

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**Expressão imunohistoquímica do fator indutor de hipóxia 1-
alfa (HIF-1 α) em pacientes com câncer de mama localmente
avançado**

Luiz Gustavo Oliveira Brito

Ribeirão Preto

2010

Luiz Gustavo Oliveira Brito

**Expressão imunohistoquímica do fator indutor de hipóxia 1-alfa
(HIF-1 α) em pacientes com câncer de mama localmente avançado**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ginecologia e Obstetrícia.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Heitor Ricardo Cosiski Marana

Ribeirão Preto

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Brito, Luiz Gustavo Oliveira.

Expressão imunohistoquímica do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) em pacientes com câncer de mama localmente avançado.

84p.: il; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Marana, Heitor Ricardo Cosiski

1. Câncer de mama – 2. Quimioterapia neoadjuvante – 3. HIF-1 α –
4. Fatores prognósticos

Luiz Gustavo Oliveira Brito

Expressão imunohistoquímica do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α)
em pacientes com câncer de mama localmente avançado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ginecologia e Obstetrícia

Área de concentração: Tocoginecologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

À **Deus**, fonte de refúgio e sabedoria nas horas fáceis e difíceis, ao amor dispensado, a paciência em perdoar meus erros, sabendo que eu vim a este mundo para melhorar espiritualmente.

À minha mãe, **Luciane Maria Oliveira Brito**. Amiga, companheira de todas as horas, uma verdadeira psicóloga, enfim, uma pessoa em tempo integral de apoio, sendo fonte de inspiração para minha vida profissional. Mãe, se eu cheguei até onde estou, com certeza, seu sucesso me seduziu para isso. E se eu chegar próximo de tudo aquilo que você já realizou, acho que conseguirei atingir meu objetivo. Cresci na vida acadêmica, e não consegui me desviar desse caminho. Aonde quer que eu fique, vá, esteja, você continuará sendo meu referencial, meu porto seguro. Amo você.

À minha irmã **Haíssa Oliveira Brito**, pela obstinação, perseverança em atingir seus objetivos, por não entregar os pontos frente aos obstáculos e pela inteligência potencial que está começando a emergir durante o seu Mestrado. Pela sua personalidade marcante, e acima de tudo, pela sua sinceridade.

À minha avó **Maria Bárbara Faray Oliveira**, *in memoriam*, pelo seu amor incondicional e eterno.

Ao meu pai **Luiz Carlos Vieira Brito**, pelo seu apoio durante minha formação e pela sua torcida para meu crescimento.

À minha amiga **Maria Bethânia da Costa Chein**, pelo entusiasmo das palavras ao falarmos do futuro e pelo apoio constante.

À minha afilhada **Maria de Lourdes Figueiredo**, pela sua honestidade e delicadeza no tratar. À minha tia **Lúcia Maria Faray Oliveira** e à minha madrinha **Ana Maria Nogueira Silva**, pelas divertidas horas juntos.

À família **Faustino**, em especial à minha segunda mãe **Laurinda**, e às minhas segundas irmãs **Beatriz e Alessandra**, por serem meu refúgio nas horas difíceis. Um grande beijo a todas.

Ao meu orientador, **Heitor Ricardo Cosiski Marana**. Obrigado pela suas dicas, pelos seus conselhos, palavras de apoio pelas vezes que procurei auxílio, e pela sua objetividade, que me ajudou a traçar metas de potencializar meu tempo de trabalho.

Ao meu mais novo **afeto** e motivo de **orgulho** pela homenagem recebida enquanto Médico Assistente: **à 54ª Turma de Medicina da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, obrigado pela confiança depositada, pelas amizades construídas e por me motivarem cada vez mais a seguir a carreira acadêmica !

Agradecimentos

Agradeço:

Às pacientes que, direta ou indiretamente, colaboraram para o desenvolvimento dessa pesquisa. Mulheres que me deram lições de vida, que se tornaram minhas amigas, que eu vi chegarem e se curarem, mas com quem também aprendi junto o processo de adoecer e morrer. Que me educaram na Oncologia Humana, e que me melhoraram enquanto pessoa.

À Amiga Viviane Fernandes Schiavon, colega de pós-graduação e companheira nessa caminhada, sempre com o seu apoio incondicional para que eu trilhe a minha felicidade profissional, o meu muito obrigado. Sei que você sempre foi um apoio na Oncologia pra mim, e será sempre um exemplo de profissional a ser seguido.

Às Amigas Paula Andréa de Albuquerque Salles Navarro, Daniela Anderson, Ana Carolina dos Santos Calderon, Carolina Sales Macedo Vieira, Elaine Cristine Dantas Moysés e Alessandra Cristina Marcolin, o meu muito obrigado por existirem na minha vida em Ribeirão Preto. Vocês tornam meu dia-a-dia mais alegre e saudável, sempre com apoio incondicional.

Aos Amigos Fábio Eduardo Zola, William Simões Clagnan, Joaquim Moraes Sarmiento Filho, Pedro Sérgio Magnani, Marcos Masaru Okido, Maria Ângela Cury Ramos Carvalho pelo apoio, conselhos e tormentos que passamos juntos nesta vida de médico assistente.

Às Professoras Fernanda Maris Peria (Oncologia), Thaís de Oliveira Gozzo (Enfermagem) e Silvana Maria Quintana (Obstetrícia) pelos conselhos, conversas

sobre o futuro, pelas frutíferas idéias que essas docentes têm, de melhorar cada vez mais, em seus campos de trabalho, motivando-me sempre a me aprimorar.

Ao Professor Daniel Guimarães Tiezzi pela amizade crescente, pelo apoio na estatística do trabalho, e pelo seu entusiasmo e inteligência na pesquisa experimental que me motiva a estudar.

Ao Professor Francisco José Cândido dos Reis, pelos conselhos, inteligência emocional, sabedoria e pela presteza em colaborar com minha formação profissional.

Ao Professor Antonio Alberto Nogueira, coordenador da Pós-Graduação, pelo apoio constante durante minha entrada no Mestrado e estímulo a continuar rumo ao Doutorado.

Aos Professores Geraldo Duarte, Ricardo de Carvalho Cavalli e Maurício Mesquita Sabino de Freitas, pela confiança depositada em meu trabalho, e pelo meu ótimo convívio dentro dos Setores de Obstetrícia e Uroginecologia, vínculos ao quais pertenço atualmente.

Ao Professor Rui Alberto Ferriani, chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pelo apoio sempre presente, pelas boas conversas que temos, e pela certeza de que sabe que tento fazer o máximo que posso. Ao Professor Jurandyr Moreira de Andrade, pela possibilidade da experiência dentro do Setor de Mastologia e Oncologia Pélvica. Ao Professor Marcos Felipe Silva de Sá, que impulsiona o grupo

do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, a sempre galgar cada vez mais espaço e a extrapolar os domínios desse Departamento.

Aos médicos residentes e aos alunos de Medicina que passam pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, que me estimulam a estar sempre estudando e me aperfeiçoando para estar transmitindo o que há de mais recente. Aos recém-chegados no Setor de Uroginecologia, Heitor Leandro e Alessandro Antunes, pela grande disposição em melhorar exponencialmente a qualidade do Serviço.

Aos grandes amigos Ilza Mazzocato, Suellen Soares, Reinaldo Tavares, Rosane Casula e Ricardo Perussi, obrigado pelo apoio, pela disposição sempre presente e pelas horas divertidas que passamos.

Aos colegas plantonistas do Centro de Referência em Saúde da Mulher (CRSM-Mater) (Caio, Luiz Augusto, Isa, Chedid, Gustavo, Mariana, Maria Rita, Nelson, Felipe), Unidade de Emergência (Júlio, Franklin) e Centro Obstétrico (Hermes, Dr.Rafael, Prof. Aderson) do HC, pela convivência. Às funcionárias do Centro Cirúrgico (Teresa, Iolanda, Rosiane, Edina, Vera e Cabral), à equipe de enfermagem dos Ambulatórios (Fabiana, Rita, Tânia, Márcia, Sílvia) e da Enfermaria de Ginecologia (Márcia, Vera, Líbia, Beth, Cristina, Cíntia) pelo carinho comigo e com as pacientes.

Aos colegas de pós-graduação (Daniela, Lucimara, Sany Rose, Salim, Rubineide, Licia) pelas horas divertidas passadas nas disciplinas de seminários. Ao meu grupo de residência de 2005 que permaneceu no DGO (Marcelo Rocha, Ercilene Yamaguchi,

Anderson Melo) após o término do *lato sensu*, pela nossa resistência mantida, transformada no objetivo de nos manter em aprimoramento.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, berço de todo o meu aprendizado desde 2005, e atual local de trabalho e pós-graduação. Não tenho palavras para expressar meu agradecimento. Local modelo de tripé ensino-pesquisa-assistência, foi, é e sempre será exemplo de vida acadêmica, aonde estiver.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu estado original.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1 – INTRODUÇÃO.....	21
1.1 – O câncer de mama no Brasil e no Mundo.....	21
1.2 – Hipóxia e carcinogênese.....	23
1.3 – Fator indutor de hipóxia.....	24
1.4 – HIF-1 α e câncer de mama.....	25
2 – OBJETIVOS.....	29
2.1 – Principal.....	29
2.2 – Secundários.....	29
3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	30
3.1 – Pacientes.....	30
3.2 – Critérios de inclusão.....	30
3.3 – Critérios de exclusão.....	31
3.4 – Diagnóstico anátomo-patológico.....	31
3.5 – Variáveis estudadas.....	32
3.6 – Imunohistoquímica e quantificação do RE, RP, cerbB2 e HIF-1 α	35
3.7 – Análise estatística.....	36
3.8 – Redação do texto.....	37
4 – RESULTADOS.....	38
5 – DISCUSSÃO.....	42

6 – CONCLUSÕES.....	46
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	51
Anexo A. Questionário aplicado.....	51
Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	53
Anexo C. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.....	56
APÊNDICE.....	57
Apêndice A. Classificação clínica TNM para câncer de mama.....	57
Apêndice B. Agrupamento dos estádios clínicos do TNM.....	58
ARTIGO CIENTÍFICO PREPARADO A PARTIR DA DISSERTAÇÃO.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação do HIF-1 α durante normoxia e hipoxia.....	25
Figura 2. Conexão do HIF-1 α com a via do mTOR.....	27
Figura 3. Forte expressão de HIF-1 α em análise imunohistoquímica. DAB, 400x.....	39
Figura 4. Ausência de marcação pelo HIF-1 α em microscopia. DAB, 200x.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado conforme características epidemiológicas. Ribeirão Preto, 2010.....	34
Tabela 2. Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado conforme marcadores imunohistoquímicos. Ribeirão Preto, 2010.....	38
Tabela 3. Avaliação da correlação entre a presença do HIF-1 α e diversas variáveis de pacientes com câncer de mama localmente avançado. Ribeirão Preto, 2010.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAIX – carbonic anhydrase IX
- CISH – chromogenic in situ hybridization
- EGF – epidermal growth factor
- EUA – Estados Unidos da América
- FGF-2 – fibroblast growth factor type 2
- FISH – fluorescence in situ hybridization
- GLUT -1 – glucose transporter 1
- HER-2 – human epidermal receptor type 2
- HIF-1 α - hypoxia inducible factor type 1 – alpha
- HRE – hypoxia response elements
- IGF – insulin growth factor
- Il-1 β – interleukin type 1beta
- LABC – locally advanced breast cancer
- MMP-2 – matrix metalloproteinase type 2
- PDGF – platelet derived growth factor
- PHD – proline hidroxilase domain
- RE – receptor de estrogênio
- RECIST – response evaluation criteria in solid tumours
- RP – receptor de progesterona
- TGF-1 β - transforming growth factor type 1 beta
- TNF- α - tumoral necrosis factor type alfa
- VEGF – vascular endothelial growth factor

BRITO, L.G.O. Expressão imunohistoquímica do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) em pacientes com câncer de mama localmente avançado. 2010. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.**

Objetivos: Determinar a expressão imunohistoquímica do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) e suas variáveis associadas em pacientes com câncer de mama localmente avançado.

Pacientes e método: Vinte e sete mulheres foram biopsiadas para diagnóstico histopatológico do carcinoma mamário e submetidas a tratamento quimioterápico pré-cirúrgico. Analisou-se a associação do HIF-1 α com idade, tamanho tumoral, grau histológico, estadió clínico, status hormonal e axilar, resposta clínica e patológica após tratamento quimioterápico, expressão do receptor de estrogênio, progesterona e cerbB2.

Resultados: A expressão de HIF-1 α foi presente em 66,7% das pacientes. O único fator associado à sua presença foi o status axilar positivo ($p=0,02$), tendo permanecido durante a análise univariada. As demais variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa.

Conclusão: Existe uma associação estatisticamente significativa entre o acometimento linfonodal e a presença de HIF-1 α em pacientes com câncer de mama localmente avançado.

Palavras-chaves: câncer de mama; HIF-1 α ; quimioterapia neoadjuvante; status axilar; fatores prognósticos.

BRITO, L.G.O. Immunohistochemical expression of hypoxia-inducible factor 1-alpha in locally advanced breast cancer patients. 2010. **Master's paper – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.**

Objectives: To assess the expression of HIF-1 α and its associated variables with locally advanced breast cancer (LABC) patients.

