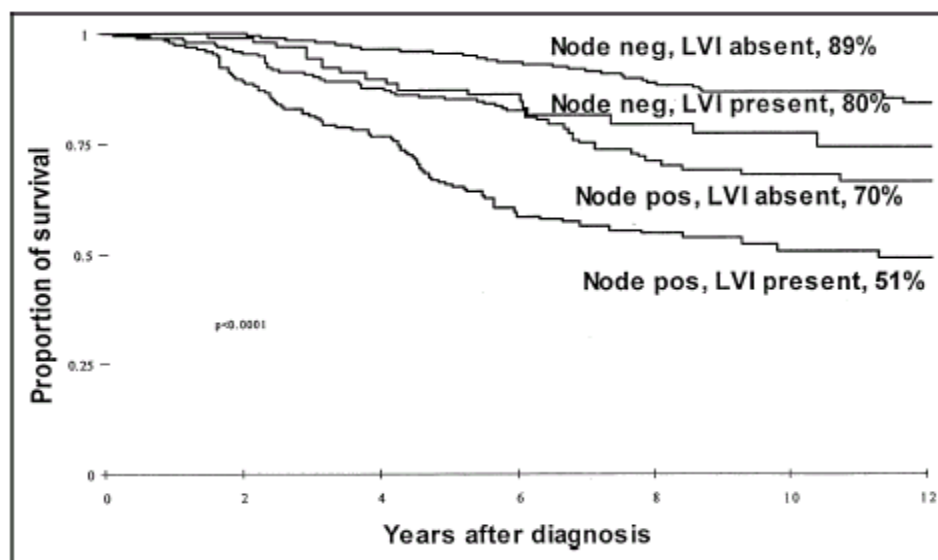
RE: receptor de estrogênio. RP: receptor de progesterona

Fonte: Woo, C.S.; Silberman, H.; Nakamura, S.K. et al. *The American Journal of Surgery*. 2002;184: 337-340.

O grupo de estudos Ludwig Breast Cancer, em 2002, seguiu 1510 pacientes durante quatro anos e a sobrevida livre de doença, nesse período, foi significativamente mais baixa nos casos com invasão vascular que no grupo sem invasão (50% x 65%, $p < 0.0001$). A

sobrevida global foi também significativamente menor quando havia invasão vascular (71% x 82%, $p=0.0006$). Realizando-se análise multivariada, esse fator continuou tendo valor prognóstico na sobrevida livre de doença ($p<0.0001$) e na sobrevida global ($p=0.003$). Das 1510 pacientes estudadas, 504 (40%) eram linfonodos positivos e 754 (60%) estavam livres de metástases. A invasão vascular esteve presente em 347 pacientes (28%) e ausente em 911 (72%). Após a divisão dessas pacientes em quatro subgrupos, baseados no acometimento de linfonodos axilares e na invasão linfo-vascular, a análise por curvas de sobrevida de Kaplan-Meier mostrou significativas diferenças entre os grupos. A invasão linfo-vascular esteve associada com queda significativa na sobrevida em doze anos, apesar da ausência de metástases axilares (89% x 80%, $p<0.0001$). O prognóstico, também, foi pior quando havia envolvimento de linfonodos axilares (70% x 51%, $p<0.001$).^[102] A Figura 1, abaixo, demonstra esses resultados:

Fig 1. Breast cancer specific survival by node status and lymphovascular invasion.



LVI: invasion lymphovascular; Node neg: axillary lymph nodes negative; Node pos: axillary lymph nodes positive
Fonte: Woo, C.S.; Silberman, H.; Nakamura, S.K. et al. *The American Journal of Surgery*. 2002;184: 337-340.

Ainda no mesmo estudo, a invasão vascular e o alto grau histológico mostraram aumento do risco para recorrência local. Associado ao envolvimento axilar e ao tamanho

tumoral, a invasão vascular e o grau histológico demonstram grande valor como fatores preditivos independentes no desenvolvimento de doença à distância. Quando foi analisado o impacto prognóstico baseado no número de linfonodos comprometidos, a invasão linfo-vascular teve significativo impacto nos casos com 1 a 3 linfonodos envolvidos, mas esse efeito não foi observado nos casos com 4 a 9 linfonodos positivos, conforme a Tabela 2. [102]

Tabela 2. Taxas de sobrevida em relação à invasão linfo-vascular (ILV) e o número de linfonodos comprometidos.

Número de linfonodos comprometidos	Número de pacientes e ILV	Sobrevida em 12 anos	p
1-3 linfonodos	174; ILV ausente	82%	0,0004
	102; ILV presente	61%	
4-9 linfonodos	53; ILV ausente	46%	0,16
	81; ILV presente	43%	

Fonte: Woo, C.S.; Silberman, H.; Nakamura, S.K. et al. *The American Journal of Surgery*. 2002;184: 337–340.

Em uma análise feita por Westenend PJ, em 2005, com 50 pacientes em estágio I que desenvolveram metástase à distância e 50 pacientes do grupo controle sem metástases (ambos os grupos sem terapia sistêmica adjuvante), demonstrou-se, após análise multivariada, que as únicas variáveis significativas como fatores prognósticos de sobrevida livre de doença foram a invasão vascular e o tamanho tumoral (Odds ratio de 8,21 e 5,35, respectivamente).^[99]

Weiser et al., em 2001, analisaram as características clínicas e histopatológicas em 206 pacientes tratadas num período de dois anos e meio. Eles puderam demonstrar, através de análise univariada, que a invasão linfo-vascular esteve significativamente associada à ausência de envolvimento de linfonodo sentinela (41% vs 26%, $p=0,021$). Contudo, não foi possível demonstrar o mesmo resultado após análise multivariada.^[98] Turner et al. também

estudaram a invasão linfo-vascular e demonstraram sua forte associação com ausência de envolvimento do linfonodo sentinela (65% vs 37%, $p0,001$).^[87]

Em análises multivariadas, o envolvimento de linfonodos axilares correlacionou-se significativamente com a ocorrência de invasão vascular no tumor primário, além do tipo e tamanho das metástases do linfonodo sentinela e do número de linfonodos acometidos.^[67, 93, 94]

Já em 1994, Chadha et al. demonstraram utilidade na identificação de invasão angiolinfática associada ao tamanho do tumor primário para se identificar mulheres com baixo risco para metástases axilares. Entre 77 pacientes com tumores menores que 1,0 cm de diâmetro e sem invasão linfática ou vascular, observaram 9% de metástases axilares, em comparação com uma incidência de 68% entre pacientes com tumores medindo entre 1,0 e 2,0 cm de diâmetro, com presença de invasão linfática ou vascular.^[12]

Uma análise retrospectiva desenvolvida por Harden SP et al., em 2001, envolvendo 639 pacientes com carcinoma ductal infiltrante T1, ou seja, tumor até 2cm de diâmetro, a invasão vascular e o tamanho tumoral foram considerados como fatores preditivos de metástases em linfonodos axilares, ao contrário do grau tumoral que não demonstrou relevância.^[34]

Wong JS et al., em 2000, constataram que a presença de invasão linfo-vascular é preditiva de envolvimento de quatro ou mais linfonodos axilares em pacientes com estágio clínico T1-2N0. Apenas 3% dos casos T1-2N0 e sem invasão linfo-vascular tinha quatro ou mais gânglios acometidos.^[101]

3.2. DIAGNÓSTICO DO CARCINOMA DE MAMA:

O diagnóstico do carcinoma de mama pode ser citológico ou histológico. A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) envolve a análise citológica do tumor, enquanto que a biópsia por agulha grossa (core-biopsy), a mamotomia e a biópsia cirúrgica convencional (incisional ou excisional) envolvem a análise histológica. [21]

A técnica da biópsia por agulha grossa (core-biopsy) é um procedimento ambulatorial, realizado sob anestesia local, que retira fragmentos do tecido tumoral, possibilitando, além do estudo histopatológico, a dosagem de receptores tumorais e o estudo imuno-histoquímico de vários fatores prognósticos. [21, 61, 78]

O diagnóstico prévio à cirurgia, através da biópsia por agulha grossa, reduz o estresse da paciente, pois possibilita o planejamento do procedimento cirúrgico a que será submetida, além de reduzir o custo quando comparado a uma cirurgia para biópsia incisional ou excisional. [61]

3.3. TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE INVASÃO VASCULAR

3.3.1. HEMATOXILINA E EOSINA:

A técnica de coloração para análise anatomopatológica utilizada rotineiramente nos serviços de patologia é a coloração com hematoxilina-eosina (H&E) demonstrada na Figura 2. Essa técnica consiste no processo pelo qual os corantes se ligam aos tecidos. Ocorre devido à presença de radicais aniônicos ou catiônicos na molécula do corante, os quais reagem, através de interações eletrostáticas, aos radicais de carga oposta presentes nos componentes tissulares. Assim, os corantes básicos interagem com os componentes tissulares ácidos, que são os radicais fosfato dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), os radicais fosfato e carboxila dos proteoglicanos e as carboxilas presentes nos

polissacarídeos ácidos e nas proteínas ácidas. Quaisquer dos componentes dos tecidos ou órgãos que reajam com um corante básico são chamados basófilos.

Embora a hematoxilina não seja exatamente um corante básico, mas por possuir propriedades semelhantes à desses corantes, o termo basofilia é também usado para a sua coloração. Deste modo, a coloração de cortes de tecidos por esta substância evidenciará com uma cor azul as estruturas celulares. Os corantes ácidos, por sua vez, reagem com os radicais catiônicos tissulares encontrados, principalmente, nas proteínas ricas em aminoácidos básicos.

A coloração pela eosina, um corante ácido, evidenciará com uma cor rósea as estruturas celulares, ou seja, a maioria dos filamentos protéicos do citoesqueleto, fibras colágenas, determinados tipos de grânulos dos leucócitos e as proteínas mitocondriais. As estruturas que reagem com um corante ácido são chamadas acidófilas que significa que têm afinidade por ácidos (demonstra acidofilia).^[15]

A técnica da coloração com hematoxilina-eosina é subjetiva e requer experiência e treinamento do patologista, pois, comumente, há retração artificial do estroma denominada artefato de retração, ao redor dos ninhos de células do tumor dentro dos carcinomas invasivos de mama e isso pode ser difícil ou impossível de distinguir das verdadeiras invasões de vaso linfático.^[28, 29] Para avaliação de invasão vascular, identifica-se os espaços vasculares e determina-se se existem células tumorais no interior da luz.^[10, 27]

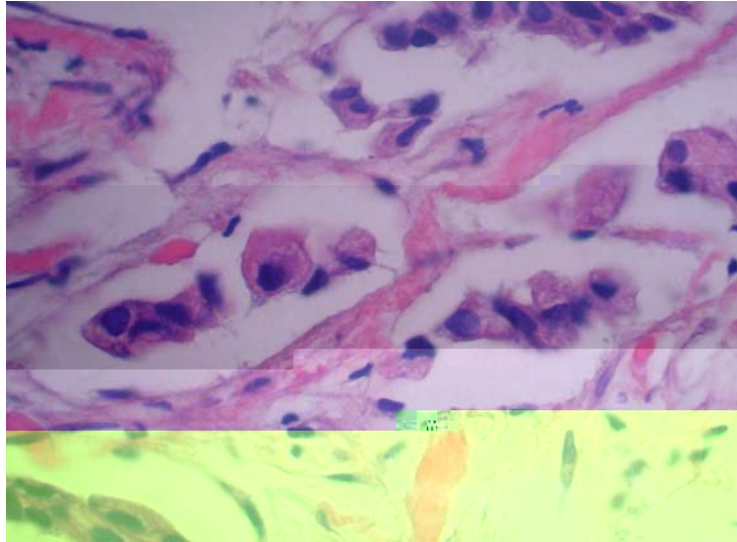


Figura 2. Coloração por H&E de biópsia por agulha grossa de carcinoma de mama.

3.3.2. IMUNO-HISTOQUÍMICA

A avaliação pela técnica imuno-histoquímica (IHC) emprega anticorpos primários monoclonais, obtidos por imunização de animais em laboratório com antígenos humanos.

As técnicas de imuno-histoquímica detectam moléculas (antígenos) teciduais, sendo de grande valor nos diagnósticos anatomopatológicos e na investigação científica.^[4]

O mecanismo básico é o reconhecimento do antígeno por um anticorpo (anticorpo primário) associado a diversos tipos de processos de visualização.^[4]

Atualmente, há disponibilidade de grande número de anticorpos para uso em tecidos fixados em formol e incluídos em blocos parafina, permitindo o estudo de blocos arquivados por longos períodos.^[4]

A técnica de IHQ mais usada é a indireta, associada ao complexo avidina-biotina-enzima. O complexo é formado pela ligação de uma molécula de estreptoavidina com várias moléculas de biotina associadas a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que têm como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final. Pode conferir diversas cores aos antígenos teciduais marcados. As cores mais comuns são a

castanha (peroxidase + diaminobenzidina- DAB) e a vermelha (fosfatase alcalina + fast red).^[4]

Em relação ao câncer de mama, podemos lançar mão de marcadores específicos para células epiteliais, que definirão as células tumorais. Para a detecção dos vasos, podemos utilizar os marcadores endoteliais.

3.3.2.a. MARCADORES ENDOTELIAIS

O antígeno CD34 é encontrado nas células progenitoras hematopoiéticas e na membrana citoplasmática de células endoteliais (membrana basal), sendo, desta forma, um bom marcador vascular.^[82, 84] O anticorpo CD34 é monoclonal e reage com células endoteliais. Considerado um marcador vascular, é muito útil para pesquisas que necessitem distinção do lúmen vascular. As células endoteliais adquirem coloração acastanhada quando reagem com este marcador.^[25, 49]

Grande parte dos estudos a respeito da angiogênese utilizam, como marcador vascular imuno-histoquímico, o fator VIII (fator de Von Willebrand). Porém, Sankey et al., em 1990, perceberam que, com a utilização deste marcador, o fundo estromal era intensamente corado, impossibilitando a avaliação correta da formação vascular. Portanto, validaram a utilização do anticorpo monoclonal para endotélio, o anti-CD34, que pode ser usado em tecidos fixados em formalina e parafinados rotineiramente.^[76]

Em uma análise feita por Speck NMG et al., em 2003, utilizando o anticorpo anti-CD34 para avaliar a angiogênese em carcinoma de endométrio, observou-se que a identificação da estrutura vascular é fácil, devido à coloração do vaso sanguíneo, distinguindo-o facilmente de todos os demais elementos estromais.^[82]

O CD34 foi utilizado por Hollingsworth et al., em 1995, para demonstrar a angiogênese no carcinoma ovariano.^[37] Calux NMCT et.al. demonstraram a superioridade

do CD34 em relação ao anti-fator VIII para a contagem de vasos na angiogênese em lesões de baixo ou alto grau e em carcinomas invasivos no colo uterino.^[10] Fina et al., em 1990, estudaram a presença de antígeno CD34 em células endoteliais e sugeriram que a molécula CD34 poderia participar da adesão celular tanto nas células endoteliais como nas progenitoras hematopoiéticas.^[25]

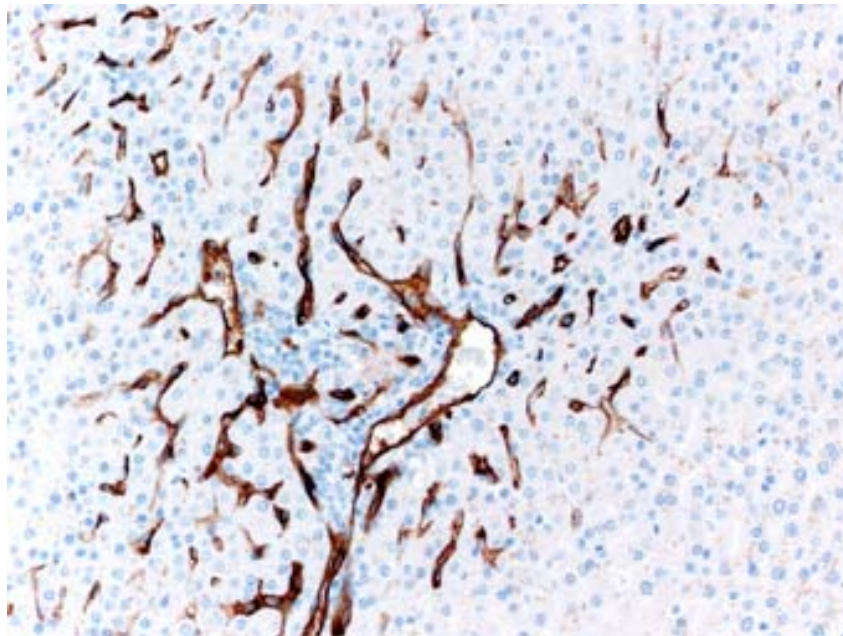


Figura 2. Fígado normal com coloração CD34. Endotélio dos vasos portais e sinusóides periportais corados em marrom.

