
CHEN MING KUE

**RELAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSION DA PROTEÍNA MASPIN
EM CARCINOMAS DUCTAIS DE MAMA ESTÁDIOS I E II E O
ESTADO DOS LINFONODOS DA AXILA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Medicina.

São Paulo
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CHEN MING KUE

**RELAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSION DA PROTEÍNA MASPIN
EM CARCINOMAS DUCTAIS DE MAMA ESTÁDIOS I E II E O
ESTADO DOS LINFONODOS DA AXILA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Tocoginecologia
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Piato
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Antonieta L. G. da Silva

São Paulo
2010

**Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Chen, Ming Kue

Relação entre a imunexpressão da proteína maspin em carcinomas ductais de mama estádios I e II e o estado dos linfonodos da axila./ Chen Ming Kue. São Paulo, 2010.

Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Sebastião Piató

Co-Orientador: Maria Antonieta Longo Galvão da Silva

1. Carcinoma ductal de mama 2. Linfonodos 3. Axila 4. Serpinas
5. Inibidores de serino proteinase 6. Imunoistoquímica.

BC-FCMSCSP/56-10

DEDICATÓRIA

A minha amada esposa Wu, e aos meus filhos Victor Chen e Tiffany Le Chen, que foram muito compreensivos e pacientes no curso da feitura deste trabalho.

E, em especial, aos meus pais Chung Sir e Yip Cok (*in memoriam*), pelos sacrifícios dispensados aos meus irmãos e a mim e por investiram na valorização da educação e do amor, com seus belos exemplos, que procuramos transmitir aos nossos filhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Sebastião Piato, pela acolhida paternal no Curso de Pós-graduação, pelo interesse pela pesquisa, habilidade didática e rigor científico aplicado, que nortearam a orientação desta tese. Extremamente cuidadoso, implacável e virtuoso, estimulou-me e transmitiu-me os rumos a serem seguidos para obter os resultados adequados.

À Prof^a. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão da Silva, que prontamente atendeu nosso pedido para a prática da reação imunoistoquímica e forneceu as bases técnicas para este estudo.

AGRADECIMENTOS

À Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, na pessoa de seu Provedor, Dr. Kalil Rocha Abdalla.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa de São Paulo, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Ernani Geraldo Rolim.

Ao Prof. Dr. Carlos Elias Fristachi, pelas valiosas orientações e pelo estímulo para a realização deste trabalho.

Aos membros da Assembléia Geral, Associação de Voluntárias, Diretoria Administrativa e Diretoria Clínica, Corpo Clínico, funcionários do Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho, que me forneceram condições para a realização deste estudo.

Às funcionárias do Registro Geral e do Registro Hospitalar do Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho, Sra. Nilza Aparecida Souza Jorge e Sra. Jorgina Aparecida da Silva pelo auxílio na localização dos prontuários.

À funcionária do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho, Sta. Gislene Barroso Vigilato, pela ajuda na localização dos blocos parafinados destinados a este estudo.

Ao Prof. Daniel Kashiwamura Scheffei, pela orientação e logística nos cálculos de estatística.

Ao Prof. Dr. José Carlos Pascalicchio pela amizade, apoio logístico e incentivo ao trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da Santa de Misericórdia de São Paulo, pela ajuda na reação e fixação para o estudo das lâminas.

Aos funcionários da Biblioteca Central da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pela ajuda no levantamento bibliográfico.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelas novas amizades.

A todos os funcionários do Curso de Pós-Graduação, pela ajuda, carinho e simpatia durante o curso, em especial ao Daniel Gomes e a Sra. Priscile Valéria C. B. Foster.

Às pacientes, que se constituem no motivo para o aprimoramento de meus conhecimentos.

E, principalmente, ao meu Deus, pelo que possui e sou.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIF – *Apoptosis-inducing factor*
- Bax – *B-cell lymphoma 2 associated protein X*
- Bcl-2 – *B-cell lymphoma*
- DIABLO – *Direct IAP-binding protein with a low isoelectric point*
- EGF – *Epidermal growth factor*
- IARC – *International Agency for Research on Cancer*
- INCA – *Instituto Nacional do Câncer*
- MASPIN – *Mammary serine protease inhibitor*
- MDA-MB-435 – *American type culture collection*
- MEC – *Matriz extracelular*
- MMPs – *Matrix metalloproteases*
- PAI-1 e PAI-2 – *Plasminogen-activator inhibitor*
- rMaspin(i) – *Maspin recombinante*
- RT-PCR – *Reverse transcription-polymerase chain reaction*
- Serpin – *Serine protease inhibitor*
- setPA – *Single-chain tissue plasminogen activator*
- SMAC – *Second mitochondrial derived activator of caspases I*
- TIMP-1 e TIMP-2 – *Matrix metalloproteases inhibitor*
- uPA – *Urokinase-type plasminogen activator*
- WHO – *World Health Organization*
-

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Carcinogênese mamária	3
1.1.1 Fenômeno da apoptose	5
1.1.2 Desenvolvimento de metástases	7
1.2 Proteína maspin	11
1.3 Proteína maspin.e câncer de mama	12
1.3.1 Maspin e apoptose.....	12
1.3.2 Maspin e metástases.....	13
1.4 Revisão da literatura	16
2. OBJETIVO	17
3. CASUÍSTICA E MÉTODO	19
3.1 Casuística	20
3.2 Método	21
3.2.1 Confirmação histopatológica	21
3.2.2 Técnica da imunohistoquímica	22
3.2.2.1 Avaliação semiquantitativa da maspin.....	23
3.3 Análise estatística	28
4. RESULTADO	29
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	37
7. ANEXOS	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
FONTES CONSULTADAS	52
RESUMO	54
ABSTRACT	56
APÊNDICES	58

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia maligna mais freqüente no mundo, perdendo somente em incidência para o câncer de pele não melanoma. A *International Agency for Research on Cancer* da *World Health Organization* (IARC / WHO) estimou a ocorrência global de cerca de um milhão de casos de câncer de mama para 2008 (*World Cancer Report*, 2008). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde do Brasil, a estimativa para o ano de 2010 em nosso meio é de 49.240 novos casos dessa doença, com taxa bruta de 49,27 casos para 100 mil mulheres (INCA, 2010).

As taxas de mortalidade atribuídas ao câncer de mama persistem globalmente elevadas, apesar dos significativos avanços relacionados com estratégias preventivas e com o aprimoramento dos métodos para a obtenção do diagnóstico precoce da doença e para o seu tratamento. De acordo com a IARC / WHO foi estimada a ocorrência de aproximadamente 559 mil óbitos por câncer de mama no mundo no ano de 2008 (*World Cancer Report*, 2008).

Deve-se reconhecer que nas últimas décadas tem-se obtido melhores taxas de intervalo livre da doença e de sobrevida global em mulheres afetadas por câncer de mama, especialmente nos centros mais desenvolvidos. Persiste, contudo, a certeza de que serão alcançadas as metas ideais quanto à prevenção dessa neoplasia maligna e quanto à queda da mortalidade pela mesma somente à partir do momento em que estejam melhor esclarecidos os complexos mecanismos envolvidos nos seus estágios de iniciação, promoção e disseminação. Daí a

importância das pesquisas que se destinam à obtenção de conhecimentos relacionados com os complexos mecanismos envolvidos nos referidos estágios, no sentido de elucidar numerosos aspectos que permanecem obscuros (Steege, 2006).

Ao lado de tais investigações são desenvolvidos ensaios *in vitro*, experimentais e clínicos no sentido de identificar fatores biomoleculares que exercem atuação supressora do câncer de mama e que possam ser utilizados em estratégias de tratamento, especialmente aqueles que envolvem quimioterapia e terapêutica endócrina. Dentre tais fatores, a proteína maspin tem despertado significativo interesse, uma vez que alguns estudos têm evidenciado que a mesma atua de forma a inibir a proliferação das células neoplásicas e a disseminação do tumor.

No sentido de favorecer o entendimento da atuação da maspin na carcinogênese da mama tecemos considerações acerca de aspectos particulares dos eventos relacionados com a gênese, promoção e disseminação do câncer desse órgão.

1.1 Carcinogênese mamária

Tanto em relação à forma esporádica, que corresponde a 90-95% dos casos de câncer de mama, quanto àquela que tem caráter hereditário (familiar), a iniciação dessa neoplasia maligna tem estreita relação com fatores gênicos. Na forma hereditária o aparecimento do câncer decorre de mutações nucleotídicas perpetuadas na linhagem familiar pelas células germinativas (particularmente mutações dos genes BRCA-1 e BRCA-2), que atribuem suscetibilidade para o

aparecimento do tumor (Friedman et al, 1994; Simard et al, 1994; Shattuck-Eidens et al, 1995). Em relação à variedade esporádica, as alterações do DNA transcorrem durante o curso da vida e relacionam-se fundamentalmente com estilo de vida, hábitos reprodutivos e fatores ambientais (Johnson-Thompson, Guthrie, 2000).

Em ambas as variedades existem evidências de que nas etapas de iniciação, de promoção e de disseminação ocorre a participação de numerosas variáveis epigenéticas, principalmente aquelas vinculadas a ações autócrinas, parácrinas e endócrinas de moléculas regulatórias da promoção tumoral. Os conhecimentos atuais evidenciam que os mecanismos íntimos envolvidos nessa progressão apresentam extrema complexidade, envolvendo a atuação de hormônios, de peptídios e de numerosas outras moléculas (Dickson, 1996; Steeg, 2006).

No que se relaciona com a etapa de promoção do câncer mamário tem importante papel a proliferação celular. O ciclo celular torna-se ativado de forma mais ou menos intensa, na medida que fatores de crescimento, que se constituem em proto-oncogenes, ligam-se a receptores de membrana. Dentre tais fatores destacam-se aqueles da família *epidermal growth factor* (EGF), incluindo EGFR, Her-2 (c-erb-b2), Her-3 e Her-4 (Price et al, 2002). Outro fator biomolecular que tem participação comprovada na proliferação celular, tanto em tecido normal da mama quanto em tecido neoplásico desse órgão é o antígeno monoclonal Ki67 (Brown, Gatter, 1990; Goodson et al, 1998). Tem-se constatado que a maior expressão desta molécula se dá na fase G2/M (Verheijen et al, 1989; Dettmar et al, 1997).

Por fim, na história natural do câncer mamário ocorre o transporte pelas vias linfática e sanguínea das células neoplásicas provenientes do tumor primário, com a

possibilidade do desenvolvimento de metástases em linfonodos ou em estruturas e órgãos distantes (Fisher et al, 1983; De Freitas et al, 1991; Silverstein et al, 1994; Barth et al, 1997).