Methods: Twenty-seven women were submitted to incisional biopsy for histopathological diagnosis of breast carcinoma and undertaken to neoadjuvant chemotherapy (NACT). It was studied the association of HIF-1 α with age, tumoral size, histological grade, clinical stage, hormonal and axillary status, clinical and pathological response after NACT, expression of estrogen and progesterone receptors, as well as the presence of cerbB2 antigen.

Results: HIF-1 α 's expression was found in 66.7% of patients. Only axillary status was the associated factor with its presence (p=0.02), and remained after univariate analysis. The others did not present any significant statistically difference.

Conclusion: There is a significant statistically association between axillary status and HIF-1 α 's expression in LABC patients.

Keywords: breast cancer; HIF-1 α ; neoadjuvant chemotherapy; axillary status; prognostic factors

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer de mama no Brasil e no Mundo

O câncer é um problema de saúde pública, com estimativas de 11 milhões de casos novos no mundo em 2008 e 7 milhões de mortes, e previsão de 16 milhões de casos novos em 2020, com 10 milhões de óbitos. Destes, 60% ocorrerão em países em desenvolvimento (FERLAY, 2010).

O câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres ocidentais. As estatísticas indicam um aumento de frequência da neoplasia tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Nos EUA, estimou-se para 2009, 192.370 mulheres com esta patologia, com 40.170 mortes (NCI, 2010). No Brasil, o tumor de mama é a principal causa de morte (15,6%) entre as mulheres, contabilizando mais de nove mil óbitos por ano, segundo dados de 2008 (INCA, 2010). Este também é o segundo tipo mais incidente de câncer, contabilizando 49.400 casos, sendo ultrapassado apenas pelos tumores de pele não melanoma. Apenas no estado de São Paulo, a estimativa para 2010 estipula aproximadamente 65 casos novos para cada 100.000 mulheres, perfazendo um total de 27.620 pacientes (INCA, 2010).

Dados analisados através de *trials* randomizados mostraram, entre 1976 e 1990, que a detecção precoce através da avaliação mamográfica reduziu a mortalidade por câncer de mama em 25% das mulheres entre 50 e 69 anos (UICC, 2010). Apesar das políticas de incentivo ao screening mamográfico para detecção precoce do câncer de mama, aproximadamente 10% dos tumores, mundialmente, são diagnosticados como câncer de mama localmente avançados, com aumento do risco de metástases

subseqüentes e prognóstico mais reservado (AHERN et al., 2005). Diferente de países como os EUA, onde há um aumento da incidência, mas diminuição da mortalidade por câncer de mama, o Brasil ainda apresenta elevação nas taxas de mortalidade pela neoplasia, principalmente pela detecção tardia da doença, ocorrendo em aproximadamente metade dos casos (INCA, 2010).

Devido ao alto percentual de estádios clínicos avançados em nosso país, o tratamento cirúrgico não é a forma inicialmente mais recomendada nesses casos; aplica-se, nessa situação, a terapia neoadjuvante, cujo objetivo é reduzir o volume primário, proporcionando operabilidade nos casos inoperáveis e aumentando as taxas de cirurgia conservadora da mama nos casos passíveis de cirurgia. Embora não existam evidências que a quimioterapia aplicada antes do tratamento cirúrgico leve a um ganho de sobrevida substancial, em comparação a aplicação após o tratamento cirúrgico, está estabelecido que pacientes que apresentam resposta objetiva com tratamento neoadjuvante, em especial, resposta patológica completa, apresentam uma sobrevida livre de doença e global maior que os casos onde a resposta ao tratamento não foi satisfatória (PEINTINGER et al., 2008).

Detectar, através de estudos biológicos, quais pacientes apresentarão resposta objetiva a um determinado tratamento, relaciona-se à necessidade de conhecimento de mecanismos que propiciam o crescimento tumoral para responder essas questões, além de descobrir alvos para novas terapias. Diversos pontos do processo carcinogênico são revisitados, a depender do foco da pesquisa: neoangiogênese tumoral, mecanismos pró-inflamatórios, hipóxia, remodelação tissular e desdiferenciação celular, intra e extravasão celular, fenômenos epigenéticos e genéticos.

1.2. Hipóxia e carcinogênese

Assim como outros tumores sólidos, os tumores de mama necessitam de um microambiente que promova angiogênese, que não apenas mantém a viabilidade tumoral e seu crescimento, mas que também contribua com a disseminação da doença. Esse mecanismo apresenta estreita relação com o prognóstico da doença e tem sido estudada há pelo menos 40 anos (FOLKMAN, 2007).

Porém, um modelo não menos importante, que promove a angiogênese é o mecanismo de hipóxia tecidual. A hipóxia está presente em muitos tumores sólidos, causada geralmente pela vascularização anormal neoplásica, e pela rápida produção celular. Isso resulta em áreas de necrose tissular e rápida morte de células saudáveis (VAUPEL et al., 2001).

Define-se hipóxia como um nível de oxigenação menor que 1,5%, valor bem menor que a média de 7% encontrada em tecidos bem vascularizados (VAUPEL, 2004). Tais medidas geralmente são feitas com eletrodos que avaliam a tensão de oxigênio local, método considerado padrão-ouro para tal verificação. A desvantagem do mesmo é não conseguir identificar as células que se desdiferenciam no ambiente hipóxico (SEMENZA, 2002).

Marcadores bioquímicos produzidos em ambiente hipóxico estão relacionados com diversos cânceres, notadamente o de mama, e têm sido considerados fatores prognósticos para tumores altamente indiferenciados, com recentes pesquisas sobre a sua aplicabilidade clínica como terapia-alvo (HARRY, 2002; O'DONNELL et al., 2006). Não se sabe se a hipóxia contribui para a formação de tumores agressivos, ou se estes têm um padrão de hipóxia difusa (o mecanismo central é o desvio angiogênico, com produção de fatores neovasculares potentes, como VEGF), e de

forma semelhante, uma explicação não exclui a outra. Porém, ela tem sido utilizada como parâmetro prognóstico em diversos estudos.

Se a hipóxia é severa ou prolongada, a morte celular ocorre. As células tumorais podem sofrer mudanças genéticas e adaptativas que as permitem escapar de perecer da deprivação de oxigênio. Tais alterações são associadas a um fenótipo mais agressivo, e à maior resistência à radio e quimioterapia (VLEUGEL et al., 2005).

1.3 Fator indutor de hipóxia

A ampla resposta celular desencadeada pela hipóxia é mediada pelo HIF-1 (fator indutor de hipóxia). Este é uma proteína heterodímera (fator de transcrição nuclear), e são divididos em 2 subunidades, a alfa (α) e a beta (β), ambas membros de uma família de proteínas (bHLH). A subunidade α apresenta 3 tipos diferentes de unidades (1α , 2α , 3α). Porém, a 1α é a superexpressa em tumores mamários, e a que apresenta importância funcional, e provavelmente prognóstica.

Em condições de normóxia, são reconhecidas pela proteína de von Hippel Lindau (pVHL) e degradadas por hidroxilação através dos domínios da prolina hidroxilase (PHD's) e do fator inibidor da hipóxia (FIH-1), e por fim, sofrem ubiquitinação via proteassomo (LUNDGREN et al., 2007).

Contudo, no período de hipóxia, como não há a presença das PHD's e do FIH-1, o HIF-1 migra do citoplasma para o núcleo, e através da sua ligação com os elementos de resposta à hipóxia (HRE), na sequência 5'-RCGTG-3' (onde R é qualquer base purínica), assim como do fator de transcrição CBP300, levam a produção de genes alvo (LUNDGREN et al., 2007). Em especial, há um aumento na ativação dos genes que controlam o transporte de glicose, a glicólise, gliconeogênese,

produção de fatores de crescimento, metabolismo de fosfatos de alta energia, eritropoiese, metabolismo do heme, transporte de ferro, e síntese do óxido nítrico; isto posto, aumenta a chance de sobrevivência da célula cancerígena sobre condições de hipóxia (Figura 1).

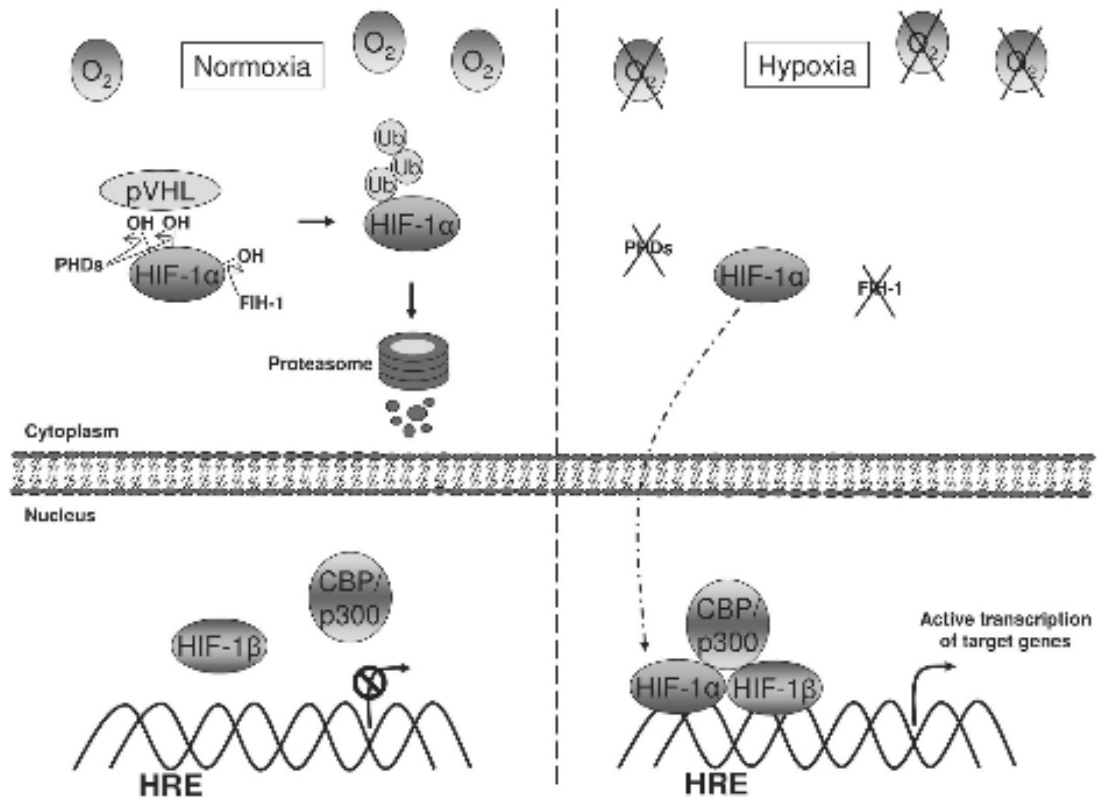


Figura 1. Regulação do HIF-1 α durante normoxia e hipoxia (adaptado de Lundgren et al., 2007).

1.4 – HIF-1 α e câncer de mama

A principal fonte de estímulo do HIF-1 α é a hipóxia; porém ele também pode ser estimulado através da mutação do proto-oncogene PTEN (ZUNDES et al., 2000), p53 (RAVI et al., 2000) e pela superexpressão do oncogene HER-2/neu

(LAUGHNER et al., 2001). Em estudo realizado por Garieri (2008) em nossa Instituição, foram observados maiores níveis séricos de HIF-1 α em pacientes HER-2 positivos do que no grupo HER-2 negativo, tendo sido considerado fator preditivo importante, com pior sobrevida global e menor intervalo livre de doença para este subgrupo.

O papel do HIF-1 na carcinogênese mamária têm sido devido ao fato do mesmo induzir a transcrição do VEGF (fator de crescimento epidermóide vascular), levando a uma maior angiogênese tumoral (SCHOPPMANN et al., 2002; BOS et al., 2005); daí a utilização de anticorpos monoclonais (bevacizumab) contra o VEGF, apresentando ótimos resultados no controle tumoral, tanto em estudos pré-clínicos, como em pacientes com doença metastática (ROSEN, 2005).

Também, o HIF-1 α pode ser superativado como consequência de fatores de crescimento vascular, tais como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), EGF (fator de crescimento epidérmico), FGF-2 (fator de crescimento derivado dos fibroblastos), TGF-1 β (fator de crescimento transformador), IGF (fator de crescimento derivado da insulina) e citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 β . Tal mediação ocorre através de duas importantes vias de sinalização, a RAS/MEK/MAPK e a cascata PI3K/Akt/mTOR, em especial, a sinalização desta última (LUNDGREN et al., 2007) (Figura 2).

