

Detecção de invasão vascular em biópsia por agulha grossa de carcinoma de mama por meio da técnica IHQ com duplo marcador CD34 e pancitoqueratina AE1/AE3

Detection of blood vessel invasion in breast cancer core-biopsy through immunohistochemical analysis with double staining CD34 and pan cytokeratin AE1/AE3

Luciane Poletto Antunes¹, Márcia Silveira Graudenz¹, Ademar Bedin Jr.¹, Maira Caleffi¹

¹Pós-graduação da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Laboratório de Anatomia Patológica da Pós-Graduação; Hospital Santa Rita – Santa Casa e Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS. Correspondência para: Luciane Poletto Antunes. Núcleo Mama Moinhos, Rua Ramiro Barcelos, 910, 11º andar, 90035-001, Porto Alegre, RS, e-mail: lu.poletto@gmail.com

Recebido em: 10/7/2006. Aceito após modificações em: 15/12/2007

Palavras-chaves

Câncer de mama;
Invasão vascular; IHQ
(imunohistoquímica).

Keywords

Breast cancer; Blood
vessel invasion;
Immunohistochemistry.

RESUMO

Objetivos: Detectar a presença de invasão vascular nas biópsias por agulha grossa de carcinoma de mama por meio da técnica IHQ (IHQ) com duplo marcador (CD34-pancitoqueratina AE1/AE3); analisar a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) com essa técnica e comparar a acurácia do duplo marcador com a técnica da hematoxilina-eosina (H&E). **Métodos:** Cortes histológicos de 74 casos de biópsias por agulha grossa de pacientes com câncer de mama foram submetidos à coloração por IHQ com duplo marcador e coloração por H&E. Como grupo-controle, utilizou-se os resultados anatomopatológicos das cirurgias. **Resultados:** Invasão vascular ocorreu em 34 casos (45,9%). O teste H&E demonstrou valores superiores à IHQ quanto a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN. Apenas em casos sem metástases axilares, a especificidade foi superior no teste com IHQ. **Conclusão:** O teste com maior acurácia para a detecção de invasão vascular nas biópsias foi o da coloração por H&E. Nos casos sem metástases axilares, o duplo marcador mostrou-se superior somente quanto à especificidade. Por causa da escassez de material das biópsias, a principal suposição é que, no material proveniente das cirurgias, que é mais representativo, ou em biópsias com maior número de fragmentos, o duplo marcador tenha melhores resultados.

ABSTRACT

Purposes: To detect blood vessel invasion in breast cancer core-biopsies through the immunohistochemical double staining technique (CD34 and pancytokeratin AE1/AE3); to analyze the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of this technique and to compare the accuracy of double staining with the hematoxylin-eosin technique. **Methods:** 74 specimens of breast cancer core-biopsies were analyzed. Core-biopsy specimens were stained with immunohistochemical (IHC) double staining and with hematoxylin-eosin (H&E) in different slides for blood vessel invasion research. For the control group, we used anatomopathological results from previous surgeries. **Results:** 34 patients (45.9%) presented blood vessel invasion. The H&E test showed better results of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). Only in cases without metastatic axillary lymph node, specificity was higher in the ICH test. **Conclusion:** The H&E is the most accurate method to the detection of blood invasion in core-biopsies breast cancer. In cases without metastatic axillary lymph node, IHC double staining proved to be superior regarding specificity. Considering the low density of core-biopsy specimens, our hypothesis is that IHC double staining would be the best choice when used in specimens of surgeries or in core-biopsy with abundant sample of tissue.

INTRODUÇÃO

A avaliação dos fatores prognósticos no câncer de mama demonstra ser um excelente espelho sobre o comportamento biológico dos tumores. A invasão vascular é um parâmetro prognóstico independente para recorrência locorregional, sobrevivência global e sobrevivência livre de doença¹.

Diante da constatação de invasão linfática, o tratamento tem incluído, cada vez mais, a radioterapia pós-operatória². Para as mulheres submetidas à mastectomia com reconstrução imediata pela técnica do expensor, a radioterapia pós-operatória pode implicar resultado estético ruim, com taxa de complicação aumentada, por causa da ocorrência de contratura capsular ou da diminuição da expansibilidade da pele³.

