

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Alexandre Pavan Garieri

**Produção de VEGF e HIF-1 α em Pacientes com Carcinoma de
Mama Localmente Avançado submetidas à Quimioterapia
Neoadjuvante**

RIBEIRÃO PRETO
2008

Alexandre Pavan Garieri

**Produção de VEGF e HIF-1 α em pacientes com carcinoma de
mama localmente avançado submetidas à quimioterapia
neoadjuvante**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para concorrer ao título de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Área de concentração: Mastologia.

Orientador: *Prof. Dr. Heitor Ricardo Cosiskj Marana*

RIBEIRÃO PRETO

2008

Índice de páginas

1. Resumo	4
2. Abstract	6
3. Introdução	8
4. Objetivos	13
5. Casuística e Metodologia	14
5.1 Critérios de Seleção de Pacientes	14
5.2 Características das Pacientes	15
5.3 Ambiente do projeto	17
5.4 Coleta de Material	17
5.5 Tratamento	18
5.6 Critérios de Resposta	18
5.7 Toxicidade	19
5.8 Processamento do material	22
5.9 Análise Estatística	23
6. Resultados	25
6.1 Avaliações clínicas	25
6.2 Avaliações laboratoriais	30
7. Discussão	42
8. Conclusões	49
9. Bibliografia	50
10. Apêndice	55
11. Termo de consentimento livre e esclarecido	56
12. Esclarecimento ao sujeito de pesquisa	57

Resumo

PROPOSTA: Determinar o valor prognóstico e preditivo do VEGF (vascular endothelial growth factor) e do HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1) em relação à sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) em pacientes com carcinoma de mama localmente avançado (CMLA) tratadas primariamente pela quimioterapia neoadjuvante.

MATERIALS E METODOS: VEGF e HIF foram quantificados consecutivamente em plasma de 36 pacientes com CMLA pelo método de ELISA (enzyme labeling immunoassay absorbant) para o VEGF₁₆₅ e o HIF-1 α . O tratamento neoadjuvante foi realizado em todas as pacientes com docetaxel e epirrubicina. O tempo médio de seguimento foi de 56 meses.

RESULTADOS: Uma análise univariada demonstrou que o HIF-1 α está significativamente relacionado à SLD (**P** =.0238) e à SG (**P** = .0121) com as pacientes HER-2 positivas. Não houve diferença significativa para a SLD ou SG no que diz respeito aos receptores de hormônio, comprometimento axilar ou grau tumoral. Os valores de VEGF foram maiores no grupo de pacientes RE+ do que no grupo RE negativo (**P** =.01). Inversamente os valores de HIF-1 α foram menores no grupo RE+ comparados ao grupo RE - (**P** =.02). Pacientes com recorrência óssea apresentaram uma tendência a apresentarem valores de VEGF menores (media, 175.7 pg/ml) do que aquelas com recorrência visceral (441 pg/ml). Uma análise multivariada demonstrou o comprometimento axilar (**P** =.0004), receptores de estrógeno (ER) (**P** < .0001), e tamanho do tumor (**P** = .0085) como fatores independentes de SLD. O HIF-1 α foi tido como um fator independente preditivo de SG (**P** =.0180). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores plasmáticos de HIF-1 α ou VEGF nos períodos pré e pós quimioterapia. **CONCLUSÕES:** Os resultados sugerem que o nível plasmático do HIF-1 α é preditivo de SLD e SG nas pacientes com CMLA apresentando uma sobreposição as pacientes HER-2 positivas. As dosagens de VEGF podem ser preditivas de resposta e prognóstico no tratamento neoadjuvante, mas são necessários novos estudos prospectivos comparados ao HIF-1 α para conclusões mais consistentes.

Abstract

PURPOSE: To determine the predictive and prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 α) for relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) in locally advanced breast cancer (LABC) primarily submitted to neoadjuvant chemotherapy.

MATERIALS AND METHODS: VEGF and HIF were quantitatively measured in plasma sample from 36 consecutive patients with LABC using an enzyme immunoassay for human VEGF₁₆₅ and HIF-1 α . Neoadjuvant treatment was given to all patients as docetaxel and epirubicin. The follow-up median time was 56 months.

