

Correlação da expressão do receptor do fator de crescimento do epitélio vascular (VEGFR1) e do KI-67, em pacientes com câncer de mama, com variáveis histopatológicas

Correlation of the expression of the receptor of vascular endothelial growth factor (VEGF) and KI-67 with pathological variables in breast cancer patients

Nilton Leite Xavier¹, Carlos Henrique Menke¹, Diego de Mendonça Uchoa², Melina Braude Canterji³, Lara Rech Poltronieri³, Rodrigo Cericatto⁴

Descritores

Marcador Celular
Imuno-histoquímica
Neovascularização patológica

RESUMO

Correlação da expressão do receptor do fator de crescimento do epitélio vascular – *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e do KI-67, em pacientes com câncer de mama, com variáveis histopatológicas. Introdução: proteínas que influam na proliferação celular, como o VEGF e o KI-67, são alvo de estudos. O VEGF está implicado na angiogênese, que é necessária ao crescimento tumoral. **Objetivo:** Analisar a correlação do VEGF e do KI-67 com variáveis histopatológicas. Métodos: entre 15/03/2008 e 14/04/2009, incluímos 41 pacientes com câncer de mama inicial, tumores T1 e T2, para estudo, usando a coloração H&E na análise do tumor, grau histológico e invasão vascular e a imunoperoxidase para a avaliação imuno-histoquímica com anticorpos específicos para os receptores de VEGF, KI-67, p53 e receptor de estrogênio (RE), usando escore qualitativo até 3+ na avaliação da intensidade da coloração e/ou quantitativo até 5+, para avaliar a expressão percentual das células coradas. O escore total, soma das duas, pode chegar ao máximo de 8+. Apenas o KI-67 foi categorizado pelo percentual de células coradas na IHQ e considerado positivo a partir de 20%. **Resultados:** o receptor do VEGFR1, tanto no escore intensidade de cor quanto no escore total, apresenta correlação positiva com os tumores T1 ($p=.01$), com o receptor estrogênico positivo ($p=.01$) e com a expressão negativa do KI-67 ($p=.02$). A expressão do KI-67 apresenta correlação positiva com p53 ($p=.00$) e com o receptor hormonal negativo (RE-) ($p=.04$) e correlação fraca com a invasão vascular ($p=.09$) e o grau histológico indiferenciado (G3) ($p=.07$). **Discussão:** A avaliação de marcadores tumorais que possam responder à terapia alvo é um objetivo a ser perseguido. A correlação positiva do VEGF com o *status* do RE já foi relatada e está de acordo com nossos resultados. A expressão do KI-67 é associada à pobre evento. Os resultados controversos dos marcadores refletem a dificuldade em padronizar as avaliações (reagentes usados, procedimentos e escore) e impedem sua validação prognóstica. **Conclusões:** Os resultados são promissores e o seguimento dessas pacientes permitirá analisar o significado destes marcadores para os eventos de sobrevida livre de doença ou mortas.

Trabalho realizado nos Serviços de Mastologia e Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – Porto Alegre (RS), Brasil.

¹ Doutor e Professor-associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO) da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre (RS), Brasil.

² Médico-patologista; Contratado do Serviço de Patologia do HCPA da UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

³ Graduandas e bolsistas da UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

⁴ Mastologista contratado do Serviço de Mastologia do HCPA – Porto Alegre (RS), Brasil.

Endereço para correspondência: Nilton Leite Xavier – Rua João Paetzel, 551 – CEP 91330-280 – Porto Alegre (RS), Brasil –

E-mail: 00003774@ufrgs.br

Conflito de interesse: nada a declarar.