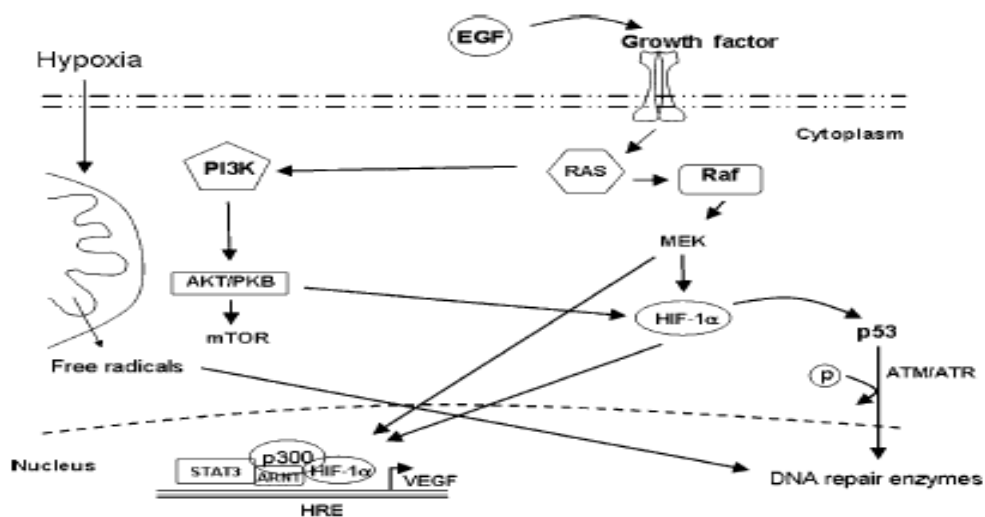


Figura 2. Conexão do HIF-1 α com a via do mTOR (adaptado de Lundgren et al., 2007).

Outro aspecto crucial é se existe uma diferença ou mudança na ativação dos genes-alvo que normalmente o HIF-1 α iria realizar, seja de uma maneira mais ou menos intensa. Sabe-se que a anidrase carbônica (CAIX), um membro da família das metaloenzimas ligadas ao zinco é um alvo amplamente ativado pelo HIF-1 α . Sua função é regular o pH intra e extracelular pela conversão de dióxido de carbono em ácido carbônico. Tal marcador tem se mostrado de valor prognóstico em vários tumores (mama, cervical, nasofaríngeos). Outra proteína de membrana amplamente ativada é o transportador de glicose 1 (GLUT-1), freqüentemente superexpressa em tumores, cuja função é aumentar a captação de glicose pelas células tumorais (VLEUGEL et al., 2005).

Assim, investigações enfocando o valor prognóstico do HIF-1 α no câncer de mama têm surgido; estudo de Schindl et al.(2002) evidenciou que a superexpressão de HIF-1 α esteve associado à pior sobrevida global em pacientes com câncer de mama localmente avançado; Bos et al. (2003) entretanto, já encontraram esta associação em

pacientes axila negativa, inclusive. Em um estudo com espécimes tissulares da mama de pacientes com doença pré-neoplásica e com carcinoma mamário, foi encontrado uma correlação positiva entre o HIF-1 α e tumores menos diferenciados e de maior risco neoplásico (BOS et al., 2001).

Em trabalho realizado em nosso serviço, não foi evidenciado diferença estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos de HIF-1 α e VEGF antes e após quimioterapia adjuvante (GARIERI, 2008). Porém, não existem estudos mostrando se há redução ou não da marcação imunohistoquímica do HIF-1 α após tratamento neoadjuvante; poucos estudos ainda estão disponíveis na literatura correlacionando o HIF-1 α com fatores prognósticos classicamente conhecidos, como o estado axilar, status hormonal e outros marcadores imunohistoquímicos.

2.OBJETIVOS

2.1 Principal

Avaliar a expressão imunohistoquímica do fator indutor de hipóxia tipo 1-alfa (HIF-1 α) em pacientes com câncer de mama localmente avançado.

2.2 Secundários

- A. Avaliar e correlacionar os marcadores de prognóstico clínico (idade, status hormonal, tamanho tumoral, estadió clínico, status axilar e resposta clínico-patológica) com a maior ou menor expressão de HIF-1 α .
- B. Avaliar e correlacionar os marcadores de prognóstico histológico (grau histológico, RE, RP, HER-2), agrupando as pacientes em risco baixo, médio e alto, com a maior ou menor expressão de HIF-1 α .

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Tornaram-se elegíveis para a participação neste projeto as pacientes atendidas consecutivamente no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), com tumor localmente avançado de mama, que vieram a ser submetidas à quimioterapia neo-adjuvante e tratadas com cirurgia, posteriormente. Todas as pacientes foram informadas do estudo e assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE), já aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa desta instituição.

A parte laboratorial do projeto foi realizada no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HC-FMRP-USP em colaboração com o Laboratório de Imunologia do Departamento de Imunologia, Parasitologia e Microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.2. Critérios de inclusão

Paciente com diagnóstico de câncer de mama, sem tratamento prévio.

Idade entre 25 e 80 anos.

Indicação de tratamento com quimioterapia neoadjuvante (câncer de mama localmente avançado - estadios III; tumores estadios II, onde a relação volume tumor/mama não permite cirurgia conservadora), conforme protocolo de

tratamento estabelecido e em prática no Serviço de Mastologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

3.3. Critérios de exclusão

Impossibilidade de compreensão do TCLE.

Paciente com déficit cognitivo.

Performance status reduzido.

Tratamento quimioterápico prévio.

Outra neoplasia maligna prévia, com exceção dos tumores de pele não melanoma.

Gestação.

Doença metastática confirmada.

Pacientes menores de 18 anos.

3.4. Diagnóstico anátomo-patológico

Vinte e sete pacientes foram submetidas a biópsia incisional para diagnóstico histopatológico antes do início da quimioterapia de indução conforme protocolo deste serviço, no período de março a novembro de 2009. Durante o procedimento feito de rotina no Setor em todas as pacientes, após retirado fragmento, foi amostrado um fragmento de $0,125\text{ cm}^3$ ($0,5 \times 0,5 \times 0,5\text{cm}$), no qual foi realizado o estudo. O resto do material foi armazenado em meio de congelamento “tissue-tek”. Todas apresentaram o diagnóstico de adenocarcinoma mamário, sendo 26 do subtipo ductal e uma paciente com subtipo lobular.

3.5 Variáveis estudadas

As variáveis clínicas estudadas foram: idade (em anos), maior diâmetro tumoral (em centímetros), grau histológico segundo a Classificação de Elston e Ellis (ELSTON et al., 1991), estadió clínico segundo a Classificação TNM (SOBIN et al., 1997), subtipo histológico, status hormonal (pré e pós-menopausa).

Como as pacientes foram submetidas ao tratamento neoadjuvante, foram avaliadas a resposta clínica e patológica. A resposta clínica foi inicialmente baseada pelos critérios RECIST (EISENHAUER et al., 2009), como segue abaixo:

- 1) Resposta Completa: definida como desaparecimento completo de toda evidência de doença clínica.
- 2) Resposta Parcial: definida como diminuição de mais de 50% no produto das medidas dos maiores eixos perpendiculares das lesões.
- 3) Resposta Menor: uma diminuição de 25-50%, sem satisfazer o critério de resposta parcial.
- 4) Progressão: aumento do volume do tumor.

Para a análise estatística, dividimos as respostas em completa e incompleta/ausente (engloba resposta parcial, menor e progressão). A resposta patológica segue o mesmo padrão. Como tivemos cinco casos de desistência do tratamento e três óbitos no decorrer da pesquisa, em 8 pacientes não foi possível realizar esta análise.

Para o status axilar, foi considerado a dissecação linfonodal após o tratamento neoadjuvante para os casos em que a axila era clinicamente negativa; quando a mesma era considerada positiva, não era aguardado o anátomo-patológico.

De um total de 27 pacientes, a média/desvio-padrão e mediana de idade foram de, respectivamente, $51,96 \pm 12,65$ e 52 anos. A maior parte das pacientes encontra-se acima de 50 anos (66,7%). Em relação ao tamanho tumoral, a média/desvio-padrão e mediana dos nódulos mamários eram de, respectivamente, $5,85 \pm 4,19$ (2,7-25) e 5,0 centímetros.

A Tabela 1 mostra, em seguida, a distribuição das mesmas conforme as características epidemiológicas; verifica-se que a maioria da amostragem encontra-se na menopausa, com tumores agressivos do ponto de vista histológico (graus 2 e 3) e em estádios avançados (IIIA – 37%).

Ao analisarmos a resposta clínica e patológica das pacientes após o tratamento neoadjuvante, observamos um percentual de 54,55% de pacientes com resposta clínica completa e 26,32% de mulheres com resposta patológica completa, com o resto da porcentagem cabendo ao grupo das que tiveram resposta incompleta ou ausente. Em relação ao estado linfonodal, metade das pacientes apresentaram axila positiva.

Tabela 1. Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado conforme características epidemiológicas. Ribeirão Preto, 2010.

Variável	Número	%
Idade (anos)		
< 50	9	33,3
50 +	18	66,7
Tamanho tumoral (cm)		
Até 5	14	51,8
5,1-10	12	44,4
>10	1	3,8
Estado hormonal		
Pré-menopausa	12	44,4
Menopausa	15	55,6
Subtipo histológico		
Ductal	26	96,2
Lobular	1	3,8
Grau histológico		
I	3	11,1
II	14	51,9
III	10	37,0
Estadio clínico (TNM)		
IIA	4	14,8
IIB	4	14,8
IIIA	10	37,0
IIIB	7	25,9
IIIC	2	7,5
Total	27	100,0

3.6. Imunohistoquímica e quantificação do RE, RP, CerbB2 e HIF-1- α

Com o auxílio de um criostato, foram obtidos cortes com 4 micrômetros de espessura, utilizados para as reações de imunohistoquímica. O método utilizado para as mesmas foi a biotina-peroxidase-ABC. Os cortes foram fixados em acetona a 100% por 10 minutos a -20° C. A peroxidase endógena do tecido foi bloqueada através da incubação dos cortes com água oxigenada a 3% em PBS por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por três vezes com PBS e incubadas com 3% de leite desnatado (Nestlé, SP, Brasil) por 45 minutos a fim de se obter o bloqueio das ligações inespecíficas. Os cortes foram finalmente incubados com anticorpos primários em câmara úmida, a 37° C por 2 horas. Para a análise do HIF-1 α , foi utilizado o anticorpo para camundongos MAb (Abcam Company). Após esse período, as lâminas foram lavadas e incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente com os anticorpos secundários biotinilados. Após novas lavagens, foi adicionado o complexo avidina-biotina peroxidase (ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Decorridos os minutos de incubação, os cortes foram lavados com PBS e revelados através do substrato DAB (Zymed Laboratories Inc., CA, USA). As lâminas com os cortes foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e, então, montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil).

Para a quantificação imunohistoquímica do antígeno HER-2, utilizou-se o HercepTest (DAKO System), cujo sistema de score analisa a intensidade e a completude da marcação de membrana das células tumorais para determinar o status do HER-2. Um score de 3+ (10% das células tumorais evidenciando uma forte e completa coloração de membrana; marcação citoplasmática não é levada em conta) era indicativo de positividade para o HER-2. Casos negativos não mostram nenhuma marcação (score 0) ou a marcação da membrana é ausente em menos de 10% das células tumorais (score 1+). (LEONG et al., 2006). Para os tumores intermediários

entre essas duas categorias, era colocado um score 2+ (indeterminado) era realizado o CISH (*chromogenic in situ hybridization*), pois em nosso Serviço de Patologia, o FISH (*fluorescence in situ hybridization*) não era disponível.

A marcação dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) era realizada quando uma coloração nuclear era visualizada, considerando-se positiva quando um percentual de 10% ou mais de células tumorais eram marcadas (BOS et al., 2001).

A quantificação de HIF-1 α foi feita com o completo escurecimento dos núcleos celulares, local habitual da fração ativa do HIF-1 α (BOS et al., 2001). Marcações citoplasmáticas do HIF-1 α foram ignoradas. Considerou-se negativa quando menos de 10% das membranas celulares não eram marcadas e positiva quando um valor igual ou maior que esta porcentagem era encontrado (BOS et al., 2005).

A interpretação dos resultados do HIF-1 α foram feitos por três avaliadores e blindados para os demais marcadores imunohistoquímicos, assim como para os resultados clínicos.

3.7 Análise estatística

Foi utilizado o pacote estatístico Intercooled Stata versão 8.0 (Stata Corporation, Texas, USA) para interpretação dos resultados. O teste de Fisher foi utilizado para estipular uma correlação entre os marcadores imunohistoquímicos (RE, RP, *cerbB2*) e a presença ou ausência do HIF-1 α . As médias, medianas e desvios-padrão de variáveis contínuas também foram calculadas. Um nível de significância de até 5% foi estipulado como limite para uma análise bicaudal.

3.8 – Redação do texto

Este trabalho foi elaborado segundo as “Diretrizes para apresentação de Teses e Dissertação à USP: documento eletrônico ou impresso”, sugerido pelo grupo de estudos de referências bibliográficas do Sistema Integrado de Bibliotecas (SIBi/USP), 2001.

4. RESULTADOS

A Tabela 2 mostra a relação de positividade/negatividade dos marcadores imunohistoquímicos analisados. A maior parte das pacientes tinha positividade para receptor de estrogênio, enquanto que para o receptor de progesterona, um pouco menos da metade apresentava marcação. Aproximadamente 30% das pacientes tinham positividade para o antígeno cerbB2. Em relação à expressão do HIF-1 α , este se mostrou presente em 66,7% das lâminas analisadas, percentual reduzido para 25,9% se considerássemos apenas as marcações de membrana fortes e difusas (Figura 1). Em 33% dos cortes histológicos analisados, não houve esboço de marcação do anticorpo (Figura 2).