RESULTS: Univariate analysis showed that HIF-1 α is a significant predictor of RFS ($P = .0238$) and OS ($P = .0121$) in HER-2 positive patients. No significant difference was seen in RFS or OS related to hormonal receptor, axillary status or tumoral grade. The VEGF level was higher in the group of patients who ER was positive than ER negative ($P = .01$). On the other hand, the HIF-1 α level is higher in ER negative patients than ER positive ($P = .02$). Patients with bone recurrences tended to have lower VEGF plasma level (median, 175.7 pg/ml) than patients with visceral metastasis (441 pg/ml). Multivariate analysis showed nodal status ($P = .0004$), estrogen receptor (ER) status ($P < .0001$), and tumor size ($P = .0085$) to be independent predictors of RFS. HIF-1 α was found to be an independent predictor of OS ($P = .0180$). No statistically differences were observed related to pre and post chemotherapy period in HIF-1 α or VEGF measurements. **CONCLUSION:** The results suggest that high level of plasma HIF-1 α is associated to HER-2 over expression and they are major predictive factors of RFS and OS in LABC. VEGF content might also predict outcome after neoadjuvant treatment, however further studies in a prospective setting with HIF-1 α homologous treatments are required.

3. *Introdução*

O câncer é um problema de saúde pública, com aproximadamente 11 milhões de casos novos em todo o mundo em 2006, os quais apresentaram 7 milhões de mortes. Para o ano de 2020 a previsão é de 16 milhões de casos novos e 12 milhões de óbitos, segundo relatório do UICC/2005. Destes, 60% ocorrerão em países em desenvolvimento.

O câncer de mama é a principal neoplasia maligna entre as mulheres ocidentais, e uma das principais causas de morte. As estatísticas indicam um aumento de frequência da neoplasia tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Nos EUA, foi estimado para 2006, 214.000 mulheres com esta patologia (Bevers, TB *et al*, 2007). No Brasil, o tumor de mama é a principal causa de mortes entre as mulheres, contabilizando mais de nove mil óbitos por ano, segundo dados de 2006 (INCA, 2006). Este também é o segundo tipo mais incidente de câncer, contabilizando cerca de 50 mil casos, sendo ultrapassado apenas pelos tumores de pele não melanoma. Apenas no estado de São Paulo, a estimativa para 2006, revela aproximadamente 75,45 casos novos para cada 100.000 mulheres.

Apesar das políticas de incentivo ao rastreamento por mamografia para detecção precoce do câncer de mama, aproximadamente 10% dos tumores, mundialmente, são diagnosticados como câncer de mama localmente avançado, com aumento do risco de metástases subsequentes e prognóstico mais sombrio (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.

Nas pacientes portadoras de doença localmente avançada, a terapia multidisciplinar, com combinação de quimioterapia, radioterapia e cirurgia, torna-se obrigatória (Ahern *et al*, 2005). Como opção de tratamento, a fim de iniciar o tratamento sistêmico mais precoce, diminuir o tamanho tumoral e reduzir a extensão da cirurgia, utiliza-se a quimioterapia neoadjuvante. Os dados ainda contraditórios favorecem a

hipótese de que não há aumento da sobrevida global e do tempo livre de doença nas pacientes usuárias de quimioterapia neoadjuvante comparadas àquelas submetidas à quimioterapia adjuvante, exceção feita àquelas que apresentam resposta patológica completa (Bear HD, *et al* 2006).

As premissas que corroboram para o uso da terapêutica sistêmica primária são: esterilizar áreas de micrometástases, que poderiam sofrer estímulos após a retirada do tumor primário, através do processo de angiogênese; aumentar as taxas de cirurgias conservadoras com redução dos riscos de recidiva local e finalmente, testar, *in vivo*, o efeito dos quimioterápicos (Sachelarie *et al*, 2006).