Com o propósito de esclarecer o comportamento diferentemente agressivo da neoplasia, numerosos pesquisadores têm-se dedicado ao estudo dos eventos relacionados com o fenômeno da apoptose, que tem importante papel no controle da proliferação das células neoplásicas do tumor primário, e com os complexos mecanismos envolvidos na perda da adesão célula-célula e na motilidade celular, que participam no desenvolvimento de metástases (Nicholson, 1991; MacDonald, Steeg, 1993; Tooney et al, 1993; Fazioli, Blasi, 1994; Kerr et al, 1994; Ellis et al, 1997; Zhang et al, 1997; Cavallaro et al, 2002; Amarante-Mendes, 2003; Wang et al, 2006).

Na seqüência expomos os mecanismos relacionados com o fenômeno da apoptose e aqueles envolvidos na perda da adesão entre as células neoplásicas e na motilidade celular por ocasião da formação de tumores secundários, uma vez que investigações têm demonstrado que a atuação da proteína maspin no câncer de mama se dá por ocasião desses eventos, conforme assinalamos à frente.

1.1.1 Fenômeno da apoptose

A apoptose, que é também conhecida pela denominação morte celular programada, tem como fatores desencadeantes algumas formas de estresse na intimidade da célula. O fenômeno caracteriza-se por série de eventos, que culminam com a fragmentação celular nos chamados corpos apoptóticos. Num primeiro momento ocorre condensação da cromatina e degradação do DNA genômico em fragmentos oligonucleossomais. As outras alterações que se seguem à morte da

célula consistem em perda do volume e aumento da granulosidade celular, manutenção da estrutura das organelas e formação de pregas na membrana plasmática (Hengarstner, 2000; Amarante-Mendes, 2003; Grivicich et al, 2007).

A apoptose caracteriza-se por mudanças bioquímicas mediadas por caspases, que consistem em proteinases da família da cisteinil aspartase-específica (Wang et al, 2006). As vias envolvidas no processo de apoptose são a intrínseca, também denominada mitocondrial, e a extrínseca ou de membrana. A primeira dessas vias é desencadeada por danos intra ou extracelulares, que ocasionam desacoplamento da cadeia respiratória das mitocôndrias. Este fato leva à liberação de Smac / DIABLO (*second mitochondrial derived activator of caspases / AP-binding protein with a low isoelectric point*) e de AIF (*apoptosis-inducing factor*). Atuando sobre as mitocôndrias, estes fatores ocasionam a liberação da proteína pró-apoptótica Bax (Hengarstner, 2000; Grivicich et al, 2007).

A via extrínseca inicia-se com a ligação de receptores localizados na superfície celular, denominados receptores de morte (*death receptors*). A estimulação dos mesmos resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras, como a FADD, as quais associam a esses receptores as caspases. O complexo formado por determinado receptor de morte, moléculas adaptadoras e caspases é conhecido como apoptossomo iniciador. A partir do momento em que tal complexo atua sobre células neoplásicas, as mesmas entram em estado catalítico ativo, caracterizando-se o fenômeno da apoptose (Kerr et al, 1994; Hengarstner, 2000; Grivicich et al, 2007).

No processo de morte celular programada existe relevante participação das proteínas da família Bcl-2. Proteínas anti-apoptóticas dessa família, como a Bcl-2 e a

Bcl-xl, têm capacidade para inibir a morte celular, enquanto que proteínas pró-apoptóticas como a Bax e a Bat favorecem esse fenômeno (Reed et al, 1996; Chao, Korsmeyer, 1998; Adams, Cory, 1998; Pratt et al, 2007).

O mecanismo anti-apoptótico primário referente à atuação da Bcl-2 consiste na interação com membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, no sentido de bloquear a permeabilidade da membrana mitocondrial, facilitando a liberação do citocromo c (Chao, Korsmeyer, 1998; Gross et al, 1999; Deveraux et al, 2001). Tal inibição se dá tanto por seqüestro da Bax como por mecanismo de competição por locais da referida membrana, que seriam ocupados por essa proteína (Adams, Cory, 1998). A proporção entre a Bcl-2 e os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 dita a sensibilidade ou a resistência das células a diversos estímulos apoptóticos (Krajewsky et al, 1997; Kerr et al, 1994; Hengartner, 2000).

1.1.2 Desenvolvimento de metástases

No que se refere ao desenvolvimento de metástase em linfonodos e em estruturas e órgãos distantes, em câncer de mama, numerosas têm sido as pesquisas realizadas com o propósito de esclarecer os mecanismos envolvidos na migração das células neoplásicas e na formação dos tumores secundários (Steeg, 2006). Como bem ressaltam Nicholson e MacDonald (1991) e Steeg (2003), “o selo do desenvolvimento de metástases é a complexidade”.

Os eventos que precedem a passagem das células neoplásicas para as circulações linfática e sanguínea consistem na perda de adesão célula-célula e na motilidade celular (Nicholson, MacDonald, 1991; MacDonald, Steeg, 1993; Tooney et al, 1993; Cramer et al, 1994; Zhang et al, 1997; Cavallaro et al, 2002).

O elemento fundamental responsável pela adesão entre as células neoplásicas consiste na matriz extra-celular (MEC). A mais importante molécula envolvida na adesão célula-célula durante a diferenciação epitelial mamária é a E-caderina, que se encontra presente na superfície da membrana citoplasmática. Neste local, essa molécula interage com cateninas, actinina, vinculina e o citoesqueleto da actina, para proporcionar as forças de adesão do complexo de junção (Cavallaro et al, 2002). Outras moléculas partícipes do processo de adesão entre as células são integrinas, selectinas, membros da superfamília das imunoglobulinas e proteína CD44 (MacDonald, Steeg, 1993; Cramer et al, 1994; Cichy, Puré, 2003).

A perda da adesão entre as células ocorre no momento em que a matriz extracelular sofre processo de degradação, que tem como causa a atuação de diferentes proteinases do sistema de ativação do plasminogênio. A atividade proteolítica envolvida na degradação da matriz protéica promove interações dinamicamente moduladas entre a célula e o substrato, isto é, a matriz extracelular (Werb, 1997). No decorrer do desenvolvimento tumoral a interação de múltiplos fatores ocasiona a formação de complexos na superfície da célula, que leva a aumento da geração de plasminogênio (Chen, 1992; Schmitt et al, 1995; Ellis, Whawell, 1997; Ellis et al, 1999). A falência do substrato de união celular na organização da citoarquitetura da lesão primária ocasiona modificações ativas, com perda da compartimentalização do tecido neoplásico (MacDonald, Steeg, 1993; Tooney et al, 1993; Cramer et al, 1994; Potempa et al, 1994).

Dentre as classes de proteinases responsáveis pela referida degradação, interessa-nos no presente estudo as serino proteinases, com destaque para o

ativador do plasminogênio (*plasminogen activator*) (Chen et al, 1992). A interação de elementos do referido sistema, particularmente o ativador do plasminogênio uPA, leva à formação de complexos na superfície das células responsáveis por aumento da geração de plasmina (Gettins et al, 1992).

A inibição da atuação do ativador do plasminogênio na matriz extracelular é exercida pelos inibidores das serino proteinases (serpins) PAI-1 e PAI-2. Existe comprovação de que estas serpins apresentam habilidade para bloquear a conversão do plasminogênio para plasmina (Janicke et al, 1994; Potempa et al, 1994; Bianchi et al, 1995).

A partir do momento em que ocorre perda de adesão celular, estabelece-se o evento fundamental subsequente, isto é, a motilidade das células neoplásicas. O mesmo possibilita a penetração dessas células nas correntes linfática e sanguínea e migração das mesmas para linfonodos ou sítios distantes, onde poderão desenvolver-se tumores metastáticos (Sommers et al, 1991; Janicke et al, 1994; Schmitt et al, 1995; Steeg, 2006).

O envolvimento dos linfonodos da axila constitui-se em evento da maior importância na etapa de disseminação do câncer de mama, especialmente por se relacionar fortemente com o prognóstico da doença. Tem-se observado que, por ocasião do diagnóstico do câncer de mama, em diferentes estágios de crescimento, cerca de 38% das pacientes exibem metástases em linfonodos axilares (Weinstat-Saslow, Steeg, 1994).

O aparecimento de metástases em linfonodos da axila pode ocorrer em mulheres acometidas por tumores que se encontram em estágio muito inicial de desenvolvimento e sua freqüência sofre aumento diretamente proporcional ao

estádio clínico da neoplasia. Assim, em estudo que envolveu 1.128 mulheres portadoras de câncer de mama, Silverstein et al (1994) observaram comprometimento linfonodal axilar em 3% dos casos T1A, em 17% dos T1B, em 32% dos T1C, em 44% dos T2 e em 60% dos T3.

Conforme assinalado, particular atenção relacionada com o desenvolvimento de metástases linfonodais, decorrentes da propagação através de vasos linfáticos, relaciona-se com a percepção de que o estado dos linfonodos axilares constitui-se no mais importante fator prognóstico isolado nos casos de câncer mamário (Saez et al 1989; van der Wall, 1999).

Em 1983, Fisher et al realizaram estudo prospectivo, no qual fizeram comparação entre grupo de mulheres acometidas por câncer mamário que apresentavam axila livre com outro grupo em que os linfonodos axilares encontravam-se comprometidos. Os pesquisadores observaram que as taxas de sobrevivência em cinco e 10 anos das pacientes do primeiro grupo foram de 83% e 72%, respectivamente, enquanto que para aquelas que apresentaram metástases em um a três linfonodos axilares foram de 73% e 50% e nas com quatro ou mais de 46% e 33%.

1.2 Proteína maspin

Em pesquisa pioneira, realizada por meio de hibridização subtrativa, Zou et al (1994) identificaram em câncer de mama humano um novo gene supressor responsável pela codificação de proteína relacionada com a família dos inibidores das proteinases séricas (serpins). O referido gene, que se localiza no cromossomo

18 q21.3 - q23, foi encontrado expresso em 29 de 45 espécimes cirúrgicos de câncer de mama (64%) por Maass et al (2001), com auxílio da técnica de RT-PCR (*reverse transcription - polymerase chain reaction*). Luppi et al (1996) detectaram transcrição do mesmo em espécimes de metástases de câncer mamário.