Fonte: <http://www.nordiqc.org/Assessments/Run7/CD34-as7.htm>

3.3.2.b. MARCADORES EPITELIAIS

As citoqueratinas, também utilizadas na técnica de imuno-histoquímica, podem prestar informações a respeito das células epiteliais, estruturas existentes na maioria dos carcinomas mamários. Elas constituem o principal componente do citoesqueleto das células epiteliais e formam uma família codificada por, pelo menos, vinte tipos de genes. As citoqueratinas AE1/AE3 são uma mistura de diferentes clones de anticorpos anti-citoqueratina monoclonais AE1 e AE3. Ambos detectam queratinas de alto e baixo peso molecular. O clone AE1 detecta as citoqueratinas 10, 14, 15 e 16 (estas com alto peso

molecular) e a citoqueratina 19 (com baixo peso molecular). Já o clone AE3 detecta as citoqueratinas 1, 2,3,4,5 e 6 (com alto peso molecular) e as citoqueratinas 7 e 8 (com baixo peso molecular).^[75]

Mediante métodos eletroforéticos e imunológicos com anticorpos monoclonais, classifica-se em duas subfamílias: a primeira compreende proteínas básicas relativamente grandes (com 56 a 67 kDa) numeradas de 1 a 8 e a segunda é constituída por proteínas menores e ácidas e são numeradas de 9 a 19.^[1, 18, 75, 83] As citoqueratinas de baixo peso molecular encontram-se em epitélios simples e glandulares, as de peso molecular intermediário, nos epitélios estratificados e as de alto peso molecular, em epitélios queratinizados (~67kDa). Sua expressão é afetada por fatores ambientais e mudanças patológicas.^[84]

As citoqueratinas AE1/AE3 têm sido utilizadas em alguns serviços para a análise do linfonodo sentinela, na tentativa de detectar micrometástases através daa

3.3.3. DUPLO MARCADOR IMUNO-HISTOQUÍMICO

Atualmente, alguns estudos têm tentado associar marcadores imuno-histoquímicos para células epiteliais, como as citoqueratina AE1/AE3, e para endotélio vascular, como o CD34, visando tornar mais acurada a detecção de invasão vascular.^[1, 2, 10]

Barbareschi, M. et al., em 1994, associaram o padrão morfológico e a imuno-histoquímica (com anticorpos específicos para células endoteliais, como CD 31 e fator VIII) para avaliar a presença de invasão vascular no carcinoma mamário. Em um total de 233 pacientes com linfonodos axilares negativos, 11% tinham invasão vascular.^[5]

O sistema de dupla coloração tem a capacidade de detectar simultaneamente dois antígenos tissulares diferentes num mesmo corte de tecido. É utilizada uma combinação de sistemas de que empregam imunoglobulinas de cabra anti-camundongo e anti-coelho conjugadas a um polímero marcado com peroxidase (HRP) ou fosfatase alcalina (AP). esse sistema é indicado para uso com anticorpos primários de coelho ou camundongo para identificação qualitativa de antígenos por microscopia de luz em tecidos emblocados em parafina, tecidos congelados e preparações celulares para auxiliar os diagnósticos patológicos. Podem ser usados tecidos processados numa variedade de fixadores, incluindo o etanol, o B-5, Bouin, a formalina com zinco e a formalina tamponada neutra.

Estas técnicas estão baseadas na imunorreatividade de anticorpos e nas propriedades químicas de complexos enzimáticos, os quais reagem com substrato-cromógeno descorado para produzirem produtos finais corados. Já foram descritas muitas metodologias para executar coloração dupla em IHQ.^[88, 89] Um destes métodos utiliza marcação direta de anticorpos primários.^[8, 70] No entanto, este método pode ser difícil, trabalhoso e insensível.^[8]

Outros protocolos melhorados e adaptados para dupla-coloração imuno-histoquímica incluem métodos indiretos envolvendo anticorpos marcados com enzima ¹¹, complexos avidina-biotina (ABC) ^[90] e peroxidase anti-peroxidase (PAP) combinada com o complexo fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina (APAAP).^[57, 92] A combinação de métodos é incômoda, demorada e, em muitos casos, insensível.

Muitos dos protocolos de dupla-coloração anteriormente descritos sofrem limitações, tais como processos com muitas complicações, falta de versatilidade, falta de sensibilidade e reação cruzada. ^[36]

O Sistema de Duplacoloração EnVision TM DakoCytomation utiliza tecnologia de polímero marcado realçada.^[36] Este sistema está baseado em polímeros marcados com peroxidase horseradish (HRP) e fosfatase alcalina (AP) os quais estão conjugados a anticorpos secundários contra imunoglobulinas de camundongo e coelho. Os polímeros não contêm avidina ou biotina. Os dois antígenos são marcados com cores contrastantes na mesma amostra: a cor marrom é gerada usando-se o cromógeno DAB para peroxidase, e a cor vermelha com o cromógeno Fast Red para fosfatase alcalina. Ambas as cores permitem a visualização com contra-coloração em hematoxilina.^[36]

A ordem de marcação pode melhorar a qualidade de coloração: os antígenos mais abundantes são corados primeiro, seguidos pela coloração dos antígenos menos abundantes. As amostras de tecido são inicialmente tratadas com o bloqueio de peroxidase para acabar com a atividade da peroxidase endógena. As amostras são, então, incubadas com o primeiro anticorpo primário de camundongo ou coelho, caracterizado, e diluído corretamente, seguido pela incubação com o polímero marcado com HRP. A reação inicial é completada com 5 a 15 minutos de incubação do substrato-cromógeno DAB+ líquido, que resulta num precipitado de cor marrom no local do primeiro antígeno. Para a conclusão da primeira reação, é recomendada a incubação do tecido por três minutos com bloqueio de

estudos prospectivos adicionais para tumores T1 e T2 e com um a três linfonodos comprometidos. ^[9, 35]

A prática diária da maioria dos serviços ainda indica a radioterapia pós-mastectomia para os casos com quatro ou mais linfonodos axilares metastáticos e para o estadio clínico III ou T3. ^[39, 74] Até o momento, os dados são insuficientes para recomendar radioterapia pós-mastectomia baseado somente na presença de invasão vascular. ^[72] Entretanto, as pesquisas têm demonstrado aumento no número de indicações para tratamentos adjuvantes, incluindo as pacientes com câncer precoce e com cirurgias mais conservadoras. Desta forma, teremos, cada vez mais, pacientes submetidas à radioterapia. ^[50]

Um estudo prospectivo, de 2003, feito por Wallgren A. et al., envolvendo 5352 pacientes do trial IBCSG (I a VII), com média de seguimento de 14,5 anos, demonstrou que a invasão vascular contribuiu para o risco de recidiva local nas pacientes pré-menopausadas e sem metástases axilares. A mesma foi considerada como um fator prognóstico de sobrevida livre de doença, associada ao tamanho tumoral. Nas pacientes pós-menopausadas e sem metástases axilares, a invasão vascular foi o único fator de alto risco preditivo de recidiva. Naquelas com metástases axilares e na pré-menopausa a invasão vascular representou aumento no risco para a sobrevida livre de doença, assim como o acometimento de muitos linfonodos axilares e o alto grau tumoral. ^[96]

Jagsi R. et al., publicaram em 2005 resultados de uma coorte, com 877 casos de câncer de mama, sem metástases axilares, tratadas com mastectomia, e sem radioterapia adjuvante, no período entre 1980 a 2000. Constataram a redução da recorrência locorregional após o emprego da radioterapia pós-mastectomia. A média de acompanhamento dessa coorte foi de 100 meses. O tamanho tumoral maior que 2cm, a margem cirúrgica menor que 2mm, as pacientes na pré-menopausa e a invasão linfo-

vascular mostraram-se como fatores prognósticos independentes de recorrência locorregional. Este estudo sugere

e

e

e

Diante do aumento progressivo das indicações de radioterapia pós-mastectomia, deparamo-nos com maior complexidade e dificuldade no planejamento da técnica de reconstrução imediata da mama. O problema potencial para quem realiza reconstrução imediata e necessita de radioterapia é que a mesma pode causar problemas nos resultados estéticos, principalmente quando é aplicada a técnica utilizando-se expansores e prótese de silicone, pois o tecido mamário irradiado adquire menor elasticidade após o tratamento.^[9, 35, 40, 46] Vários estudos têm demonstrado alta incidência de complicações e resultados estéticos ruins.^[46, 72] Uma análise feita por Tallet AV et al., 2003, demonstraram aumento nas complicações e na taxa de falha da reconstrução até três vezes quando empregou-se radioterapia pós-mastectomia.^[85] Conforme alguns autores, a reconstrução imediata deveria ser evitada e postergada para quem necessita realizar radioterapia pós-mastectomia.^[46]

Deve-se levar em consideração que a radioterapia é uma das contra-indicações relativas ao uso de implantes mamários como expansores e próteses de silicone devido à ocorrência de contratura capsular fibrosa, resultado estético ruim e necessidade de maior número de cirurgias reparadoras.^[3, 26, 55, 78]

Diversos estudos têm demonstrado resultados estéticos insatisfatórios após radioterapia em reconstrução com os expansores teciduais. Demonstaram, ainda, a superioridade do uso de retalhos autólogos nesses casos, algumas publicações com nível V de evidência.^[59, 72, 81] Contudo, como nem

a radioterapia, foi empregada, esse valor reduziu (55% x 34%), demonstrando que os efeitos negativos da radioterapia foram maiores quando foi empregada a reconstrução imediata.^[26]

3. OBJETIVOS:

3.1. GERAL:

Detectar a presença de invasão vascular nas biópsias por agulha grossa de carcinomas de mama através da imuno-histoquímica com duplo marcador (CD34 e citoqueratina AE1/AE3).

3.2. ESPECÍFICOS:

- 1) Analisar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da imuno-histoquímica com duplo marcador (CD34 e citoqueratina AE1/AE3) nas biópsias por agulha grossa de carcinoma de mama.
- 2) Comparar a acurácia do duplo marcador com a técnica da H&E.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1) AKISHIMA, Y.; ITO, K.; ZHANG, L. et al. Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. **Virchows Arch.** 2004 Feb; 444(2): 153-7.
- 2) ALEXANDER, S.F.; SINGH, N.; AYHAN, A. et al. Clinical value of immunohistochemically detected lymphovascular invasion in endometrioid endometrial cancer. **Gynecol Oncol.** 2004 Feb; 92(2):653-9.
- 3) ANANIAN, P.; PROTIERE, C.; TALLET, A.; ARNAUD, S. et al. Breast reconstruction after mastectomy for breast cancer: which reconstructive surgical procedure should be retained? **Ann Chir.** 2004 May;129(4):192-202.
- 4) ANTIBODY HOTLINE, Technical Questions. Disponível em: **<http://www.acris-antibodies.com>**. Acesso em: 12 abr. 2005.
- 5) BARBARESCHI, M.; DALLA PALMA, P.; BEVILACQUA, P. et al. Invasive node-negative breast carcinoma: multivariate analysis of the prognostic value of peritumoral vessel invasion compared with that of conventional clinic-pathologic features. **Anticancer Res.** 1994 Sep-Oct;14(5B):2229 -35.
- 6) BARTH, A.; CRAIG, P.H.; SILVERSTEIN, M.J. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 breast carcinoma. **Cancer** 1997; 79:1918-22.

- 7) BEACH, R.A.; LAWSON, D.; WALDROP, S.M.; COHEN, C. Rapid immunohistochemistry for cytokeratin in the intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes for metastatic breast carcinoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology** 2003; 11(1):45-50.
- 8) BOORSMA, D.M. Direct immunoenzyme double staining applicable for monoclonal antibodies. **Histochem.** 1984; 80:103.
- 9) BUCHHOLZ, T.A.; STROM, E.A.; PERKINS, G.H. Controversies regarding the use of radiation after mastectomy in breast cancer. **The Oncologist.** 2002 Dec; Vol. 7, No. 6, 539–546.
- 10) CALUX, N.M.C.T.; RIBALTA, J.C.L.; FOCCHI, J.N.S.J. et al. Angiogênese na neoplasia escamosa do colo uterino: comparação entre dois marcadores de células endoteliais. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** 2001 Jun; vol.23 no.5: 313-19.
- 11) CAMPBELL, G.T.; BHATNAGAR, A.S. Simultaneous visualization by light microscopy of two pituitary hormones in a single tissue section using a combination of indirect immunohistochemical methods. **J Histochem Cytochem.** 1976; 24(2):448.
- 12) CHADHA, M.; CHABON, A.B.; FRIEDMANN, P. et al. Predictors of axillary metastases in patients with T1 breast cancer. A multivariate analysis. **Cancer** 1994; 73:350-3.
- 13) CHIA, S.K.; SPEERS, C.H.; BRYCE, C.J. et al. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast

cancers without adjuvant systemic therapies. **Journal of Clinical Oncology** 2004; 22(9): 1630-1637.

14) CLOUGH, K.B.; O 'DONOGHUE, J.M.; FITOUSSI, A.D. et al. Prospective evaluation of late cosmetic results following breast reconstruction:implant oncologia. **Plast Reconstr Surg.** 2001; 107: 1702-9.

15) COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. et al. **Robbins Pathologic Basis of Disease.** 7th ed., Saunders, Philadelphia, 2004:985-93.

16) COWEN, D.; HOUVENAEGHEL, G.; JACQUEMIER, J. et al. Local recurrences after conservative treatment of breast cancer: risk factors and influence on survival. **Cancer Radiotherapy.** 1998 Sep-Oct;2(5):460-8.

17) COWEN, D.; JACQUEMIER, J.; HOUVENAEGHEL, G. et al. Local and distant recurrence after conservative management of "very low-risk" breast cancer are dependent events: a 10-year follow-up. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 1998 Jul 1;41(4):801-7.

18) CREWETHER, W.G.; DOWLING, L.M.; STEINERT, P.M. Structure of intermediate filament. **Int. J. Biol. Macromol.** 1983; 5: 267-74.

19) CZERNIECKI, B.I.; SCHEFF, A.M.; CALLANS, L.S. et al. Immunohistochemistry with pancytokeratins improves the sensitivity of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma. **Cancer.** 1999;85:1098-1103.

- 20) DAVIS, B.W.; GELBER, R.; GOLDBIRSCHE, A. et al. Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. **Hum Pathol.** 1987;18(1):79.
- 21) DIAS, E.N.; CALEFFI, M.; SILVA, H.M.S. et al. Fatores prognósticos do câncer de mama - importância clínica. **Mastologia Atual.** 1º ed., Rio de Janeiro Revinter,1994; 281-86.
- 22) DINSHAW, K.A.; BUDRUKKAR, A.N.; CHINOY, R.F. et al. Profile of prognostic factors in 1022 Indian women with early-stage breast cancer treated with breast-conserving therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2005 Jun 22. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. Acesso em: 18 jan. 2005.
- 23) EISENBERG, A.L.A; KOIFMAN, S.; REZENDE, L.M.M.C. et al. Predictive factors to lymph node involvement on breast cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2001; 47(4): 389-96.
- 24) FEIN, D.A.; FOWBLE, B.L.; HANLON, A.L. et al. Identification of women with T1-T2 breast cancer at low risk of positive axillary nodes. **J Surg Oncol** 1997; 65:34.
- 25) FINA, L.; MOLGAARD, H.V.; ROBERTSON, D. et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. **Blood** 1990; 75: 2417-26.
- 26) FODOR, J.; GULYAS, G.; POLGAR, C. et al. Radiotherapy and breast reconstruction: the issue of compatibility. **Orv Hetil.** 2003 Mar 23;144(12):549-55.

27) GAIOTTO, M.A.M.; RIBALTA, J.C.L.; FOCCHI, J. et al. Relação entre a atividade do epitélio e a resposta angiogênica estromal em neoplasias intra-epiteliais do colo uterino. **RBGO** 2001; 5(23):35.

28) GASPARINI, G.; MELI, S.; PANIZZONI, G.A. et al. Peritumoral lymphatic vessel invasion compared with DNA ploidy, proliferative activity, and other pathologic features as prognostic indicators in operable breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 1992 Mar; 20 (3):195-204.

29) GASPARINI, G.; WEIDNER, N.; BEVILACQUA, P. et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. **J Clin Oncol.** 1994 Mar; 12(3):454-66.