Apesar dos conhecimentos prévios oriundos do largo emprego da quimioterapia neoadjuvante, ainda desconhecem-se quais são as pacientes que verdadeiramente se beneficiam com a quimioterapia primária e quais os regimes mais apropriados. O conhecimento dos mecanismos intra-tumorais que regulam o crescimento tumoral, sua interação com o estroma subjacente e com o infiltrado de células inflamatórias, podem cooperar para responder essas questões, fornecendo marcadores preditivos de resposta terapêutica e prognósticos de seguimento, além de propiciar alvos para novas terapias.

Como outros tumores sólidos, os tumores de mama necessitam de um microambiente que promova angiogênese e linfangiogênese, 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 (Folkman J., 1998).

Enquanto a vasculatura de um adulto normal encontra-se quiescente, com divisões das células endoteliais a cada dez anos, os tumores apresentam constante formação e remodelação vascular. Alguns dos fatores atuantes na angiogênese e linfangiogênese tumoral já são conhecidos. O HIF (fator indutor de hipóxia) e o HIF1- α (fator de resposta a hipóxia), superexpressos em carcinomas ductais de mama, induzem diretamente a expressão de mediadores pró-angiogênicos, notadamente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores (Boudreau *et al*, 2003).

O VEGF é um potente peptídeo angiogênico com ação no desenvolvimento de *stem cell* hematopoiéticas, remodelação da matrix extracelular e regeneração de citocinas inflamatórias. É fator de crescimento e permeabilidade vascular. A família VEGF é formada pelo VEGF-A (VEGF), PlGF (fator de

crescimento placentário), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. O VEGF-A atua através dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, PIGF e VEGF-B através de VEGFR-1, VEGF-C através dos receptores VEGFR-2 e VEGFR-3 e o VEGF-D através do VEGFR-1 e VEGFR-2. O receptor VEGFR-3/FLT-4 e seus ligantes, VEGF-C e VEGF-D, estão relacionados à linfangiogênese e metástases linfáticas em vários tipos de tumores sólidos (Pradeep *et al*, 2005).

Os fatores VEGF-C e VEGF-D são produzidos pelos macrófagos associados ao tumor (TAMs) ativados, que também expressão o receptor VEGFR-3. Estudos com tumores sólidos, com carcinoma espinocelular de colo uterino, evidenciaram que a densidade microvascular linfática e a superexpressão destes dois fatores tem relação com a disseminação linfática e prognóstico dos doentes (Schoppmann *et al*, 2002).

O uso de anticorpos monoclonais, como o bevacizumabe (Avastin®), dirigido especificamente contra o VEGF-A, impedindo a ligação da isoforma ao seu receptor, em estudos pré-clínicos e em pacientes com doença metastática, associados aos quimioterápicos, apresentam resultados animadores no controle tumoral (Rosen *et al*, 2007).

Este conjunto de evidências torna claro que a neoangiogênese, a presença de macrófagos associados ao tumor (TAMs), a expressão de VEGF-C e VEGF-D e a densidade microvascular linfática exerce atividade sobre a disseminação linfática dos tumores de mama, correlacionando-se com o status axilar e com o prognóstico das pacientes. Em outra análise da expressão do HIF-1 α , observou-se uma correlação crescente entre a sua expressão e o aumento do estágio clínico, e portanto, da extensão do tumor, assim como do aumento da sua indiferenciação histológica (Bos *et al*, 2001).

Como estes fatores são solúveis e detectáveis no plasma de pacientes com carcinoma, a sua avaliação e correlação com o comportamento do tumor frente ao tratamento neoadjuvante de carcinomas localmente avançados de mama, poderiam ser utilizados como fatores prognósticos e/ou preditivos de resposta, a fim de selecionar grupos de pacientes que pudessem se beneficiar desta forma de tratamento específica.

Dentre os fatores conhecidos tanto o VEGF, como o HIF1- α são passíveis de detecção plasmática, e guardam uma estreita relação com prognóstico em situações de carcinomas da mama (Bos *et al*, 2001). A detecção de valores elevada de VEGF plasmático está associado a um mau prognóstico, porém em

alguns casos de VEGF elevados com bom prognóstico, o que podemos observar é que o HIF é encontrado em baixas concentrações. Assim, parece que a detecção de ambos os fatores angiogênico e de hipóxia intratumoral são necessários para a geração de clones de células tumorais que se perpetuam em casos mais agressivos (Kimbrow & Simons, 2006).