A sigla maspin conferida à proteína maspin, que é membro da família dos inibidores das proteinases séricas, deriva da denominação *mammary serine protease inhibitor* (Zou et al, 1994). A estrutura molecular da proteína maspin tem forte homologia com outros membros das serpins, em especial com o *plasminogen-activator inhibitor PAI-1* (Bass et al, 2002). Várias outras investigações vieram comprovar a habilidade inibitória da maspin sobre as serino proteinases (Sheng et al, 1998; Maass et al, 2001; Odero-Marah et al, 2003).

Quando presente no câncer de mama, a maspin encontra-se expressa nas células epiteliais basais e nas células mioepiteliais (Sheng et al, 1994; Sternich et al, 1997). Trata-se de proteína predominantemente citoplasmática, mas também pode ser encontrada na superfície das células (Pemberton et al, 1997). Por meio do estudo de 69 peças cirúrgicas provenientes de mulheres acometidas por carcinoma ductal infiltrativo, Sopel et al (2005) constataram que a maspin encontrava-se presente em 50,73% das mesmas, sendo que em nove espécimes (13,04%) a expressão era fraca, em 16 (23,18%) era moderada e em 10 (14,49%) era forte. Foi observado por Maass et al (2001) e por Zhang et al (1997) que durante o crescimento do tumor primário ocorre *down regulation* da expressão da maspin nas células neoplásicas.

1.3 Proteína maspin e câncer de mama

Vários estudos, nos quais foram utilizadas metodologias *in vitro*, experimental e clínica, foram realizadas com o propósito de associar a proteína maspin com os eventos relacionados com os estágios de promoção e de disseminação do câncer de mama. A observação de Sheng et al (1994) de que ocorre perda progressiva da expressão da maspin à medida que se dá a progressão do carcinoma mamário constitui-se no motivo que tem levado os pesquisadores a suspeitar que a mesma desempenha papel na invasão do tumor e no desenvolvimento de metástases. Em seguida analisamos os ensaios que procuraram avaliar a forma de atuação da maspin sobre a progressão do tumor mamário e o desenvolvimento de metástases.

Algumas investigações foram realizadas com o propósito de verificar se a proteína maspin tem habilidade para favorecer o fenômeno da apoptose e para inibir o desenvolvimento de metástases no câncer de mama humano.

1.3.1 Maspin e apoptose

Na literatura encontramos a publicação de Jiang et al (2002) acerca dos resultados de pesquisa *in vitro*, na qual procuraram observar a possível ação pró-apoptótica da proteína maspin. O material utilizado para a realização do estudo consistiu em cultura de células de carcinoma humano da linha MDA-MB-435 (*american type culture collection*). No sentido de avaliar se a proteína maspin teria capacidade para regular diretamente a atividade da caspase-3 adicionaram à cultura das células maspin recombinante [rMaspin(i)] purificada. Pelo fato de observarem aumento da fragmentação do DNA e incremento da inativação proteolítica da PARP (*poly ADP - ribose - polimerase*) e da ativação das caspases 3 e 8, os citados

pesquisadores concluíram pela positividade da ação pró-apoptótica.

1.3.2 Maspin e metástases

No sentido de confirmar que a maspin possui habilidade similar à da serpin PAI-1 para inibir as proteinases séricas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, bloqueando assim o desenvolvimento de metástases, vários pesquisadores têm realizado estudos *in vitro* e experimentais

Em ensaio *in vitro* com culturas de células de câncer de mama humano das linhas MDA-MB-435 e MDA-MB-231, no qual utilizaram *time-lapse vídeo microscopy*, Sheng et al (1998) observaram, que a maspin recombinante apresentou capacidade para inibir a motilidade celular. Verificaram que a taxa de migração na matriz extracelular foi significativamente menor nas culturas de células em que adicionaram a rMaspin(i), quando comparado com as culturas em que a mesma não foi adicionada. Outros estudos *in vitro* também evidenciaram habilidade da rMaspin(i) para inibir a motilidade celular (Fazioli, Blasi, 1994; Biliran, Sheng, 2001).

Em 1993, Tomasetto et al realizaram interessante ensaio experimental com o objetivo de avaliar a capacidade inibidora de metástases da proteína maspin. O estudo consistiu em comparar dois grupos de camundongos geneticamente imunossuprimidos (*nude mice*) que, ao serem transfectados com células de câncer de mama da linha MDA-MB-435, desenvolveram essa neoplasia. Em parte dos camundongos (grupo estudo) adicionaram às culturas das referidas células transfectantes vetor contendo gene maspin; no outro grupo de camundongos (grupo controle) não foi adicionado o referido vetor. Ao realizar exames anatomopatológicos dos camundongos os referidos pesquisadores constataram que nenhum tumor foi encontrado nos pulmões e linfonodos daqueles do grupo estudo, enquanto que nos

do grupo controle existiam efusões neoplásicas pleurais e metástases em linfonodos e no parênquima pulmonar.

Alguns ensaios clínicos têm evidenciado que mulheres acometidas por câncer de mama, nas quais as células do tumor primário apresentam forte expressão da proteína maspin, apresentam menor risco para o desenvolvimento de metástases e, conseqüentemente, mais prolongado intervalo livre da doença.

Em 2001, Maass et al publicaram ensaio clínico, que teve como objetivo correlacionar a presença do gene maspin nas células de espécimes do tumor primário de 45 mulheres afetadas por câncer de mama (10 casos no estágio I, 30 no II e cinco no III) com o aparecimento de metástases distantes. Os linfonodos axilares apresentavam-se livres em 25 pacientes (46%) e comprometidos por metástases nas restantes 20 pacientes (44%). O método utilizado para a detecção do gene maspin foi a RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*). Os pesquisadores constataram transcrição do gene maspin nos espécimes de 29 pacientes (64%). Decorridos 38 meses em média de seguimento, verificaram que entre as 37 pacientes que não desenvolveram metástases distantes, 26 delas (70%) mostraram expressão do maspin positiva ($p = 0,05$). A conclusão foi que a perda da expressão do gene maspin no câncer de mama associa-se com menor intervalo livre da doença e dá suporte à hipótese de que a função desse gene é indicativa de menor agressividade do tumor e de menor potencial para o desenvolvimento de metástases.

Recentemente, Stark et al (2009) realizaram estudo de espécimes cirúrgicos provenientes de mulheres acometidas por câncer de mama, com auxílio da técnica de RT-PCR, com o objetivo de avaliar a expressão do gene maspin no tumor

mamário e em metástases cerebrais. Verificaram que a taxa de sobrevida média foi mais longa nos casos em que o maspin encontrava-se positivo no tumor primário.

Em contraposição a estes ensaios clínicos, que mostram efeito protetor da maspin quanto ao risco do desenvolvimento de metástases em relação ao câncer de mama, existem outras publicações nas quais ficou evidenciado que a presença dessa proteína aumenta a agressividade do tumor.

Em estudo clínico, no qual utilizaram técnica de imunoistoquímica para avaliar a expressão da proteína maspin nas células dos tumores primários provenientes de mulheres operadas por câncer de mama, Umekita e Yoshida (2003) verificaram *up-regulation* da mesma durante a progressão tumoral. Constataram, outrossim, que essa *up-regulation* correlacionou-se com a aquisição de fenótipo agressivo pelo tumor.

Em outro ensaio clínico que envolveu 73 mulheres acometidas por carcinoma ductal invasivo de mama, Joensuu et al (2009) procuraram relacionar a forte expressão da proteína maspin nas células do tumor primário com o período de tempo entre o tratamento inicial da neoplasia e o aparecimento de metástases. Em um primeiro grupo de 19 pacientes, que desenvolveram metástases após dois anos do tratamento inicial, observaram expressão da maspin em 19% dos tumores. Num segundo grupo de 34 pacientes, em que as metástases surgiram após cinco a 10 anos, a maspin encontrou-se expressa em 9% dos tumores. Finalmente, num terceiro grupo de 20 pacientes, em que se desenvolveram metástases após 10 anos, a proteína estava expressa em 4% dos tumores. Esses pesquisadores concluíram que a presença de forte expressão da maspin em câncer de mamma não se mostrou positivamente consistente com diminuição da taxa de desenvolvimento de metástases.

1.4 Revisão da literatura

Por meio de extensa revisão bibliográfica, que se baseou em consultas do Pubmed, Up to Date e Lilacs, não encontramos publicações acerca da análise da relação entre a expressão da proteína maspin no tumor primário de mulheres portadoras de carcinoma de mama e as condições dos linfonodos da axila. Por tal motivo, nos decidimos pela realização do presente trabalho.

2. OBJETIVO

O presente ensaio teve como objetivo relacionar a superexpressão da proteína maspin nas células neoplásicas do tumor primário de mulheres acometidas por carcinoma ductal invasivo de mama nos estádios clínicos I e II com o estado dos linfonodos da cadeia axilar ipsilateral

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Casuística

Para a realização do presente estudo foram utilizados fragmentos teciduais dos tumores primários de 40 mulheres acometidas por carcinoma ductal invasivo de mama nos estádios clínicos I e II. Todas as pacientes do nosso estudo foram assistidas no Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho (ICAVC), no período de maio de 2000 a abril de 2009. O estudo obteve parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do referido Instituto (Apêndice 1). As pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 2).

O diâmetro dos tumores mamários variou entre 1 e 3 cm. Em 10 casos os fragmentos foram retirados de espécimes cirúrgicos provenientes de mastectomia radical modificada (técnica de Patey) e nos outros 30 de peças de quadrantectomia. As 40 pacientes foram submetidas a esvaziamento completo da axila ipsilateral e os linfonodos extraídos foram avaliados por patologistas do ICAVC.

Os critérios de exclusão adotados para a seleção dos nossos 40 casos foram: uso prévio de radioterapia, quimioterapia ou terapêutica endócrina; material proveniente das cirurgias mal conservado; e associação do carcinoma com gravidez ou lactação.

Consoante o estado dos linfonodos axilares removidos por ocasião do tratamento cirúrgico, as 40 pacientes foram separadas em dois grupos. No Grupo 1 foram incluídas 20 pacientes em que os linfonodos apresentaram-se livres de

comprometimento metastático e do Grupo 2 participaram 20 pacientes nas quais o exame histopatológico evidenciou envolvimento linfonodal pela neoplasia. Os dados gerais das pacientes do Grupo 1 são apresentados no anexo 1 e aqueles das pacientes do Grupo 2 são expostos no anexo 2.

3.2 Método

3.2.1 Confirmação histopatológica

O exame microscópico dos 40 tumores mamários, com vistas a obter confirmação histopatológica de carcinoma ductal infiltrativo de mama, foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP), obedecendo as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Patologia.