30) GOLDBIRSCHE, A.; GLICK, J.; GELBER, R. et al. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. **J Clin Oncol.** 2001; 19:3817-3827.

31) GRUBER, G.; BERCLAZ, G.; ALTERMATT, H.J.; GREINER, R.H. Can the addition of regional radiotherapy counterbalance important risk factors in breast cancer patients with extracapsular invasion of axillary lymph node metastases? **Strahlenther Onkol.** 2003 Oct;179(10):661-6.

32) GUEDES, J.M.; MACÉA, J.R.; RINALDI, J.F. Quantificação dos linfonodos axilares obtidos em cirurgias para câncer na mama e sua correlação com dados terapêuticos e

variáveis epidemiológicas. **Revista Brasileira de Mastologia**. 2004- vol. 14, número 4, pg135-141.

33) GUPTA, A.; DESHPANDE, C.G.; BADVE, S. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. **Cancer**. 2003 May 1;97(9):2341-7.

34) HARDEN, S.P.; NEAL, A.J.; AL-NASIRIN, A.S. et al. Predicting axillary lymph node metastases in patients with T1 infiltrating ductal carcinoma of the breast. **Breast**. 2001 Apr;10(2):155-9.

35) HARRIS, J.R.; HALPIN-MURPHY, P.; MCNEESE, M. et al. Consensus Statement on postmastectomy radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1999;44:989–990.

36) HERAS, A. Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry. **Lab Invest** 1995; 72(1):165A.

37) HOLLINGSWORTH, H.C.; KOHN, E.C.; STEINBERG, G.S. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. **Am J Pathol**. 1995; 147: 33-41.

38) HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**. 1981; 29: 577-80.

- 39) HUANG, E.H.; TUCKER, S.L.; STROM, E.A. et al. Postmastectomy radiation improves local-regional control and survival for selected patients with locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and mastectomy. **J Clin Oncol.** 2004; 22:4691-4699.
- 40) HUSSIEN, M.; SALAH, B.; MALYON, A.; WIELER-MITHOFF, E.M. The effect of radiotherapy on the use of immediate breast reconstruction. **Eur J Surg Oncol.** 2004 Jun;30(5):490-4.
- 41) INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Controle do câncer de mama. Documento de consenso. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicacoes/Consensointegra.pdf>> Acesso em 20 abr. 2005.
- 42) INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2005. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/conteudo_view.asp?ID=3>. Acesso em 20 abr. 2005.
- 43) JAGSI, R.; RAAD, R.A.; GOLDBERG, S. et al. Locoregional recurrence rates and prognostic factors for failure in node-negative patients treated with mastectomy: implications for postmastectomy radiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2005;62(4):1035-9.

- 44) KATO,T.; KAMEOKA, S.; KIMURA, T. et al. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. **Br J Cancer**. 2003 jun; 88(12): 1900-8.
- 45) KATZ, A.; STROM, E.A.; BUCHHOLZ, T.A. et al. The influence of pathologic tumor characteristics on locoregional recurrence rates following mastectomy. **J Radiat Oncol Biol Phys**. 2001 Jul 1;50(3):735-42.
- 46) KRONOWITZ, S.J.; ROBB, G.L. Breast reconstruction with postmastectomy radiation therapy: current issues. **Plast Reconstr Surg**. 2004 SEP 15; 114(4): 950-60.
- 47) KURTZ, J. The curative role of radiotherapy in the treatment of operable breast cancer. **European Journal of Cancer**.2002; 38:1961–1974.
- 48) KURU, B.; CAMLIBEL, M.; ALI GULCELIK, M.; ALAGOL, H. Prognostic factors affecting survival and disease-free survival in lymph node-negative breast carcinomas. **J Surg Oncol**. 2003 Jul;83(3):167-72.
- 49) LANZA, F.; HEALY, L.; SUTHERLAND, D.R. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**. 2001 February 1; 15: 1-13.
- 50) LEAL, P.L.; CAETANO, M.; PALMA, C.L. et al. Reconstrução imediata de mama:avaliação das pacientes operadas no Instituto Nacional de Câncer no período de

junho de 2001 a junho de 2002. **Revista Brasileira de Mastologia**. 2003; Vol. 13 – nº 4 – pg 149-58.

51) LEAL, P.R.; CAMMAROTA, M.C.; PALMA, L. et al. Reconstrução imediata de mamas: avaliação das pacientes operadas no Instituto Nacional de Câncer no período de junho de 2001 a junho de 2002. **Revista Brasileira de Mastologia**. 2003; 13(4): 150-8.

52) LEE, A.K.; DELELLIS, R.A.; SILVERMAN, M.L. et al. Lymphatic and blood vessel invasion in breast carcinoma: a useful prognostic indicator? **Hum Pathol**. 1986 Oct;17(10):984-7.

53) LEE, A.K.; DELELLIS, R.A.; SILVERMAN, M.L. et al. Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast. **J.Clin.Oncol**.1990Sep;8(9):1457-65.

54) LERWILL, M.F. Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. **American Journal of Surgical Pathology**. 2004; 28(8): 1076-1091.

55) LOSKEN, A.; CARLSON, G.W.; SCHOEMANN, M.B. et al. Factors that influence the completion of breast reconstruction. **Ann Plast Surg**. 2004 MAR 01; 52(3): 258-61.

56) MARINHO, V.F.Z.; GOBBI, H.; ZAGURY, M.S. et al. Micrometastasis (mic-met) in breast carcinoma detected by imunohistochemistry method. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. 2004; vol.40 no.2. RiodeJaneiro.Disponívelem:
www.ufmg.br/prpg/dow_anais/cien_saude/patologia_3/vanessa2.doc. Acesso em: 14 ago. 2005.

57) MASON, D.Y.; SAMMONS, R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. **J Clin Pathol** 1978; 31:454.

58) MC GEE, J.M.; YOUMANS, R.; CLINGAN, F. et al. The value of axillary dissection in T1a breast cancer. **Am J Surg.** 1996; 172:501.

59) MEHTA, V.; GOFFINET, D. Postmastectomy radiation therapy after TRAM flap breast reconstruction. **Breast J.** 2004; 10:118-122.

60) MIETTINEN, M.; LINDENMAYER, A.E.; CHAUBAL, A. Endotelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens: evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. **Mod Pathol.** 1994; 7: 82-90.

61) MINISTÉRIO DA SAÚDE. Normas e recomendações do Ministério da Saúde. Controle do câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2004; 50 (2) 77-90.

62) MIRZA, A.N.; MIRZA, N.Q.; VLASTOS, G. et al. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. **Ann Surg.** 2002 Jan; 235(1):10-26.

63) MOKBEL, K.M.; PARRIS, C.N.; GHILCHIK, M.; AMERASINGHE, C.N.; NEWBOLD, R.F. Telomerase activity and lymphovascular invasion in breast cancer. **Eur J Surg Oncol.** 2000, 26(1):30-3.

64) NAHRIG, J.; RICHTER, T.; KOWOLIK, J. et al. Comparison of different histopathological^m methods for the examination of sentinel lymph nodes in breast cancer. **Anticancer Res.** 2000; 20:2209-2212.

65) NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Adjuvant therapy for breast cancer. **NIH Consensus Statement.** 2000; vol 17, pp 1-23.

66) NERI, A.; MARRELLI, D.; ROVIELLO, F. et al. Prognostic value of extracapsular extension of axillary lymph nodesⁱ. **Ann Oncol.** 2000; 11:1001-1006.

a

- 71) PETIT, J.; RIETJENS, M.; GARUSI, C. Breast reconstructive techniques in cancer patients: which ones, when to apply, which immediate and long term risks? **Crit Rev Oncol Hematol.** 2001 Jun; 38(3):231-9.
- 72) PIERCE, L.J. The use of radiotherapy after mastectomy: a review of the literature. **J Clin Oncol.** 2005 Mar; 23:1706-1717.
- 73) RAGAZ, J.; SPINELLI, J.; SPEERS, C. et al. Adverse impact of lymphangitic and vascular invasion (LVI) in early breast cancer: results from the British Columbia (BC) breast cancer outcome unit. **Breast Cancer Res Treat.** 2002;76(42 Suppl. 1); abstract 119.
- 74) RECHT, A.; EDGE, S.B.; SOLIN, L.J. et al. Postmastectomy radiotherapy: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol.** 2001 Mar 1; 19(5):1539-69.
- 75) RODNEY, T.M. Cytokeratin AE1/AE3. **The Focus Immunohistochemistry.** 2003 November. Disponível em: < www.propathlab.com >. Acesso em 20 abril de 2005.
- 76) SANKEY, E.A.; MORE, L.; DHILLON, A.P. A new immunostain for the routine diagnosis of Kaposi's sarcoma. **J Pathol.**1990; 161: 267-71.
- 77) SCHLINGEMANN, R.O.; RIETVELD, F.J.R.; DE WAAL, R.M. et al. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial albuminal microprocesses in the tumor stroma. **Lab Invest.** 1990; 62: 690-6.

78) SCHNITT, J.S.; GUIDI, A.J. Pathology and biological markers of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. **Diseases of the Breast**. 2st ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 2002; p.540-42.

79) SCHOPPMANN, S.F.; BAYER, G.; AUMAYR, K.; TAUCHER, S. et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. **Annals of Surgery**. 2004; 240(2):306-312.

80) SHEN, J.; HUNT, K.K.; MIRZA, N.Q. et al. Predictors of systemic recurrence and disease-specific survival after ipsilateral breast tumor recurrence. **Cancer**. 2005 Aug;104(3):479-90.

81) SOONG, I.S.; YAU, T.K.; HO, C.M. et al. Postmastectomy radiotherapy after immediate autologous breast reconstruction in primary treatment of breast cancers. **Clin Oncol**. 2004; 16:283-289.

82) SPECK, N.M.G.; FOCCHI, J.; ALVES, A.C. et al. Relação entre angiogênese e estágio no carcinoma do endométrio. **RBGO** 2003; v. 25, nº 6: 396-401.

83) STEINERT, P.M. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. **Ann. Rev. Biochem**. 1988; 57: 593-625.

84) STITZENBERG, K.B.; CALVO, B.F.; IACOCCA, M.V. et al. Cytokeratin immunohistochemical validation of the sentinel node hypothesis in patients with breast cancer. **Am J Clin Pathol**. 2002 May;117(5):729-37.

- 85) TALLET, A.V.; SALEM, N.; MOUTARDIER, V. et al. Radiotherapy and immediate two-stage breast reconstruction with a tissue expander and implant: complications and esthetic results. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2003 Sep 1;57(1):136-42.
- 86) TRUONG, P.T.; YONG, C.M.; ABNOUSI, F. et al. Lymphovascular invasion is associated with reduced locoregional control and survival in women with node-negative breast cancer treated with mastectomy and systemic therapy. **J Am Coll Surg.** 2005 Jun; 200(6):912-21.
- 87) TURNER, R.R.; CHU, K.U.; QI, K. et al. Pathologic features associated with nonsentinel lymph node metastases in patients with metastatic breast carcinoma in a sentinel lymph node. **Cancer.** 2000; 89:574-581.
- 88) VANDESANDE, F. Immunohistochemical double staining techniques. In: Cuello AC (ed.). **Immunohistochemistry.** New York: John Wiley & Sons 1983:257.
- 89) VAN DER LOOS, C.M. et al. Practical suggestions for successful immunoenzyme double-staining experiments. **Histochem J** 1993; 25:1.
- 90) VAN DER LOOS, C.M. et al. An immunoenzyme triple-staining method using both polyclonal and monoclonal antibodies from the same species. Application of combined direct, indirect, and avidin-biotin complex (ABC) technique. **J Histochem Cytochem** 1987; 35(11):1199.

91) VANDEWEYER, E.; DERAEMAECKER, R. Radiation therapy after

- 97) WEIDNER, N.; SEMPLE, J.P.; Steinberg SM et al. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Méd.** 1991; 324: 1-8.
- 98) WEISER, M.R.; MONTGOMERY, L.L.; TAN, L.K. et al. Lymphovascular invasion enhances the prediction of non-sentinel node metastases in breast cancer patients with positive sentinel nodes. **Ann Surg Oncol.** 2001; 8:145.
- 99) WESTENEND, P.J. Tumour size and vascular invasion predict distant metastasis in stage I breast cancer. Grade distinguishes early and late metastasis. **J Clin Pathol.** 2005 FEB 01; 58(2): 196-201.
- 100) WHITE, J.; MOUGHAN, J.; PIERCE, L.J. et al. Status of postmastectomy radiotherapy in the United States: a patterns of care study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2004 Sep 1;60(1):77-85.
- 101) WONG, J.S.; O'NEILL, A.; RECHT, A.; SCHNITT, S.J. et al. The relationship between lymphatic vessel invasion, tumor size, and pathologic nodal status: can we predict who can avoid a third field in the absence of axillary dissection? **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2000; 48(1):133-7.
- 102) WOO, C.S.; SILBERMAN, H.; NAKAMURA, S.K. et al. Lymph node status combined with lymphovascular invasion creates a more powerful tool for predicting outcome in patients with invasive breast cancer. **The American Journal of Surgery.** 2002;184: 337-340.

RESUMO

Objetivos: Detectar a presença de invasão vascular nas biópsias por agulha grossa de carcinoma de mama através da técnica por imuno-histoquímica com o duplo marcador para células endoteliais (CD34) e para células epiteliais (pancitoqueratina AE1/AE3); analisar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo com essa técnica e comparar a acurácia do duplo marcador com a técnica da H&E.

Método: Foram estudados 74 casos de biópsias por agulha grossa de pacientes com câncer de mama, operadas para a mesma patologia no Hospital Santa Rita e Hospital Moinhos de Vento, de Porto Alegre, no período entre Janeiro/2003 a Maio/2005. Cortes histológicos das biópsias foram submetidos a coloração imuno-histoquímica com duplo marcador e coloração padrão de hematoxilina-eosina (H&E) em lâminas independentes e separadas para pesquisa de invasão vascular. O método de IHC utilizado foi o sistema de dupla coloração Envision da DakoCytomation e os anticorpos primários utilizados foram anti-CD34 e pancitoqueratina AE1/AE3. Como grupo controle, foram utilizados os resultados anatomopatológicos das cirurgias já existentes, considerados como padrão ouro para detecção de invasão vascular. Os dados referentes às características gerais das pacientes e do tumor foram colhidos dos prontuários hospitalares.

Resultados: A idade média das pacientes diagnosticadas com carcinoma invasor de mama foi de 58,1 anos (desvio padrão 14). A média de tamanho tumoral foi de 2,7cm (0,2-11cm) e a média do número de linfonodos acometidos de 3,5. Três casos eram multicêntricos. O tipo de tumor mais encontrado foi o carcinoma ductal invasor (83,8%) e o grau tumoral 2 foi o mais freqüente (49,2%). Metástases axilares estavam presentes em

47,3% dos casos. O estadiamento patológico dos tumores distribuiu-se da seguinte forma: I 20/74 casos (27%), IIa 25/74 casos (33,8%), IIb 17/74 casos (23%), IIIa 11/74 casos (14,9%) e IIIb 1/74 casos (1,3%). O número médio de fragmentos das biópsias foi de 5 (entre 3 e 7). De acordo com o t

dúvidas com o H&E quando artefatos estão presentes como fatores confusionais para adequada análise.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é considerado uma das maiores causas de morbi-mortalidade em todo o mundo. Conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa brasileira para 2005 é de 49.470 casos novos, ou seja, 53 casos para cada 100.000 mulheres.^[1]

No Rio Grande do Sul, a mortalidade cresceu 80% nos últimos 20 anos. Embora uma das causas apontadas para a alta mortalidade seja o atraso no diagnóstico, é necessário que novos estudos explorem a história natural da doença e os novos tratamentos direcionados ao tipo específico do tumor em questão.^[1]

A avaliação dos fatores prognósticos se confirma como um excelente espelho sobre o comportamento biológico de um tumor. A invasão vascular mostra-se como um parâmetro prognóstico independente para recorrência locorregional, sobrevida global e sobrevida livre de doença.^[2,3,4,5,6,7,8,9,10,77,12,13,14,15,16, 17]

Diante da constatação de invasão linfática, o tratamento tem incluído, cada vez mais, a radioterapia pós-operatória.^[18, 19, 20, 21, 22, 23, 24] Para as mulheres submetidas à mastectomia com reconstrução imediata pela técnica do expensor, a radioterapia pós-operatória pode implicar em resultado estético pouco satisfatório, com uma taxa de complicação aumentada, devido à ocorrência de contratura capsular ou diminuição da expansibilidade da pele.^[25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]

Portanto, a identificação correta de casos positivos para invasão vascular, previamente à cirurgia, possibilitaria planejamento do tratamento cirúrgico e o tipo de reconstrução a serem empregados.