Ao lidarmos com carcinomas localmente avançados, temos um período de crescimento tumoral mais prolongado, e um prognóstico mais reservado, provavelmente secundário a existência de clones altamente angiogênicos e produzidos em uma atmosfera de hipóxia relativa (Furstenberger *et al.*, 2006). Estas células tumorais poderiam ser tratadas pela quimioterapia neoadjuvante, assim como as micrometástases decorrentes deste tumor. Desta forma, as detecções plasmáticas do VEGF e do HIF-1 α poderiam ser utilizadas como fatores prognósticos em carcinomas de mama localmente avançados, tanto em termos preditivos como prognósticos.

Este estudo visa estabelecer tanto esta relação de detecção plasmática destes fatores, quanto aos valores de corte para fins de análise experimental. Secundariamente faremos a correlação com fatores clínicos, histopatológicos e de imunohistoquímica com as detecções realizadas de fatores angiogênicos e de hipóxia tumoral, e aos efeitos dos quimioterápicos sobre eles, com a finalidade de oferecer dados consistentes ao benefício da quimioterapia e potencializar estratégias de tratamento para pacientes com neoplasias malignas de mama.

4. Objetivos

Este estudo tem por objetivo:

- 1) Dosar os fatores angiogênico e de hipóxia no plasma periférico, colhido antes do início do tratamento e após a terapia neo-adjuvante.

- 2) Correlacionar os achados com a resposta clínica e histopatológica ao tratamento neoadjuvante.
- 3) Correlacionar as dosagens plasmáticas com os fatores prognósticos clínicos, histopatológicos e de imunohistoquímica das pacientes estudadas.
- 4) Avaliar o padrão de curvas de sobrevida e intervalo livre de doenças nos subgrupos desta avaliação.

5. Casuística e Metodologia

5.1 Critérios de Seleção de Pacientes

Foram incluídas para a participação neste projeto as pacientes com tumores localmente avançados de mama atendidas no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), no período de 2001 a 2006. Todas apresentavam o diagnóstico de carcinoma de mama, obtido por biópsia, tumor palpável e deveriam ter recebido tratamento neoadjuvante com pelo menos dois ciclos de quimioterapia com o esquema de Docetaxel e Epirrubicina. Foram incluídas as que apresentassem doença no estágio clínico IIA a IIIC, independente de idade, raça, status menopausal ou tipo histológico.

Pacientes que após avaliação histopatológica do material obtido pela biópsia tiveram o diagnóstico de patologia mamária benigna foram excluídas do projeto. A realização de qualquer terapia antitumoral previamente ao procedimento diagnóstico ou quimioterapia primária também serviu como critério de exclusão. Além destas, foram ainda excluídas as pacientes que tivessem o diagnóstico de doença metastática durante o tratamento neoadjuvante, bem como as que se recusaram a participar do estudo ou que abandonaram o seguimento ao longo do mesmo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP, de acordo com o processo HCRP nº 2519/2003.

5.2 Características das Pacientes

Trinta seis mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma mamário invasor, tumores localmente avançado e indicação de tratamento primário com quimioterapia neoadjuvante foram avaliadas durante o presente estudo.

A média de idade das pacientes foi de 49 anos (29 – 63) e o número de ciclos de quimioterapia neoadjuvante variou de 2 a 5 ciclos, com média de 3 ciclos por paciente.

De todas as mulheres, 32 eram portadoras de carcinoma ductal invasor e o restante outros subtipos histológicos especiais. Dados referentes ao estágio clínico, status menopausal, grau tumoral e análise imunohistoquímica encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Características das pacientes com carcinoma de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante.