Tabela 2. Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado conforme marcadores imunohistoquímicos. Ribeirão Preto, 2010.

Variável	Número	%
RE		
Positivo	16	59,3
Negativo	11	40,7
RP		
Positivo	12	44,4
Negativo	15	55,6
Cerb-B2		
Positivo	9	33,3
Negativo	18	66,7
HIF-1α		
Positivo	18	66,7
Negativo	9	33,3
Total	27	100,0

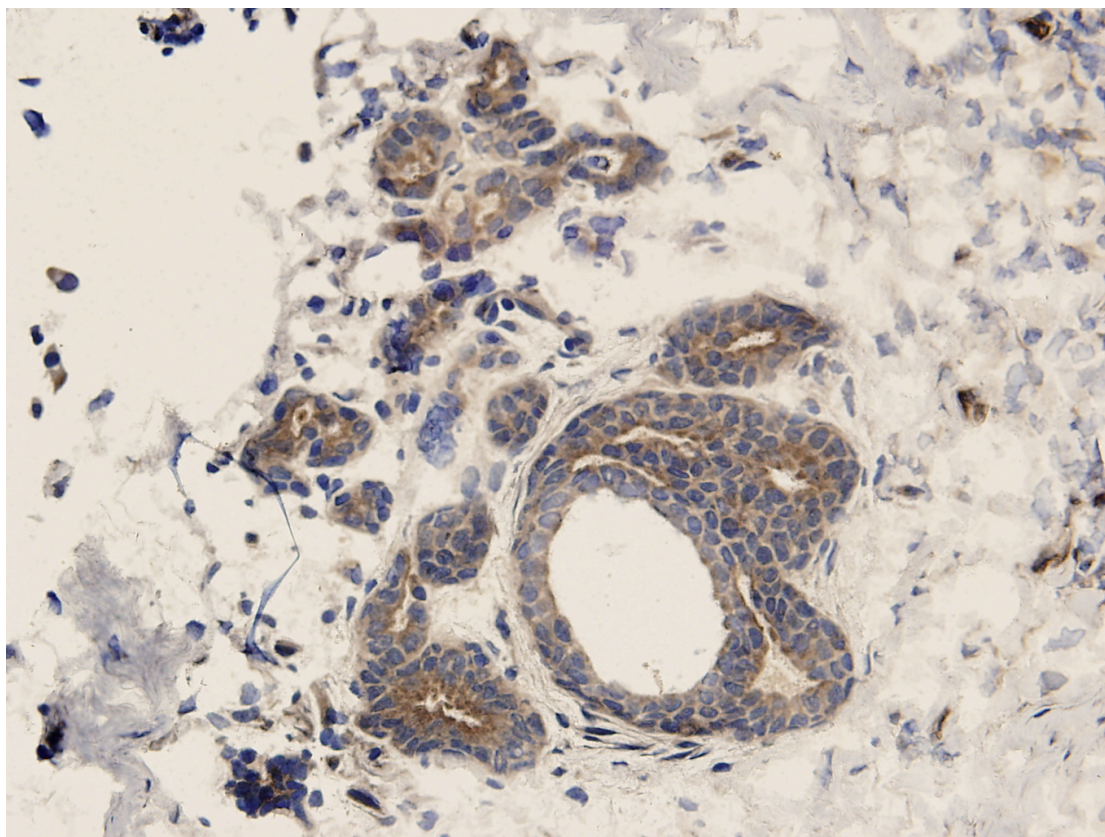


Figura 3. Forte expressão de HIF-1 α em análise imunohistoquímica. DAB, 400x.

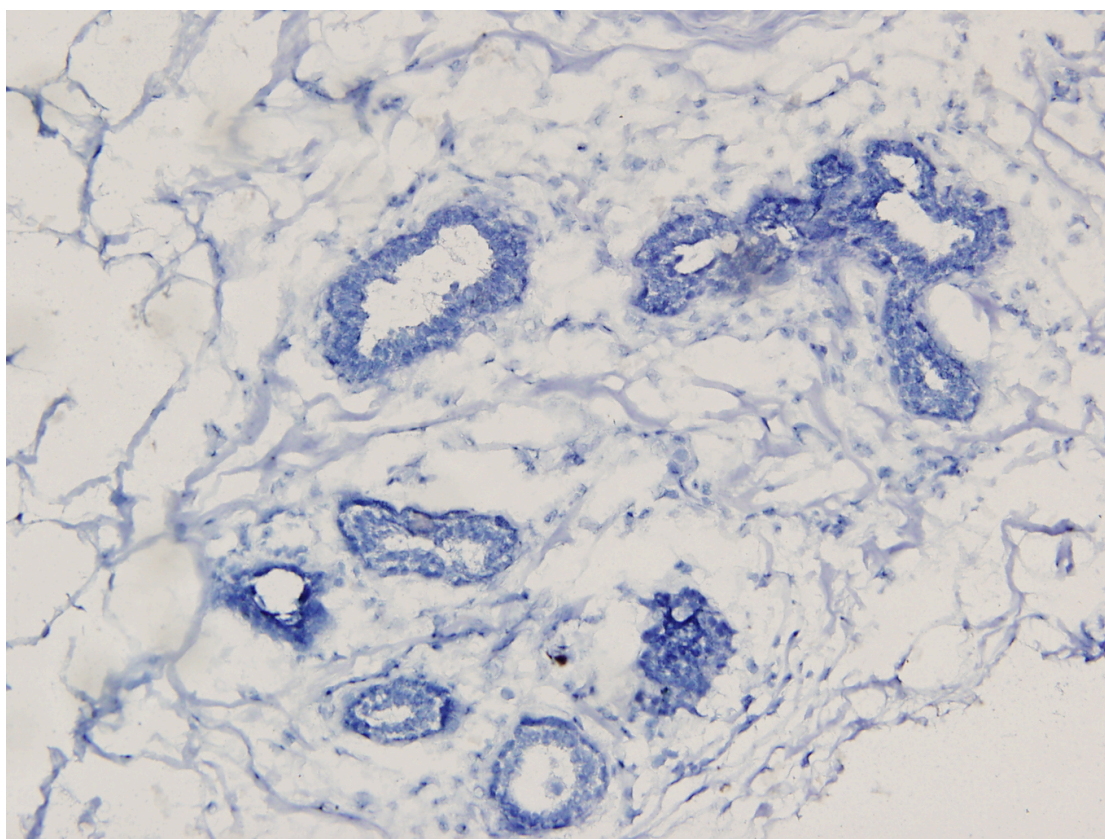


Figura 4. Ausência de marcação pelo HIF-1 α em microscopia. DAB, 200x.

Ao se buscar associação entre as variáveis clínicas e a expressão do HIF-1 α , encontrou-se marginalmente significativa uma correlação com a faixa etária (menor que 50 anos; p=0,08), e estatisticamente importante com o status axilar positivo (p=0,02) (Tabela 3). Houve uma tendência marginalmente significativa de associação do status hormonal (pré-menopausadas; p= 0,10) com maiores níveis de HIF-1 α , assim como menores índices de resposta patológica completa (p=0,12) e maiores taxas de resposta clínica completa (p=0,09). Fazendo uma análise univariada entre as variáveis com associação estatística, a única que se manteve correlacionada a um maior nível de HIF-1 α foi a positividade axilar (RR bruto de 1,9). Em relação a análise dos marcadores imunohistoquímicos (RE, RP e cerb2), não houve associação estatisticamente significativa.

Tabela 3. Avaliação da correlação entre a presença do HIF-1 α e diversas variáveis de pacientes com câncer de mama localmente avançado. Ribeirão Preto, 2010.

Variáveis	Expressão de HIF-1 α		p*
	Negativo (%)	Positivo (%)	
Faixa etária (anos)			0,08
< 50	4 (22,2)	14 (77,8)	
50 +	5 (55,6)	4 (44,4)	
Tamanho tumoral (cm)			0,4
Até 4,9	6 (40)	9 (60)	
5 e +	3 (25)	9 (75)	
Estadio clínico (TNM)			0,55
II	2 (25)	6 (75)	
III	7 (36,8)	12 (63,2)	
Grau**			0,13
I	0 (0)	3 (100)	
II	7 (50)	7 (50)	
III	2 (20)	8 (80)	
Status hormonal			0,10
Menopausa	3 (20)	12 (80)	
Pré-menopausa	6 (50)	6 (50)	
Resposta clínica			0,09
Completa	2 (16,7)	10 (83,3)	
Incompleta/ausente	5 (50)	5 (50)	
Resposta patológica			0,12
Completa	0 (0)	5 (100)	
Incompleta/ausente	5 (35,7)	9 (64,3)	
Status axilar			0,02
Positivo	7 (53,9)	6 (46,1)	
Negativo	2 (14,3)	12 (85,7)	
RE			0,58
Positivo	6 (37,5)	10 (62,5)	
Negativo	3 (27,3)	8 (72,7)	
RP			0,41
Positivo	5 (41,7)	7 (58,3)	
Negativo	4 (26,7)	11 (73,3)	
Cerb2			0,38
Positivo	2 (22,2)	7 (77,8)	
Negativo	7 (38,9)	11 (61,1)	

* Teste de Fisher – < 0,05 – estatisticamente significante

** Agrupado graus II e III para realização de Fisher

5. DISCUSSÃO

Este trabalho objetivou avaliar a expressão de HIF-1 α em pacientes com câncer de mama localmente avançado e determinar uma possível função prognóstica e/ou preditiva para o mesmo ao associá-lo com variáveis clínicas e outros marcadores imunohistoquímicos. A sua presença (66,7%) foi semelhante àquela encontrada na literatura (GRUBER et al., 2004 e BOS et al., 2005, com 56%; KRONBLAD et al., 2006, com 67%), com alguma variação devido ao ponto de corte ser diverso nas metodologias empregadas para analisar a sua pontuação (LUNDGREN et al., 2007).

Subjetivamente, encontrou-se uma maior concentração deste marcador em regiões perinecroticas, o que corresponde provavelmente à sua ativação pela hipóxia. Porém, Vleugel et al. (2005) evidenciaram que, de 44% das amostras positivas para HIF-1 α , 13,5% a expressaram de forma perinecrotica, enquanto que 30,5% tiveram uma marcação mais difusa, indicando uma provável via alternativa de sua ativação (mutação do p53, superexpressão do HER-2, etc.). Uma maneira de se encontrar a influência do HER-2 na ativação do HIF-1 α é a sua correlação estatisticamente significativa com a marcação imunohistoquímica do antígeno cerbB2, fato este provado em análise plasmática de pacientes com tumores localmente avançados em nossa Instituição (GARIERI, 2008) e extensamente descrito na literatura (BOS et al., 2001; BOS et al., 2003; KRONBLAD et al., 2006; LUNDGREN et al., 2007). Porém, em nosso trabalho não foi encontrado tal associação; isto provavelmente se deve à baixa amostragem, embora os grupos sejam homogêneos em relação às suas variáveis.

Foi encontrado uma associação estatisticamente significativa entre o status axilar positivo e a marcação forte e difusa de HIF-1 α em pacientes com tumores localmente avançados. Tal achado é equivalente em trabalho executado por Gruber e

colaboradores (2004), onde numa casuística de 77 pacientes, o HIF-1 α era expresso na maioria dos casos com axila positiva, servindo como fator de mau prognóstico neste grupo, especificamente no subgrupo com tumores T1/T2; na casuística dos mesmos, nenhuma variável permaneceu na análise multivariada associada ao HIF-1 α . Outro trabalho com resultados similares foi o efectuado por Schindl et al. (2002), envolvendo somente pacientes com axila positiva, quase todas com tumores T1 ou T2 (192/206 pacientes), e a expressão de HIF-1 α foi altamente significativa.

Similarmente a outros trabalhos prévios (BOS et al., 2003; GRUBER et al., 2004), tumores de maior diâmetro e estadios clínicos mais avançados não obtiveram associação estatisticamente significativa; diferindo dos demais, Kronblad et al. (2006) encontraram uma correlação positiva importante, especialmente em tumores maiores que 5 cm; porém, esta não permaneceu na análise multivariada. Em nosso trabalho, devido à amostragem, houve desestabilização do modelo estatístico ao se realizar a regressão logística, o que não foi implicar nenhum resultado mais fidedigno. Outrossim, pelo objetivo da pesquisa em realizar uma análise de tumores localmente avançados, e pela pequena casuística, não nos foi possível analisar o impacto no subgrupo das pacientes com estágio IIA. Porém, ficamos com a hipótese de Gruber (2004) que acredita que o impacto do HIF-1 α é minimizado em tumores mais avançados devido à repressão por mecanismos adaptativos.

Contrariamente ao exposto acima, Bos et al. (2003) realizaram uma pesquisa com 81 mulheres axila negativa e 69 pacientes com axila positiva tratadas e concluíram que altos níveis de HIF-1 α tiveram um profundo impacto na sobrevida global e no intervalo livre de doença no subgrupo de pacientes com tumores axila negativa, sem influência nos casos de axila acometida. O detalhe é que nenhuma paciente recebeu tratamento quimioterápico pré-operatório porque todos os tumores localmente avançados foram excluídos desta pesquisa. Provavelmente houve uma

influência da quimioterapia em trabalhos envolvendo pacientes com estadios mais avançados.