A subjetividade da detecção de invasão vascular feita apenas pela técnica da coloração com hematoxilina-eosina (H&E) tem trazido dificuldades na sua interpretação, e,

nem sempre, proporciona clara identificação da invasão, principalmente em uma amostra reduzida de tecido, como no caso da biópsia por agulha grossa do tumor. A presença de artefatos de retração, devido ao processamento do material, também pode trazer dúvidas quanto à presença da invasão vascular verdadeira.^[35, 36]

A técnica da imuno-histoquímica, utilizando o sistema de dupla coloração, tem a capacidade de detectar simultaneamente dois antígenos tissulares diferentes em um mesmo corte de tecido.^[37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45]

Os anticorpos utilizados na imuno-histoquímica para demonstrar as células tumorais, ou seja, células epiteliais, são as citoqueratinas AE1/AE3.^[46] Essas têm sido utilizadas para a análise do linfonodo sentinela, na detecção de micrometástases.^[47, 48, 49, 38, 50, 51, 52]

O CD 34 é considerado um marcador vascular, e tem mostrado utilidade nos trabalhos que necessitam distinção do lúmen vascular.^[53, 54] Em uma análise feita por Speck NMG et al., utilizando o anticorpo anti-CD34 para avaliar a angiogênese em carcinoma de endométrio, observou-se que a identificação da estrutura vascular torna-se fácil, distinguindo-o facilmente de todos os demais elementos estromais.^[55]

A análise de invasão vascular no carcinoma mamário através da técnica imuno-histoquímica, associando os anticorpos para células epiteliais (pancitoqueratina AE1/AE3), e para células endoteliais (anti-CD34), com sistema de dupla-coloração, ainda não foi descrita na literatura. Essa técnica torna possível a visualização dos elementos tumorais e endoteliais, com colorações diferentes, no mesmo corte tecidual.

Baseado na hipótese que o duplo marcador aumente a sensibilidade e especificidade da detecção de invasão vascular, o objetivo principal deste estudo é detectar a presença de invasão vascular nas biópsias por agulha grossa de carcinoma de mama através da técnica por imuno-histoquímica com o duplo marcador para células endoteliais

(CD34) e para citoqueratinas (AE1/AE3). Os objetivos específicos consistem em analisar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do duplo marcador imuno-histoquímico e comparar sua acurácia com a técnica da coloração por H&E.

MÉTODO

a) Seleção de pacientes:

O presente estudo caracteriza-se como observacional, transversal e retrospectivo. Um total de 95 pacientes com carcinoma invasor de mama foi incluído neste trabalho, entretanto, 21 casos tiveram que ser excluídos por não preencherem adequadamente os critérios de inclusão ou por problemas no processamento do material durante o seu preparo. Foram estudadas 74 pacientes com carcinoma invasor de mama, tratadas com cirurgia para a doença, no Hospital Santa Rita e no Hospital Moinhos de Vento, em Porto Alegre, no período entre Janeiro de 2003 a Maio de 2005, que realizaram biópsias por agulha grossa para o diagnóstico da doença e que tinham o resultado anatomopatológico da cirurgia disponível. Os critérios de exclusão foram: realização de outras técnicas para o diagnóstico do câncer de mama (punção aspirativa, mamotomia, biópsia incisional ou excisional), carcinoma de mama no sexo masculino, realização de tratamentos neoadjuvantes (quimioterapia, radioterapia ou hormonioterapia), dados incompletos nos prontuários e ausência de tumor no material examinado.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Irmandade Santa Casa de misericórdia de Porto Alegre sob o protocolo nº 849/04.

b) Preparação do material:

Foram selecionados os blocos de parafina correspondentes às biópsias por agulha grossa dos 74 casos de carcinoma mamário e coletados os dados dos prontuários referentes à idade, tipo e tamanho tumoral, grau histológico, comprometimento de linfonodos axilares. Para o grupo controle utilizamos os resultados anatomopatológicos das cirurgias já existentes, que é considerado o padrão ouro para detecção de invasão vascular.

Os blocos de parafina, referentes às biópsias contendo tumor representativo, foram processados e corados no Laboratório de Patologia da Pós-graduação da FFFCMPA, com o duplo marcador imuno-histoquímico e com H&E, em lâminas separadas (Técnica descrita no Anexo I).

Foram submetidos a cortes de 3 micra de espessura com o micrótomo Leica RM2025, de acordo com os padrões já validados para experimentos científicos.^[4] Após confeccionadas as lâminas, procedeu-se à desparafinização e recuperação do antígeno com citrato de sódio pH6,0 em banho-maria a 92-95°C durante 40 minutos. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente por 20 minutos e iniciou-se a coloração das mesmas com a técnica imuno-histoquímica (IHC).

O método de IHC utilizado foi o sistema de dupla coloração Envision da DakoCytomation Código Nº K1395. Os anticorpos primários utilizados foram anti-CD34, na diluição 1:200 (Mouse anti-human, Dako, clone Q B End 10, cod M7165, lote 077), e pancitoqueratina AE1/AE3, na diluição 1:100 (Mouse monoclonal anti-human, Dako, clone AE1/AE3, cód M3515, lote 020). A diluição foi previamente testada baseada nos controles positivos e negativos com tecido amigdaliano, para a avaliação da eficácia do anticorpo primário.

O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 10.0.

Para avaliar a associação entre linfonodos com metástase e presença de invasão vascular foi aplicado o teste qui-quadrado de Pearson.

Para comparar a idade entre os linfonodos metastáticos ou não e entre invasão vascular presente ou não foi utilizado o teste t.

RESULTADOS

Os resultados são referentes aos 74 casos de carcinoma mamário do tipo invasor que realizaram biópsia por agulha grossa para diagnóstico da patologia, no período entre Janeiro de 2003 a Maio de 2005 e foram submetidas a tratamento cirúrgico. A idade média das pacientes foi de 58,1 anos, com desvio padrão de + 14 anos. A média de idade entre as pacientes com e sem invasão vascular foi 56,8 e 59,1 anos, respectivamente. A média de tamanho tumoral foi de 2,7cm (0,2-11cm) e do número de linfonodos acometidos de 3,5. Três casos foram descritos como tumores multicêntricos. O tamanho tumoral médio no grupo com invasão vascular foi 3,1cm, e no grupo sem invasão foi 2,3 cm. Quanto ao número de linfonodos metastáticos, o grupo com invasão vascular mostrou uma média de 6,3 linfonodos acometidos, contrastando com o grupo sem invasão, com 1,2 linfonodos acometidos. Houve dois casos com micrometástases, correspondendo a 2,7% da amostra.

A caracterização da amostra quanto ao tipo de cirurgia realizada, metástases axilares tipo e grau tumoral está demonstrada na Tabela 1.

O estadiamento patológico dos tumores distribuiu-se da seguinte forma: I 27%, IIa 33,8%, IIb 23%, IIIa 14,9% e IIIb 1,3% (Gráfico 1). O número médio de fragmentos das biópsias foi de 5 (entre 3 e 7).

No Gráfico 2 está representada a distribuição da população estudada conforme a detecção de invasão vascular com as três técnicas: padrão ouro (cirurgia com H&E), biópsia com H&E e biópsia com IHQ. As Fotos 1, 2, 3 e 4 demonstram os cortes histológicos das biópsias por agulha grossa coradas pela técnica imuno-histoquímica utilizando o duplo marcador (CD34 e citoqueratina AE1/AE3).

Percebe-se, através do Gráfico 2, que a análise da peça de cirurgia, com a coloração de H&E, por ser o teste considerado como padrão ouro para essa detecção, apresenta maior número de casos diagnosticados com invasão vascular que as outras técnicas. Tanto a biópsia corada com H&E, como com IHQ detectam números aproximados de casos com invasão vascular, mas a detecção é inferior ao padrão ouro.

De maneira geral, comparando-se as duas técnicas com o padrão ouro, em relação à detecção de invasão vascular, a que mais se aproximou dos valores reais foi a coloração com H&E, o que pode ser visto na Tabela 2. A especificidade foi a mesma nos dois testes e os outros valores foram superiores na técnica com H&E, porém sem significância estatística. Ambos os testes não apresentaram resultados satisfatórios na sensibilidade e especificidade.

O teste com H&E nas biópsias demonstrou sensibilidade de 38,2%, comparado com o padrão ouro, especificidade de 77,5%, valor preditivo positivo (VPP) de 59,1%, valor preditivo negativo (VPN) de 59,6%, kappa 0,162 e p 0,140. O teste com IHQ nas biópsias apresentou sensibilidade de 29,4%, especificidade de 77,5%, VPP de 52,6%, VPN de 56,4%, kappa 0,071 e p 0,498 (Tabela 2).

No Gráfico 3 encontramos a associação entre invasão vascular, detectada nas cirurgias com H&E, e o comprometimento dos linfonodos axilares por metástases. Podemos perceber que os casos com metástases nos linfonodos axilares apresentam uma frequência maior de invasão vascular (85,3%) comparado aos casos sem metástases (14,7%).

Após estratificação dos grupos por presença ou ausência de metástases axilares, como pode ser visto nas Tabela 3 e 4, nos casos com metástases axilares o teste com IHQ persistiu com resultados inferiores ao H&E, quando comparados ao padrão ouro (H&E nas cirurgias). Nos casos sem metástases axilares, o duplo marcador mostrou-se superior quanto à especificidade (82,4%), como está demonstrado na Tabela 4. Entretanto, no restante dos casos, a coloração com H&E ainda é o método de melhor acurácia, apesar de não demonstrar bons resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN.

A média de idade para os casos com metástases axilares foi de 57,9 anos (DP + 13,6) e para os casos sem metástases foi de 58,7 anos (DP +14,4), com p 0,916. A média de idade para os casos com e sem invasão vascular detectada nas cirurgias com H&E foi 56,9 anos (DP +12,8) e 59,1 anos (DP +15), respectivamente (p 0,494).

DISCUSSÃO

A invasão vascular é considerada um fator prognóstico no carcinoma de mama para recorrência locorregional, sobrevida global e sobrevida livre de doença.^[59, 60, 61, 62] Está presente em, aproximadamente, 28% a 59% dos casos, conforme referências da literatura.^[63, 64, 65] No presente estudo, encontramos invasão vascular em 45,9% da população estudada, compatível com a literatura.

As características da população estudada não diferem das publicações que investigam fatores prognósticos através de técnicas imuno-histoquímicas para carcinoma

de mama. A média de faixa etária foi 58,1 anos e o carcinoma ductal invasor foi o tipo de carcinoma mais freqüente (83,8%), concordando com os dados disponíveis.^[3,9,67,68] A média de idade das pacientes com invasão vascular não diferiu significativamente da média geral (56,8 anos), assim como o tipo e o grau tumoral mais freqüentes (carcinoma ductal invasor e grau II).^[3, 9, 66, 67, 68] Na mesma população, a média de tamanho dos tumores (2,7cm) e do número de linfonodos acometidos (3,5) também estão de acordo com os resultados descritos na literatura.^[1, 17, 39]

O diagnóstico do carcinoma mamário, no Brasil, ainda ocorre em estágios mais avançados.^[1] Entretanto, neste estudo, foi verificada uma freqüência alta de diagnóstico nos estágios iniciais I e II (83,8%), provavelmente devido aos critérios de exclusão dos casos com tumores maiores de 5cm que realizaram tratamento neoadjuvante como primeira opção. Portanto, pacientes com estágio III, considerado avançado, esteve presente em apenas 12 casos (16,2%) submetidos à cirurgia como tratamento inicial. Apesar do diagnóstico ter sido de tumores menores, observou-se uma percentagem de mastectomias de 63,2%, provavelmente pelo número de tumores entre 3cm e 5cm, tumores multicêntricos ou de localização central na mama, cuja indicação para a cirurgia radical inclui esses fatores citados na decisão do tratamento.^[80]

A utilização da técnica de imuno-histoquímica nas biópsias por agulha grossa para investigar fatores prognósticos tem sido descrita em vários estudos.^[73, 74, 75, 76, 77] Badoual e colaboradores descreveram a comparação entre os achados da biópsia por agulha grossa e da cirurgia na determinação dos fatores prognósticos do câncer de mama. Constataram que houve concordância entre as duas técnicas em 73,6% tanto para o diagnóstico do carcinoma como para a caracterização do tipo tumoral. O grau histológico e a determinação dos receptores hormonais também mostraram-se com boa concordância.^[73] Em um outro trabalho, com 500 pacientes, foi constatado que a determinação da invasão

vascular através das duas técnicas (biópsia por agulha grossa e a ressecção cirúrgica) concordou em 69% dos casos, sendo que o maior problema para análise dos fatores prognósticos pela técnica da biópsia por agulha grossa é a quantidade limitada de material, que pode não representar adequadamente as características do tumor.^[74] No entanto, Sharifi et al. não encontraram concordância na detecção de invasão vascular entre as duas técnicas.^[76]

Através do presente estudo, constatou-se que a invasão vascular não é descrita na maioria dos laudos anatomopatológicos das biópsias por agulha grossa, mesmo quando presente. A principal razão pode estar relacionada às amostras escassas de material disponível para H&E, técnica essa que não permite a distinção inequívoca do lúmen vascular e do tumor.

Quanto ao uso da dupla coloração por imuno-histoquímica, existem poucos casos de estudos com carcinoma mamário na literatura. Barbareschi utilizou marcadores vasculares CD31 e fator VIII para avaliar a presença de invasão vascular em casos de carcinoma ductal invasor.^[72] Prasad et al. associaram o uso de citoqueratina e da actina derivada de músculo-liso para diferenciar células malignas de células mioepiteliais.^[78] Anos mais tarde, Kidogawa e colaboradores utilizaram AgNORs e MIB-1 em 42 casos submetidos a cirurgia de carcinoma mamário para determinar a atividade proliferativa do tumor.^[71]

A descrição do uso específico da dupla-coloração com CD34 e da pancitoqueratina AE1/AE3 não está relatada na literatura disponível, tanto para a mama quanto para outras patologias. Entretanto a utilização da imuno-histoquímica com o CD34 tem ocorrido na investigação de angiogênese tumoral^[70] e as citoqueratinas têm sido utilizadas para a detecção de tumores epiteliais.^[47, 48] A constatação da falta de estudos nesta área e a

crescente importância da invasão vascular como fator prognóstico foram os principais motivadores deste trabalho.

A invasão vascular tem sido investigada, na prática atual, através da técnica da coloração por H&E. Entretanto, por ser um método subjetivo, nem sempre permite a clara distinção entre o lúmen vascular e o tumor, dificultando, assim, seu valor clínico. Faz-se necessário desenvolver ou testar novos métodos de avaliação da presença de invasão vascular.

Um dos achados importantes do presente estudo é que a invasão vascular teve forte correlação com as metástases axilares (85,3%), embora ocorra uma parcela de casos com invasão vascular, mas sem metástases linfonodais (14,7%). Quanto ao número de linfonodos metastáticos, o grupo com invasão vascular teve uma média de 6,3 linfonodos acometidos, contrastando com o grupo sem invasão, com 1,2 linfonodos acometidos. Este resultado demonstra, como já está descrito na literatura, a importância da invasão vascular como um fator independente de pior prognóstico.^[64, 69]

Um estudo realizado por Woo et al. mostrou que a invasão vascular esteve associada à queda significativa da sobrevida em doze anos, mesmo quando as metástases axilares estavam ausentes ($p < 0.001$).^[63] O número de gânglios axilares envolvidos está diretamente associado a pior sobrevida^[80], portanto, mesmo sem a disponibilidade de informação das pacientes, neste estudo, quanto à sobrevida, constatou-se uma correlação significativa entre a detecção de invasão vascular e os achados de metástases ganglionares. Em outra publicação feita por Lee foi constatada a presença de invasão linfo-vascular em 19% dos casos, através da coloração por H&E, num total de 2760 peças cirúrgicas de pacientes operadas por carcinoma mamário invasor e sem metástases axilares, confirmando os achados deste estudo (14,7%). Demonstrou ainda que esta invasão esteve associada a

tumores e grau histológico maiores, além da idade jovem. A diferença na sobrevida esteve associada à presença ou ausência de invasão vascular.^[79]

Comparando-se os grupos estudados com e sem invasão vascular, percebe-se que não houve diferença significativa quanto ao tamanho tumoral (3,1cm x 2,3cm, respectivamente), o grau histológico e a idade (56,8 x 59,1 anos).