Características	n = 36	(%)
Média de Idade (variação)	47 (29 – 63)	
Ciclos de QTX (variação)	3 (2 – 5)	
Status menopausal		
Pré	19	52.7
Pos	17	47.3
Estádio clínico		
IIA	4	11.1
IIB	13	36.1
IIIA	4	11.1
IIIB	13	36.1
IIIC	2	5.6
Tipo histológico		
Ductal	34	94.4
Outros	2	5.6
Grau Histológico		
I	7	19.4
II	22	61.2
III	7	19.4
Receptores Hormonais		
RE/RP +	29	80.5
RE/RP -	7	19.5

5.3 Ambiente do Projeto

O projeto foi realizado no departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HC-FMRP-USP em colaboração com o laboratório de Imunologia Básica do Prof. João Santana da Silva do Departamento de

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

5.4 Coleta de Material

Amostras do tumor primário de mama e 5 ml de sangue periférico heparinizado foram obtidos das pacientes submetidas a procedimento cirúrgico diagnóstico no HC-FMRP-USP. Todas as pacientes foram informadas do estudo, e obtidos consentimentos pós-informados aprovados pelo comitê de ética em pesquisa desta instituição.

As amostras foram obtidas assepticamente no ato cirúrgico a partir da amostra inicial enviada para a rotina histológica, a saber, no momento da biópsia incisional pré quimioterapia e da tumorectomia ou mastectomia pós quimioterapia. Áreas necróticas ou qualquer gordura ao redor do tumor foram cuidadosamente removidas antes da preparação histológica.

O sangue periférico foi centrifugado e o plasma aliquotado em tubos de *Eppendorf* e congelados em freezer a menos 20°C. Todas as amostras foram descongeladas e processadas simultaneamente ao final do período de coleta.

5.5 Tratamento

As pacientes receberam: Docetaxel na dose de 75 mg m⁻² em infusão contínua em 1 hora em solução fisiológica, e Epirrubicina na dose de 60 mg m⁻² em infusão contínua em 1 hora em solução fisiológica a seguir, a cada 21 dias.

Pré-medicação foi administrada com o objetivo de evitar qualquer reação alérgica possível dos pacientes ao Docetaxel: 10 mg de Dexametasona 30 minutos antes do início da infusão. No domicílio, 2 dias antes as pacientes foram orientadas a ingerir Maleato de Dextroclorfeniranamina 2mg de 8/8 horas e Dexametasona 4 mg de 8/8 horas via oral com o objetivo de evitar *rash* cutâneo e retenção de fluido.

Tendo ocorrido eventos de grau maior que II, mielossupressão, neuropatia, neurite ou efeitos gastrotóxicos (Classificação da OMS), o tratamento foi adiado até a recuperação. As doses de ambas as drogas permaneceram estáveis.

5.6 Critérios de Resposta

Antes de cada ciclo de tratamento as pacientes tiveram a resposta ao tratamento avaliado. As respostas foram categorizadas como segue, de acordo com critérios padrão da UICC – International Union Against Câncer (Hayward et al, 1977):

- 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.

5.7 Toxicidade

A Toxicidade foi avaliada de acordo com critérios da OMS (Miller et al, 1981).