Em relação ao grau histológico, não houve significância estatística com o HIF-1 α , mesmo agrupando-se em baixo e alto grau as categorias. Isso provavelmente se deve ao tamanho amostral, pois discorda de vários trabalhos (BOS et al., 2003; KRONBLAD et al., 2006). Outra possibilidade seja pelo fato de termos um alto percentual de linfonodos positivos (50%), o que poderia reprisar o verificado em pesquisas que investigaram somente pacientes com axila acometida (SCHINDL et al., 2002; GRUBER et al., 2004). Porém, na grande casuística de Kronblad et al. (2006) com 564 pacientes, a correlação positiva entre grau histológico e expressão de HIF-1 α permaneceu mesmo somente neste grupo ($p=0,003$).

A idade menor que 50 anos e o estado pré-menopausal foram variáveis marginalmente associadas a uma maior expressão de HIF-1 α neste grupo de mulheres. Ao se realizar a análise univariada, estas não permaneceram associadas, com uma provavelmente exercendo efeito de confusão sobre a outra. Esta correlação não foi encontrada em nenhuma casuística relacionada (BOS et al., 2003; GRUBER et al., 2004) e acreditamos que tal situação se deva à amostragem.

Não houve influência da expressão do HIF-1 α na resposta clínica e patológica dessas pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante, com discreta tendência estatística a significância, o que nos desencoraja a atribuir um papel preditivo para este marcador, de forma independente de outras variáveis. Existem pouquíssimos trabalhos estudando o valor preditivo do HIF-1 α em relação a terapêuticas neoadjuvantes, com tendência a um aumento na busca por tais informações, visando o desenvolvimento de terapias-alvo. Em um trabalho experimental conduzido por Narita et al. (2009), o uso do KC7F2, um inibidor da via do HIF-1 α , preveniu a

ativação de genes da anidrase carbônica, MMP2 (matrix metaloproteinase), endotelina 1 e enolase 1, assim como de mecanismos relacionados à síntese protéica de HIF-1 α , funcionando de forma eficaz.

Não houve associação, positiva ou negativa, da expressão do HIF-1 α com a presença do receptor de estrogênio. Experimentalmente, sabe-se que em condições de hipóxia, existe um decréscimo na expressão de receptores de estrogênio em células tumorais mamárias (MCF-7 e CAMA-1), com relação direta entre o nível de oxigênio e a queda na produção protéica dos mesmos (LUNDGREN et al., 2007). Preditivamente, já foi mostrado que a resposta ao tamoxifeno em pacientes na pré-menopausa sofre uma diminuição em células tumorais mamárias hipóxicas em comparação àquelas em condições de normoxia (KRONBLAD et al., 2003). Ou seja, o mecanismo seria uma degradação proteossômica desses receptores, com diminuição da transcrição da sua forma ativada.

Quanto à expressão do antígeno c-erbB2 em pacientes com HIF-1 α , sabe-se que existem associações bem documentadas em câncer de mama. Uma publicação de Giatromanolaki et al. (2004) mostrou que pacientes com tumores apresentando alta expressão de HIF-1 α e amplificação do gene HER-2 tiveram uma pior sobrevida global. Em nossa casuística, tal correlação não foi observada.

Em suma, existe uma ligação entre a expressão de marcadores relacionados à hipóxia e piores desfechos, o que reforça a necessidade de conhecer melhor o papel preditivo desta via, de investigar drogas inibidoras deste eixo e de seus produtos gênicos, de identificar subpopulações de pacientes que venham a se beneficiar desta terapia, provavelmente daquelas que não respondem à terapia dita convencional e de aprender com este processo comum de carcinogênese, considerando-o de importante papel para a elucidação do tratamento do câncer de mama.

6. CONCLUSÕES

1 – Existe um alto percentual da expressão do HIF-1 α na maioria das pacientes com câncer de mama localmente avançado.

2 – Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o acometimento linfonodal e a presença de HIF-1 α em pacientes com câncer de mama localmente avançado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahern V, Brennan M, Ung O, Kefford R. Locally advanced and inflammatory breast cancer. **Australian Family Physician** 2005;34:1027-32.

Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 2001;93:309-14.

Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer** 2003; 97:1573-81.

Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. Hypoxia-inducible factor-1 α is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. **Histopathology** 2005;46:31-6.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2009.98p.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). **European Journal of Cancer** 2009; 45:228-47.

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.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 2010; e1-e52.

Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? **J Pediatr Surg** 2007;42(1):1-11.

Garieri AP. Produção de VEGF e HIF-1 α em pacientes com carcinoma localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina. [Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP]. 2008. 49p.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Simopoulos C, Polychronidis A, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E. c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1 α dependent. **Clin Cancer Res** 2004;10:7972-7.

Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G, Djonov V. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? **Breast Cancer Res** 2004;6:R191-8.

Kronblad A, Helczynska K, Nielsen NH, Pahlman E, Emdin S, Pahlman S, Landberg G. Regional cyclin D1 overexpression or hypoxia correlate inversely with heterogeneous oestrogen receptor-alpha expression in human breast cancer. **In Vivo** 2003;17:311-8.

Kronblad A, Jirstrom K, Ryden L, Nordenskjold B, Landberg G. Hypoxia inducible factor-1 α is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. **Int J Cancer** 2006; 118:2609-16.

Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer** 2002;2:38-47.

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. Her2(neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (hif-1 α) synthesis: novel mechanism for hif-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. **Mol Cell Biol** 2001, 21:3995-4004.

Leong TY, Leong AS. Controversies in the assessment of HER-2: more questions than answers. **Adv Anat Pathol** 2006;13(5)263-9.

Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. **Cell Mol Life Sci** 2007;64:3233-47.

National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. [Disponível em : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf] Acesso em: 10 fev 2010.

Narita T, Yin S, Gelin CF, Moreno CS, Yepes M, Nicolaou KC, Van Meir EG. Identification of a novel small molecule HIF-1 α translation inhibitor. **Clin Cancer Res** 2009;15(19):6128-36.

O'Donnell JL, Joyce MR, Shannon AM, Harmey J, Geraghty J, Bouchier-Hayes D. Oncological implications of hypoxia inducible factor-1-alfa (HIF-1alpha) expression. **Cancer Treat Rev** 2006;32:407-16.

Peintinger F, Buzdar AU, Kuerer HM, Mejia JÁ, Hatzis C, Gonzalez-Ângulo AM et al. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab. **Ann Oncol** 2008 [Epub ahead of print].

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible fator 1 α . **Genes Dev** 2000,14:34-44.

Rosen SL. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. **Oncologist** 2005;10:382-91.

Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an

unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1831-7.

Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C et al. Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. **American Journal of Pathology** 2002;16: 947-56.

Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. **Biochem Pharmacol** 2002, 64:993-998.

Sobin LH, Wittekind CH. **UICC TNM classification of malignant tumors**, 5a edição. New York: Wiley-Liss, 1997. 302p.

Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. **Semin Oncol** 2001; 28:29-35.

Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. **Oncologist** 2004;9(5):S10-S17.

Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aasrødem Y et al. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 α expression in invasive breast cancer. **J Clin Pathol** 2005;58:172-7.

Zundes W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. **Genes Dev** 2000, 14:391-6.

ANEXOS

Anexo A. Questionário aplicado



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Av. Bandeirantes, 3900 - 8º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900

Fone (016) 633-0216/633-1028 - Fax (016) 633-0946

Nome: _____

Número da biópsia: _____ Registro: _____ Data da biópsia: _____

Data do caso novo:	Data de nascimento:
Idade:	Consentimento:
Procedência:	Telefone:
Menarca:	DUM:
Paridade:	Primeira gestação:
Antecedentes familiares:	Hábitos: tabagista
Uso de ACO: nega	Uso de TH: nega
Patologias:	Medicações em uso:

H.M.A.:

Exame Físico: Pele:
Parede torácica:
Axila:

The diagram shows two circles representing breasts. Each has a vertical dashed line through its center. A horizontal dashed line passes through the centers of both. A rectangular box is drawn above the right breast. A vertical dashed line extends from the top of this box down to the top of the right breast. An arrow points from the 'Axila:' label to this vertical line.

Estadiamento Clínico: T
N EC

Mamografia:

Us de mamas:

RNM de mamas:

Punção biópsia aspirativa:

Exames de estadiamento
Rx de tórax:
Us de abdome:
Cintilografia:

Outros exames de imagem:

Diagnóstico histológico

Número da biópsia na patologia:

Tipo:

Grau de diferenciação:

Invasão angiolinfática:

Receptor de estrogênio:

Receptor de progesterona:

c-erb-B2:

lfn sentinela não corado

Resposta patológica após tratamento neoadjuvante

Completa () Incompleta/ausente ()

Resposta clínica após tratamento neoadjuvante

Completa () Incompleta/ausente ()



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Av. Bandeirantes, 3900 - 8º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900

Fone (016) 633-0216/633-1028 - Fax (016) 633-0946

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, Luiz Gustavo Oliveira Brito, médico e pós-graduando do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, estou desenvolvendo um estudo com pacientes portadoras de tumor maligno na mama, como é o seu caso. O título do estudo é: Avaliação da produção de HIF-1 α em infiltrado linfoplasmocitário de pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante. O objetivo é analisar algumas substâncias que são produzidas pelo tumor, avaliando se após a quimioterapia houve diferença na sua produção.

Em casos como o seu, o tratamento consiste em iniciar quimioterapia antes da cirurgia, com a finalidade de tentar diminuir o tamanho do tumor, como estabelecido pelo protocolo de tratamento utilizado neste serviço.

Antes de iniciar a quimioterapia, todas as pacientes são submetidas a uma biópsia do tumor (retirada de um pequeno fragmento), para que este seja submetido a exame patológico e sejam avaliados o tipo de tumor e algumas características importantes para o tratamento. Essa biópsia é feita com anestesia local e algumas complicações podem ocorrer, como: abertura da cicatriz, infecção ou acúmulo de sangue no local, porém são incomuns.

Caso a senhora aceite participar deste estudo, quando realizar a biópsia, iremos utilizar um pequeno fragmento do tumor retirado para ser analisado separadamente, sem necessidade de aumentar a quantidade retirada. Além deste procedimento, quando a senhora for submetida à cirurgia definitiva, será guardada outra pequena amostra do tumor, feita após a retirada cirúrgica.

Esses procedimentos são feitos freqüentemente de rotina em todas as pacientes com o mesmo problema que o seu neste hospital, sendo que sua contribuição para o estudo será apenas com um pequeno fragmento do material retirado. Após a dosagem de algumas substâncias nestas amostras, o material será desprezado, não sendo

possível nenhuma informação adicional sobre a senhora ou sua doença.

Os resultados deste estudo ainda não serviram para mudança do seu tratamento, não sendo, portanto, trazidos ao seu conhecimento. Servirão para novos estudos e descobertas para o tratamento do câncer de mama em futuras pacientes.

Como todos estes procedimentos que a senhora realizará fazem parte do seu tratamento, não ocorrendo nenhuma mudança ou necessitando de nenhuma consulta adicional, a senhora não receberá nenhuma ajuda financeira ou ressarcimento e não terá nenhum custo adicional para participar do estudo.

Se a senhora tiver alguma dúvida ou sentir qualquer mal-estar durante o tratamento, poderá procurar imediatamente a equipe do setor de Mastologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, durante os dias da semana, no período diurno, nos telefones 3602-2585 ou 3602-2322 e, nos fins de semana, à noite ou feriados, procurar a Unidade de Emergência do HC, no centro de Ribeirão Preto. Sempre há alguém da nossa equipe com um BIP, que pode ser acionado através do telefone 3602-1000, o número é 7139. Eu, Dr. Luiz Gustavo Oliveira Brito, estou a disposição para qualquer dúvida, também, nestes telefones.

Este projeto tem a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do nosso hospital, que se localiza no Campus Universitário, no bairro Monte Alegre, na cidade de Ribeirão Preto e o número de seu telefone é (16) 36022228.

A sua participação neste estudo é completamente voluntária, podendo se recusar a participar do mesmo ou interrompê-la quando quiser, sem prejuízos no atendimento recebido neste hospital. Também terá a garantia de que suas informações serão tratadas com o absoluto sigilo, pois as amostras não serão identificadas com seu nome e seu registro, com esta relação feita apenas por mim.

A senhora receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para retirar possíveis dúvidas.

Eu, _____, RG: _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, aceito participar da pesquisa intitulada **“Avaliação da produção de HIF-1 α em infiltrado linfoplasmocitário de pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante”**

Participante

Dr. Luiz Gustavo Oliveira Brito

Testemunha*

Ribeirão Preto, / / .

* No caso de paciente impossibilitada de ler o termo de consentimento, este será lido na presença de uma testemunha.