Dos espécimes cirúrgicos, que haviam sido emblocados em parafina por ocasião do tratamento cirúrgico, foram obtidos cortes histológicos com 4 µm de espessura, por meio de micrótomo calibrado para tanto. Na seqüência, os cortes foram desidratados com álcool etílico, clareados pelo xilol e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE). A leitura das lâminas foi feita com auxílio de microscópio óptico comum. Para a caracterização dos tumores examinados como carcinomas ductais infiltrativos foi utilizado o critério proposto por Dabbs et al, em 1993, enquanto que os graus histológico e nuclear foram classificados consoante os critérios estabelecidos por Elston e Ellis (1991). A redação dos laudos seguiu padronização estabelecida pela *World Health Organization* (WHO).

3.2.2 Técnica de imunohistoquímica

Para a detecção da maspin nas células neoplásicas do tumor mamário utilizamos a técnica de imunohistoquímica, acompanhando a maioria dos pesquisadores que se dedicaram ao estudo dessa proteína. Existem comprovações de que esse método laboratorial tem elevada sensibilidade para comprovar, por meio de união altamente seletiva antígeno-anticorpo, a expressão da maspin no tecido neoplásico (Rose et al, 1994; Shi et al, 1995; Sopel et al, 2005).

Na análise da expressão da proteína maspin utilizamos anticorpo monoclonal liofilizado de camundongo, clone EAW24, classe de imunoglobulina IgG2a, cujo antígeno utilizado para imunização foi proteína recombinante procariótica, na diluição de 1:80. O *kit* de anticorpos anti-maspin, contendo 1 mL de anti-corpos anti-maspin empregado, foi da marca Novocastra, da Benton Lane, Newcastle Upon Tyne NE 12 BEW, UK. As etapas da técnica da imunohistoquímica, que se prestou para avaliação da expressão da proteína maspin, são expostas no anexo 3.

A positividade da reação para identificação das células epiteliais tumorais mamárias, por meio do anticorpo maspin, foi marcada pela coloração sépia, tomando-se como controle positivo células epiteliais basais de tecido de mama normal e como controle negativo células epiteliais lumbares do mesmo tecido, previamente testadas (Fig. 1).

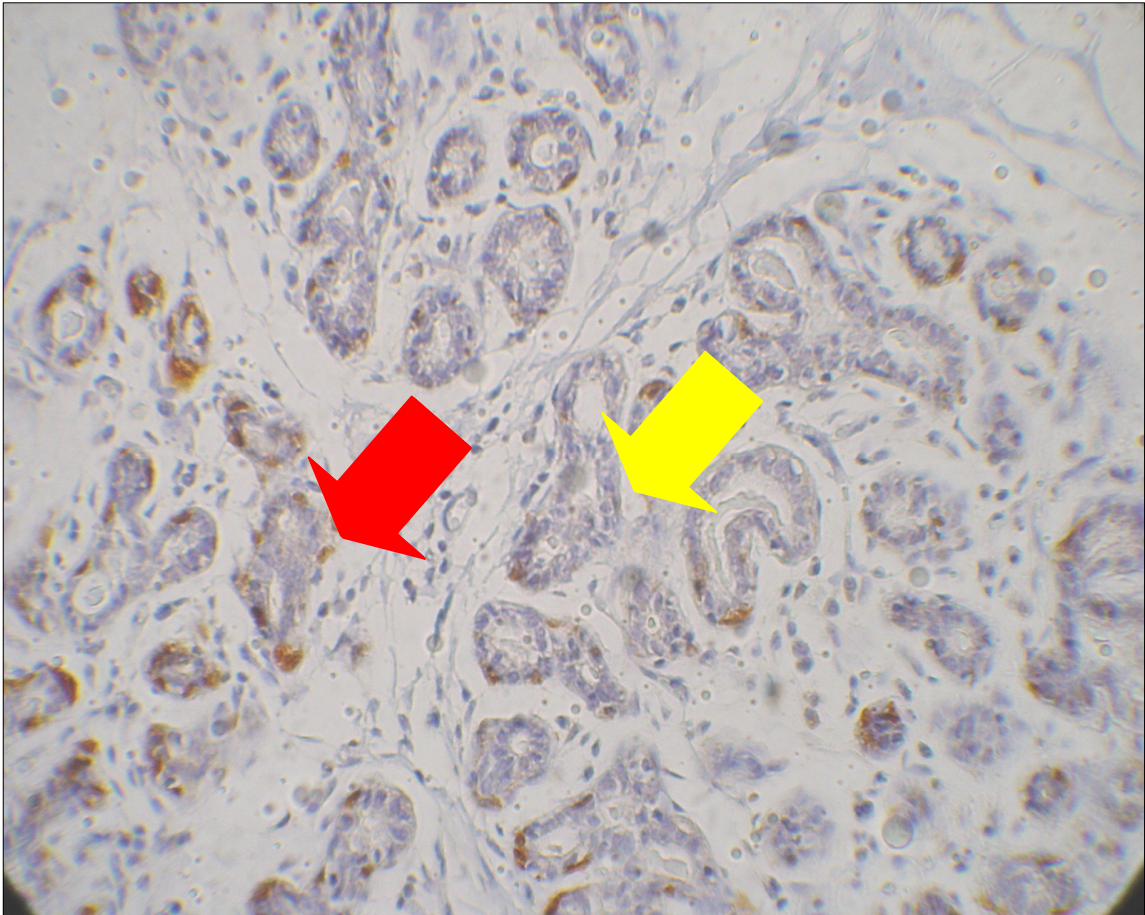


FIGURA 1. Corte de tecido mamário normal (400 X). Controle positivo em células epiteliais basais (seta vermelha) e negativo em células epiteliais luminares (seta amarela).

3.2.2.1 Avaliação semiquantitativa da maspin

As células marcadas pelo anticorpo antimaspín (cor sépia) foram contadas pelo método semiquantitativo. Na leitura das lâminas foi utilizado microscópio óptico Axioskop – Zeiss, com aumento de 400 vezes. Pelo fato de não encontrarmos na literatura referências acerca do critério para caracterizar a expressão como positiva ou negativa utilizamos os escores expostos no quadro 1, com base no Hercep Test (Wolff et al, 2007). Para a obtenção das fotomicrografias utilizou-se câmara digital Sony DSC 585 *cyber-shot*, com resolução de 4,1 *megapixels*.

QUADRO 1. Escores estabelecidos para avaliação semiquantitativa da expressão da proteína maspin.

Escore	Avaliação da expressão	Porcentagem de células coradas (%)
0	Negativa	A coloração do citoplasma não é observada ou está presente em menos de 10% das células tumorais.
1	Negativa	A coloração é observada no citoplasma de mais de 10% das células tumorais, mas a mesma apresenta-se incompleta..
2	Positiva fraca	Coloração completa do citoplasma, fraca ou moderada, é observada em mais de 10% das células tumorais,
3	Positiva forte	Forte e completa coloração do citoplasma é observada em mais de 10% das células tumorais.

Baseado em Wolff et al, 2007.

Na figura 2 é representado corte histológico de carcinoma ductal invasivo da mama em que o escore semiquantitativo foi considerado 0, uma vez que o citoplasma das células não apresenta coloração sépia após tratamento pelo anticorpo anti-maspin.

Nas figuras 3, 4 e 5 os escores são, respectivamente, 1, 2 e 3, posto que os cortes histológicos de carcinoma ductal invasivo de mama, representados pelas mesmas, mostram porcentagens de células que apresentam o citoplasma com cor sépia consoante os graus da classificação exposta no quadro 1.

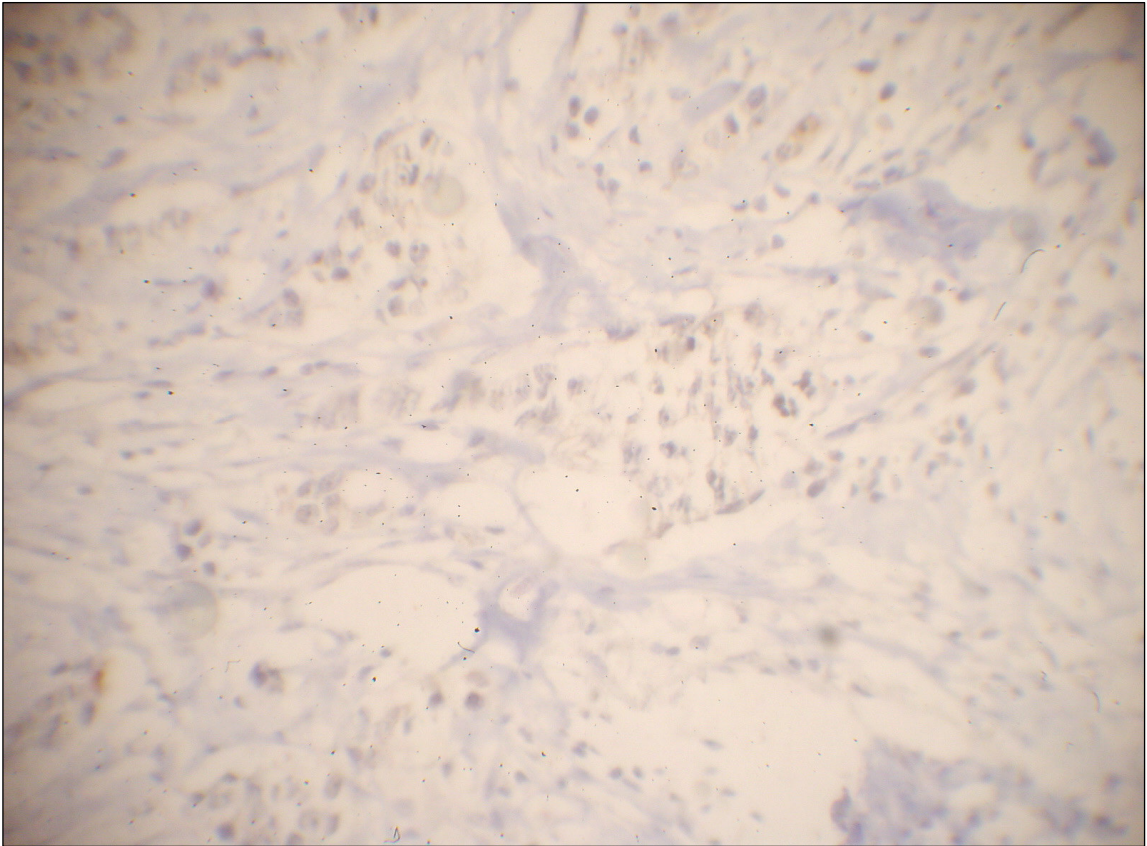


FIGURA 2 Corte histológico de carcinoma ductal invasivo da mama para marcação pelo anticorpo anti-maspin (400 X). Escore 0, uma vez que citoplasma das células não se apresenta corado em sépia pelo anticorpo.