O padrão ouro para a detecção de invasão vascular é realizado no exame anatomopatológico da peça cirúrgica com coloração por H&E. A técnica com duplo marcador, onde se discrimina o endotélio vascular do tumor, através da presença de cores (rosa e marrom), não se mostrou superior ao H&E. A principal explicação para esse resultado é que a amostra tumoral não é adequada para análise dos fragmentos de biópsia. É necessário que quantidade mais representativa do tumor seja avaliada pra que possamos dar o diagnóstico fidedigno a respeito da presença ou ausência de invasão vascular. Isso nos leva a concluir que somente o exame da peça cirúrgica pode fornecer dados completos dos fatores prognósticos referentes ao tumor. A biópsia por fragmento apresenta falhas, principalmente se for considerada para determinação de detalhes qualitativos, como é o caso da invasão vascular.

Na análise dos casos sem metástases axilares, a IHC com o duplo marcador, mostrou-se superior quanto à especificidade, entretanto, no restante dos casos com metástases, a coloração com H&E ai

de mama e sem metástases axilares. Foi constatada a relação direta entre a invasão vascular e a queda na sobrevida.^[79]

Concluindo, a principal hipótese que surge, baseado nos resultados desse estudo é que, no material proveniente das cirurgias, o duplo marcador (IHC) talvez apresente melhores resultados, pois, como já foi demonstrado anteriormente, podemos distinguir claramente células tumorais de células endoteliais com a técnica da dupla coloração. Entretanto, tendo em vista o alto custo deste teste, sua aplicabilidade torna-se restrita. Talvez essa técnica sirva como um auxiliar no caso de dúvidas quanto aos casos falso-positivos com o H&E, quando os artefatos estão presentes como fatores confusionais para a adequada análise.

Torna-se necessário a investigação da aplicabilidade do duplo marcador na análise das peças cirúrgicas ou de maior número de fragmentos da biópsia, através de novos estudos, pois, para a abordagem adequada do tratamento do câncer de mama, o estudo prévio dos marcadores prognósticos tumorais traz informações preciosas, pois alia uma técnica com maior especificidade para os casos com invasão vascular, reduzindo a complexidade do tratamento e os custos a ele relacionados .

CONCLUSÃO

A biópsia por agulha grossa com a coloração por H&E foi a técnica que apresentou melhores resultados para a detecção de invasão vascular no câncer de mama comparado à imuno-histoquímica com o duplo marcador, apesar dos resultados não serem semelhantes ao teste considerado padrão ouro (ressecção cirúrgica com coloração de H&E).

Apenas nos casos sem metástases axilares o duplo marcador imuno-histoquímico apresentou maior especificidade.

A hipótese desse estudo é que o duplo marcador imuno-histoquímico apresenta melhores resultados no material proveniente da ressecção cirúrgica e também em amostras mais representativas das biópsias, com maior número de fragmentos. Entretanto, tendo em vista o alto custo desse te



3) Cowen D, Houvenaeghel G, Jacquemier J et al. Local recurrences after conservative treatment of breast cancer: risk factors and influence on survival. *Cancer Radiotherapy*. 1998 Sep-Oct;2(5):460-8.

4) Cowen D, Jac

JJ2646 Th

- 10) Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Annals of Surgery*. 2004; 240(2):306-312.

- 11) White J, Moughan J, Pierce LJ et al. Status of postmastectomy radiotherapy in the United States: a patterns of care study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Sep 1;60(1):77-85.

- 12) Ragaz J, Spinelli J, Speers C et al. Adverse impact of lymphangitic and vascular invasion (LVI) in early breast cancer: results from the British Columbia (BC) breast cancer outcome unit. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;76(42 Suppl. 1); abstract 119.

- 13) Kuru B, Camlibel M, Ali Gulcelik M, Alagol H. Prognostic factors affecting survival and disease-free survival in lymph node-negative breast carcinomas. *J Surg Oncol*. 2003 Jul;83(3):167-72.

- 14) Katz A, Strom EA, Buchholz TA et al. The influence of pathologic tumor characteristics on locoregional recurrence rates following mastectomy. *J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Jul 1;50(3):735-42.

- 15) Ollila DW, Stitzenberg KB. Breast cancer sentinel node metastases: histopathologic detection and clinical significance. *Cancer Control*. September/October 2001, Vol. 8, No.5 pg 407-414.

- 16) Neri A, Marrelli D, Roviello F et al. Prognostic value of extracapsular extension of axillary lymph node metastases in T1 to T3 breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005 Mar;12(3):246-53.
- 17) Chia SK, Speers CH, Bryce CJ et al. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22(9): 1630-1637.
- 18) National Institutes of Health. Adjuvant therapy for breast cancer. NIH Consensus Statement. 2000; vol 17, pp 1-23.
- 19) Goldhirsch A, Glick J, Gelber R et al. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001; 19:3817-3827.
- 20) Gruber G, Berclaz G, Altermatt HJ, Greiner RH. Can the addition of regional radiotherapy counterbalance important risk factors in breast cancer patients with extracapsular invasion of axillary lymph node metastases? *Strahlenther Onkol*. 2003 Oct;179(10):661-6.
- 21) Harris JR, Halpin-Murphy P, McNeese M et al. Consensus Statement on postmastectomy radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:989-990.
- 22) Kurtz J. The curative role of radiotherapy in the treatment of operable breast cancer. *European Journal of Cancer*.2002; 38:1961-1974.

- 23) Instituto Nacional do Câncer (INCA). Controle do câncer de mama. Documento de consenso. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicacoes/Consensointegra.pdf>> Acesso em 20 abr. 2005.
- 24) Pierce LJ. The use of radiotherapy after mastectomy: a review of the literature. *J Clin Oncol.* 2005; 23:1706-1717.
- 25) Schnitt JS, Guidi AJ. Pathology and biological markers of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. *Diseases of the Breast.* 2st ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 2002; p.540-42.
- 26) Kronowitz SJ, Robb GL. Breast reconstruction with postmastectomy radiation therapy: current issues. *Plast Reconstr Surg.* 2004 SEP 15; 114(4): 950-60.
- 27) Losken A, Carlson GW, Schoemann MB et al. Factors that influence the completion of breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2004 MAR 01; 52(3): 258-61.
- 28) Leal PL, Caetano M, Palma CL, et al. Reconstrução imediata de mama:avaliação das pacientes operadas no Instituto Nacional de Câncer no período de junho de 2001 a junho de 2002. *Revista Brasileira de Mastologia.* 2003; Vol. 13 – nº 4 – pg 149-58.
- 29) Hussien M, Salah B, Malyon A, Wieler-Mithoff EM. The effect of radiotherapy on the use of immediate breast reconstruction. *Eur J Surg Oncol.* 2004 Jun;30(5):490-4.

- 30) Tallet AV, Salem N, Moutardier V et al. Radiotherapy and immediate two-stage breast reconstruction with a tissue expander and implant: complications and esthetic results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Sep 1;57(1):136-42.
- 31) Fodor J, Gulyas G, Polgar C, Major T, Kasler M. Radiotherapy and breast reconstruction: the issue of compatibility. *Orv Hetil.* 2003 Mar 23;144(12):549-55.
- 32) Soong IS, Yau TK, Ho CM et al. Postmastectomy radiotherapy after immediate autologous breast reconstruction in primary treatment of breast cancers. *Clin Oncol.* 2004; 16:283-289.
- 33) Mehta V, Goffinet D. Postmastectomy radiation therapy after TRAM flap breast reconstruction. *Breast J.* 2004; 10:118-122.
- 34) Ananian P, Protiere C, Tallet A, Arnaud S et al. Breast reconstruction after mastectomy for breast cancer: which reconstructive surgical procedure should be retained? *Ann Chir.* 2004 May;129(4):192-202.
- 35) Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 1994 Mar; 12(3):454-66.
- 36) Gasparini G, Meli S, Panizzoni GA et al. Peritumoral lymphatic vessel invasion compared with DNA ploidy, proliferative activity, and other pathologic features as prognostic indicators in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992 Mar; 20 (3):195-204.

- 37) Antibody Hotline, technical questions, antibody location service. Monoclonal antibody to endothelial cells (CD34). Disponível em: www.acris-antibodies.com. Acesso em: 12 abr. 2005.
- 38) Pargaonkar AS, Beissner RS, Snyder S, Speights VO. Evaluation of immunohistochemistry and multiple-level sectioning in sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2003 Jun;127(6):701-5.
- 39) Guedes JM, Macéa JR, Rinaldi JF. Quantificação dos linfonodos axilares obtidos em cirurgias para câncer na mama e sua correlação com dados terapêuticos e variáveis epidemiológicas. *Revista Brasileira de Mastologia*. 2004- vol. 14, número 4,. pg135-141.
- 40) Vandesande F. Immunohistochemical double staining techniques. In: Cuello AC (ed.). *Immunohistochemistry*. New York: John Wiley & Sons 1983:257
- 41) Van der Loos CM, et al. Practical suggestions for successful immunoenzyme double-staining experiments. *Histochem J* 1993; 25:1
- 42) Boorsma DM. Direct immunoenzyme double staining applicable for monoclonal antibodies. *Histochem* 1984; 80:103
- 43) Pastore JN, et al. A rapid immunoenzyme double labeling technique using EPOS reagents. *J Histotech* 1995; 18(1):35

- 44) Campbell GT and Bhatnagar AS. Simultaneous visualization by light microscopy of two pituitary hormones in a single tissue section using a combination of indirect immunohistochemical methods. *J Histochem Cytochem* 1976; 24(2):448
- 45) Van der Loos CM, et al. An immunoenzyme triple-staining method using both polyclonal and monoclonal antibodies from the same species. Application of combined direct, indirect, and avidin-biotin complex (ABC) technique. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(11):1199
- 46) Rodney TM. Cytokeratin AE1/AE3. *The Focus Immunohistochemistry*. 2003 November. Disponível em: < <http://www.propathlab.com>>. Acesso em 20 abril de 2005.
- 47) Lerwill MF. Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. *American Journal of Surgical Pathology*. 2004; 28(8): 1076-1091.
- 48) Czerniecki BI, Scheff AM, Callans LS et al. Immunohistochemistry with pancytokeratins improves the sensitivity of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 1999;85:1098-1103.
- 49) Stitzenberg KB, Calvo BF, Iacocca MV et al. Cytokeratin immunohistochemical validation of the sentinel node hypothesis in patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2002 May;117(5):729-37.

- 50) Mason DY and Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol* 1978; 31:454
- 51) Van Noorden S, et al. Localization of human pituitary hormones by multiple immunoenzyme staining procedures using monoclonal and polyclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1986; 34(3):287
- 52) Heras A, et al. Enhanced polymer detections system for immunohistochemistry. *Lab Invest* 1995; 72(1):165A
- 53) Fina L, Molgaard HV, Robertson D et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 2417-26.
- 54) Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2001 February 1; 15: 1-13.
- 55) Speck NMG, Focchi J, Alves AC et al. Relação entre Angiogênese e Estádio no Carcinoma do Endométrio The Relationship between Endometrial Adenocarcinoma Staging and Angiogenesis. *RBGO* - v. 25, nº 6, 2003.
- 56) Cowen D, Houvenaeghel G, Jacquemier J et al. Local recurrences after conservative treatment of breast cancer: risk factors and influence on survival. *Cancer Radiotherapy*. 1998 Sep-Oct;2(5):460-8.

- 57) Eisenberg ALA, Koifman S, Rezende LMMC et al. Predictive Factors to lymph node involvement on breast cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2001; 47(4): 389-96.
- 58) Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G. et al. Fatores prognósticos em câncer de mama linfonodo negativo. Revisão de estudos com amostra superior a 200 e seguimento acima de 5 anos. *Ann Surg*. 2002; 235(1):10-26.
- 59) Ministério da Saúde. Normas e recomendações do Ministério da Saúde. Controle do câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2004; 50 (2) 77-90.
- 60) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL et al. *Robbins Pathologic basis of disease*. 7th ed., Saunders, Philadelphia, 2004:985-93.
- 61) Akishima Y, Ito K, Zhang L et al. Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. *Virchows Arch*. 2004 Feb; 444(2): 153-7.
- 62) Mokbel KM, Parris CN, Ghilchik M, Amerasinghe CN, Newbold RF. Telomerase activity and lymphovascular invasion in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2000, 26(1):30-3.
- 63) Davis BW, Gelber R, Goldhirsch A et al. Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Hum Pathol* 1987;18(1):79.

- 64) Woo CS, Silberman H, Nakamura SK et al. Lymph node status combined with lymphovascular invasion creates a more powerful tool for predicting outcome in patients with invasive breast cancer. *The American Journal of Surgery* 2002; 184:337–340.
- 65) Gupta A, Deshpande CG, Badve S. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer*. 2003 May 1;97(9):2341-7.
- 66) Viale G, Maiorano E, Pruneri G et al. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Annals of Surgery*. 2005 February; 241(2): 319-325.
- 67) Westenend PJ. Tumour size and vascular invasion predict distant metastasis in stage I breast cancer. Grade distinguishes early and late metastasis. *J Clin Pathol*. 2005 FEB 01; 58(2): 196-201.
- 68) Buchholz TA, Strom EA, Perkins GH. Controversies regarding the use of radiation after mastectomy in breast cancer. *The Oncologist*. 2002 Dec; Vol. 7, No. 6, 539–546.
- 69) Chia SK, Speers CH, Bryce CJ et al. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22(9): 1630-1637.
- 70) Sankey, E.A.; More, L.; Dhillon, A.P. A new immunostain for the routine diagnosis of Kaposi's sarcoma. *J Pathol*.1990; 161: 267-71.

71) Kidogawa, H.; Nanashima, A.; Yano, H. et al. Clinical significance of double staining of MIB-1 and AgNORs in primary breast carcinoma. *Anticancer Res.* 2005 Nov-Dec;25(6B):3957-62.

72) Barbareschi, M.; Dalla Palma, P.; Bevilacqua, P. et al. Invasive node-negative breast carcinoma: multivariate analysis of the prognostic value of peritumoral vessel invasion compared with that of conventional clinic-pathologic features. *Anticancer Res.* 1994 Sep-Oct;14(5B):2229 -35.

73) Badoual, C.; Maruani, A.; Ghorra, C. et al. Pathological prognostic factors of invasive breast carcinoma in ultrasound-guided large core biopsies-correlation with subsequent surgical excisions. *Breast.* 2005 Feb;14(1):22-7.

74) Harris, G.C.; Denley, H.E.; Pinder, S.E. et al. Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2003 Jan;27(1):11-5.

75) Denley, H.; Pinder, S. E.; Elston, C. W. et al. Preoperative assessment of prognostic factors in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2001 Jan; 54 (1): 20-4.

76) Sharifi, S.; Peterson, M.K.; Baum, J.K. et al. Assessment of pathologic prognostic factors in breast core needle biopsies. *Mod Pathol.* 1999 Oct;12(10):941-5.

77) Connor, C.S.; Tawfik, O.W.; Joyce, A.J. et al. A comparison of prognostic tumor markers obtained on image-guided breast biopsies and final surgical specimens. *Am J Surg.* 2002 Oct;184(4):322-4.

78) Prasad, M.L.; Hyjek, E.; Giri, D.D. et al. Double immunolabeling with cytokeratin and smooth-muscle actin in confirming early invasive carcinoma of breast. *Am J Surg Pathol.* 1999 Feb;23(2):176-81.

79) Lee, A.H.; Pinder, S.E.; Macmillan, R.D. et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005 Dec. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>>. Acesso em: 27/12/2005.

80) Harris, J.R.; Lippman, M.E.; Morrow, M.; Osborne, C.K. *Doenças da Mama.* 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 2002. p.621-34.

ANEXO (ARTIGO EM PORTUGUÊS)

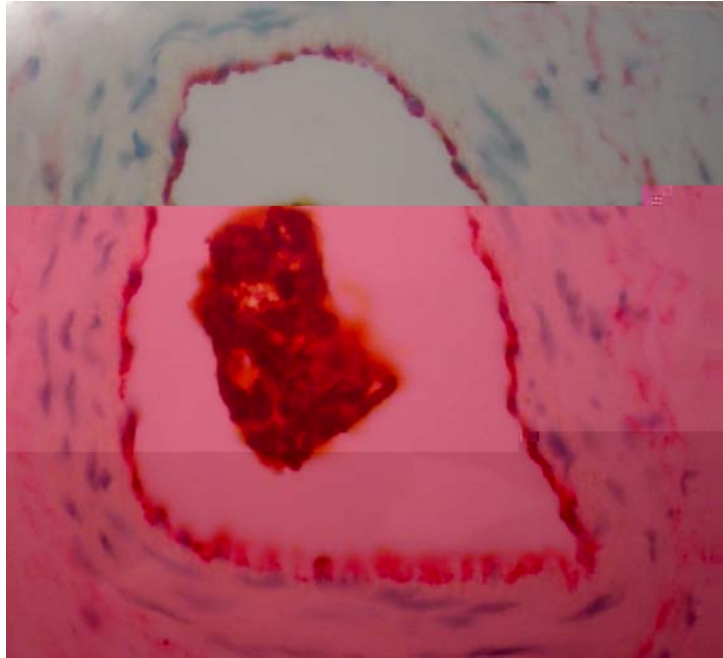


Figura 1. Biópsia por agulha grossa de carcinoma de mama. Coloração com duplo marcador IHQ. Demonstração de invasão vascular com êmbolo tumoral (marrom) no interior do vaso (rosa).