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

A subjetividade da detecção de invasão vascular feita apenas pela técnica da coloração com hematoxilina eosina (H&E) tem trazido dificuldades na sua interpretação, e, nem sempre, proporciona clara identificação da invasão, principalmente em uma amostra reduzida de tecido, como no caso da biópsia por agulha grossa. A presença de artefatos de retração, por causa do processamento do material, também pode trazer dúvidas⁴.

A técnica da imunoistoquímica (IHQ), utilizando o sistema de dupla coloração, tem a capacidade de detectar simultaneamente dois antígenos tissulares diferentes em um mesmo corte tecidual⁵.

Os anticorpos utilizados na IHQ para demonstrar células tumorais são as citoqueratinas AE1/AE3. Essas têm sido utilizadas na análise do linfonodo sentinela, para detecção de micrometástases⁶. O CD34 é considerado um marcador vascular, e tem mostrado utilidade nos casos que necessitam distinção do lúmen dos vasos⁷.

A análise de invasão vascular no carcinoma mamário por meio da técnica IHQ com sistema de dupla coloração, ainda não foi descrita na literatura. Essa técnica torna possível a visualização dos elementos tumorais e endoteliais, com colorações diferentes, no mesmo corte tecidual.

Com base na hipótese de que o duplo marcador aumenta a sensibilidade e a especificidade da detecção de invasão vascular, o objetivo principal deste estudo é detectar a presença de invasão vascular nas biópsias por agulha grossa de carcinoma de mama por meio da técnica IHQ com o duplo marcador para células endoteliais (CD34) e para citoqueratinas (AE1/AE3). Os objetivos específicos consistem de analisar a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo

(VPN) do duplo marcador IHQ comparar sua acurácia com a técnica da coloração por H&E.

Método

Seleção de pacientes

O presente estudo caracteriza-se observacional, transversal e retrospectivo. Foram estudadas 74 pacientes com carcinoma invasor de mama, tratadas com cirurgia para a doença, no período entre janeiro de 2003 a maio de 2005, que realizaram biópsias por agulha grossa para o diagnóstico da doença e que tinham o resultado anatomopatológico da cirurgia disponível. Os critérios de exclusão foram: realização de outras técnicas para o diagnóstico do câncer, carcinoma de mama no sexo masculino, realização de tratamentos neoadjuvantes, dados incompletos nos prontuários e ausência de tumor no material examinado.

Preparação do material

Foram selecionados os blocos de parafina correspondentes às biópsias dos 74 casos e coletados dados dos prontuários referentes às características gerais da população. Para o grupo-controle, utilizou-se os resultados anatomopatológicos das cirurgias já existentes, considerado o padrão-ouro para detecção de invasão vascular.

Os blocos de parafina, referentes às biópsias, foram processados e corados com o duplo marcador IHQ e com H&E, em lâminas separadas.

O método utilizado foi o sistema de dupla coloração Envision da DakoCytomation código nº K1395[®], com os anticorpos primários anti-CD34, na diluição 1:200 (Mouse anti-human, Dako, clone Q B End 10, cod M7165, lote 077) e pancitoqueratina AE1/AE3, na diluição 1:100 (Mouse monoclonal anti-human, Dako, clone AE1/AE3, cód. M3515, lote 020). A diluição foi previamente testada com base nos controles positivos e negativos com tecido amigdaliano.

Análise anatomopatológica

A leitura das lâminas foi realizada por dois examinadores, ambos sem o conhecimento prévio dos resultados.

O resultado anatomopatológico das peças cirúrgicas foi considerado o teste padrão-ouro para informação sobre a presença ou ausência de invasão vascular.

O critério para definir invasão vascular foi a presença de tumor, corado em marrom, no interior do vaso com a superfície endotelial corada por cor rósea. A interface do vaso deveria ser vista na totalidade do seu contorno (Figuras 1 e 2)⁸. Foi utilizado o método qualitativo na interpretação dos resultados, demonstrando a presença ou a ausência de invasão vascular das amostras.

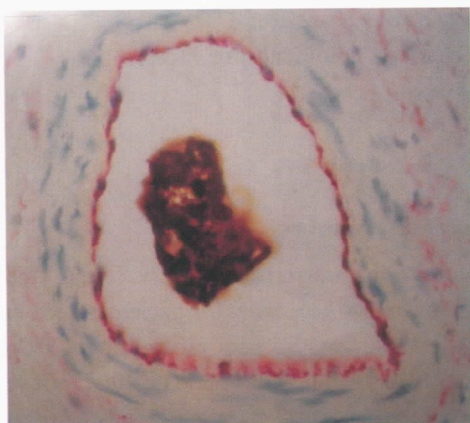


Figura 1. Biópsia por agulha grossa de carcinoma de mama. Coloração com duplo marcador IHQ. Demonstração de invasão vascular com êmbolo tumoral (marrom) no interior do vaso (rosa).