Anexo C - Carta de aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa do
HCRP-USP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 03 de fevereiro de 2009

Ofício nº 298/2009
CEP/SPC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIF-1ALFA EM INFILTRADO LINFOPLOSMOCITÁRIO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 279ª Reunião Ordinária realizada em 02/02/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 12554/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

LUIZ GUSTAVO OLIVEIRA BRITO

PROF. DR. HEITOR RICARDO COSISKI MARANA (Pesquisador responsável)

Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

Apêndice A – Classificação clínica TNM para câncer de mama

Estadiamento do AJCC 2002

T- Tumor primário

T1 – Tumor ≤ 2 cm na maior extensão

T1 mic – microinvasão $\leq 0,1$ cm

T1a - $> 0,1$ cm e $\leq 0,5$ cm

T1b - $> 0,5$ cm e ≤ 1 cm

T1c - > 1 cm e ≤ 2 cm

T2 – Tumor > 2 cm e ≤ 5 cm na maior dimensão

T3 – Tumor > 5 cm na maior dimensão

T4 – Tumor de qualquer tamanho com:

T4a – extensão à parede torácica

T4b – extensão à pele

T4c – ambos

T4d – câncer inflamatório

N- Linfonodos regionais

N1 – Linfonodos axilares ipsilaterais móveis

N2a – Linfonodos axilares ipsilaterais fixos entre eles ou à outras estruturas

N2b – Apenas na cadeia mamária interna ipsilateral, sem metástase na cadeia axilar

N3a – Linfonodo da cadeia infraclavicular ipsilateral, com ou sem acometimento axilar

N3b – Linfonodo da cadeia mamária interna ipsilateral, com acometimento axilar

N3c – Linfonodo na cadeia supraclavicular ipsilateral, com ou sem acometimento das cadeias axilar ou mamária interna

M- Metástases à distância

M1 – metástase à distância

Apêndice B - Agrupamento dos Estádios Clínicos TNM

Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Estádio IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Estádio IIIC	QqT	N3	M0
Estádio IV	QqT	qqN	M1

Expressão do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) em pacientes com câncer de mama localmente avançado

Expression of HIF-1 α in locally advanced breast cancer patients

Heitor Ricardo Cosiski Marana¹, Viviane Fernandes Schiavon¹, Luiz Gustavo Oliveira Brito¹, Daniel Guimarães Tiezzi¹, Jurandyr Moreira de Andrade¹, William Simões Clagnan¹ e João Santana da Silva².

1 – Setor de Mastologia e Oncologia Ginecológica, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

2 – Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Endereço para correspondência:

Dr. Heitor Ricardo Cosiski Marana

Avenida Bandeirantes, 3900 – 8º andar – Monte Alegre

14049-900 – Ribeirão Preto – SP / Tel: (16)3602-2583

E-mail: hmarana@hcrp.usp.br

RESUMO

Objetivos: Determinar a expressão imunohistoquímica do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) e suas variáveis associadas em pacientes com câncer de mama localmente avançado.

Métodos: Vinte e sete mulheres foram biopsiadas para diagnóstico histopatológico do carcinoma mamário e submetidas a tratamento quimioterápico pré-cirúrgico. Analisou-se a associação do HIF-1 α com idade, tamanho tumoral, grau histológico, estadió clínico, status hormonal e axilar, resposta clínica e patológica após tratamento quimioterápico, expressão do receptor de estrogênio, progesterona e *cerbB2*.

Resultados: A expressão de HIF-1 α foi presente em 66,7% das pacientes. O único fator associado à sua presença foi o status axilar positivo ($p=0,02$), tendo permanecido durante a análise univariada. As demais variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa.

Conclusão: Existe uma associação estatisticamente significativa entre o acometimento linfonodal e a presença de HIF-1 α em pacientes com câncer de mama localmente avançado.

Palavras-chaves: câncer de mama; HIF-1 α ; quimioterapia neoadjuvante; status axilar; fatores prognósticos

ABSTRACT

Objectives: To assess the expression of HIF-1 α and its associated variables with locally advanced breast cancer (LABC) patients.

Methods: Twenty-seven women were submitted to incisional biopsy for histopathological diagnosis of breast carcinoma and undertaken to neoadjuvant chemotherapy (NACT). It was studied the association of HIF-1 α with age, tumoral size, histological grade, clinical stage, hormonal and axillary status, clinical and pathological response after NACT, expression of estrogen and progesterone receptors, as well as the presence of cerbB2 antigen.

Results: HIF-1 α 's expression was found in 66.7% of patients. Only axillary status was the associated factor with its presence (p=0.02), and remained after univariate analysis. The others did not present any significant statistically difference.

Conclusion: There is a significant statistically association between axillary status and HIF-1 α 's expression in LABC patients.

Keywords: breast cancer; HIF-1 α ; neoadjuvant chemotherapy; axillary status; prognostic factors

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres ocidentais. As estatísticas indicam um aumento de frequência da neoplasia tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Nos EUA, estimou-se para 2009, 192.370 mulheres com esta patologia, com 40.170 mortes¹. No Brasil, o tumor de mama é a principal causa de morte (15,6%) entre as mulheres, contabilizando mais de nove mil óbitos por ano, segundo dados de 2008². Apenas no estado de São Paulo, a estimativa para 2010 estipula aproximadamente 65 casos novos para cada 100.000 mulheres, perfazendo um total de 27.620 pacientes².

Dados analisados através de *trials* randomizados mostraram, entre 1976 e 1990, que a detecção precoce através da avaliação mamográfica reduziu a mortalidade por câncer de mama em 25% das mulheres entre 50 e 69 anos³. Apesar das políticas de incentivo ao screening mamográfico para detecção precoce do câncer de mama, aproximadamente 10% dos tumores, mundialmente, são diagnosticados como câncer de mama localmente avançados, com aumento do risco de metástases subseqüentes e prognóstico mais reservado⁴. Diferente de países como os EUA, onde há um aumento da incidência, mas diminuição da mortalidade por câncer de mama, o Brasil ainda apresenta elevação nas taxas de mortalidade pela neoplasia, principalmente pela detecção tardia da doença, ocorrendo em aproximadamente metade dos casos.

Devido ao alto percentual de estádios clínicos avançados em nosso país, o tratamento cirúrgico não é a forma inicialmente mais recomendada nesses casos; aplica-se, nessa situação, a terapia neoadjuvante, cujo objetivo é reduzir o volume primário, proporcionando operabilidade nos casos inoperáveis e aumentando as taxas de cirurgia conservadora da mama nos casos passíveis de cirurgia. Embora não

existam evidências que a quimioterapia aplicada antes do tratamento cirúrgico leve a um ganho de sobrevida substancial, em comparação a aplicação após o tratamento cirúrgico, está estabelecido que pacientes que apresentam resposta objetiva com tratamento neoadjuvante, em especial, resposta patológica completa, apresentam uma sobrevida livre de doença e global maior que os casos onde a resposta ao tratamento não foi satisfatória⁵.

Detectar, através de estudos biológicos, quais pacientes apresentarão resposta objetiva a um determinado tratamento, relaciona-se à necessidade de conhecimento de mecanismos que propiciam o crescimento tumoral para responder essas questões, além de descobrir alvos para novas terapias. Assim como outros tumores sólidos, os tumores de mama necessitam de um microambiente que promova angiogênese, que não apenas mantém a viabilidade tumoral e seu crescimento, mas que também contribua com a disseminação da doença. Esse mecanismo apresenta estreita relação com o prognóstico da doença.

Porém, um modelo não menos importante, que promove a angiogênese é o mecanismo de hipóxia tecidual. A hipóxia está presente em muitos tumores sólidos, causada geralmente pela vascularização anormal neoplásica, e pela rápida produção celular. Isso resulta em áreas de necrose tissular e rápida morte de células sadias⁶.

Define-se hipóxia como um nível de oxigenação menor que 1,5%, valor bem menor que a média de 7% encontrada em tecidos bem vascularizados⁷. Marcadores bioquímicos produzidos em ambiente hipóxico estão relacionados com diversos cânceres, notadamente o de mama, e têm sido considerados fatores prognósticos para tumores altamente indiferenciados, com recentes pesquisas sobre a sua aplicabilidade clínica como terapia-alvo^{8,9}.

A ampla resposta celular desencadeada pela hipóxia é mediada pelo HIF-1 (fator indutor de hipóxia), uma proteína heterodímera (fator de transcrição nuclear) superexpressa em tumores mamários, que em condições de normóxia, são reconhecidas pela proteína de von Hippel Lindau (pVHL) e degradadas por hidroxilação através dos domínios da prolina hidroxilase (PHD's) e do fator inibidor da hipóxia (FIH-1), e por fim, sofrem ubiquitinação via proteassomo¹⁰. Contudo, no período de hipóxia, como não há a presença das PHD's e do FIH-1, o HIF-1 migra do citoplasma para o núcleo, e através da sua ligação com os elementos de resposta à hipóxia (HRE), assim como do fator de transcrição CBP300, levam a produção de genes alvo¹⁰.

A principal fonte de estímulo do HIF-1 α é a hipóxia; porém ele também pode ser estimulado através da mutação do proto-oncogene PTEN¹¹, p53¹² e pela superexpressão do oncogene HER-2/neu¹³. Em estudo realizado por Garieri¹⁴ em nossa Instituição, foram observados maiores níveis séricos de HIF-1 α em pacientes HER-2 positivos do que no grupo HER-2 negativo, tendo sido considerado fator preditivo importante, com pior sobrevida global e menor intervalo livre de doença para este subgrupo.

O papel do HIF-1 na carcinogênese mamária têm sido devido ao fato do mesmo induzir a transcrição do VEGF (fator de crescimento epidermóide vascular), levando a uma maior angiogênese tumoral^{15,16}; daí a utilização de anticorpos monoclonais (bevacizumab) contra o VEGF, apresentando ótimos resultados no controle tumoral, tanto em estudos pré-clínicos, como em pacientes com doença metastática¹⁷.

Assim, investigações enfocando o valor prognóstico do HIF-1 α no câncer de mama têm surgido; estudo de Schindl et al.¹⁸ evidenciou que a superexpressão de

HIF-1 α esteve associado à pior sobrevida global em pacientes com câncer de mama localmente avançado; Bos et al.¹⁹ entretanto, já encontraram esta associação em pacientes axila negativa. Em um estudo com espécimes tissulares da mama de pacientes com doença pré-neoplásica e com carcinoma mamário, foi encontrado uma correlação positiva entre o HIF-1- α e tumores menos diferenciados e de maior risco neoplásico²⁰.

Em trabalho realizado em nosso serviço, não foi evidenciado diferença estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos de HIF-1 α e VEGF antes e após quimioterapia adjuvante¹⁴. Porém, não existem estudos mostrando se há redução ou não da marcação imunohistoquímica do HIF-1 α após tratamento neoadjuvante; poucos estudos ainda estão disponíveis na literatura correlacionando o HIF-1 α com fatores prognósticos classicamente conhecidos, como o estado axilar, status hormonal e outros marcadores imunohistoquímicos, tendo este último como nosso objetivo.

MÉTODOS

Pacientes e variáveis clínicas

Tornaram-se elegíveis para a participação neste projeto as pacientes atendidas consecutivamente no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), com tumor localmente avançado de mama, que vieram a ser submetidas à quimioterapia neo-adjuvante e tratadas com cirurgia, posteriormente. Todas as pacientes foram informadas do estudo e assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE), já aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa desta instituição.

A parte laboratorial do projeto foi realizada no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HC-FMRP-USP em colaboração com o Laboratório de Imunologia do

Departamento de Imunologia, Parasitologia e Microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os critérios de inclusão foram: paciente com diagnóstico de câncer de mama, sem tratamento prévio; idade entre 25 e 80 anos; indicação de tratamento com quimioterapia neoadjuvante (câncer de mama localmente avançado - estadio III; tumores estágio II, onde a relação volume tumor/mama não permite cirurgia conservadora), conforme protocolo de tratamento estabelecido e em prática no Serviço de Mastologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Os critérios de exclusão foram: impossibilidade de compreensão do TCLE; paciente com déficit cognitivo; *performance status* reduzido; tratamento quimioterápico prévio; outra neoplasia maligna prévia, com exceção dos tumores de pele não melanoma; gestação; doença metastática confirmada; pacientes menores de 18 anos.

Vinte e sete pacientes foram submetidas à biópsia incisional para diagnóstico histopatológico antes do início da quimioterapia de indução conforme protocolo deste serviço, no período de março a novembro de 2009. Durante o procedimento de biópsia diagnóstica, feito de rotina no setor em todas as pacientes, após retirado fragmento, foi amostrado um fragmento de 0,125 cm³ (0,5 x 0,5 x 0,5cm), no qual foi realizado o estudo. O resto do material foi armazenado em meio de congelamento “tissue-tek”.

As variáveis clínicas estudadas foram: idade (em anos), maior diâmetro tumoral (em centímetros), grau histológico segundo a Classificação de Elston e Ellis²¹, estadio clínico segundo a Classificação TNM²², subtipo histológico, status hormonal (pré e pós-menopausa).

Como as pacientes foram submetidas ao tratamento neoadjuvante, foram avaliadas a resposta clínica e patológica. A resposta clínica foi inicialmente baseada pelos critérios RECIST²³, como segue abaixo:

- 5) Resposta Completa: definida como desaparecimento completo de toda evidência de doença clínica.
- 6) Resposta Parcial: definida como diminuição de mais de 50% no produto das medidas dos maiores eixos perpendiculares das lesões.
- 7) Resposta Menor: uma diminuição de 25-50%, sem satisfazer o critério de resposta parcial.
- 8) Progressão: aumento do volume do tumor.