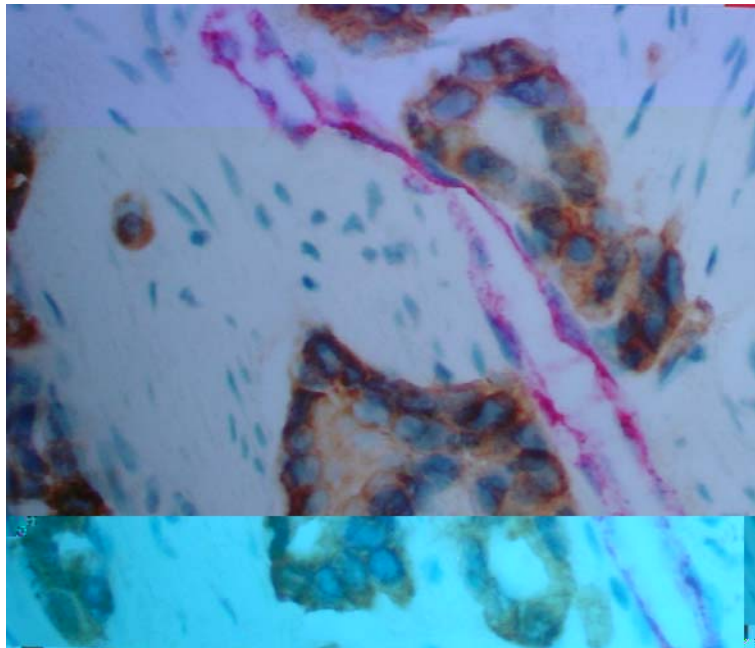


Figura 2. Biópsia por agulha grossa de carcinoma de mama. Coloração com duplo marcador IHQ. Demonstra ausência de invasão vascular. Tumor (marrom) e vaso (rosa) paralelos.

Tabela 1. Caracterização da amostra.

Características	Número de pacientes	%
Tipo de cirurgia		
Mastectomia c/ LA	47	63,2
Setorectomia c/ LA	24	32,4
Setorectomia c/ LNS	3	4
Metástase axilar		
Sim	35	47,3
Não	39	52,7
Tipo de tumor		
CDI	62	83,8
CLI	2	2,7
CDI/CLI	2	2,7
Medular	1	1,4
Metaplásico	1	1,4
Mucinoso	3	4,1
Tubular	3	4,1
Grau tumoral		
1	6	9,8
2	30	49,2
3	25	41

LA: linfadenectomia axilar; LSN: linfonodo sentinela; CDI: carcinoma ductal invasor; CLI: carcinoma lobular invasor

Gráfico 1. Estadiamento das pacientes estudadas.

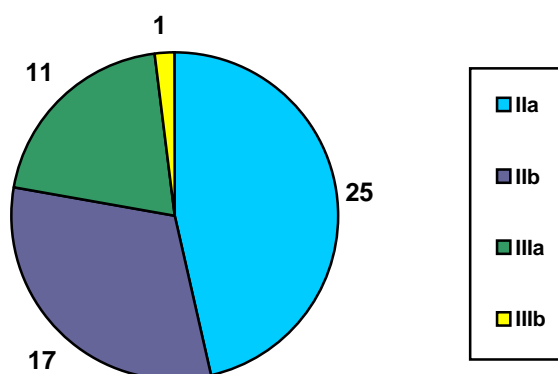


Gráfico 2. Distribuição dos casos conforme detecção de invasão vascular nas três técnicas estudadas.

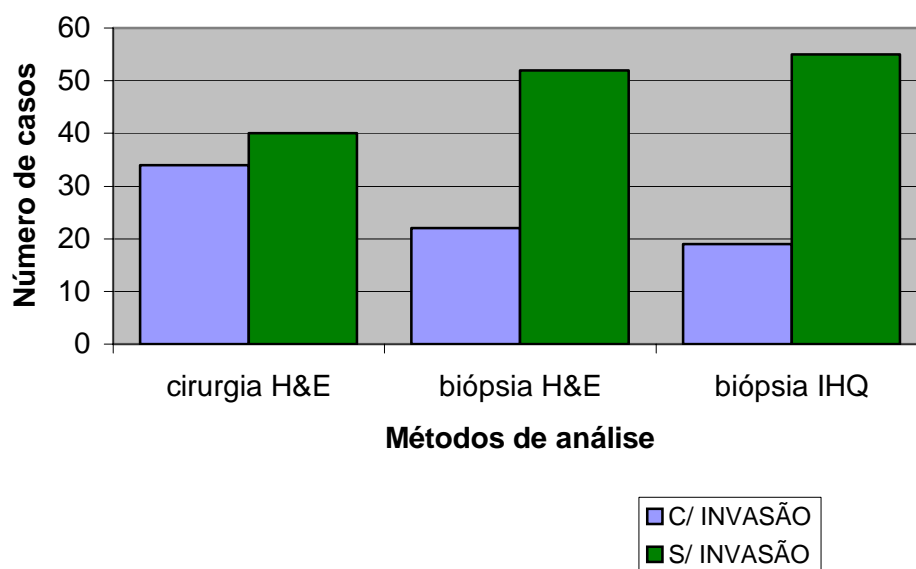


Tabela 2. Análise dos testes com H&E e IHC nas biópsias quando comparados ao padrão ouro (cirurgias com H&E).

	H&E biópsia	IHC biópsia
Sensibilidade	13/34 (38,2%)	10/34 (29,4%)
Especificidade	31/40 (77,5%)	31/40 (77,5%)
VP+	13/22 (59,1%)	10/19 (52,6%)
VP-	31/52 (59,6%)	31/55 (56,4%)
Kappa	0,162	

Gráfico 3. Associação entre invasão vascular, detectada nas cirurgias com H&E (padrão ouro), e metástases axilares.

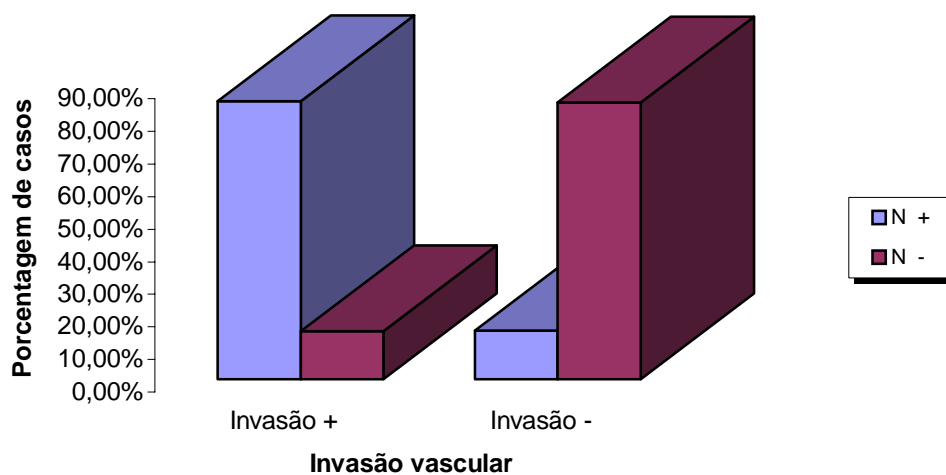


Tabela 3. Análise de sensibilidade e especificidade dos testes nos casos com metástase em linfonodos axilares.

	H&E biópsia	IHC biópsia
Sensibilidade	10/29 (34,5%)	9/29 (31%)
Especificidade	4/6 (66,7%)	3/6 (50%)
VP+	10/12 (83,3%)	9/12 (75%)
VP-	4/23 (17,4%)	3/23 (13%)
Kappa	0,005	-0,089
<i>p</i>	0,957	0,373

VP+: valor preditivo positivo; VP-: valor preditivo negativo

Tabela 4. Análise de sensibilidade e especificidade dos testes nos casos sem metástase em linfonodos axilares.

	H&E biópsia	IHC biópsia
Sensibilidade	3/5 (60%)	1/5 (20%)
Especificidade	27/34 (79,4%)	28/34 (82,4%)
VP+	3/10 (30%)	1/7 (14,3%)
VP-	27/29 (93,1%)	4/32 (12,5%)
Kappa	0,276	0,020
<i>p</i>	0,060	0,898

VP+: valor preditivo positivo; VP-: valor preditivo negativo

ABSTRACT

Purposes: To detect blood vessel invasion in breast cancer core-biopsies through the immunohistochemical double staining technique with CD34 and pancytokeratin AE1/AE3; to analyze the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of this technique and to compare the accuracy of double staining with the hematoxylin-eosin technique.

Method: 74 specimens of breast cancer core-biopsies were analyzed. Patients underwent a surgical treatment between January 2003 and May 2005 at Santa Rita Cancer Hospital or Moinhos de Vento Hospital. Core-biopsy specimens were stained with immunohistochemical (IHC) double staining and with hematoxylin-eosin(H&E) in different slides for blood vessel invasion research. The staining system used was the DakoCytomation EnVision Doublestain System and the primary antibodies used were anti-CD34 and pancytokeratin AE1/AE3. For the control group, we used anatomopathological results from previous surgeries considered the gold standard for the detection of blood vessel invasion. Data about patients and tumor characteristics were collected from hospital records.

Results: The mean age of patients with invasive breast cancer was 58.1 (SD14). The mean tumor diameter was 2.7cm (0.2-11cm) and the mean number of metastatic axillary lymph nodes was 3.5. Three cases were multicentric. Invasive ductal carcinoma and histological grade 2 were the most frequent types (83.8% and 49.2% respectively). Axillary metastases were present in 47.3% of the cases. Pathological stages were distributed in: I 20/74 cases (27%), IIa 25/74 cases (33.8%), IIb 17/74 cases (23%), IIIa 11/74 cases (14.9%) e IIIb 1/74 cases (1.3%). The mean number of core-biopsy fragments was five (3-7). According to the gold standard (results of surgeries), 34 patients (45.9%) presented blood vessel invasion. IHC and H&E tests were compared with the gold standard test, which refers to the results

obtained in surgery specimens, colored with H&E. The H&E test showed 38.2% of sensitivity, 77.5% of specificity, 59.1% of positive predictive value (PPV), 59.6% negative predictive value (NPV), kappa 0.162, and $p= 0.140$. In the IHC test sensitivity, specificity, PPV and NPV were 29.4%, 77.5%, 52.6%, 56.4%, respectively. Kappa was 0.071 and $p= 0.498$. In cases of metastatic axillary lymph node, IHC sensitivity was of 31% and H&E, 34.5%. In the same group, specificity was of 50% with IHC test and of 66.7% with H&E test, PPV 75% x 83.3% and NPV 13% x 17.4%, kappa -0.089 x 0.005 and $p= 0.373$ x 0.957 in IHC and H&E tests, respectively. In cases without metastatic axillary lymph node, specificity was higher in the IHC test (82.4% x 79.4%); however, all the other values were lower.

Conclusion: In this study, the H&E provided the best results compared with IHC regarding the detection of blood invasion in core-biopsies breast cancer. In cases without metastatic axillary lymph node, immunohistochemical double staining proved to be superior regarding sensitivity; however, in the other cases, the H&E test is still the most accurate method, although it does not show good results in terms of sensitivity, specificity, PPV and NPV. Considering the low density of core-biopsy specimens, our hypothesis is that IHC double staining would be the best choice when used in specimens of surgeries or in core-biopsy with abundant sample of tissue. However, due to high cost of this test, its use must be restricted to those cases in which it is important to clear doubts arisen due to the existence of factors that cause confusion, harming the analysis.

INTRODUCTION

Breast cancer is considered one of the most frequent causes of morbidity and mortality in the world. According to data from the INCA (National Institute of Cancer), the estimation for 2005 in Brazil is of 49,470 new cases, which means 53 cases for every 100,000 women. ^[1]

Mortality increased by 80% in the last 20 years in the state of Rio Grande do Sul. Although late diagnosis is considered one of the reasons for high mortality, it is necessary that new studies investigate the natural history of this disease and new treatments indicated for this specific kind of tumor. ^[1]

The assessment of prognos

processing of the material, can also raise doubts regarding the presence of the actual blood vessel invasion. [35, 36]

The immunohistochemical technique using the double staining system is capable of detecting simultaneously two different tissue antigens in the same specimen. [37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45]

The antibodies used by the immunohistochemical technique to demonstrate epithelial cells (tumor cells) are Cytokeratin AE1/AE3. [46] They have been used by physicians to analyze the sentinel lymph node in an attempt to detect micrometastases by verifying the presence of epithelial cells in the lymph node. For being a sensitive epithelial marker, they proved to be superior to the hematoxilina-eosin in this case. [47, 48, 49, 38, 50, 51, 52]

CD 34 is considered a vascular marker and it has proved useful when a distinction of vessel lumen is required. [53, 54] Speck NMG et al. used antibody CD34 to analyze angiogenesis in endometrial cancer. They observed that this technique facilitates the identification of the vessel structure. [55]

The analysis of vessel invasion in breast cancer by immunohistochemical double staining with primary antibodies CD34 and pancytokeratins AE1/AE3 has not yet been described in publications. This technique renders possible the detection of tumor cells and vessel cells in the same specimen.

Based on the hypothesis that double marker can increase sensibility and specificity in detection of blood vessel invasion, the aims of this study are to detect vessel invasion in core-biopsies of breast cancer through the immunoistochemical double staining system (CD34 and cytokeratins AE1/AE3); to analyze the sensibility, specificity, positive and negative predictive values with this technique and to compare the accuracy of the double staining system with the hematoxylin-and-eosin (H&E) method.

METHOD

a) Selection of patients:

This study is observational, cross-sectional and retrospective. A total of 95 patients were included in this study; however, 21 cases had to be excluded due to problems in the selection or in the processing of the material during the preparations. The study comprised 74 patients with invasive breast cancer who underwent surgery for the disease at Santa Rita Hospital or at Moinhos de Vento Hospital, in Porto Alegre, between January 2003 and May 2005. All of them underwent a core-biopsy to the diagnosis of breast cancer. Excluded cases were: other techniques for the diagnosis of breast cancer (needle aspiration, mammotomy biopsy, incisional or excisional biopsy), breast cancer in male patients, neoadjuvant treatment (chemotherapy, radiotherapy or hormonal therapy), incomplete data in the records or absence of tumor in the selected specimens.

This study was approved by the Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre's Committee of Ethics (protocol # 849/04).

b) Preparation of the material:

The tissues embedded in paraffin from the core-biopsies were selected. Besides, data from hospital records concerning tumor age, type and size, histological stage and damage of axillary lymph node was collected. For the control group we used the anatomopathological results from previous surgeries. It is considered the gold standard for the detection of vessel invasion.

The tissues embedded in paraffin from the core-biopsies were processed and stained at the Laboratory of Pathology from the FFFCMPA graduate program. The

specimens were stained with immunohistochemical double marker and with hematoxylin-eosin in separate slides.

Immunohistochemistry was performed with 3-micrometer sections according to the standards validated in published scientific experiments. ^[4] After the confection of slides, we proceeded to de-paraffinization and antigen recovery, carried out with sodium citrate at pH6,0 in a 92-95°C immersion bath for 40 minutes. It cooled at room temperature for 20 minutes and then the staining procedure was conducted according to the instructions from the DakoCtomation laboratory.

The immunohistochemical method used was the Dakocytomation EnVision Doublestain System Code N° K1395. Primary antibodies used were anti-CD34, at 1:200 dilution (Mouse anti-human, Dako, clone Q B End 10, code M7165, allotment 077), and pan cytokeratin AE1/AE3, at 1:100 dilution, (Mouse monoclonal anti-human, Dako, clone AE1/AE3, code M3515, allotment 020). The concentration of antibodies was tested based on positive and negative controls with tonsil tissue.

c) Analysis of specimens:

An experienced pathologist and the author, who ignored the previous anatomopathological results, made the interpretation of slides.