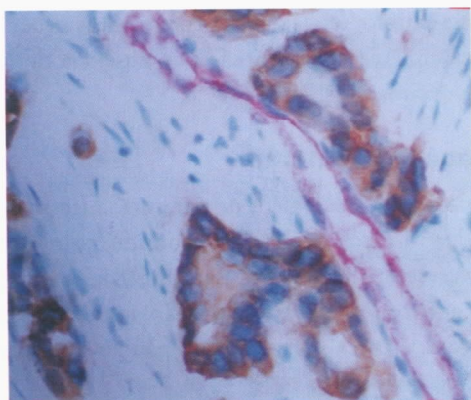


Figura 2. Biópsia por agulha grossa de carcinoma de mama. Coloração com duplo marcador IHQ. Demonstra ausência de invasão vascular. Tumor (marrom) e vaso (rosa) paralelos.

RESULTADOS

A idade média do grupo ($n = 74$ casos) foi de 58,1 anos, com desvio-padrão de + 14 anos. A média de idade entre as pacientes com e sem invasão vascular foi 56,8 e 59,1 anos, respectivamente. A média de tamanho tumoral foi de 2,7 cm (0,2 a 11 cm) e do número de linfonodos acometidos de 3,5. O tamanho tumoral médio no grupo com invasão vascular foi 3,1 cm, e no grupo sem invasão foi 2,3 cm. Quanto ao número de linfonodos metastáticos, o grupo com invasão vascular mostrou média de 6,3 linfonodos acometidos, contrastando com o grupo sem invasão, com 1,2 linfonodos acometidos. Houve dois casos com micrometástases, correspondendo a 2,7% da amostra.

A caracterização da amostra quanto ao tipo de cirurgia realizada, metástases axilares tipo e grau tumoral está demonstradas nas Tabelas 1 e 2.

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

Tabela 1. Caracterização da amostra.

Características	n	%
Tipo de cirurgia		
Mastectomia com LA	47	63,2
Setorectomia com LA	24	32,4
Setorectomia e LNS	3	4
Metástase axilar		
Sim	35	47,3
Não	39	52,7

LA: linfadenectomia axilar; LNS: linfonodo-sentinela.

Tabela 2. Caracterização da amostra.

Características	n	%
Tipo de tumor		
CDI	62	83,8
CLI	2	2,7
CDI/CLI	2	2,7
Mucinoso	3	4,1
Tubular	3	4,1
Outros	2	2,8
Grau tumoral		
1	6	9,8
2	30	49,2
3	25	41

CDI: carcinoma ductal invasor; CLI: carcinoma lobular invasor.

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

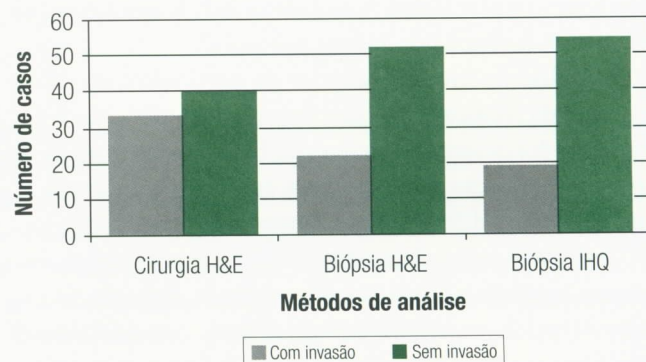


Gráfico 1. Distribuição dos casos conforme detecção de invasão vascular nas três técnicas estudadas.

Percebe-se, por meio do Gráfico 1, que a análise da peça de cirurgia, com a coloração de H&E, por ser o teste

considerado padrão-ouro para essa detecção, apresenta maior número de casos diagnosticados com invasão vascular que as outras técnicas. Tanto a biópsia corada com H&E, quanto com IHQ detectam números aproximados de casos com invasão vascular, mas a detecção é inferior ao padrão-ouro.