WHO (World Health Organization) Toxicity Criteria by Grade

Category	Toxicity	Grade0	Grade1	Grade2	Grade3	Grade4
Haematology	WBC (x103/l)	4	3.0 - 3.9	2.0 - 2.9	1.0 - 1.9	< 1.0
Haematology	Platelets (x103/l)	WNL	75.0 - normal	50.0 - 74.9	25.0 - 49.9	< 25.0
Haematology	Haemoglobin (g/dl)	WNL	10.0 - normal	8.0 - 9.9	6.5 - 7.9	< 6.5
Haematology	Granulocytes/ Bands (x103/l)	2	1.5 - 1.9	1.0 - 1.4	0.5 - 0.9	< 0.5
Haematology	Lymphocytes (x103/l)	2	1.5 - 1.9	1.0 - 1.4	0.5 - 0.9	< 0.5
Haematology	Haemorrhage	None	mild, no	gross, 1 - 2 units transfusion per episode	gross, 3 - 4 units transfusion p.e.	massive, > 4 units transfusion p.e.
Coagulation	Fibrinogen	WNL	0.99 - 0.75 x N	0.74 - 0.50 x N	0.49 - 0.25 x N	< 0.25 x N
Coagulation	Prothrombin time(Quick)	WNL	1.01 - 1.25 x N	1.26 - 1.50 x N	1.51 - 2.00 x N	> 2.00 x N
Coagulation	Partial thrombo- plastin time	WNL	1.01 - 1.66 x N	1.67 - 2.33 x N	2.34 - 3.00 x N	> 3.00 x N
Metabolic	Hyperglycaemia (mg/dl)	< 116	116 - 160	161 - 250	251 - 500	>500 or ketoacidose
Metabolic	Hypoglycaemia (mg/dl)	> 64	55 - 64	40 - 54	30 - 39	< 30
Metabolic	Amylase	WNL	< 1.5 x N	1.5 - 2.0 x N	2.1 - 5.0 N	> 5.0 x N
Metabolic	Hypercalcaemia (mg/dl)	< 10.6	10.6 - 11.5	11.6 - 12.5	12.6 - 13.4	13.5
Metabolic	Hypocalcaemia (mg/dl)	> 8.4	8.4 - 7.8	7.7 - 7.0	6.9 - 6.1	6
Metabolic	Hypomagnesaemia (mg/dl)	> 1.4	1.4 - 1.2	1.1 - 0.9	0.8 - 0.6	0.5
Gastrointestinal	Nausea	None	able to eat reasonable intake	intake significantly decreased but can eat	no significant intake	—
Gastrointestinal	Vomiting	None	1 episode in 24 hrs	2 - 5 episodes in 24 hrs	6-10 episodes/24hrs	> 10 episodes in 24 hrs or requiring parenteral support
Gastrointestinal	Diarrhoea	None	increase of 2 - 3 stools / day over pre-Rx	increase of 4 - 6 stools / day, or nocturnal stools, or moderate cramping	increase of 7 - 9 stools / day, or incontinence, or severe cramping	increase of >10 stools/day or grossly bloody diarrhoea, or need for parenteral support
Gastrointestinal	Stomatitis	None	painless ulcers, erythema, or mild soreness	painful erythema, oedema, or ulcers but can eat solids	painful erythema, oedema, or ulcers and cannot eat solids	requires parenteral or enteral support for alimentation
Liver	Bilirubin (N = 17 µmol/L)	WNL	-----	< 1.5 x N	1.5 - 3.0 x N	> 3.0 x N
Liver	Transaminase (SGOT, SGPT)	WNL	2.5 x N	2.6 - 5.0 x N	5.1 - 20.0 x N	> 20.0 x N
Liver	Liver- clinical	No change from baseline	-----	-----	precoma	hepatic coma
Kidney, bladder	Creatinine	WNL	< 1.5 x N	1.5 - 3.0 x N	3.1 - 6.0 x N	> 6.0 x N
Kidney, bladder	Haematuria	Negative	microscopic only	gross, no clots no Rx needed	gross and clots bladder irrigation	requires transfusion or cystectomy
Kidney, bladder	Weight gain/ loss	< 5.0 %	5.0 - 9.9 %	10.0 - 19.9 %	20.00%	-----
Respiratory	Pulmonary	none or no change	asymptomatic, with abnormal- ity in PFTs	dyspnoea on significant exertion	dyspnoea at normal level of activity	dyspnoea at rest
Cardiac	Cardiac arrhythmias	None	asymptomatic, transient, requiring no therapy	recurrent or persistent, no therapy required	requires treatment	requires moni- toring; or hypo- tension, or ventricular tachycardia or fibrillation
Cardiac	Cardiac function	None	asymptomatic, decline of resting ejection	asymptomatic, decline of resting ejection fraction by	mild CHF, responsive to therapy	severe of refractory CHF