The optical microscope Olympus BX40, with 400x zoom was used. First, we analyzed the slices with biopsies stained by immunohistochemistry, and then those stained with hematoxylin-eosin.

The histological results of surgeries were established as gold standard. In 46 cases the results were interpreted by the pathologist of this study, and in 28 cases the interpretation was made by the pathologists from Santa Casa Hospital.

The qualitative method was used for the interpretation of results. The criterion to define positive blood vessel invasion was the presence of tumor (in brown) inside the vessel (in rose). It must be possible to see the whole circumference of the vessel. ^[4] This is demonstrated in pictures 1,2,3 and 4.(ANNEX)

d) Statistical analysis:

Quantitative variables were described by mean and standard deviation.

The qualitative variables were described through absolute and relative frequencies.

The concordance between the diagnosis tests was evaluated by the kappa coefficient.

The sensitivity and specificity analyses were carried out with the aim of evaluating the accuracy of H&E and double staining (IHC) tests.

The level of significance adopted was of 5% and the analyses were carried out at the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) program, version 10.0.

In order to evaluate the connection between lymph nodes with metastasis and the presence of vessel invasion, the Pearson chi-square test was employed.

In order to compare the age between metastatic or non-metastatic lymph nodes and between the presence or absence of vessel invasion, the test t was used.

RESULTS

The results refer to 74 patients with breast cancer who underwent a core-biopsy between January 2003 and May 2005. All of them underwent a surgery at the two surveyed institutions. General aspects are represented in Tables 1. The mean age was 58.1 (standard deviation + 14 years old). The mean ages among patients with vessel invasion and without

vessel invasion were 56.8 and 59.1, respectively. The average tumor size was 2.7cm (0,2-11cm) and the mean number of axillary lymph nodes with metastasis was 3.5. Three cases were described as multicentric tumors. The mean tumor diameter in the group with vessel invasion was 3.1cm, and 2.3 cm in the group without vessel invasion. The group with vessel invasion showed an average of 6.3 axillary metastatic lymph nodes, whereas the other group had only 1.2 nodes in average. Two cases had micrometastases (2.7%).

Pathological stages were distributed in: I 20/74 cases (27%), IIa 25/74 cases (33.8%), IIb 17/74 cases (23%), IIIa 11/74 cases (14.9%) e IIIb 1/74 cases (1.3%), described in Graph 1. The mean number of fragments of core-biopsies was 5 (between 3 and 7).

Graph 2 represents the distribution of the population studied according to the detection of vessel invasion with the tree techniques: gold standard (surgery with H&E staining) (34/40), core-biopsy with H&E staining (22/52) and core-biopsy with IHC staining (19/55). Pictures 1, 2, 3 and 4 show the specimens from core-biopsy with double IHC staining (CD34 and cytokeratin AE1/AE3).

In Graph 2 it's possible to realize that gold standard (surgery with H&E staining) presents greater number of detection of vessel invasion than the other techniques. Core-biopsy with H&E staining and core-biopsy with IHC staining presents similar number of detection of vessel invasion.

Table 2 shows the aspects regarding sensitivity, specificity and predictive values of the two techniques for the detection of vessel invasion. They were compared with the gold standard (surgeries with H&E staining). Core-biopsies with H&E staining had a sensitivity of 38.2%, specificity of 77.5%, positive predictive value

displayed a sensitivity of 29.4%, specificity of 77.5%, PPV of 52.6%, NPV of 56.4%, kappa 0.071 and p 0.498.

Graph 3 shows the association between vessel invasion, detected in surgeries with H&E staining, and metastasis of axillary lymph nodes. Cases with metastasis of axillary lymph nodes had a higher frequency of vessel invasion (85,3%) compared to cases without metastasis (14,7%).

Tables 3 and 4 show the results from the tests in the groups with and without axillary metastasis.

In cases with axillary metastases, shown in Table 3, the IHC test, compared with H&E test of core-biopsies, presented IHC test either shown worst results than H&E test. In cases without axillary metastases specificity was higher in IHC test (82.4% x 79.4%); however, all the other results were lower, seen in Table 4.

The mean age in cases presenting axillary metastasis was 57.9 (SD + 13.6) and 58.7 in cases without metastasis (SD +14.4), $p=0,916$. The mean age in cases with and without vessel invasion was 56.9 (SD +12,8) and 59.1 (SD +15), respectively ($p=0.494$).

DISCUSSION

Vessel invasion is considered a prognostic factor in breast cancer for failure locoregional, global survival and disease-free survival. ^[59, 60, 61, 62] It is present in 28% to 59% of breast cancer cases. ^[63, 64, 65] In this study vessel invasion was present in 45.9% of the cases.

The characteristics of population in this study are similar to the studies that investigate prognostic factors and immunohistochemistry techniques to breast cancer. The

With this study it was possible to notice that vessel invasion isn't described in most of anatomopathological results of core-biopsies. The main reason seem to be the difficult to analyse with H&E a little specimen of tumor.

The use of double staining is described in a few cases of breast cancer in literature. ^[72] Barbareschi, M. et al. (1999) tested vessel markers (CD31 and factor VIII) to analyse the presence of vessel invasion in invasive ductal breast cancer. ^[72] Kidogawa, H. et al. (2005) used AgNORs and MIB-1 to determinate proliferative activity of tumor in 42 cases that were submitted to surgery for breast cancer. ^[71] Prasad, M.L. et al. (1999) tested cytokeratin and smooth-muscle actin to distinguish malignant cells from the mioepithelial cells. ^[78]

The use of immunohistochemistry double staining with CD34 and pancytokeratin AE1/AE3 wasn't find in literature. CD34 has been used to investigate tumoral angiogenesis. ^[70] Cytokeratins are common used to detect epithelial tumors. ^[47, 48]

Vessel invasion has been investigated by H&E technique. However, with H&E technique isn't possible to distinguish adequately the vessel lumen and the tumor because all these structures are color by pink.

Vessel invasion is more frequently detected in cases with axillary metastasis (85.3%), according to the results from graph 2; however, there are also cases without metastasis but with vessel invasion (14.7%). In a study conducted by Woo CS et al., 2002, vessel invasion was associated with a significant twelve-year reduction in survival, despite the absence of axillary metastases (89% x 80%, $P < 0.0001$). The study also indicated a worse prognostic in cases involving axillary metastasis (70% x 51%, $p < 0.001$). ^[63] Another publication of Lee, A. H. et al. (2005) demonstrated vessel invasion in 19% of cases in 2760 patients with invasive breast cancer and without axillary metastases. In this study,

vessel invasion was associated with young age, with bigger diameter tumors and with higher histological grade. Difference in survival was associated with vessel invasion.^[79]

There was no difference between the groups with and without vessel invasion regarding tumor diameter (3.1cm in the group with vessel invasion and 2.3 cm in the group without vessel invasion). However, the group with vessel invasion had more metastatic axillary lymph nodes than the group without vessel invasion (mean of 6.3 x 1.2 respectively). This result stresses the importance of vessel invasion as a factor of worst prognostic, as demonstrated in many studies.^[64, 69]

As a general rule, when the two techniques are compared to the gold standard regarding the detection of vessel invasion, H&E had better results than IHC, even after the reduction of the subjectivity with ICH double marker that allow to distinguish clearly the colors of vessel and tumor (pink and brown, respectively).The main reason is that the fragments of core-biopsy are not sufficient to the adequately analysis. It's necessary to analyze specimens more representative of tumor to give a fair

Based on the showed results, the main hypothesis of this study is that ICH with double staining will show better results if tested in surgical specimens or in biopsies with abundant sample of tissue. However, considering the high costs of this technique, its use should be restrict to the false-positive cases that need a confirmation when the artifacts are present and confuse the pathologist affecting an accurate analysis.

It's necessary to investigate the applicability of double staining on surgical specimens and in core-biopsy with more fragments based on the importance to determinate prognostic factors of tumor to define the best treatment to each case. When we use a technique with high specificity to detect the cases with vessel invasion we can reduce the complexity of treatment and its costs.

CONCLUSION

H&E staining in core-biopsies was the test that presented the best results compared to the IHC test in the detection of vessel invasion of breast cancer.

Only in cases without axillary metastases the IHC test with double staining showed higher specificity.

The H&E test is also better than the IHC test to analyze fragments of core-biopsy, despite the results not being similar to those of the gold standard (H&E test in specimens of surgery).

Due to the scarcity of histological tissue from core-biopsy, the hypothesis of this study is that the ICH double staining has better results on the material deriving from surgeries and in material more numerous of core-biopsy. However, since this test is very expensive, its applicability is very restrict. Maybe this technique is useful as an aid in cases

in which there are doubts concerning the H&E test because of the presence of many confusing factors that damage the analysis.

REFERENCES

- 1) Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2005. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/conteudo_view.asp?ID=3>. Acesso em 20 abr. 2005.
- 2) Chadha M, Chabon AB, Friedmann P et al. Predictors of axillary metastases in patients with T1 breast cancer. A multivariate analysis. *Cancer* 1994; 73:350-3.
- 3) Cowen D, Houvenaeghel G, Jacquemier J et al. Local recurrences after conservative treatment of breast cancer: risk factors and influence on survival. *Cancer Radiotherapy*. 1998 Sep-Oct;2(5):460-8.
- 4) Cowen D, Jacquemier J, Houvenaeghel G et al. Local and distant recurrence after conservative management of "very low-risk" breast cancer are dependent events: a 10-year follow-up. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998 Jul 1;41(4):801-7.
- 5) Fein DA, Fowble BL, Hanlon AL et al. Identification of women with T1-T2 breast cancer at low risk of positive axillary nodes. *J Surg Oncol* 1997; 65:34.

- 6) Harden SP, Neal AJ, AL-NASIRI N AS et al. Predicting axillary lymph node metastases in patients with T1 infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Breast*. 2001 Apr;10(2):155-9.
- 7) Mc Gee JM, Youmans R, Clingan F et al. The value of axillary dissection in T1a breast cancer. *Am J Surg*. 1996; 172:501.
- 8) Dias EN, Caleffi, M, Silva HMS et al. Fatores prognósticos do câncer de mama - importância clínica. *Mastologia Atual*. 1º ed., Rio de Janeiro Revinter,1994; 281-86.
- 9) Wallgren A, Bonetti M, Gelber RD et al. Risk factors for locoregional recurrence among breast cancer patients: results from International Breast Cancer Study Group Trials I through VII. *J Clin Oncol*. 2003 Apr 1;21(7):1205-13.
- 10) Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Annals of Surgery*. 2004; 240(2):306-312.
- 11) White J, Moughan J, Pierce LJ et al. Status of postmastectomy radiotherapy in the United States: a patterns of care study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Sep 1;60(1):77-85.

- 12) Ragaz J, Spinelli J, Speers C et al. Adverse impact of lymphangitic and vascular invasion (LVI) in early breast cancer: results from the British Columbia (BC) breast cancer outcome unit. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;76(42 Suppl. 1); abstract 119.

- 13) Kuru B, Camlibel M, Ali Gulcelik M, Alagol H. Prognostic factors affecting survival and disease-free survival in lymph node-negative breast carcinomas. *J Surg Oncol.* 2003 Jul;83(3):167-72.

- 14) Katz A, Strom EA, Buchholz TA et al. The influence of pathologic tumor characteristics on locoregional recurrence rates following mastectomy. *J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Jul 1;50(3):735-42.

- 15) Ollila DW, Stitzenberg KB. Breast cancer sentinel node metastases: histopathologic detection and clinical significance. *Cancer Control.* September/October 2001, Vol. 8, No.5 pg 407-414.

- 16) Neri A, Marrelli D, Roviello F et al. Prognostic value of extracapsular extension of axillary lymph node metastases in T1 to T3 breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2005 Mar;12(3):246-53.

- 17) Chia SK, Speers CH, Bryce CJ et al. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22(9): 1630-1637.

- 18) National Institutes of Health. Adjuvant therapy for breast cancer. NIH

Consensus Statement. 2000; vol 17, pp 1-23.

19) Goldhirsch A, Glick J, Gelber R et al. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19:3817-3827.

20) Gruber G, Berclaz G, Altermatt HJ, Greiner RH. Can the addition of regional radiotherapy counterbalance important risk factors in breast cancer patients with extracapsular invasion of axillary lymph node metastases? *Strahlenther Onkol.* 2003 Oct;179(10):661-6.

21) Harris JR, Halpin-Murphy P, McNeese M et al. Consensus Statement on postmastectomy radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:989–990.

22) Kurtz J. The curative role of radiotherapy in the treatment of operable breast cancer. *European Journal of Cancer.*2002; 38:1961–1974.

23) Instituto Nacional do Câncer (INCA). Controle do câncer de mama. Documento de consenso. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicacoes/Consensointegra.pdf>> Acesso em 20 abr. 2005.

24) Pierce LJ. The use of radiotherapy after mastectomy: a review of the literature. *J Clin Oncol.* 2005; 23:1706-1717.

- 25) Schnitt JS, Guidi AJ. Pathology and biological markers of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. Diseases of the Breast. 2st ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 2002; p.540-42.
- 26) Kronowitz SJ, Robb GL. Breast reconstruction with postmastectomy radiation therapy: current issues. *Plast Reconstr Surg.* 2004 SEP 15; 114(4): 950-60.
- 27) Losken A, Carlson GW, Schoemann MB et al. Factors that influence the completion of breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2004 MAR 01; 52(3): 258-61.
- 28) Leal PL, Caetano M, Palma CL, et al. Reconstrução imediata de mama:avaliação das pacientes operadas no Instituto Nacional de Câncer no período de junho de 2001 a junho de 2002. *Revista Brasileira de Mastologia.* 2003; Vol. 13 – nº 4 – pg 149-58.
- 29) Hussien M, Salah B, Malyon A, Wieler-Mithoff EM. The effect of radiotherapy on the use of immediate breast reconstruction. *Eur J Surg Oncol.* 2004 Jun;30(5):490-4.
- 30) Tallet AV, Salem N, Moutardier V et al. Radiotherapy and immediate two-stage breast reconstruction with a tissue expander and implant: complications and esthetic results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Sep 1;57(1):136-42.
- 31) Fodor J, Gulyas G, Polgar C, Major T, Kasler M. Radiotherapy and breast reconstruction: the issue of compatibility. *Orv Hetil.* 2003 Mar 23;144(12):549-55.

- 32) Soong IS, Yau TK, Ho CM et al. Postmastectomy radiotherapy after immediate autologous breast reconstruction in primary treatment of breast cancers. *Clin Oncol.* 2004; 16:283-289.
- 33) Mehta V, Goffinet D. Postmastectomy radiation therapy after TRAM flap breast reconstruction. *Breast J.* 2004; 10:118-122.
- 34) Ananian P, Protiere C, Tallet A, Arnaud S et al. Breast reconstruction after mastectomy for breast cancer: which reconstructive surgical procedure should be retained? *Ann Chir.* 2004 May;129(4):192-202.
- 35) Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 1994 Mar; 12(3):454-66.
- 36) Gasparini G, Meli S, Panizzoni GA et al. Peritumoral lymphatic vessel invasion compared with DNA ploidy, proliferative activity, and other pathologic features as prognostic indicators in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992 Mar; 20(3):195-204.
- 37) Antibody Hotline, technical questions, antibody location service. Monoclonal antibody to endothelial cells (CD34). Disponível em: www.acris-antibodies.com. Acesso em: 12 abr. 2005.