Recebido em: 01/07/2011. Aceito em: 14/09/2011

Keywords

Cell Marker
Immunohistochemistry
Neovascularization, Pathologic

ABSTRACT

*Correlation of the expression of the receptor of vascular endothelial growth factor (VEGF) and KI-67 with pathological variables in breast cancer patients. **Background:** Many studies have been conducted on proteins that have action on cell proliferation, such as VEGF and KI-67. VEGF acts in the angiogenesis required for tumor growth. The KI-67 correlates with proliferation of tumor cells, probably reflecting its aggressiveness. **Objective:** To analyze the correlation of VEGFR1 and KI-67 with pathological variables. **Methods:** The study was approved by the Committee on Ethics in research, University Hospital of Porto Alegre (RS). Between March 2008 and April 2009 we included 41 patients with early breast cancer (T1 and T2). We used H&E staining for tumor analysis, histological grade and vascular invasion, and immunohistochemistry evaluation with antibodies specific for VEGF receptors, KI-67, p53, estrogen receptor (ER), using quality score until 3+ of the evaluation of intensity of stain and quantitative until 5+, to evaluate the expression percentage of stained cells. The total score, add either, can reach 8+ Only the KI-67 was categorized by percentage of stained cells in the IHC and considered positive above 20%. **Statistics:** correlation and pearson's chi square and, for the significant variables, used the multivariate analysis. **Results:** The receptor VEGFR1 in both color intensity score and the total score, correlated positively with T1 tumors ($p=.01$), with the estrogen receptor positive ($p=.01$) and negative expression of KI-67 ($p=.02$). The expression of KI-67 correlates positively with p53 ($p=.00$) and with estrogen receptor negative ($p=.04$) and weak correlation with vascular invasion ($p=.09$) and histological grade undifferentiated ($p=.07$). **Discussion:** evaluation of tumor markers that may respond to targeted therapy is a goal to be pursued. The positive correlation of VEGF with the status of ER has been reported and is consistent with our results. The expression of KI-67 is associated with poor outcome. The controversial results of the markers reflect the difficulty in standardizing evaluations (used reagents, procedures and score) and prevent its prognostic validation. **Conclusions:** The clinical correlation between the results obtained and outcomes of disease-free survival and overall survival could not be measured. However, the data presented can enhance the studies done and seek better methods for standardization of future results and statistical analysis.*

Introdução

Os tumores sólidos podem induzir o crescimento vascular do estroma, e a intensidade da resposta angiogênica pode ser correlacionada com o prognóstico em pacientes com câncer de mama. O fator de crescimento do epitélio vascular – *vascular endothelial growth factor* (VEGF) estimula diretamente o crescimento das células endoteliais e a permeabilidade vascular, estimulando o extravasamento de proteínas plasmáticas que alteram a matriz extracelular, promovendo a angiogênese^{1,2}. O VEGF pode ser um facilitador do crescimento tumoral pelo aumento vascular, promovendo a nutrição tumoral e, além disso, tem sido correlacionado com o intervalo livre de doença.

A expressão do VEGF das células endoteliais foi correlacionada com a expressão do receptor 1 do VEGF (VEGFR-1), positivamente, e também com os tumores LN negativos. Esses achados apontam para o tratamento com agente antiangiogênico³.

O VEGF liga e ativa dois receptores da tirosina-cinase, o VEGFR1 e o VEGFR2, que regulam a atividade antiangiogênica, tanto fisiológica quanto patológica. O VEGFR1 tem dupla rota; negativa na angiogênese do embrião e positiva no adulto. É expressado nas células endoteliais e também nos

macrófagos, podendo promover crescimento tumoral, metástase e inflamação. Essa dupla função, positiva e negativa, em diferentes sistemas e condições biológicas, ainda não é bem conhecida^{4,5}.

A relação dos fatores angiogênicos na patologia mamária está ganhando o reconhecimento de cientistas e clínicos, desde que possam funcionar como alvos moleculares no controle da expansão tumoral. O VEGF é uma das chaves reguladoras da angiogênese e, apesar dos avanços, não se conhece sua real dependência dos hormônios sexuais². Essa citocina pró-angiogênese pode ser um indicador da resposta estromal à ferida operatória ou ao câncer.

Estudos⁶⁻⁸ sobre o câncer de mama, procurando estabelecer variáveis clínicas e histopatológicas que traduzam um risco estatisticamente significativo à disseminação metastática, valorizam as características histopatológicas do tumor primário. A invasão vascular tem sido valorizada por vários estudiosos do câncer de mama, no sentido de predizer tanto metástases axilares quanto a distância, podendo ter uma relação direta com a angiogênese tumoral.

Tem-se dado ênfase aos marcadores celulares⁸, procurando estabelecer, em bases individuais, qual seria a agressividade tu-

moral, útil na predição prognóstica de sobrevida e de tratamento complementar. Há os receptores hormonais – proteína citoplasmática que expressa a associação hormonal com o tumor –; o antígeno KI-67 – proteína nuclear que expressa o índice de proliferação celular e pode ser detectada em material fixado com o uso do clone MIB-1 –; a fosfoproteína p53, que mantém o controle do ciclo celular e que, com a mutação do gene p53 e do cromossomo 17p13, pode resultar na proteína p53 estável, detectada por métodos imuno-histoquímicos.

Esses alvos moleculares e sua correlação com o VEGF, na rota da angiogênese hormono-dependente, poderão apontar caminhos na terapia e na quimioprevenção se a “ângio-prevenção” for o objetivo².