			fraction by less than 20 % of baseline value	more than 20 % of baseline value		
Cardiac	Cardiac ischaemia	None	non-specific T- wave flattening	asymptomatic, ST and T wave changes suggesting ischaemia	angina without evidence of infraction	acute myocardial infarction
Cardiac	Cardiac- pericardial	None	asymptomatic effusion, no intervention required	pericarditis (rub, chest pain, ECG changes)	symptomatic effusion; drainage required	tamponade; drainage urgently required
Cardiac	Hypertension	none or no change	asymptomatic, transient increase by greater than 20 mm Hg (D) or to > 150 / 100 if previously WNL. No treatment required.	recurrent or persistent increase by greater than 20 mm HG (D) or to > 150 / 100 if previously WNL. No treatment required.	requires therapy	hypertensive crisis
Cardiac	Hypotension	none or no change	changes requiring no therapy (including transient orthostatic hypotension)	requires fluid replacement or other therapy but not hospitalisation	requires therapy and hospitalisation; resolves within 48 hours of stopping the agent	requires therapy and hospitalisation for > 48 hrs after stopping the agent
Neurologic	Neuro: sensory	none or no change	mild paraesthesias; loss of deep tendon reflexes	mild or moderate objective sensory loss moderate paraesthesias	severe objective sensory loss or paraesthesias that interfere with function	----
Neurologic	Neuro: motor	none or no change	subjective weakness; no objective findings	mild objective weakness without significant impairment of function	objective weakness with impairment of function	Paralysis
Neurologic	Neuro: cortical	None	mild somnolence or agitation	moderate somnolence or agitation	severe somnolence, (>50 % waking hours), agitation, confusion, disorientation or hallucinations	coma, seizures, toxic psychosis
Neurologic	Neuro: cerebellar	None	slight incoordination, dysdiadochokinesia	intention tremor, dysmetria, slurred speech, nystagmus	locomotor ataxia	cerebellar necrosis
Neurologic	Neuro: mood	no change	Mild anxiety or depression	moderate anxiety or depression	severe anxiety or depression	suicidal ideation
Neurologic	Neuro: headache	None	mild	moderate or severe but transient	unrelenting and severe	----
Neurologic	Neuro: constipation	none or no change	mild	moderate	severe	ileus > 96 hrs
Neurologic	Neuro: hearing	none or no change	asymptomatic, hearing loss on audiometry only	tinnitus	hearing loss interfering with function but correctable with hearing aid	deafness not correctable
Neurologic	Neuro: vision	none or no change	----	----	symptomatic subtotal loss of vision	Blindness
Pain	Pain	None	mild	moderate	severe	reg. Narcotics
Skin	Skin	none or no change	scattered macular or papular eruption or erythema that is asymptomatic	scattered macular or papular eruption or erythema with pruritus or other associated symptoms	generalised symptomatic macular, papular or vesicular eruption	exfoliative dermatitis or ulcerating dermatitis
Alopecia	Alopecia	no loss	mild hair loss	pronounced or total hair loss	----	----
Allergy	Allergy	None	transient rash, drug fever < 38oC	urticaria, drug fever 38oC, mild bronchospasm	serum sickness, bronchospasm requiring parenteral medication	Anaphylaxis
Local	Local	None	pain	pain and swelling with inflammation or phlebitis	ulceration	plastic surgery indicated
Fever of unknown origin	Fever of unknown origin	None	37.1 - 38.0o C 98.7o - 100.4o F	38.1 - 40.0oC 100.5 - 104oF	> 40.0oC for less than 24hrs	> 40.0oC for more than 24 hrs or accompanied by hypotension
Infection	Infection	None	mild	moderate	severe	life-threatening
Neurological events	Asthenia	Analogous to Karnofsky index (WHO grading)				
Neurological events	Chills	Analogous to fever				
Neurological events	Peripheral oedema	analogous to weight gain				
Neurological events	Anorexia	analogous to weight loss				

5.8 *Processamento do material*

5.8.1. Avaliação por HE do tipo histológico e grau tumoral e por imunohistoquímica dos receptores hormonais de estrógeno e progesterona e HER-2.

O tipo histológico e o grau tumoral foram avaliados através da peça de biópsia, fixada em parafina cortada com micrótomo, fixada em lâmina de vidro e corada pela técnica de hematoxilina eosina. A avaliação foi realizada através de microscopia óptica comum.

As lâminas de parafina também foram utilizadas para execução da imunohistoquímica com cada anticorpo primário específico, a fim de detectarmos e quantificarmos a expressão dos receptores hormonais de estrógeno e progesterona e HER-2.