- 38) Pargaonkar AS, Beissner RS, Snyder S, Speights VO. Evaluation of immunohistochemistry and multiple-level sectioning in sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2003 Jun;127(6):701-5.
- 39) Guedes JM, Macéa JR, Rinaldi JF. Quantificação dos linfonodos axilares obtidos em cirurgias para câncer na mama e sua correlação com dados terapêuticos e variáveis epidemiológicas. *Revista Brasileira de Mastologia*. 2004- vol. 14, número 4,. pg135-141.
- 40) Vandesande F. Immunohistochemical double staining techniques. In: Cuello AC (ed.). *Immunohistochemistry*. New York: John Wiley & Sons 1983:257
- 41) Van der Loos CM, et al. Practical suggestions for successful immunoenzyme double-staining experiments. *Histochem J* 1993; 25:1
- 42) Boorsma DM. Direct immunoenzyme double staining applicable for monoclonal antibodies. *Histochem* 1984; 80:103
- 43) Pastore JN, et al. A rapid immunoenzyme double labeling technique using EPOS reagents. *J Histotech* 1995; 18(1):35
- 44) Campbell GT and Bhatnagar AS. Simultaneous visualization by light microscopy of two pituitary hormones in a single tissue section using a combination of indirect immunohistochemical methods. *J Histochem Cytochem* 1976; 24(2):448

- 45) Van der Loos CM, et al. An immunoenzyme triple-staining method using both polyclonal and monoclonal antibodies from the same species. Application of combined direct, indirect, and avidin-biotin complex (ABC) technique. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(11):1199
- 46) Rodney TM. Cytokeratin AE1/AE3. *The Focus Immunohistochemistry*. 2003 November. Disponível em: < <http://www.propathlab.com>>. Acesso em 20 abril de 2005.
- 47) Lerwill MF. Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. *American Journal of Surgical Pathology*. 2004; 28(8): 1076-1091.
- 48) Czerniecki BI, Scheff AM, Callans LS et al. Immunohistochemistry with pancytokeratins improves the sensitivity of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 1999;85:1098-1103.
- 49) Stitzenberg KB, Calvo BF, Iacocca MV et al. Cytokeratin immunohistochemical validation of the sentinel node hypothesis in patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2002 May;117(5):729-37

52) Heras A, et al. Enhanced polymer detections system for immunohistochemistry. *Lab Invest* 1995; 72(1):165A

53) Fina L, Molgaard HV, Robertson D et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 2417-26.

54) Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2001 February 1; 15: 1-13.

55) Speck NMG, Focchi J, Alves AC et al. Relação entre Angiogênese e Estádio no Carcinoma do Endométrio The Relationship between Endometrial Adenocarcinoma Staging and Angiogenesis. *RBGO* - v. 25, nº 6, 2003.

56) Cowen D, Houvenaeghel G, Jacquemier J et al. Local recurrences after conservative treatment of breast cancer: risk factors and influence on survival. *Cancer Radiotherapy*. 1998 Sep-Oct;2(5):460-8.

57) Eisenberg ALA, Koifman S, Rezende LMMC et al. Predictive Factors to lymph node involvement on breast cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2001; 47(4): 389-96.

58) Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G. et al. Fatores prognósticos em câncer de mama linfonodo negativo. Revisão de estudos com amostra superior a 200 e seguimento acima de 5 anos. *Ann Surg*. 2002; 235(1):10-26.

- 59) Ministério da Saúde. Normas e recomendações do Ministério da Saúde. Controle do câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2004; 50 (2) 77-90.
- 60) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL et al. *Robbins Pathologic basis of disease*. 7th ed., Saunders, Philadelphia, 2004:985-93.
- 61) Akishima Y, Ito K, Zhang L et al. Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. *Virchows Arch*. 2004 Feb; 444(2): 153-7.
- 62) Mokbel KM, Parris CN, Ghilchik M, Amerasinghe CN, Newbold RF. Telomerase activity and lymphovascular invasion in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2000, 26(1):30-3.
- 63) Davis BW, Gelber R, Goldhirsch A et al. Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Hum Pathol* 1987;18(1):79.
- 64) Woo CS, Silberman H, Nakamura SK et al. Lymph node status combined with lymphovascular invasion creates a more powerful tool for predicting outcome in patients with invasive breast cancer. *The American Journal of Surgery* 2002; 184:337–340.
- 65) Gupta A, Deshpande CG, Badve S. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer*. 2003 May 1;97(9):2341-7.

- 66) Viale G, Maiorano E, Pruneri G et al. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Annals of Surgery*. 2005 February; 241(2): 319-325.
- 67) Westenend PJ. Tumour size and vascular invasion predict distant metastasis in stage I breast cancer. Grade distinguishes early and late metastasis. *J Clin Pathol*. 2005 FEB 01; 58(2): 196-201.
- 68) Buchholz TA, Strom EA, Perkins GH. Controversies regarding the use of radiation after mastectomy in breast cancer. *The Oncologist*. 2002 Dec; Vol. 7, No. 6, 539–546.
- 69) Chia SK, Speers CH, Bryce CJ et al. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22(9): 1630-1637.
- 70) Sankey, E.A.; More, L.; Dhillon, A.P. A new immunostain for the routine diagnosis of Kaposi's sarcoma. *J Pathol*.1990; 161: 267-71.
- 71) Kidogawa, H.; Nanashima, A.; Yano, H. et al. Clinical significance of double staining of MIB-1 and AgNORs in primary breast carcinoma. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec;25(6B):3957-62.
- 72) Barbareschi, M.; Dalla Palma, P.; Bevilacqua, P. et al. Invasive node-negative breast carcinoma: multivariate analysis of the prognostic value of peritumoral vessel invasion

compared with that of conventional clinic-pathologic features. *Anticancer Res.* 1994 Sep-Oct;14(5B):2229 -35.

73) Badoual, C.; Maruani, A.; Ghorra, C. et al. Pathological prognostic factors of invasive breast carcinoma in ultrasound-guided large core biopsies-correlation with subsequent surgical excisions. *Breast.* 2005 Feb;14(1):22-7.

74) Harris, G.C.; Denley, H.E.; Pinder, S.E. et al. Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2003 Jan;27(1):11-5.

75) Denley, H.; Pinder, S.E.; Elston, C.W. et al. Preoperative assessment of prognostic factors in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2001 Jan;54(1):20-4.

76) Sharifi, S.; Peterson, M.K.; Baum, J.K. et al. Assessment of pathologic prognostic factors in breast core needle biopsies. *Mod Pathol.* 1999 Oct;12(10):941-5.

77) Connor, C.S.; Tawfik, O.W.; Joyce, A.J. et al. A comparison of prognostic tumor markers obtained on image-guided breast biopsies and final surgical specimens. *Am J Surg.* 2002 Oct;184(4):322-4.

78) Prasad, M.L.; Hyjek, E.; Giri, D.D. et al. Double immunolabeling with cytokeratin and smooth-muscle actin in confirming early invasive carcinoma of breast. *Am J Surg Pathol.* 1999Feb;23(2):176-81.

79) Lee, A.H.; Pinder, S.E.; Macmillan, R.D. et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2005 Dec. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>>. Acesso em: 27/12/2005.

80) Harris, J.R.; Lippman, M.E.; Morrow, M.; Osborne, C.K. *Doenças da Mama*. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 2002. p.621-34.

ANNEX

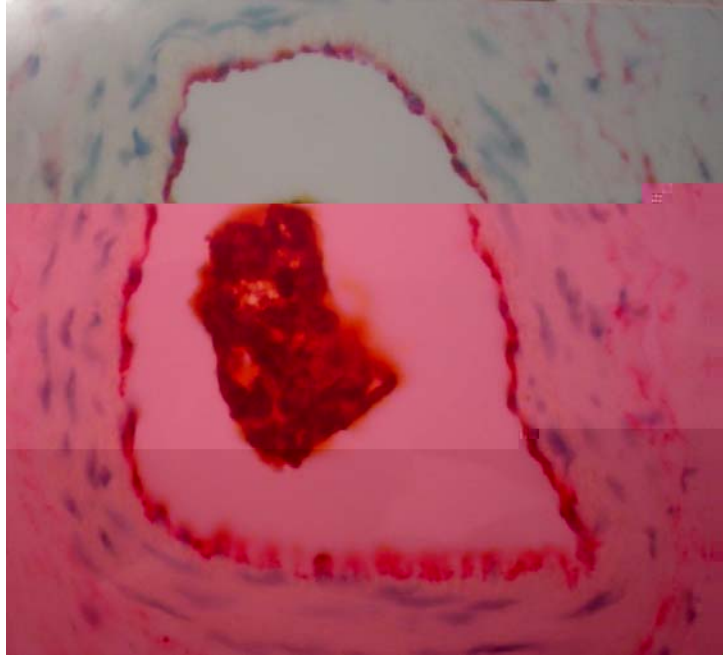


Figure 1. Core-biopsy of breast cancer with IHC double staining (CD34 and AE1/AE3). Tumor emboli (brown) and vessel (pink).

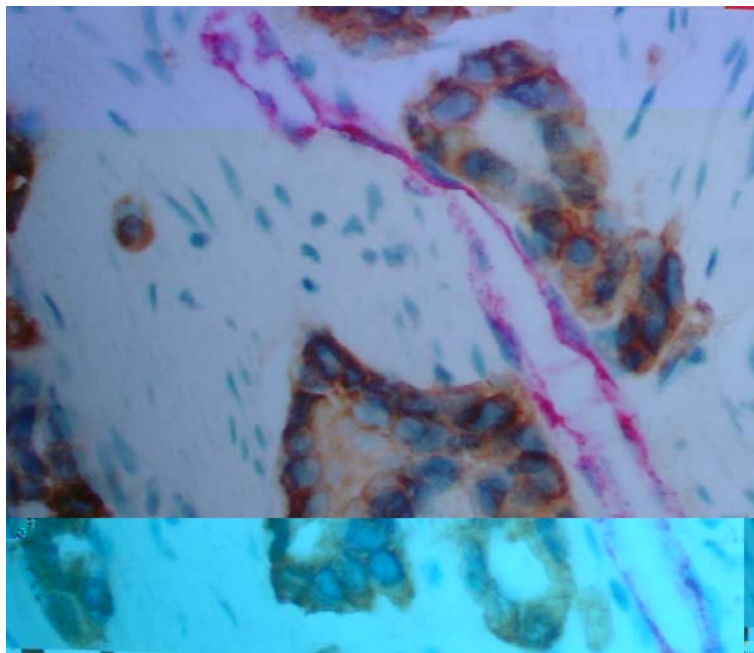


Figure 2. Core-biopsy of breast cancer with IHC double staining (CD34 and AE1/AE3). Without vessel invasion. Tumor (brown) and vessel (pink) parallel.

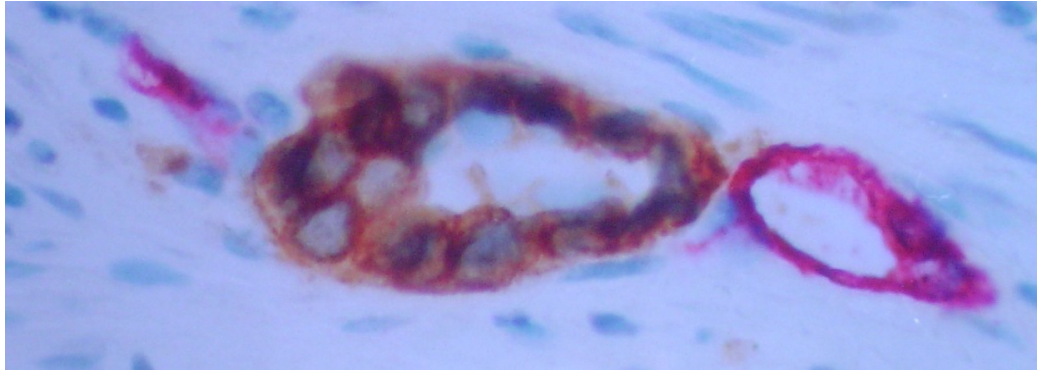


Figure 3. Core-biopsy of breast cancer with IHC double staining (CD34 and AE1/AE3). Without vessel invasion. Tumor (brown) and vessel (pink) parallel.

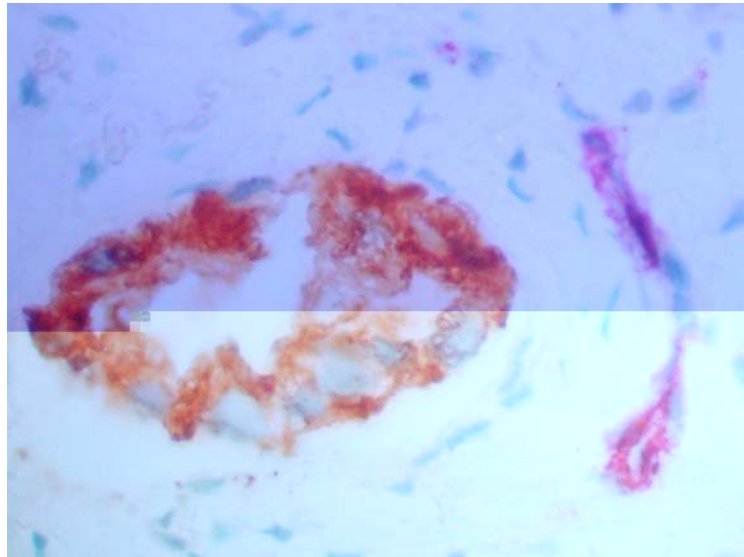


Figure 4 . Core-biopsy of breast cancer with IHC double staining (CD34 and AE1/AE3). Without vessel invasion. Tumor (brown) and vessel (pink) parallel.

Table 1. Characteristics of population.

Characteristics	Number of patients	%
Kind of surgery		
MRM	47	63,2
Breast conserving treatment	24	32,4
Breast conserving treatment and SNL	3	4
Axillary metastases		
Yes	35	47,3
No	39	52,7
Kind of tumor		
IDC	62	83,8
ILC	2	2,7
IDC/ILC	2	2,7
Medullary	1	1,4
Metaplastic	1	1,4
Mucinous	3	4,1
Tubular	3	4,1
Tumor grade		
1	6	9,8
2	30	49,2
3	25	41

MRM: modified radical mastectomy; SNL: sentinel lymph node biopsy; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma.

Graph 1. Stage of tumors.

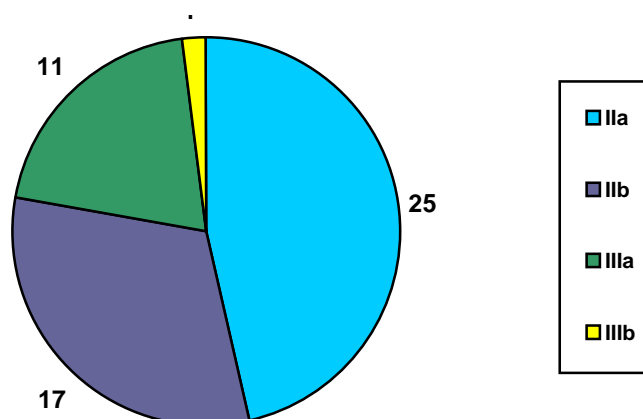




Table 4. Analysis of sensibility and specificity of the test in cases without axillary metastases.

	Core-biopsy H&E	Core-biopsy IHC
Sensibility	3/5 (60%)	1/5 (20%)
Specificity	27/34 (79,4%)	28/34 (82,4%)
PV+	3/10 (30%)	1/7 (14,3%)
PV-	27/29 (93,1%)	4/32 (12,5%)
Kappa	0,276	0,020
p	0,060	0,898

PV+: positive predictive value; PV-: negative predictive value

ANEXO I

TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA DA DUPLA COLORAÇÃO

A técnica foi desenvolvida de acordo com as seguintes etapas:

- 1) Etapa 1- Bloqueio de peroxidase: foi aplicado o Bloqueio de Peroxidase do frasco 1 nas lâminas preparadas, na quantidade suficiente para cobrir a amostra. Deixou-se incubando por 5 minutos. Após esse período, realizou-se o enxágüe suave das lâminas com solução tampão do frasco de lavagem.
- 2) Etapa 2- Anticorpo primário ou reagente controle negativo: Desprezou-se o excesso de tampão e enxugou-se as lâminas. Aplicou-se anticorpo primário pancitoqueratina AE1/AE3 em quantidade suficiente para cobrir as lâminas. Incubou-se durante 10 minutos e, a seguir, enxaguou-se como na etapa 1.
- 3) Etapa 3- Polímero marcado com peroxidase: desprezou-se o excesso de tampão e enxugou-se as lâminas como anteriormente. Aplicou-se o polímero marcado com HRP do frasco 2 o suficiente para cobrir as lâminas e, em seguida, incubou-se por 30 minutos. Enxaguou-se as lâminas como na etapa 1.
- 4) Etapa 4- Solução substrato-cromógeno (DAB+líquido): desprezou-se o excesso de tampão e enxugou-se as lâminas. Aplicou-se solução substrato-cromógeno o suficiente para cobrir as amostras e incubou-se durante 5 minutos. A seguir, enxaguou-se suavemente com água destilada do frasco de lavagem.
- 5) Etapa 5- Bloqueio de dupla-coloração: desprezou-se o excesso de água e enxugou-se as lâminas. Aplicou-se o bloqueio de dupla-coloração do frasco 4 em quantidade suficiente para cobrir as amostras. Incubou-se por 3 minutos e enxaguou-se as lâminas como na etapa 1.
- 6) Etapa 6- Anticorpo primário ou reagente controle negativo: desprezou-se o excesso de tampão e enxugou-se as lâminas. Aplicou-se o segundo anticorpo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)