De maneira geral, comparando-se as duas técnicas com o padrão-ouro, em relação à detecção de invasão vascular, a que mais se aproximou dos valores reais foi a coloração com H&E, o que pode ser visto na Tabela 3. A especificidade foi a mesma nos dois testes e os outros valores foram superiores na técnica com H&E, porém sem significância estatística. Ambos os testes não apresentaram resultados satisfatórios na sensibilidade e na especificidade.

Tabela 3. Análise dos testes com H&E e IHC nas biópsias quando comparados ao padrão-ouro (cirurgias com H&E).

	H&E biópsia	IHC biópsia
Sensibilidade	13/34 (38,2%)	10/34 (29,4%)
Especificidade	31/40 (77,5%)	31/40 (77,5%)
VP+	13/22 (59,1%)	10/19 (52,6%)
VP-	31/52 (59,6%)	31/55 (56,4%)
Kappa	0,162	0,071
p	0,140	0,498

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

No Gráfico 2, encontramos a associação entre invasão vascular, detectada nas cirurgias com H&E, e o comprometimento dos linfonodos axilares por metástases. Pode-se perceber que os casos com metástases nos linfonodos axilares apresentam frequência maior de invasão vascular (85,3%), comparado aos casos sem metástases (14,7%).

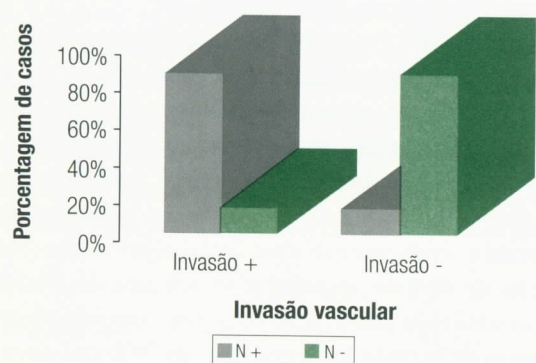


Gráfico 2. Associação entre invasão vascular, detectada nas cirurgias com H&E (padrão-ouro) e metástases axilares.

Após estratificação dos grupos por presença ou ausência de metástases axilares, como pode ser visto nas Tabelas 4 e 5, nos casos com metástases axilares o teste com IHQ persistiu com resultados inferiores ao H&E, quando compa-

rados ao padrão-ouro (H&E nas cirurgias). Nos casos sem metástases axilares, o duplo marcador mostrou-se superior quanto à especificidade (82,4%), como está demonstrado na Tabela 5. Entretanto, no restante dos casos, a coloração com H&E ainda foi o método de melhor acurácia, apesar de não demonstrar bons resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN.

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

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

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

Tabela 5. Análise de sensibilidade e especificidade dos testes nos casos sem metástase em linfonodos axilares.

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

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

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

DISCUSSÃO

A invasão vascular é considerada um fator prognóstico no carcinoma de mama para recorrência local-regional, sobrevida global e sobrevida livre de doença¹. Está presente em, aproximadamente, 28% a 59% dos casos, conforme referências da literatura^{9,10}. No presente estudo, encontramos invasão vascular em 45,9% da população estudada, compatível com a literatura.

As características da população estudada não diferiram das publicações que investigam fatores prognósticos por meio de técnicas IHQs para carcinoma de mama. A média

de faixa etária foi de 58,1 anos e o carcinoma ductal invasor foi o tipo mais freqüente (83,8%), concordando com os dados disponíveis¹. A média de idade das pacientes com invasão vascular não diferiu significativamente da média geral (56,8 anos), assim como o tipo e o grau tumoral mais freqüentes (carcinoma ductal invasor e grau II)¹. Na mesma população, a média de tamanho dos tumores (2,7 cm) e do número de linfonodos acometidos (3,5) também estiveram de acordo com os resultados descritos na literatura¹¹.

O diagnóstico do carcinoma de mama, no Brasil, ainda ocorre em estágios mais avançados¹¹. Entretanto, neste estudo, foi verificada freqüência alta de diagnóstico nos estágios iniciais I e II (83,8%), provavelmente por causa dos critérios de exclusão dos casos com tumores maiores de 5 cm, que realizaram tratamento neoadjuvante como primeira opção. Portanto, o estágio III, considerado avançado, esteve presente em apenas 12 casos (16,2%) submetidos à cirurgia como tratamento inicial. Apesar de o diagnóstico ter sido de tumores menores, observou-se porcentagem de mastectomias de 63,2%, provavelmente pelo número de tumores entre 3 e 5 cm, tumores multicêntricos ou de localização central na mama, cuja indicação para a cirurgia radical inclui esses fatores citados na decisão do tratamento¹¹.