Método

Planejou-se um estudo transversal para correlacionar e expressão do receptor do epitélio vascular (VEGFR1) e do KI-67, no nódulo tumoral, com variáveis histo-patológicas, simultâneo com um estudo de caso e de controle para o estudo do VEGF sérico. O cálculo amostral foi baseado na hipótese de que o VEGF esteja elevado em 40% dos casos com câncer e 10% nos de controles, na proporção de 1:1; nessas condições, com risco relativo de 4,00 e/ou taxa de odds de 6,00, o “n total”, de 76 pacientes. Incluiu-se 42 pacientes com câncer de mama.

Foram eleitas as mulheres com câncer de mama primário, no momento do diagnóstico, com idade entre 30 e 74 anos, com doença local, tumores T1 e T2. Foram excluídas as com outro tipo de neoplasia, em tratamento neoadjuvante ou com diabetes *mellitus*.

A inclusão prospectiva de 42 pacientes ocorreu de 15 de março de 2008 até 14 de abril de 2009, entre aquelas que frequentam o ambulatório de mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Após a elegibilidade, foi solicitado a assinatura no consentimento informado (CI) para a participação no estudo, que constou de um questionário com informações clínico-patológicas.

O patologista, na avaliação dos parâmetros patológicos, usou as técnicas de coloração por hematoxilina e eosina (HE). A técnica de imuno-histoquímica (IHQ), usando o complexo avidina-biotina-peroxidase, foi aplicada para avaliar a expressão dos antígenos dos tumores. A imunorreação foi analisada de forma qualitativa (Quali) e quantitativa (Quanti). A classificação Quali foi feita de acordo com a intensidade da coloração acastanhada no citoplasma das células neoplásicas, usando os seguintes escores: 0 = ausência de coloração; 1+ = coloração fraca; 2++ = coloração média e 3+++ = coloração forte. A análise Quanti da expressão das proteínas foi classificada em índices percentuais de 0 a 100%, nas seguintes proporções: 0 / 1% / >1 até 10% / >10 até 33% / >33 até 66% / >66 até 100, correspondendo a 0/, /+, /++, /+++, /++++, /+++++, respectivamente. O escore total (ET) é a soma até 3+ da Quali com o máximo de até

5+ da Quanti. Na Quali, 2+ significa 1/100 de células fracamente coradas e, para alguns autores, é praticamente expressão negativa⁹.

O receptor do VEGF (VEGFR1) foi pesquisado pelo anticorpo VEGF, clone A20, com diluição 1:400. O receptor do VEGF foi categorizado⁹ segundo o escore Quali (InVEGFR1) em coloração forte =1, cor média =2 e coloração fraca =3 e, segundo o ET, que é a associação da intensidade da coloração com a expressão do percentual de células coradas (InExVEGFR1), nos seguintes valores: quando a intensidade e a percentagem corada somarem 8+=1, quando a soma for 7+=2 e quando a soma for abaixo de 7+=3.

A expressão da proteína p53, com o uso do ET, foi categorizada em positiva (>2+/8) e negativa (ausente ou até 2+/8).

A expressão do receptor de estrogênio (RE) foi avaliada de duas maneiras: numa, foi categorizada em qualquer positividade =1 e negatividade =2 e, na outra, em três categorias, positiva, acima de 3+/8+=1, positiva fraca =2, usando-se 2 e 3+ como fraca expressão, e negativa =3.

Na IHQ da proteína KI-67, usou-se o anticorpo MIB-1. O KI-67 foi avaliado em porcentagem de células positivas e categorizado em positivo, quando a proteína está expressa em 20% das células ou mais ($\geq 20\%$ =1) e negativo quando inferior a 20% (<20%=2).

As variáveis histopatológicas foram o tamanho do nódulo, categorizado em T1p e T2p; o *status* axilar, categorizado em LN+/LN-, a histologia categorizada como G1, G2 e G3 e a invasão vascular peritumoral, categorizada em sim e não.

A característica da amostra foi avaliada pela análise da frequência. A correlação entre os marcadores tumorais e a histopatologia foi realizada pelo coeficiente e pelo χ^2 de Pearson. As variáveis tabuladas, significantes ou próximas da significância estatística ($p < 0,05$), também foram avaliadas em análise multivariada, com resultados iguais.

Resultados

Ocorreu a perda de uma paciente que decidiu pela quimioterapia neoadjuvante. Na Tabela 1 estão as características das 41 restantes.

A avaliação do receptor do VEGF, correlacionando a intensidade de coloração (InVEGFR1) com algumas variáveis, está sintetizada na Tabela 2. Usou-se a correlação de Pearson e o significado estatístico pelo valor p. Também usou-se o χ^2 de Pearson e seu valor p. No ET, quando considerado a InExVEGFR1, os resultados estão na Tabela 3. Na Tabela 4, estão as correlações com o KI-67 e a estimativa de risco.