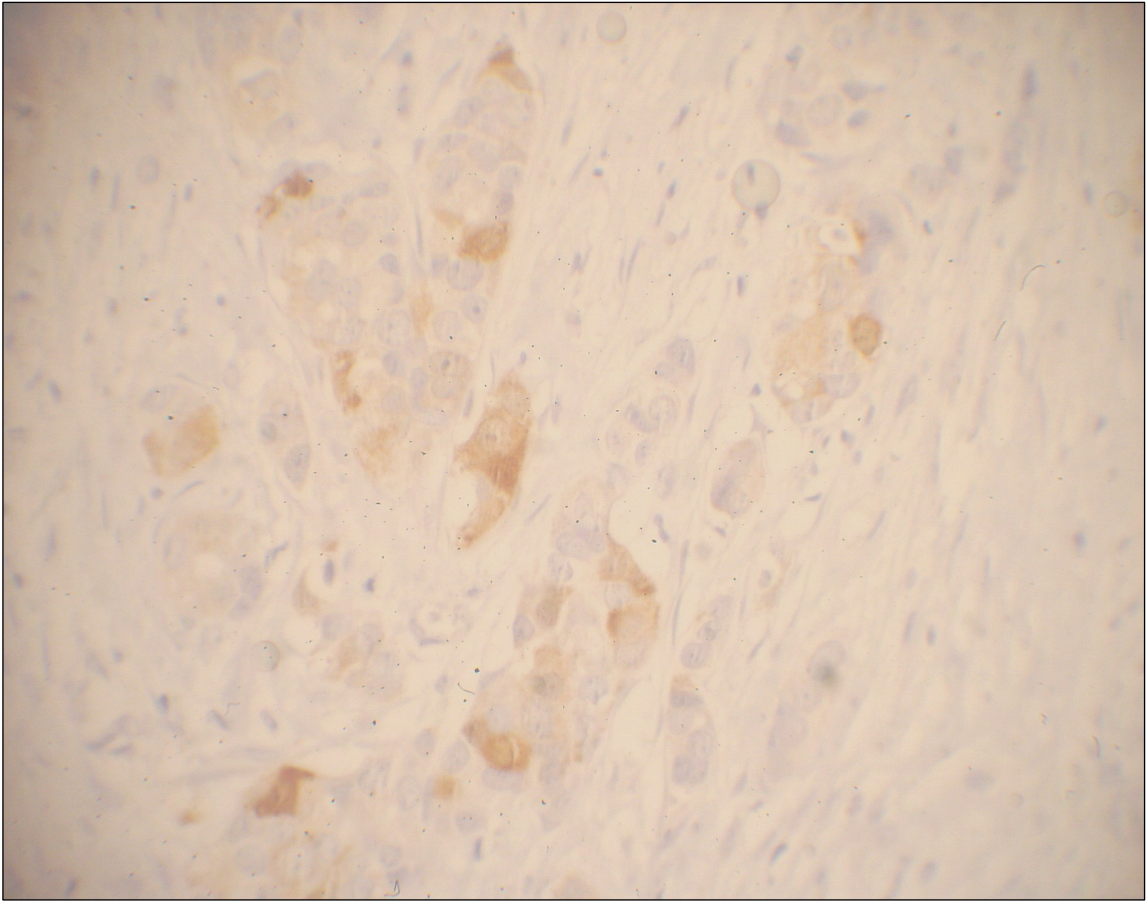


FIGURA 3 Corte histológico de carcinoma ductal invasivo da mama para marcação pelo anticorpo anti-maspin (400 X). Porcentagem de citoplasma de células coradas em sépia corresponde ao escore 1.

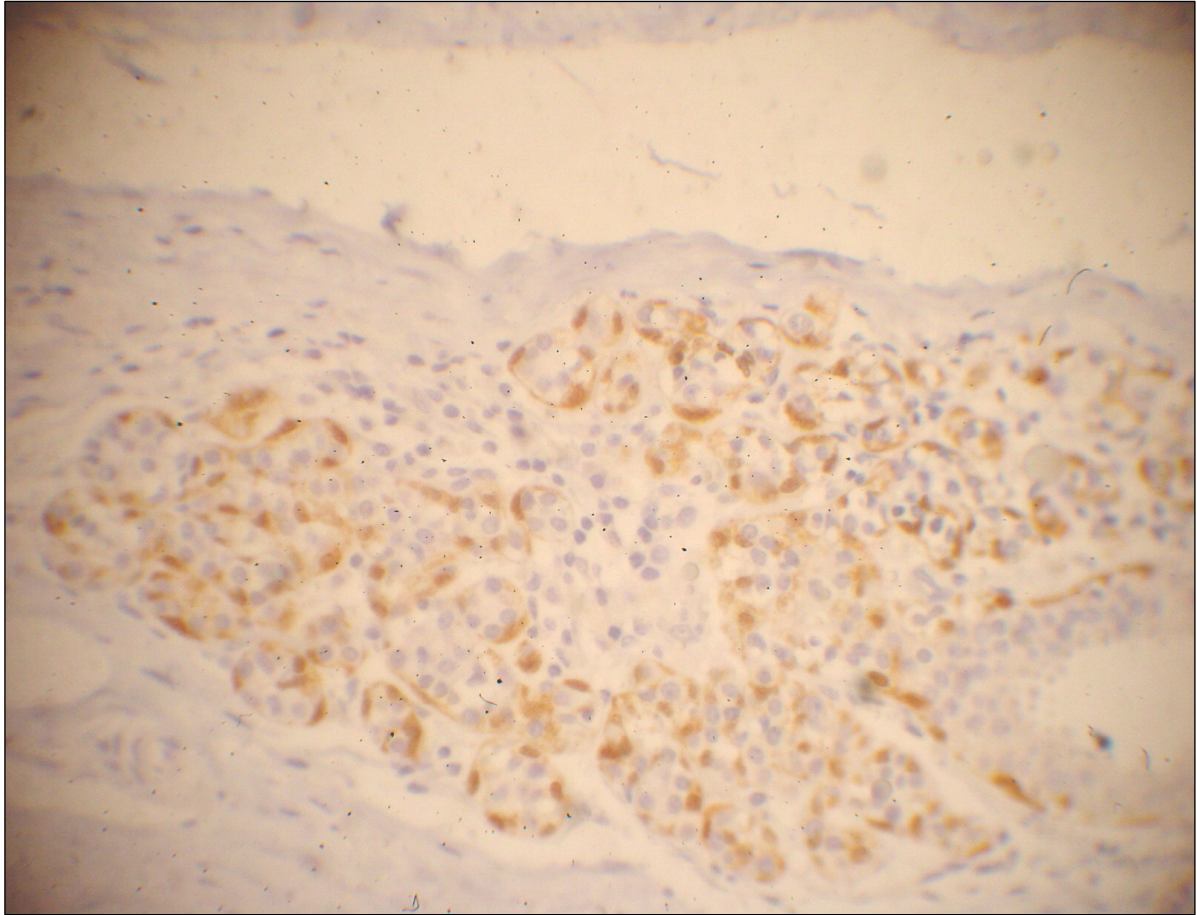


FIGURA 4 Corte histológico de carcinoma ductal invasivo da mama para marcação pelo anticorpo anti-maspin (400 X). Porcentagem de citoplasma de células corado em sépia corresponde ao escore 2.

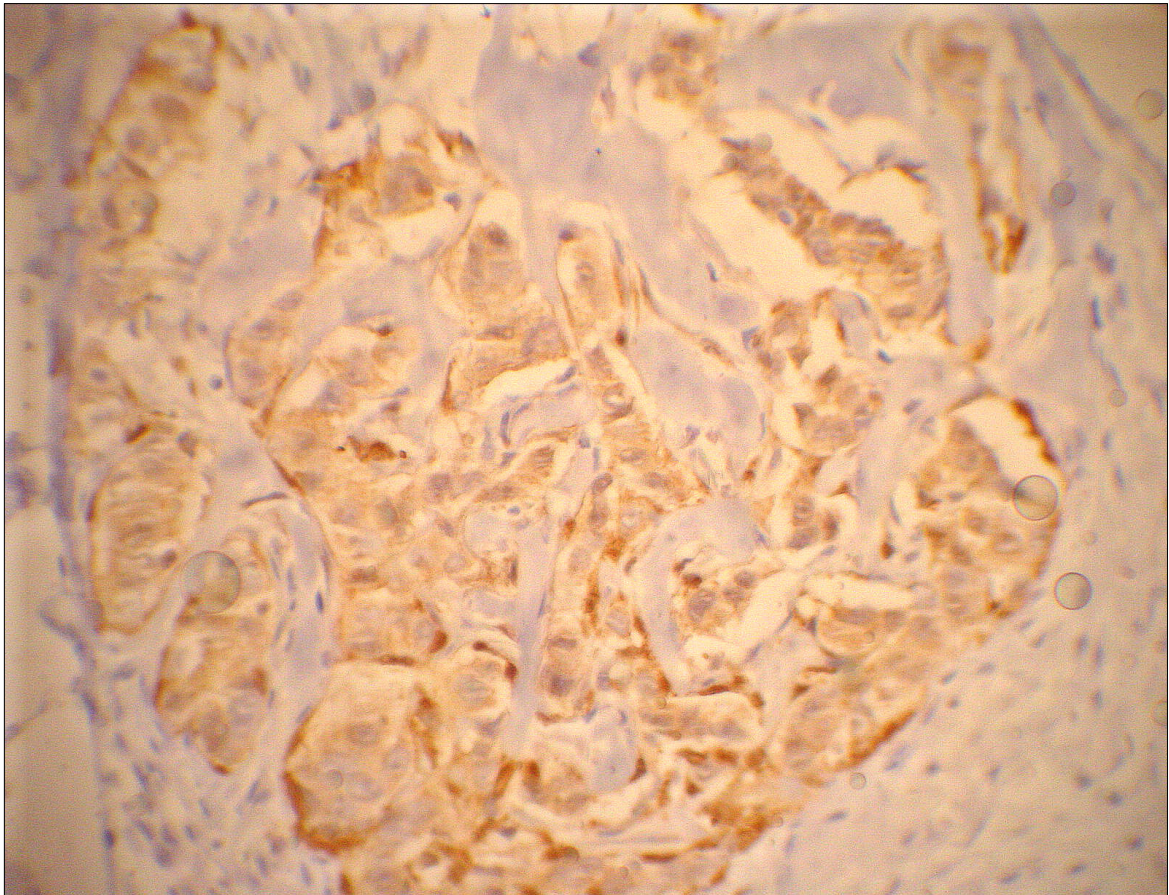


FIGURA 5 Corte histológico de carcinoma ductal invasivo de mama para marcação pelo anticorpo anti-maspin (400 X). Porcentagem de citoplasma de células corado em sépia corresponde ao escore 3.