Para a análise estatística, dividimos as respostas em completa e incompleta/ausente (engloba resposta parcial, menor e progressão). A resposta patológica segue o mesmo padrão.

Para o status axilar, foi considerado a dissecação linfonodal após o tratamento neoadjuvante para os casos em que a axila era clinicamente negativa; quando a mesma era considerada positiva, não era aguardado o anátomo-patológico.

Imunohistoquímica e quantificação do RE, RP, CerbB2 e HIF-1- α

Com o auxílio de um criostato, foram obtidos cortes com 4 micrômetros de espessura, utilizados para as reações de imunohistoquímica. O método utilizado para as mesmas foi a biotina-peroxidase-ABC. Os cortes foram fixados em acetona a 100% por 10 minutos a -20° C. A peroxidase endógena do tecido foi bloqueada através da incubação dos cortes com água oxigenada a 3% em PBS por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por três vezes com PBS e incubadas com 3% de leite desnatado (Nestlé, SP, Brasil) por 45 minutos a fim de se obter o bloqueio

das ligações inespecíficas. Os cortes foram finalmente incubados com anticorpos primários em câmara úmida, a 37° C por 2 horas. Para a análise do HIF-1 α , foi utilizado o anticorpo para camundongos MAb (Abcam Company). Após esse período, as lâminas foram lavadas e incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente com os anticorpos secundários biotinilados. Após novas lavagens, foi adicionado o complexo avidina-biotina peroxidase (ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Decorridos os minutos de incubação, os cortes foram lavados com PBS e revelados através do substrato DAB (Zymed Laboratories Inc., CA, USA). As lâminas com os cortes foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e, então, montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil).

Para a quantificação imunohistoquímica do antígeno HER-2, utilizou-se o HercepTest (DAKO System), cujo sistema de score analisa a intensidade e a completude da marcação de membrana das células tumorais para determinar o status do HER-2. Um score de 3+ (10% das células tumorais evidenciando uma forte e completa coloração de membrana; marcação citoplasmática não é levada em conta) era indicativo de positividade para o HER-2. Casos negativos não mostram nenhuma marcação (score 0) ou a marcação da membrana é ausente em menos de 10% das células tumorais (score 1+)²⁴. Para os tumores intermediários entre essas duas categorias, era colocado um score 2+ (indeterminado) era realizado o CISH (*chromogenic in situ hybridization*), pois em nosso Serviço de Patologia, o FISH (*fluorescence in situ hybridization*) não era disponível.

A marcação dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) era realizada quando uma coloração nuclear era visualizada, considerando-se positiva quando um percentual de 10% ou mais de células tumorais eram marcadas¹⁶.

A quantificação de HIF-1 α foi feita com o completo escurecimento dos núcleos celulares, local habitual da fração ativa do HIF-1 α ²⁰. Marcações citoplasmáticas do HIF-1 α foram ignoradas. Considerou-se negativa quando menos

de 10% das membranas celulares não eram marcadas e positiva quando um valor igual ou maior que esta porcentagem era encontrado¹⁶.

A interpretação dos resultados do HIF-1 α foram feitos por três avaliadores e blindados para os demais marcadores imunohistoquímicos, assim como para os resultados clínicos.

Análise estatística

Foi utilizado o pacote estatístico Intercooled Stata versão 8.0 (Stata Corporation, Texas, USA) para interpretação dos resultados. O teste de Fisher foi utilizado para estipular uma correlação entre os marcadores imunohistoquímicos (RE, RP e cerbB2) e a presença ou ausência do HIF-1 α . As médias, medianas e desvios-padrão de variáveis contínuas também foram calculadas. Um nível de significância de até 5% foi estipulado como limite para uma análise bicaudal.

RESULTADOS

De um total de 27 pacientes, a média/desvio-padrão e mediana de idade foram de, respectivamente, 51,96 \pm 12,65 e 52 anos. A maior parte das pacientes encontra-se acima de 50 anos (66,7%). Em relação ao tamanho tumoral, a média/desvio-padrão e mediana dos nódulos mamários eram de, respectivamente, 5,85 \pm 4,19 (2,7-25) e 5,0 centímetros.

A Tabela 1 mostra, em seguida, a distribuição das mesmas conforme as características epidemiológicas; verifica-se que a maioria da amostragem encontra-se

na menopausa, com tumores agressivos do ponto de vista histológico (graus 2 e 3) e em estádios avançados (IIIA – 37%).

Ao analisarmos a resposta clínica e patológica das pacientes após o tratamento neoadjuvante, observamos um percentual de 54,55% de pacientes com resposta clínica completa e 26,32% de mulheres com resposta patológica completa, com o resto da porcentagem cabendo ao grupo das que tiveram resposta incompleta ou ausente. Em relação ao estado linfonodal, metade das pacientes apresentaram axila positiva.

A Tabela 2 mostra a relação de positividade/negatividade dos marcadores imunohistoquímicos analisados. A maior parte das pacientes tinha positividade para receptor de estrogênio, enquanto que para o receptor de progesterona, um pouco menos da metade apresentava marcação. Aproximadamente 30% das pacientes tinham positividade para o antígeno cerbB2. Em relação à expressão do HIF-1 α , este se mostrou presente em 66,7% das lâminas analisadas, percentual reduzido para 25,9% se considerássemos apenas as marcações de membrana fortes e difusas (Figura 1). Em 33% dos cortes histológicos analisados, não houve esboço de marcação do anticorpo (Figura 2).

Ao se buscar associação entre as variáveis clínicas e a expressão do HIF-1 α , encontrou-se marginalmente significativa uma correlação com a faixa etária (menor que 50 anos; $p=0,08$), e estatisticamente importante com o status axilar positivo ($p=0,02$) (Tabela 3). Houve uma tendência marginalmente significativa de associação do status hormonal (pré-menopausadas; $p= 0,10$) com maiores níveis de HIF-1 α , assim como menores índices de resposta patológica completa ($p=0,12$) e maiores taxas de resposta clínica completa ($p=0,09$). Fazendo uma análise univariada entre as variáveis com associação estatística, a única que se manteve correlacionada a um

maior nível de HIF-1 α foi a positividade axilar (RR bruto de 1,9). Em relação a análise dos marcadores imunohistoquímicos (RE, RP e cerb2), não houve associação estatisticamente significativa.

Tabela 1. Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado conforme características epidemiológicas. Ribeirão Preto, 2010.

Variável	Número	%
Idade (anos)		
< 50	9	33,3
50 +	18	66,7
Tamanho tumoral (cm)		
Até 5	14	51,8
5,1-10	12	44,4
>10	1	3,8
Estado hormonal		
Pré-menopausa	12	44,4
Menopausa	15	55,6
Subtipo histológico		
Ductal	26	96,2
Lobular	1	3,8
Grau histológico		
I	3	11,1
II	14	51,9
III	10	37,0
Estadio clínico (TNM)		

IIA	4	14,8
IIB	4	14,8
IIIA	10	37,0
IIIB	7	25,9
IIIC	2	7,5
Total	27	100,0

Tabela 2. Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado conforme marcadores imunohistoquímicos. Ribeirão Preto, 2010.

Variável	Número	%
RE		
Positivo	16	59,3
Negativo	11	40,7
RP		
Positivo	12	44,4
Negativo	15	55,6
Cerb-B2		
Positivo	9	33,3
Negativo	18	66,7
HIF-1α		
Positivo	18	66,7
Negativo	9	33,3
Total	27	100,0

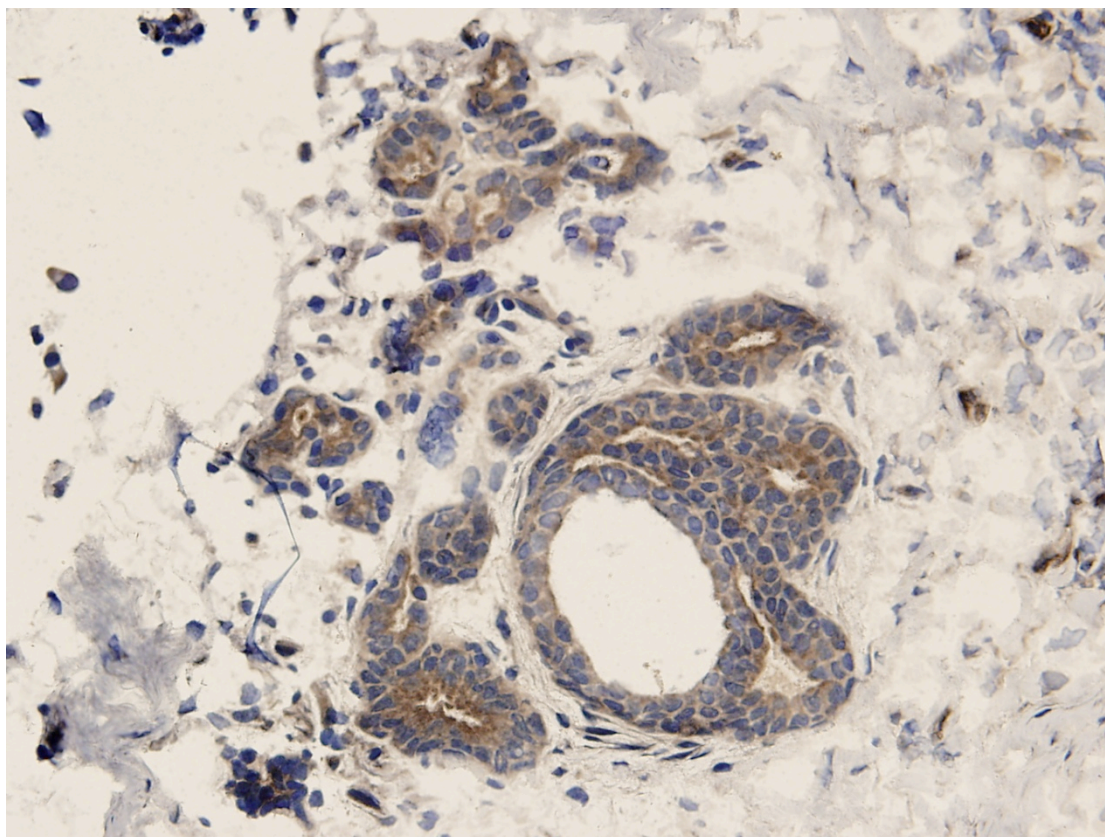


Figura 1. Forte expressão de HIF-1 α em análise imunohistoquímica. DAB, 400x.

Tabela 3. Avaliação da correlação entre a presença do HIF-1 α e diversas variáveis de pacientes com câncer de mama localmente avançado. Ribeirão Preto, 2010.

Variáveis	Expressão de HIF-1 α		p*
	Negativo (%)	Positivo (%)	
Faixa etária (anos)			0,03
< 50	4 (22,2)	14 (77,8)	
50 +	5 (55,6)	4 (44,4)	
Tamanho tumoral (cm)			0,4
Até 4,9	6 (40)	9 (60)	
5 e +	3 (33,3)	9 (75)	
Estadio clínico (TNM)			0,55
II	2 (25)	6 (75)	
III	7 (36,8)	12 (63,2)	
Grau**			0,13
I	0 (0)	3 (100)	
II	7 (50)	7 (50)	

III	2 (20)	8 (80)	
Status hormonal			0,10
Menopausa	3 (20)	12 (80)	
Pré-menopausa	6 (50)	6 (50)	
Resposta clínica			0,09
Completa	2 (16,7)	10 (83,3)	
Incompleta/ausente	5 (50)	5 (50)	
Resposta patológica			0,12
Completa	0 (0)	5 (100)	
Incompleta/ausente	5 (35,7)	9 (64,3)	
Status axilar			0,02
Positivo	7 (53,9)	6 (46,1)	
Negativo	2 (14,3)	12 (85,7)	
RE			0,58
Positivo	6 (37,5)	10 (62,5)	
Negativo	3 (27,3)	8 (72,7)	
RP			0,41
Positivo	5 (41,7)	7 (58,3)	
Negativo	4 (26,7)	11 (73,3)	
Cerb2			0,38
Positivo	2 (22,2)	7 (77,8)	
Negativo	7 (38,9)	11 (61,1)	