A utilização da técnica de IHQ nas biópsias por agulha grossa para investigar fatores prognósticos tem sido descrita em vários estudos^{12,13}. Badoual *et al.* descreveram a comparação entre os achados da biópsia por agulha grossa e da cirurgia na determinação dos fatores prognósticos do câncer de mama. Constataram que houve concordância entre as duas técnicas em 73,6%, tanto para o diagnóstico do carcinoma quanto para a caracterização do tipo tumoral. O grau histológico e a determinação dos receptores hormonais também mostraram boa concordância¹². Em um outro trabalho, com 500 pacientes, foi constatado que a determinação da invasão vascular por meio das duas técnicas (biópsia por agulha grossa e ressecção cirúrgica) concordou em 69% dos casos, visto que o maior problema para análise dos fatores prognósticos pela técnica da biópsia por agulha grossa é a quantidade limitada de material, que pode não representar adequadamente as características do tumor¹³. No entanto, Sharifi *et al.* não encontraram concordância na detecção de invasão vascular entre as duas técnicas¹⁴.

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

Quanto ao uso da dupla coloração IHQ, existem poucos estudos com carcinoma mamário na literatura. Barbareschi utilizou marcadores vasculares CD31 e fator VIII para avaliar a presença de invasão vascular em casos de carcinoma ductal invasor¹⁵. Prasad *et al.* associaram o uso de citoqueratina e da actina derivada de músculo liso para diferenciar células malignas de células mioepiteliais¹⁶. Anos mais tarde, Kidogawa *et al.* utilizaram AgNORs e MIB-1 em 42 casos submetidos à cirurgia de carcinoma mamário para determinar a atividade proliferativa do tumor¹⁷.

O uso específico da dupla coloração com CD34 e da pancitoqueratina AE1/AE3 não está relatada na literatura disponível, tanto para a mama quanto para outras patologias. Entretanto, a utilização do CD34 tem ocorrido na investigação de angiogênese tumoral⁷ e as citoqueratinas têm sido utilizadas para a detecção de tumores epiteliais⁶. A constatação da falta de estudos nessa área e a crescente importância da invasão vascular como fator prognóstico foram os principais motivadores deste trabalho.

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

A invasão vascular teve forte correlação com as metástases axilares neste estudo (85,3%), embora ocorra uma parcela de casos com invasão vascular, mas sem metástases linfonodais (14,7%). Quanto ao número de linfonodos metastáticos, o grupo com invasão vascular teve média de 6,3 linfonodos acometidos, contrastando com o grupo sem invasão, com 1,2 linfonodos acometidos. Este resultado demonstra a importância da invasão vascular como fator independente de pior prognóstico¹⁰.

Woo, em 2002, mostrou que a invasão vascular esteve associada à queda significativa da sobrevida em 12 anos, mesmo quando as metástases axilares estavam ausentes ($p < 0,001$)⁹. O número de gânglios axilares envolvidos está diretamente associado a pior sobrevida⁹, portanto, mesmo sem a disponibilidade de informação das pacientes quanto à sobrevida, constatou-se correlação significativa entre a detecção de invasão vascular e os achados de metástases ganglionares. Em publicação feita por Lee, foi constatada a presença de invasão linfovascular em 19% dos casos sem metástases axilares, confirmando os achados deste estudo (14,7%). Constataram-se, ainda, que esta invasão esteve associada a tumores e grau histológico maiores, além da idade jovem. A diferença na sobrevida esteve associada à presença ou à ausência de invasão vascular¹⁸.

Comparando-se os grupos com e sem invasão vascular, percebe-se que não houve diferença significativa quanto ao tamanho tumoral, ao grau histológico e à idade.

O padrão-ouro para detecção de invasão vascular é realizado no exame anatomopatológico da peça cirúrgica com H&E. A técnica com duplo marcador, em que se discrimina o endotélio vascular do tumor pela presença de cores diferentes, não se mostrou superior ao H&E. A principal explicação para esse resultado é que a amostra tumoral nos fragmentos de biópsia não foi suficiente para análise. É necessário que quantidade mais representativa do tumor seja avaliada a fim de que o diagnóstico seja fidedigno a respeito da presença ou da ausência de invasão vascular. Isso leva à conclusão de que somente o exame da peça cirúrgica pode fornecer dados completos dos fatores prognósticos referentes ao tumor. A biópsia por fragmento apresenta falhas, principalmente se for considerada para determinação de detalhes qualitativos, como é o caso da invasão vascular.