3.3 Análise estatística

As associações entre as variáveis qualitativas foram analisadas por meio do teste Qui-quadrado. Foi adotado o nível de significância de 5% (0,05) para a aplicação dos testes estatísticos.

A análise estatística foi feita pelo programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 13.0 para Microsoft Windows.

4. RESULTADO

Na tabela 1 é apresentada a comparação entre os grupos de axilas livres e comprometidas em relação à expressão da proteína maspin, na sua forma original.

TABELA 1. Relação entre a imunexpressão da proteína maspin e o estado dos linfonodos axilares.

Grupo	Expressão da proteína maspin				Total	
	-	+	++	+++		
Axila positiva	N	8	2	5	5	20
	%	40,0	10,0	25,0	25,0	100,0
Axila negativa	N	1	4	7	8	20
	%	5,0	20,0	35,0	40,0	100,0
Total	N	9	6	12	13	40
	%	22,5	15,0	30,0	32,5	100,0

$p = 0,068$ (teste Qui-quadrado)

Utilizando o critério apresentado no quadro 1, comparamos esses grupos em relação à expressão de tal proteína, cujo resultado pode ser visto na tabela 2.

TABELA 2. Relação entre a imunexpressão da maspin agrupada com o estado dos linfonodos axilares.

Grupo	Expressão da proteína maspin			Total	
	Negativa	Positiva fraca	Positiva forte		
Axila positiva	n	10	5	5	20
	%	50,0	25,0	25,0	100,0
Axila negativa	n	5	7	8	20
	%	25,0	35,0	40,0	100,0
Total	n	9	12	13	40
	%	22,5	30,0	32,5	100,0

$p = 0,260$ (teste Qui-quadrado)

Na mesma observamos que a superexpressão da proteína maspin foi detectada em células neoplásicas em 40% dos espécimes provenientes de pacientes com axila livre (Grupo 1). Em relação aos espécimes correspondentes às pacientes com axila comprometida (Grupo 2) a referida proteína apresentou-se superexpressa em 25% dos mesmos. Entretanto, não existe associação estatística entre a expressão da proteína maspin entre os grupos de pacientes com axilas livres ou comprometidas ($p = 0,260$)

Nos anexos 4 e 5 são expostos, respectivamente, os achados acerca da expressão da proteína maspin nos tumores primários das pacientes de ambos os grupos.

5. DISCUSSÃO

As investigações em que são utilizadas técnicas laboratoriais, para estabelecer a relação entre a expressão de proteínas no tumor primário de indivíduos acometidos por câncer com o risco do aparecimento de metástases em linfonodos e sítios distantes, têm como propósitos fundamentais avaliar o prognóstico quanto à sobrevida global, assim como o valor preditivo para estratégias terapêuticas (Steeg, 2006).

Tais pesquisas têm especial interesse em relação ao câncer de mama em estádios clínicos iniciais, quando podem existir metástases em linfonodos da axila mesmo em mulheres com tumores primários de tamanho reduzido. Em estudo que envolveu 1.128 mulheres portadoras de câncer de mama, Silverstein et al (1949) observaram que naquelas com tumores T1A e T1B as taxas de linfonodos comprometidos por metástases foram, respectivamente, 3% e 17%.

Algumas investigações têm evidenciado que o gene maspin, inicialmente descrito por Zou et al, em 1994, situa-se entre os quatro genes supressores do câncer de mama (Sheng et al, 1996; Sager et al, 1994). De fato, na introdução deste trabalho fizemos referências a ensaios *in vitro*, experimentais e clínicos, que demonstraram a habilidade da proteína maspin para inibir a perda da adesão celular e para diminuir o risco do desenvolvimento de metástases (Tomasetto et al, 1993; Fazioli, Blasi, 1994; Sheng et al, 1998; Biliran, Sheng, 2001; Maass et al, 2001; Stark et al, 2009).

Cabe ressaltar, contudo, que os resultados observados em outros ensaios clínicos mostraram-se discordantes daqueles anteriormente referidos, tanto em relação à regulação da maspin durante a progressão do tumor primário quanto ao que se refere ao risco de metástases. Conforme assinalado, Umekita e Yoshida (2003) e Joensuu et al (2009) chegaram à conclusão de que a superexpressão dessa proteína não se mostrou positivamente consistente com diminuição da taxa de desenvolvimento de metástases. Os primeiros evidenciaram, inclusive, que a superexpressão da maspin fez com que o câncer mamário adquirisse fenótipo agressivo.

Ao realizar a análise estatística do resultado por nós obtido no presente estudo verificamos que a diferença entre a frequência de superexpressão da proteína maspin nas células neoplásicas dos tumores do grupo de pacientes com axila livre e aquela do grupo de pacientes com axila comprometida não teve diferença significativa ($p = 0,260$). A ausência de publicações sobre ensaios clínicos semelhantes ao que realizamos impossibilita-nos de fazer análise comparativa no que se relaciona com a metodologia e o resultado.

Os resultados conflitantes existentes na literatura acerca do papel da maspin quanto ao risco de desenvolvimento de metástases em mulheres acometidas por câncer de mama demonstram que ainda são insuficientes os conhecimentos relacionados com habilidade dessa proteína para inibir a perda da adesão das células e a motilidade celular. Como bem assinalam Shachar et al (2010), as discrepâncias reforçam a opinião de que ainda existem apenas suposições acerca dos mecanismos envolvidos na atuação da maspin sobre a evolução do câncer de mama.

Segundo Jones et al (2001) são admitidas os seguintes argumentos para explicar as discrepâncias: (1) a eventual mutação do gene maspin seria capaz de ocasionar perda da função normal da proteína maspin; (2) a elevada expressão intracelular da proteína maspin resulta em auto-inibição de sua atividade, por polimerização não covalente; e (3) a diferenciação de células mioepiteliais em células carcinomatosas contribui para que o fenótipo torne-se mais agressivo.

Ensaio *in vitro* realizado por Bass et al (2002) também se constitui em colaboração para o entendimento dos resultados discordantes. Em estudo de cultura de células das linhas HT-1080 e DU-145 esses pesquisadores fizeram comparação entre os efeitos da maspin e aqueles da serpin PAI-1 no que se refere à perda de adesão entre as células neoplásicas e a motilidade celular. Verificaram que a maspin teve habilidade para inibir a migração celular, mas não apresentou qualquer efeito inibitório sobre a degradação da matriz extracelular.

Outro elemento que deve ser levado em consideração consiste no fato de que, além das serino proteinases, também outras proteinases, especialmente as metaloproteinases de matriz MMP-2 e a MMP-9, apresentam habilidade para ocasionar degradação da matriz extracelular (Visse et al, 2003; Nagesse et al, 2006; Vizosso et al, 2007). Por outro lado, ao contrário do que ocorre com a serpin PAI-1, a maspin não apresenta homologia estrutural com os inibidores das MMP, isto é, o TIMP-1 e o TIMP-2, deixando assim de atuar na inibição da perda da adesão celular.

Possivelmente, certas discordâncias quanto aos resultados estejam relacionadas com insuficiente atuação da maspin no que se refere à inibição da perda da adesão célula-célula do tumor primário devido ao predomínio da atuação

das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 no mecanismo responsável pela degradação da matriz extracelular.

Tendo em vista as controvérsias acima referidas deve-se concluir que existe necessidade da aquisição de novos conhecimentos acerca da atuação da maspin no desenvolvimento de metástases no câncer de mama. Acreditamos que o modelo de estudo que envolve desenvolvimento de metástases em linfonodos axilares apresenta vantagens, dado o fácil acesso a estas estruturas.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou-nos concluir que a proteína maspin esteve superexpressa em células neoplásicas em menos da metade dos espécimes cirúrgicos provenientes das pacientes que apresentavam axila livre e, em um quarto daqueles das pacientes que apresentavam metástases nos linfonodos axilares. A análise estatística evidenciou que tal diferença não se mostrou significativa.

7. ANEXOS

Anexo 1.

Dados gerais das pacientes pertencentes ao Grupo 1.

Nº	RG Hosp.	Iniciais	Idade	Tamanho da lesão (cm)	GH	GN	LR	LC
1	272818	S B S	42	2	3	3	12	0
2	338989	S B	57	3	3	2	21	0
3	288743	L S R	50	1,5	3	2	5	0
4	297042	S A Q F	47	1,6	2	2	12	0
5	297255	L R M	71	2,5	2	2	14	0
6	295610	A R V	75	2	2	2	16	0
7	304079	E C Z	74	1,8	1	2	16	0
8	307717	A M S	51	2,3	1	2	7	0
9	307742	J O P F	41	1,2	1	1	13	0
10	307367	E Y	55	1,6	2	2	9	0
11	317962	T M C	54	1,7	3	3	12	0
12	319291	S S D	48	2,3	1	2	12	0
13	319424	J T M	81	1,2	1	2	11	0
14	318150	M G Q	57	1,5	2	2	12	0
15	324657	A P A	46	1,2	1	1	14	0
16	330188	A A L H	65	2,8	3	3	16	0
17	331517	C M C O	55	1,2	1	2	16	0
18	334248	R R R M	48	3	2	2	25	0
19	340702	R S S	47	2	2	2	14	0
20	336055	Z M S	38	1,5	2	2	22	0

GH = grau histológico

GN = grau nuclear

LR = número de linfonodos retirados da axila

LC = número de linfonodos comprometidos

Anexo 2

Dados gerais das pacientes pertencentes ao Grupo 2

Nº	RG Hosp.	Iniciais	Idade	Tamanho da lesão (cm)	GH	GN	LR	LC
1	270603	S M	64	3	3	3	19	3
2	292885	M B	84	1,5	2	3	19	2
3	296110	A F D S	30	1,8	1	2	19	3
4	298317	L S L	63	2	2	3	18	3
5	306512	F S V	75	2,5	1	1	15	1
6	308322	T C T	53	1,8	1	2	15	8
7	306958	S A S	45	2,3	3	3	18	1
8	318652	E T S C	38	2,3	2	3	18	2
9	335215	S D S P	43	1,7	2	2	12	1
10	338718	A R M	31	3	3	3	14	1
11	334819	M G D S	53	1,8	3	3	22	4
12	323896	M E S	52	1,2	2	3	14	1
13	326566	M J P S	74	2,7	1	3	30	1
14	334199	M Z L	52	2,5	2	2	7	1
15	334923	M L S S	58	0,8	2	2	17	1
16	335317	N A V S	55	1	2	2	12	8
17	334388	M M L	53	1,5	2	2	12	3
18	336001	A O	57	1,7	2	2	31	1
19	303688	N C S	42	2	1	1	13	1
20	273955	N S H C	49	1,8	3	3	8	1

GH = grau histológico

GN = grau nuclear

LR = número de linfonodos retirados da axila

LC = número de linfonodos comprometidos

Anexo 3

Etapas da técnica de imunistoquímica para a determinação da expressão da maspin.