* Teste de Fisher – $< 0,05$ – estatisticamente significativa

** Agrupado graus II e III para realização de Fisher

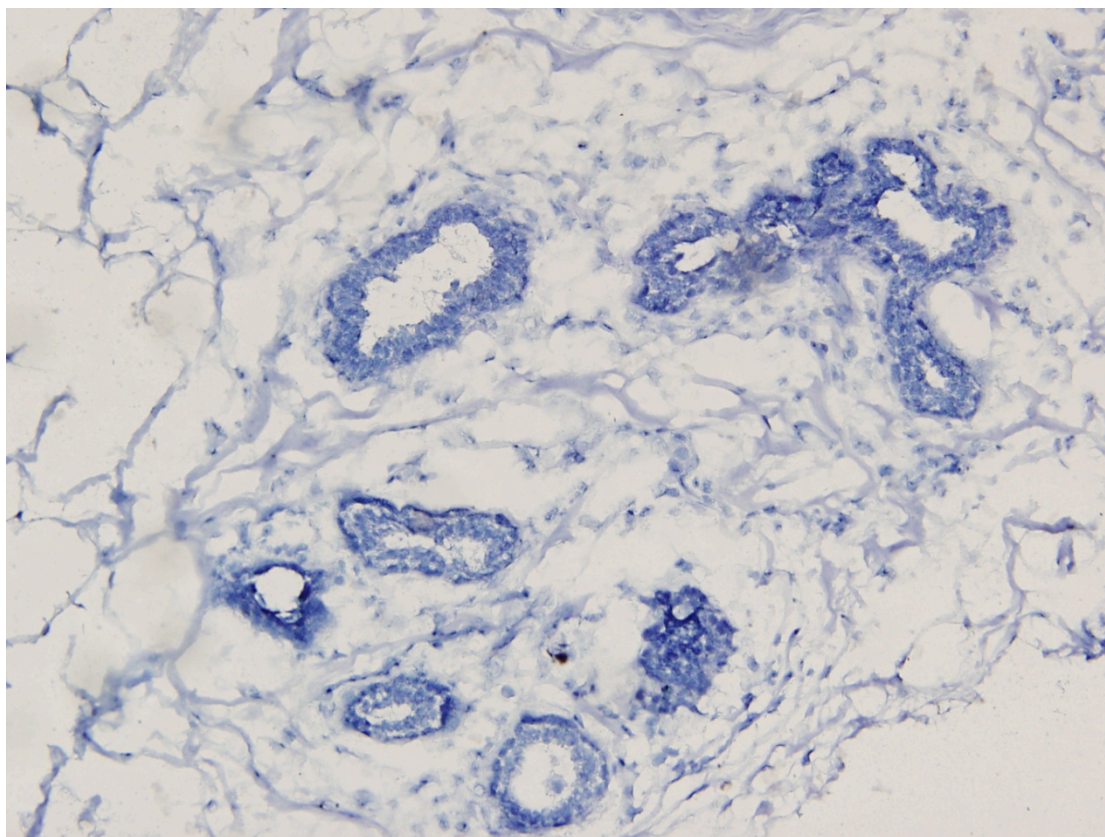


Figura 2. Ausência de marcação pelo HIF-1 α em microscopia. DAB, 200x.

DISCUSSÃO

Este trabalho objetivou avaliar a expressão de HIF-1 α em pacientes com câncer de mama localmente avançado e determinar uma possível função prognóstica e/ou preditiva para o mesmo ao associá-lo com variáveis clínicas e outros marcadores imunohistoquímicos. A sua presença (66,7%) foi semelhante àquela encontrada na literatura^{16,25,26}, com alguma variação devido ao ponto de corte ser diverso nas metodologias empregadas para analisar a sua pontuação¹⁰.

Subjetivamente, encontrou-se uma maior concentração deste marcador em regiões perinecroticas, o que corresponde provavelmente à sua ativação pela hipóxia. Porém, Vleugel et al.²⁷ evidenciaram que, de 44% das amostras positivas para HIF-1 α , 13,5% a expressaram de forma perinecrotica, enquanto que 30,5% tiveram uma

marcação mais difusa, indicando uma provável via alternativa de sua ativação (mutação do p53, superexpressão do HER-2, etc.). Uma maneira de se encontrar a influência do HER-2 na ativação do HIF-1 α é a sua correlação estatisticamente significativa com a marcação imunohistoquímica do antígeno cerbB2, fato este provado em análise plasmática de pacientes com tumores localmente avançados em nossa Instituição¹⁴ e extensamente descrito na literatura^{10,19,20,26}. Porém, em nosso trabalho não foi encontrada tal associação; isto provavelmente se deve à baixa amostragem, embora os grupos sejam homogêneos em relação às suas variáveis.

Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o status axilar positivo e a marcação forte e difusa de HIF-1 α em pacientes com tumores localmente avançados. Tal achado é equivalente em trabalho executado por Gruber e colaboradores²⁵, onde numa casuística de 77 pacientes, o HIF-1 α era expresso na maioria dos casos com axila positiva, servindo como fator de mau prognóstico neste grupo, especificamente no subgrupo com tumores T1/T2; na casuística dos mesmos, nenhuma variável permaneceu na análise multivariada associada ao HIF-1 α . Outro trabalho com resultados similares foi o executado por Schindl et al.¹⁸, envolvendo somente pacientes com axila positiva, quase todas com tumores T1 ou T2 (192/206 pacientes), e a expressão de HIF-1 α foi altamente significativa.

Similarmente a outros trabalhos prévios^{19,25}, tumores de maior diâmetro e estadios clínicos mais avançados não obtiveram associação estatisticamente significativa; diferindo dos demais, Kronblad et al.²⁶ encontraram uma correlação positiva importante, especialmente em tumores maiores que 5 cm; porém, esta não permaneceu na análise multivariada. Em nosso trabalho, devido à amostragem, houve desestabilização do modelo estatístico ao se realizar a regressão logística, o que não foi implicar nenhum resultado mais fidedigno. Outrossim, pelo objetivo da pesquisa em realizar uma análise de tumores localmente avançados, e pela pequena casuística,

não nos foi possível analisar o impacto no subgrupo das pacientes com estágio IIA. Porém, ficamos com a hipótese de Gruber²⁵ que acredita que o impacto do HIF-1 α é minimizado em tumores mais avançados devido à repressão por mecanismos adaptativos.

Contrariamente ao exposto acima, Bos et al.¹⁹ realizaram uma pesquisa com 81 mulheres axila negativa e 69 pacientes com axila positiva tratadas e concluíram que altos níveis de HIF-1 α tiveram um profundo impacto na sobrevida global e no intervalo livre de doença no subgrupo de pacientes com tumores axila negativa, sem influência nos casos de axila acometida. O detalhe é que nenhuma paciente recebeu tratamento quimioterápico pré-operatório porque todos os tumores localmente avançados foram excluídos desta pesquisa. Provavelmente houve uma influência da quimioterapia em trabalhos envolvendo pacientes com estadios mais avançados.

Em relação ao grau histológico, não houve significância estatística com o HIF-1 α , mesmo agrupando-se em baixo e alto grau as categorias. Isso provavelmente se deve ao tamanho amostral, pois discorda de vários trabalhos^{19,26}. Outra possibilidade seja pelo fato de termos um alto percentual de linfonodos positivos (50%), o que poderia reprimir o verificado em pesquisas que investigaram somente pacientes com axila acometida^{18,25}. Porém, na grande casuística de Kronblad et al.²⁶ com 564 pacientes, a correlação positiva entre grau histológico e expressão de HIF-1 α permaneceu mesmo somente neste grupo ($p=0,003$).

A idade menor que 50 anos e o estado pré-menopausal (de forma marginal) foram variáveis associadas a uma maior expressão de HIF-1 α neste grupo de mulheres. Ao se realizar a análise univariada, estas não permaneceram associadas, com uma provavelmente exercendo efeito de confusão sobre a outra. Esta correlação

não foi encontrada em nenhuma casuística relacionada^{19,25} e acreditamos que tal situação se deva à amostragem.

Não houve influência da expressão do HIF-1 α na resposta clínica e patológica dessas pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante, com discreta tendência estatística a significância, o que nos desencoraja a atribuir um papel preditivo para este marcador, de forma independente de outras variáveis. Existem pouquíssimos trabalhos estudando o valor preditivo do HIF-1 α em relação a terapêuticas neoadjuvantes, com tendência a um aumento na busca por tais informações, visando o desenvolvimento de terapias-alvo. Em um trabalho experimental conduzido por Narita et al.²⁸, o uso do KC7F2, um inibidor da via do HIF-1 α , preveniu a ativação de genes da anidrase carbônica, MMP2 (matrix metaloproteinase), endotelina 1 e enolase 1, assim como de mecanismos relacionados à síntese protéica de HIF-1 α , funcionando de forma eficaz.

Não houve associação, positiva ou negativa, da expressão do HIF-1 α com a presença do receptor de estrogênio. Experimentalmente, sabe-se que em condições de hipóxia, existe um decréscimo na expressão de receptores de estrogênio em células tumorais mamárias (MCF-7 e CAMA-1), com relação direta entre o nível de oxigênio e a queda na produção protéica dos mesmos¹⁰. Preditivamente, já foi mostrado que a resposta ao tamoxifeno em pacientes na pré-menopausa sofre uma diminuição em células tumorais mamárias hipóxicas em comparação àquelas em condições de normoxia²⁹. Ou seja, o mecanismo seria uma degradação proteossômica desses receptores, com diminuição da transcrição da sua forma ativada.

Quanto à expressão do antígeno c-erbB2 em pacientes com HIF-1 α , sabe-se que existem associações bem documentadas em câncer de mama. Uma publicação de Giatromanolaki et al.³⁰ mostrou que pacientes com tumores apresentando alta

expressão de HIF-1 α e amplificação do gene HER-2 tiveram uma pior sobrevida global. Em nossa casuística, tal correlação não foi observada.

Em suma, existe uma ligação entre a expressão de marcadores relacionados à hipóxia e piores desfechos, o que reforça a necessidade de conhecer melhor o papel preditivo desta via, de investigar drogas inibidoras deste eixo e de seus produtos gênicos, de identificar subpopulações de pacientes que venham a se beneficiar desta terapia, provavelmente daquelas que não respondem à terapia dita convencional e de aprender com este processo comum de carcinogênese, considerando-o de importante papel para a elucidação do tratamento do câncer de mama.

Referências

- 1 - **National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology.** [Disponível em : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf] Acesso em: 10 fev 2010.
- 2 - Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2009.98p.
- 3 - McKee PH, Chinyama CN, Whimster WF, Bogomoletz GS, Wolf CJ. **UICC Comprehensive Tumour Terminology Handbook.** 2007; 384p. John Wiley & Sons.
- 4 - Ahern V, Brennan M, Ung O, Kefford R. Locally advanced and inflammatory breast cancer. **Australian Family Physician** 2005;34:1027-32.

5 - Peintinger F, Buzdar AU, Kuerer HM, Mejia JÁ, Hatzis C, Gonzalez-Ângulo AM et al. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab. **Ann Oncol** 2008 [Epub ahead of print].

6 - Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. **Semin Oncol** 2001; 28:29-35.

7 - Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. **Oncologist** 2004;9(5):S10-S17.

8 - Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer** 2002;2:38-47.

9 - O'Donnell JL, Joyce MR, Shannon AM, Harmey J, Geraghty J, Bouchier-Hayes D. Oncological implications of hypoxia inducible factor-1-alfa (HIF-1alpha) expression. **Cancer Treat Rev** 2006;32:407-16.

10 - Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. **Cell Mol Life Sci** 2007;64:3233-47.

11 - Zundes W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. **Genes Dev** 2000, 14:391-6.

12 - Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . **Genes Dev** 2000,14:34-44.

13 - Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. Her2(neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (hif-1 α) synthesis: novel mechanism for hif-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. **Moll Cell Biol** 2001, 21:3995-4004.

14 - Garieri AP. Produção de VEGF e HIF-1 α em pacientes com carcinoma localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina. [**Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP**]. 2008. 49p.

15 - Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C et al. Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. **American Journal of Pathology** 2002;16: 947-56.

16 - Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. Hypoxia-inducible factor-1 α is associated with angiogenesis, and expresión of

bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. **Histopathology** 2005;46:31-6.

17 - Rosen SL. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. **Oncologist** 2005;10:382-91.

18 - Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1831-7.

19 - Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer** 2003; 97:1573-81.

20 - Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 2001;93:309-14.

21 - 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.

22 - Sobin LH, Wittekind CH. **UICC TNM classification of malignant tumors**, 5a edição. New York: Wiley-Liss, 1997. 302p.

23 - Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (RECIST Guidelines). **J Natl Cancer Inst** 2000;92:205-16.

24 - Leong TY, Leong AS. Controversies in the assessment of HER-2: more questions than answers. **Adv Anat Pathol** 2006;13(5)263-9.

25 - Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G, Djonov V. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter ? **Breast Cancer Res** 2004;6:R191-8.

26 - Kronblad A, Jirstrom K, Ryden L, Nordenskjold B, Landberg G. Hypoxia inducible factor-1 α is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. **Int J Cancer** 2006; 118:2609-16.

27 - Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aasrødem Y et al. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 α expression in invasive breast cancer. **J Clin Pathol** 2005;58:172-7.

28 - Narita T, Yin S, Gelin CF, Moreno CS, Yepes M, Nicolaou KC, Van Meir EG. Identification of a novel small molecule HIF-1 α translation inhibitor. **Clin Cancer Res** 2009;15(19):6128-36.

29 - Kronblad A, Helczynska K, Nielsen NH, Pahlman E, Emdin S, Pahlman S, Landberg G. Regional cyclin D1 overexpression or hypoxia correlate inversely with heterogeneous oestrogen receptor-alpha expression in human breast cancer. **In Vivo** 2003;17:311-8.

30 - Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Simopoulos C, Polychronidis A, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E. c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1a dependent. **Clin Cancer Res** 2004;10:7972-7.