A expressão do receptor do VEGF, analisado no escore intensidade, por meio do coeficiente de Pearson, mostrou correlação positiva com nódulo T1p, tumor RE+ e proteína KI-67 pouco expressa ou negativa.

Tabela 1. Características das pacientes

Variáveis	Média	Desvio-padrão	Limites	Pacientes
Idade (anos)	54,3	11,2	32-72	41
IMC (kg/m ²)	28,1	5,4	19-48,9	41
Idade menarca	12,6	1,7	8-17	40
Idade menopausa	49,8	2,7	44-55	25
Número de gestações	2,95	2,95	0-8	39
Número de partos	2,45	2,45	1-7	38

IMC=índice de massa corporal.

Tabela 2. Expressão da intensidade do receptor para o fator de crescimento do epitélio vascular

Variáveis e Categorização	Correlação de Pearson	χ^2 de Pearson	Significado Valor p	Likelihood Ratio
T1=1	Corr. 0,40	6,98	0,03	7,28
T2=2	p=0,009	10,29	0,00	12,08
Expressão RE	Corr. 0,38	12,46	0,00	10,10
>3+/8=1	p=0,013	5,05	0,08	5,02
2+e3+=2	Corr. 0,46	5,05	0,08	5,02
Negativa=3	p=0,002			
RE				
Qualquer + = 1	Corr. 0,34			
Negativo = 2	p=0,029			
Expressão do KI				
≥20=1				
<20=2				

RE=receptor de estrogênio

Tabela 3. Escore total do receptor para o fator de crescimento do epitélio vascular = InExVEGFR1

Variáveis e Categorização	Correlação de Pearson e p	χ^2 bilateral de Pearson	Significado Valor p	Likelihood Ratio
Nódulo				5,04
T1p=1	Corr. 0,33	4,96	0,07	
T2p=2	p=0,030	14,69	0,00	13,67
Expressão RE	Corr. 0,39	12,46	0,00	11,70
Positivo >3+=1	p=0,010	5,41	0,06	5,23
Até 3+=2	Corr. 0,49	5,41	0,06	5,23
Negativo = 3	p=0,001			
RE				
Qualquer + = 1	Corr. 0,34			
Negativo = 2	p=0,027			
Expressão KI-67				
≥20%=1				
<20%=2				

RE=receptor de estrogênio

Tabela 4. Correlação do índice de proliferação KI-67

Variáveis e categorização	Correlação de Pearson	χ^2 bilateral de Pearson	Significado Valor p	Razão de Prevalência e IC95%
Grau histológico				
G1=1	Corr. 0,28	3,42	0,18	RP=2,27
G2=2	p=0,07			(0,9<RP5,8)
G3=3		3,65	0,10	
	Corr. 0,25			RP=2,27
Invasão vascular	p=0,10	11,68	0,01	(0,9<RP<5,9)
Sim = 1				
Não = 2	Corr. 0,53	3,95	0,04	RP=4,36
	p=0,00			(1,81<RP<10,50)
Proteína p53				
>2+/8=1	Corr. 0,31			RP=3,63
Até 2+/8=2	p=0,04			(1,00<RP<13,72)
RE				
Qualquer + = 1				
Negativo = 2				

RE=receptor de estrogênio; RP=razão de prevalência.

A expressão do receptor do VEGF, no seu ET, se correlacionou positivamente com T1p e RE+ e negativamente com o KI-67.

Correlação fraca, estatisticamente não significativa, entre o KI-67 e o grau histológico e a invasão vascular. O KI-67 com alta expressão apresenta tendência de correlação com G3 (indiferenciado) e com a invasão vascular. O KI-67 tem correlação positiva com p53 expresso e com RE-.

Discussão

A avaliação de marcadores tumorais que possam responder à terapia alvo é um objetivo a ser perseguido². Alguns estudos^{10,11} estão correlacionando o VEGF, seja plasmático ou sérico, com o VEGF tecidual e a angiogênese, tentando uma seleção terapêutica.

Nossos achados indicam que o receptor VEGFR1, tanto no escore intensidade quanto no escore total, apresenta correlação positiva com os tumores T1, com o receptor estrogênico positivo (RE+) e com a expressão negativa do KI-67. O VEGFR1 no seu ET tem baixa correlação com p53 negativo. A expressão do KI-67, com valores percentuais a partir de 20%, apresenta correlação com a expressão da proteína p53, com o receptor hormonal negativo (RE-) e correlação fraca com a invasão vascular e com o grau histológico indiferenciado (G3).