1. Os cortes histológicos com 4 μm de espessura, desparafinados por xilol a 60°C durante 30 minutos, foram submetidos a mais dois banhos em xilol à temperatura ambiente, durando quinze minutos cada; em seguida procedeu-se reidratação com etanol absoluto I, etanol absoluto II, etanol absoluto III, etanol 95° GL e etanol 80° GL (Gay Lussac) (dois minutos cada banho) e passagem por água destilada.
 2. Adição de 1600 mL do tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0), com exposição ao vapor durante 30 minutos, com a finalidade de recuperar o epítipo antigênico e restituir a antigenicidade à proteína afetada pelos tecidos fixados em formalina. Manutenção das lâminas em vapor por 30 minutos, seguida de conservação em solução tamponada, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Na seqüência realizou-se a reação de inibição da peroxidase endógena, por meio da lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio a 3%, por quatro vezes, por dez minutos cada, seguida de lavagem em água parada, por cinco minutos. O processo foi finalizado pela lavagem das lâminas no tampão salino PBS (pH 7,4), por duas vezes, por 15 minutos. As lâminas foram então incubadas com anticorpo policlonal anti-maspin, obtido a partir do soro de camundongo, na diluição de 1:80 , pela técnica Steamer e Advance + DAB líquido Dako.
 3. As lâminas foram mantidas por 18 horas em geladeira, sendo então lavadas por duas vezes, em tampão PBS (pH 7,4), por dez minutos, e incubadas com anticorpos secundários (anticorpos de ligação), por 30 minutos, em estufa a 37°C.
 4. Utilização do anticorpo secundário biotilado universal, *kit* DAKO LSAB Systems Peroxidase (DAKO Corp, Carpinteria, CA, USA). Para tal, as lâminas foram novamente lavadas em tampão PBS, duas vezes, por dez minutos. Este processo foi seguido pela incubação das lâminas em anticorpo terciário, estreptavidina-biotina-peroxidase (*kit* DAKO LSAB Systems, Peroxidase-universal), em câmara úmida, por 30 minutos, em estufa a 37°C. Após duas novas lavagens das lâminas em solução tampão, por dez minutos cada; estas foram então submetidas à reação cromógena em 3,3', 5,5' tetrahidroclorato de diaminobenzidina (DAB), por três a cinco minutos. Esta reação culmina no aparecimento da cor marrom sépia, característica do anticorpo fixado à proteína. As lâminas foram novamente submetidas a duas lavagens com água corrente (10 minutos cada banho).
 5. Com o intuito de melhor visualizar a marcação citoplasmática granular da proteína maspin realizou-se contra-coloração rotineira com hematoxilina de Mayer por três minutos, em temperatura ambiente, que fornece a coloração azulada ao citoplasma e ao núcleo. As lâminas foram desidratadas em concentrações decrescente de etanol (50-70-100° GL) e embebidas em xilol. Realizou-se a montagem das lâminas, por meio de fixação sobre Entellan Mark, a fim de que a preparação passe a ter conservação permanente.
-

Anexo 4

Imunoexpressão da proteína maspin no tumor primário das
pacientes do Grupo 1.

Nº	Iniciais	Nº do Ex.	0	1 +	2 +	3+
1	SBS	8737/00		X		
2	SB	4006280				X
3	LSR	48224/03			X	
4	SAQF	60232/04				X
5	LRM	60705/04				X
6	ARV	61642/04				X
7	ECZ	5746/05	X			
8	MAS	8475/05		X		
9	JOPF	8999/05				X
10	EY	9261/05			X	
11	TMC	6594/06			X	
12	SSD	8076/06		X		
13	JTM	831/07				X
14	MGQ	2836/07				X
15	APA	4535/07			X	
16	AALH	027/08		X		
17	CMCO	148/08			X	
18	RRRM	4002094			X	
19	RSS	4006895			X	
20	ZMS	4003933				X

Anexo 5

Imunoexpressão da proteína maspin no tumor primário das
pacientes do Grupo 2.

Nº	Iniciais	Nº do Ex.	0	1 +	2 +	3+
1	SM	4465/00	X			
2	MB	56145/04				X
3	AFDS	58852/04		X		
4	LSL	61662/04			X	
5	FSV	7602/05	X			
6	TCT	8115/05		X		
7	SAS	8584/05			X	
8	ETSC	7156/06			X	
9	SDSP	4003593				X
10	ARM	4005171				X
11	MGDS	4006188	X			
12	MÊS	BI07/2974	X			
13	MJPS	BI07/4553	X			
14	MZL	4003968	X			
15	MLSS	4003418	X			
16	NAVS	4002706			X	
17	MML	4002891				X
18	AO	4005045			X	
19	NCS	BI05/821				X
20	NSHC	13047/0	X			

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-6.

Amarante-Mendes GP. Apoptose: programa molecular de morte celular. *Einstein* 2003; 1:15-8.

Barth A, Creig PH, Silverstein MJ. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer* 1997; 79:1918-22.

Bass R, Fernandez AM, Ellis V. Maspin inhibits cell migration in the absence of protease inhibitory activity. *J Biol Chem* 2002; 277:46845-8.

Bianchi E, Cohen RI, Dai A, Schuman MA, Smith HS. Immunohistochemical localization of the plasminogen activator inhibitor-1 in breast cancer. *J Cancer* 1995;60:597-603.

Biliran Jr H, Sheng S. Pleiotrophic inhibition of pericelular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin. *Cancer Res* 2001; 61:8676-82.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67; its use histopathology. *Histopathology* 1990; 17:489-503.

Cavallaro U, Schafhauser B, Cristofori G. Cadherins and tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* 2002; 176 :123-8.

Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulator of cell death. *Ann Rev Immunol*. 1998; 16:395-419.

Chen WT. Membrane proteases: role in tissue remodeling and tumor invasor. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4:802-9.

Cichy J, Puré E. The liberation of CD44. *J Cell Biol* 2003; 181:839-43.

Cramer LP, Mitchison TJ, Theriot JA. Actin-dependent motile forces and cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6:82-6.

Dabbs DJ. Ductal carcinoma of the breast: nuclear grade as a predictor of S-phase fraction. *Human Pathol* 1993; 24:652-6.

De Freitas Jr R, Costa MV, Schneider SV, Nicolau MA, Marussi M. Accuracy of ultrasound and clinical examination in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer. *Eur J Oncol* 1991; 17:240-4.

Dettmar P, Harbeck N, Thonssen C, Pache L, Ziffer P, Fizi K et al. Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB-1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 75:1525-33.

Deveraux QI, Schendel SL, Reed JC. Anti-apoptotic proteins. The Bcl-2 and inhibitors of apoptosis protein families. *Cardiol Clin* 2001; 19:57-74.

Dickson RB. Biochemical control of breast development. In Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. *Diseases of the Breast*. Philadelphia. Raven, 1996. P 221-9.

Ellis V, Whawell SA. Vascular smooth muscle cells proteolytically generate plasmin by both urokinase and tissue plasminogen activator-dependent mechanisms: evidence for a specific tissue-type plasminogen activator receptor on these cells. *Blood* 1997; 90:2312-22.

Ellis V, Whawell SA, Werner F, Deadman JJ. Assembly of urokinase receptor-mediated plasminogen activation complexes involves direct, non-active-site interactions between urokinase and plasminogen. *Biochemistry* 1999; 38:651-9.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-10.

Fazioli F, Blasi F. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new targets for anti-metastatic therapy? *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:25-9.

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB et al. Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52:1551-7.

Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CL, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer. *Nat Genet* 1994; 8:395-404.

Gettins P, Patston PA, Schapira M. Structure and mechanism of action of serpins. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992; 13:393-408.

Goodson WH, Moore DH, Ljung BM, Chew K, Florendo C, Mayall B et al. The functional relationship between in vivo bromodeoxyuridine labeling index and Ki-67 proliferation index in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49:155-64.

Grivicich I, Regner A, Rocha A B. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol* 2007; 53: 335-43.

Gross AJ, McDonald M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-911.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-6.

INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2010. [on line] disponível: www.inca.gov.br [05/01/2010].

Janicke F, Pache L, Schmitt M, Thomssen C, Graef H. Both cytolysis and detergent extract of breast cancer tissue are suited to evaluate the prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1. *Cancer Res* 1994; 54:2527-30.

Jiang N, Meng Y, Zhang S, Mensah-Osman E, Sheng S. Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:4089-98.

Joensuu KM, Leidenius MHK, Andersson LC, Heikkitä PS. High expression of maspin is associated with early tumor relapse in breast cancer. *Human Pathol* 2009; 40:1143-51.

Johnson-Thompson MC, Guthrie J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88:1224-9.

Jones C, Nonni AV, Fuitord L. CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid / myoepithelial cell differentiation. *Br J Cancer* 2001; 85:422-7.

Kerr JF, Winterford CM, Hamon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-26.

Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, Moore DH, Krajewska M, Reed JC et al. Analysis of bax and bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. *Clin Cancer Res* 1997;3:199-208.

Luppi M, Monselli M, Bandieri E et al. Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Acta Oncol* 1996; 7:619-22.

Maass N, Teffner M, Rösel F. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* 2001; 195:321-6.

Maass N, Hojo T, Rosel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 2001; 34:303-7.

MacDonald N, Steeg P. Molecular basis of tumor metastasis. *Cancer Surv* 1993; 16:175-99.

Negesse H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiov Res* 2006; 202:345-51.