Na análise dos casos sem metástases axilares, o duplo marcador mostrou-se superior quanto à especificidade, entretanto, no restante dos casos com metástases, a coloração com H&E ainda foi o método com melhor acurácia, apesar de não demonstrar resultados satisfatórios. Portanto, o duplo marcador teria maior valor na confirmação dos casos positivos para invasão vascular somente em pacientes sem acometimento dos linfonodos axilares.

Para finalizar, a coloração por H&E nas biópsias foi a técnica que apresentou melhores resultados para a detecção de invasão vascular no câncer de mama comparado à IHQ com o duplo marcador, apesar de os resultados não serem semelhantes ao teste padrão-ouro (ressecção cirúrgica com coloração por H&E).

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

REFERÊNCIAS

1. Cowen D, Houvenaeghel G, Jacquemier J, et al. Local recurrences after conservative treatment of breast cancer: risk factors and influence on survival. *Cancer Radiotherapy*. 1998;2(5):460-8.
2. Goldhirsch A, Glick J, Gelber R, et al. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19:3817-27.
3. Kronowitz SJ, Robb GL. Breast reconstruction with postmastectomy radiation therapy: current issues. *Plast Reconstr Surg*. 2004;15;114(4):950-60.
4. Gasparini G, Meli S, Panizzoni GA, et al. Peritumoral lymphatic vessel invasion compared with DNA ploidy, proliferative activity, and other pathologic features as prognostic indicators in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;20 (3):195-204.
5. Antibody Hotline, technical questions, antibody location service. Monoclonal antibody to endothelial cells (CD34) [acesso em 2005 Apr 12]. Disponível em: <http://www.acris-antibodies.com>.
6. Lerwill MF. Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28(8):1076-91.
7. Speck NMG, Focchi J, Alves AC, et al. Relação entre angiogênese e estágio no carcinoma do endométrio the relationship between endometrial adenocarcinoma staging and angiogenesis. *RBGO*. 2003;25(6).
8. Cowen D, Jacquemier J, Houvenaeghel G, et al. Local and distant recurrence after conservative management of "very low-risk" breast cancer are dependent events: a 10-year follow-up. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998;41(4):801-7.
9. Davis BW, Gelber R, Goldhirsch A, et al. Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Hum Pathol*. 1987;18(1):79.
10. Woo CS, Silberman H, Nakamura SK, et al. Lymph node status combined with lymphovascular invasion creates a more powerful tool for predicting outcome in patients with invasive breast cancer. *Am J Surg*. 2002;184:337-40.
11. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2005. Rio de Janeiro, 2005 [acesso em 2005 Apr 20]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/conteudo_view.asp?ID=3.
12. Badoual C, Maruani A, Ghorra C, et al. Pathological prognostic factors of invasive breast carcinoma in ultrasound-guided large core biopsies-correlation with subsequent surgical excisions. *Breast*. 2005;14(1):22-7.
13. Harris GC, Denley HE, Pinder SE, et al. Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(1):11-5.
14. Sharifi S, Peterson MK, Baum JK, et al. Assessment of pathologic prognostic factors in breast core needle biopsies. *Mod Pathol*. 1999;12(10):941-5.
15. Barbareschi M, Dalla Palma P, Bevilacqua P, et al. Invasive node-negative breast carcinoma: multivariate analysis of the prognostic value of peritumoral vessel invasion compared with that of conventional clinic-pathologic features. *Anticancer Res*. 1994;14(5B):2229 -35.
16. Prasad ML, Hyjek E, Giri DD, et al. Double immunolabeling with cytokeratin and smooth-muscle actin in confirming early invasive carcinoma of breast. *Am J Surg Pathol*. 1999;23(2):176-81.
17. Kidogawa H, Nanashima A, Yano H, et al. Clinical significance of double staining of MIB-1 and AgNORs in primary breast carcinoma. *Anticancer Res*. 2005;25(6B):3957-62.
18. Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2005 Dec. [acesso em 2005 Dec 27]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>.
19. Viale G, Maiorano E, Pruner G, et al. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg*. 2005; 241(2):319-25.