A correlação positiva do VEGF com o *status* do RE já foi relatada^{10,11} e está de acordo com nossos achados.

O estudo¹² avaliou a relação entre o *status* do KI-67 e o prognóstico no câncer de mama. A meta-análise com mais de 12.000 pacientes concluiu – apesar do ponto de corte dos valores para o KI-67 oscilar de 3,5 a 34% – que a positividade foi associada ao significativo alto risco de recidiva, tanto para doença com axila positiva quanto negativa, e que também há relação com pobre sobrevida nesses casos.

Pacientes com KI-67 categorizado a partir de 25% tiveram pior prognóstico¹³. Nosso ponto de corte foi 20% e obtivemos correlação com p53 positivo e com RE negativo, que são marcadores de pior prognóstico. Esses dados são concordantes, porém, o estudo¹⁴ com 54 pacientes, embora tendo a associação do VEGF tecidual com o KI-67, não demonstrou significância prognóstica. A taxa de proliferação é associada à pobre evento, mas os resultados controversos refletem a dificuldade em padronizar as avaliações e impedem a validação prognóstica e terapêutica de alguns marcadores^{9,15}.

Revisão da literatura, baseada em marcadores de proliferação, avaliados por imuno-histoquímica^{15,16}, enfatiza que há necessidade de estudos prospectivos e de padronização dos reagentes usados, dos procedimentos e do escore^{9,15}. Concluem que nenhum dos marcadores pode ser recomendado na prática clínica, e essa posição foi enfatizada na reunião de especialistas da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), em 2007¹⁷. No entanto, com o advento dos testes genéticos, o marcador de proliferação celular, como o KI-67, é revisado como marcador preditivo e prognóstico¹⁸ e, à luz de pesquisas recentes, o KI-67 está sendo reavaliado e indicado para ser rotineiro no câncer inicial de mama^{18,19}.

Os resultados parecem promissores e, acompanhando essa coorte, pode-se avaliar o valor prognóstico. Procurou-se, na metodologia, manter um padrão baseado na literatura⁹ e usado no Serviço de Patologia do HCPA, para que possa ser útil para outros estudiosos.

Referências

1. Heer K, Kumar H, Read JR, Fox JN, Monson JR, Kerin MJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: its relation with cancer type and estrogen receptor status. *Clin Cancer Res.* 2001;7(11):3491-4.
2. Hyder SM. Review: sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(3):667-87
3. Schmidt M, Voelker HU, Kapp M, Dietl J, Kammerer U. Expression of VEGFR-1 (FR-1) in breast cancer is associated with VEGF expression and with node-negative tumour stage. *Anticancer Res.* 2008;28(3A):1719-24.
4. Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Fit-1). *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(4):409-20.
5. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39(5):469-78.
6. Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ, et al. Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients. *J Am Coll Surg.* 2000;191:1-6, discussion 6-8.
7. Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Franandez FA, Buleta L, Val-Bernal JF. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with invasive breast carcinoma by a combination of classical and biological prognostic factors. *Pathol Res Pract.* 1999;195:611-8.
8. Pascalicchio JC, Fristachi CE, Baracat FF. Câncer de mama: fatores de risco, prognósticos e preditivos. *Rev Bras Mastol.* 2001;11:71-84.
9. Alfred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11(2):155-68.
10. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res.* 2000;60:2898-905.
11. Iovino F, Ferraraccio F, Orditura M, Antoniol G, Morgillo F, et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels correlate with tumor VEGF and p53 overexpression in endocrine positive primary breast cancer. *Cancer Invest.* 2008;26(3):250-5.
12. Azambuja E, Cardoso F, Castro G Jr., et al. KI-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007;96:1504.
13. Manoel WJ, Mühlbeier DFM, Paula LB, Araujo WC, Almeida FM, et al. Immunohistochemical analysis of KI-67 in 140 patients with breast cancer – correlation with clinicopathological factors and survival. *Rev Bras Mastol.* 2009;19(3):94-100.
14. Magalhães GRAAV. Angiogênese em carcinomas de mama: análise de expressão de VEGF e suas correlações com outros fatores prognósticos. *Rev Bras Mastol.* 2009;19(Suppl 1):50,TL082.
15. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, et al. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now?. *Ann Oncol.* 2005;16:1723.
16. Kroger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, et al. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006;12:159.
17. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:5287.
18. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PN, Kayes MM, Gelmon KA. KI-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):174-83.
19. Sasano H. Histopathological prognostic factors in early breast carcinoma: na evaluation of cell proliferation in carcinoma cells. *Expert Opin Invest Drugs.* 2010;19(Suppl 1):S5-11.