Nicholson G. Molecular mechanisms of cancer metastasis: tumor and host properties and the role of oncogenes and suppressor genes. *Curr Opin Oncol* 1991; 3:75-92.

Odero-Marah VA, Khalkhali-Ellis Z, Chuntapong J, Amir S, Seftor RE, Seftor EA et al. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2003; 2:398-403.

Pemberton PA, Tipton AR, Pavloff AN, Smith J, Erickson JR, Mouchabeck ZM et al. Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:1697-706.

Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors. Structure, function and regulation. *J Biol Chem* 1994; 269:15957-60.

Pratt MAC, White D, Kushraha N, Tibbo E, Niu MV. Cytoplasmic mutant p53 increased Bcl-2 expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Apoptosis* 2007; 12:657-69.

Price D, Avraham S, Feuerstain J, Fu Y, Avraham HK. The invasive phenotype in HMT-3522 cells requires increased EGF receptor signaling through both p13-kinase and ERK 1.2 pathways. *Cell Commun Adhes* 2002; 9:87-102.

Reed JC, Miyashita T, Takayama S. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996; 60:23-32.

Rose DS, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol* 1994; 47:1010-4.

Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989; 5:102-10.

Sager R, Sheng S, Anisowicz A, Sotiropoulou G, Zou Z, Stenman G et al. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59:537-46.

Shatruck-Eiden D, McClure M, Simard J, Labrie S, Narod S, Couch F et al. A collaborative study of 82 mutations of the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene: implications of presymptomatic screening and testing. *JAMA* 1995; 273:535-41.

Sheng S, Pemberton PA, Sager R. Production, purification and characterization of recombinant maspin proteins. *J Biol Chem* 1994; 269:30988-93.

Sheng S, Carey J, Seftor EA, Dias L, Hendrix MJ, Sager R. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11669-74.

Sheng S, Truong B, Fredrickson D, Wu R, Parker AB, Sager R. Tissue-type plasminogen activator is a target of the tumor suppressor gene maspin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:499-504.

Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1995; 43:193-201.

Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S et al. Common origin of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet* 1994; 8:392-8.

Schmitt M, Harbeck N, Thomsson C, Janicke F, Graeff H. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Tromb Hemost* 1995;78:285-96.

Shachar BB, Feldstein O, Hacchen D, Ginsberg D. The tumor suppressor maspin mediates E2F1-induced sensitivity of cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Res* 2010; 8:363-72.

Silverstein MJ, Gierson ED, Waisman JR, Senofsky GM, Colburn WJ, Gamagami P. Axillary lymph node dissection for T1a breast carcinoma. *Cancer* 1994; 73:664-7.

Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW. Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ* 1991; 2:365-72.

Sopel M, Kasprzik I, Berdowska I. Maspin and c-erbB-2 expression in correlation with microvessel density in invasive ductal breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2005; 43:109-16.

Stark AM, Schem C, Maass N, Hugo HH, Jonat W, Mehdorn HM et al. Expression of metastasis suppressor gene maspin is reduced in breast brain metastases and correlates with the estrogen receptor status. *Neurol Res* 2009 [Epub ahead of print].

Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Cancer Rev* 2003; 3:55-63.

Steeg PS. Control of invasion and metastasis. In Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the Breast*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, p 459-72.

Sternich MD, Kedeshian P, Shao ZM, Safariana S, Barsky SH. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1949-58.

Tooney PA, Agrez MV, Burns GF. A re-examination of the molecular basis of cell movement. *Immunol Cell Biol* 1993; 71:131-9.

Tomasetto C, Neveu MJ, Daley J, Horan PK, Sager R. Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J Cell Biol* 1993; 122:157-67.

Umekita Y, Yoshida H. Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma. *Histopathology* 2003; 42:541-5.

Van der Wall E. The sentinel node in breast cancer: implications for adjuvant treatment. *Eur J Nucl Med* 1999; 26:S17-9.

Verheijen R, Kuijpers HJH, van Driel R, Beck JLM, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ et al. Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation related antigen. In localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 1989; 92:531-40.

Vizosso FJ, González LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2007; 96:903-11.

Visse R, Nagesse H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92:827-39.

Weinstat-Saslow D, Steeg P. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J* 1994; 8:401-7.

Wang S, Yang D, Lippman ME. The BCL-2 family proteins, apoptosis, and breast cancer. In Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the Breast*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p 473-85.

Wolff AC, Hammond EH, Schwartz JN, Hagerty KL, Alfred DG, Cote RJ et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131:18-43.

World Health Organization. *World Cancer Report, 2008*. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009. [on line] disponible:
<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr> [06/01/2010].

Zhang M, Sheng S, Maass N, Sager R. mMaspin: the mouse homolog of human tumor suppressor gene inhibits mammary tumor invasion and motility. *Mol Med* 1997; 3:49-59.

Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJC, Thor A, Neven M, Sheng S et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 1994; 236:526-9.

FONTES CONSULTADAS

Faculdade de Ciências Médicas da Santa de São Paulo (Pós –Graduação).
Normatização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo; 2004. 26p.

Organização Mundial da Saúde (OMS) CID-O – Classificação Internacional de Doenças para Oncologia. Edição traduzida pela Fundação Oncocentro de São Paulo. São Paulo: 2 ed. 1996. 112p.

UICC – União Internacional Contra o Câncer. Manual de Oncologia Clínica - TNM Classificação de tumores malignos. 8 ed. São Paulo: FOSP, 2008, pg 505-36.

RESUMO

Chen, MK. Relação entre a imunexpressão da proteína maspin em carcinomas ductais de mama estádios I e II e o estado dos linfonodos da axila. Dissertação. 2010.

Objetivo. O estudo teve como propósito estabelecer relação entre a superexpressão da proteína maspin nas células neoplásicas do tumor primário de mulheres acometidas por carcinoma ductal invasivo de mama nos estádios clínicos I e II e o estado dos linfonodos axilares. **Casuística.** Foram analisados fragmentos teciduais dos tumores mamários de 40 mulheres. Consoante o estado linfonodal axilar as pacientes foram separadas em: grupo 1, formado por 20 pacientes nas quais os linfonodos apresentavam-se livres, e grupo 2, composto por 20 pacientes com linfonodos comprometidos. **Método.** A análise da expressão da maspin em ambos os grupos foi feita por meio de técnica de imunistoquímica, utilizando-se anticorpo monoclonal liofilizado de camundongo clone EAW24. O teste empregado para análise estatística dos resultados foi o Qui-quadrado, adotando-se o nível de significância de 5% ($p = 0,05$). **Resultado.** Constatou-se que a maspin encontrava-se expressa em 40% dos espécimes do grupo 1 e em 25% daqueles do grupo 2. **Conclusão.** Por meio da análise estatística verificou-se não haver associação estatisticamente significativa entre a expressão da proteína maspin e o estado dos linfonodos axilares ($p = 0,260$).

Palavras chave: carcinoma ductal de mama, linfonodos da axila, maspin, inibidores de serino proteinases.

ABSTRACT

Chen, MK. Relationship between maspin protein immunoexpression in T1 and T2 ductal breast cancer cells and axillary lymph node status. Dissertation. 2010.

Objective. The aim of this study was to determine the relationship between maspin protein overexpression of neoplastic cells from primary tumors in women with invasive ductal breast cancer at clinical stages I and II, and axillary lymph node status. **Casuistic.** Tissue specimens from breast tumors of 40 women were analysed. Patients were divided according to axillary lymph node status into: Group 1, comprising 20 patients with disease-free lymph nodes, and Group 2, comprising 20 patients with diseased lymph nodes. **Method.** The analysis of maspin expression in both groups was performed by the immunohistochemical technique, using liophilized mouse monoclonal antibody EAW24. For statistical analyses, the Chi-squared test were employed. **Results.** Maspin was found to be expressed in 40% of Group 1 specimens and 25% of Group 2 specimens. **Conclusion.** Statistical analysis did not demonstrated statistically significant association between maspin expression and axillary lymph node status ($p = 0.260$).

Key words: ductal breast cancer, axillary lymph nodes, maspin; serine proteases inhibitors.

APÊNDICES

Apêndice 1
Aprovação do Comitê de Ética e
Pesquisa



Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho
Fundado em 19/02/1920 – CGC 60.945.854/0001-72
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – CEP
APROVADO PELA CONEP/MS EM 25/08/97 CARTA Nº1555/97

São Paulo, 26 de fevereiro de 2010.

Ilmo. Sr.
Dr. Chen Ming Kue
Pesquisador Responsável

Registro CEP: 223/10

Ref.: *"Relação entre a expressão da proteína maspin no tumor primário e o estado linfonodal axilar em mulheres com carcinoma ductal de mama T1 e T2".*

Em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho, no cumprimento de suas atribuições, em reunião realizada em **24/02/2010**, foi aprovado o projeto de pesquisa acima citado e os seguintes documentos:

- **Projeto de pesquisa;**
- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Carlos Elias Fristachi
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho

Apêndice 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Informações às pacientes

Este estudo: “Relação entre a expressão da proteína maspin no tumor primário e o estado linfonodal axilar em mulheres com carcinoma ductal de mama T1 e T2” tem por objetivo analisar a expressão de substâncias (proteínas) nos tumores maligna da mama de pacientes que foram submetidas ao tratamento cirúrgico. Para isso, precisamos retirar fragmentos do material emblocada em parafina que foi realizado após cirurgia para diagnóstico e ficou sob guarda do serviço de patologia do Instituto do Câncer Dr. Arnaldo. Dessa maneira, as pacientes que autorizarem o estudo não terão nenhum procedimento e/ou risco acrescido ao seu tratamento, além daqueles já estabelecido ou realizado; isto porque é um estudo retrospectivo (posterior ao tratamento). As pacientes terão sua identidade preservada e suas informações serão mantidas em caráter sigiloso. Os dados obtidos ficarão arquivados para posterior uso em fins didáticos e científicos. As pacientes poderão, a qualquer momento, desistir de participar da pesquisa, sem isto implique em qualquer prejuízo às mesmas.

Eu, _____, portadora do RG: _____ (SSP- _____) abaixo assinada, declaro estar ciente da natureza deste estudo e ter pleno conhecimento de todos os procedimentos necessários para realização do mesmo. Declaro ter lido o exposto no documento anexo, “Informação às pacientes” , e concedo meu acordo de participação de livre e espontânea vontade. Confirmando ainda, que me foi assegurado o direito de abandonar a qualquer momento o estudo, se assim eu o desejar.

São Paulo, _____ de _____ de 20____

Assinatura da Paciente

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](#)