O complexo avidina–biotina peroxidase (ABC) foi utilizado para o ensaio. Resumidamente, utilizamos secção (4 mm) do bloco de parafina montado em poli-L-lisina, deparafenizada em xilol e fixada em etanol absoluto. Após tratamento com peróxido de hidrogênio 0.3% em metanol para quelar a atividade das peroxidases endógenas, os cortes foram lavados várias vezes em PBS (phosphate-buffered saline). A imunomarcção foi precedida de incubação com tampão citrato 10mM (200 ml/20 cortes) por sete minutos à potencia mais alta do forno de microondas. O anticorpo monoclonal primário foi específico para cada ensaio. Posteriormente os cortes foram lavados novamente em PBS e recobertos com anticorpo secundário biotilado anti-mouse por 30 minutos à temperatura ambiente. Após três lavagens adicionais, os cortes foram incubados com o complexo ABC por 60 minutos também à temperatura ambiente. A contra coloração utilizada foi a hematoxilina

de Harris. Foram utilizados controles positivos e negativos específicos para as substâncias testadas.

5.8.2. Detecção plasmática dos níveis de VEGF e HIF por ELISA

Foi colhida uma amostra de 5 ml de sangue das pacientes no momento da coleta da biópsia para separação de plasma, o qual foi aliquoteado em frascos de 500 µl e armazenados em freezer -20°C até o momento do ensaio. A avaliação foi feita simultaneamente das alíquotas pré e pós quimioterapia para todas as pacientes do estudo, evitando-se assim variação inter-experimental e foram usados kits para ELISA comercialmente disponíveis, todos obtidos da R&D Systems (USA). Todas as determinações foram realizadas em duplicata e conforme as orientações do fabricante do kit. As análises foram realizadas no Laboratório do Prof. Dr. João Santana da Silva, do departamento de Imunologia, Bioquímica e Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

5.9 *Análise Estatística*

Para a análise dos resultados, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 3.00 da GraphPad Incorporated (San Diego, USA). Os dados são expressos por média \pm desvio padrão (DP). Para todos os testes foi considerado um valor de P menor do que 0,05 como estatisticamente significativo.

O teste de Shapiro-Wilk W foi utilizado para verificação da distribuição dos valores encontrados de concentração plasmática de VEGF e HIF-1 α , e a partir destes

resultados foram feitas as demais análises estatísticas no presente estudo, que tiveram por objeto confrontar os achados no período pré e pós quimioterapia e correlacionar os mesmos com fatores prognósticos clínicos, histopatológicos e de imunohistoquímica das pacientes, bem como com resposta clínica e histopatológica ao tratamento neoadjuvante.

6. Resultados

6.1 Avaliações clínicas

Em 6 pacientes (23.1%), não houve resposta à quimioterapia neo-adjuvante. Nas demais mulheres, todas obtiveram resposta satisfatória com o tratamento quimioterápico, sendo que em 27 a resposta foi parcial, outras três apresentaram resposta completa. Os efeitos adversos de toxicidade ocorreram em 10 casos (38.5%), porém nenhum caso grave a ponto de contra-indicar a continuidade da terapia primária.

Todas foram encaminhadas para cirurgia pós-tratamento. Com a terapia primária foi possíveis a realização de cirurgia conservadora (tumorectomia oncológica com esvaziamento axilar) em 27 pacientes (75%) e 7 delas tiveram que ser submetidas a cirurgia radical (mastectomia com esvaziamento axilar). De todas as pacientes, 13 (36.2%) apresentaram axila comprometida com metástase para 3 ou mais gânglios.

Em relação à recorrência local e a distância, duas pacientes apresentaram recorrência loco-regional e 9 pacientes (incluindo as duas com recidiva local) apresentaram recorrência à distância. Destas pacientes, 6 apresentaram metástase óssea, 2 em pulmão e 2

com lesão em sistema nervoso central. Ainda ocorreram dois casos de metástase em fígado e ovário. O tempo médio de ocorrência das metástases foi de 18,1 meses. O tempo médio de sobrevida livre de doença das pacientes que não apresentaram nenhum tipo de recorrência foi de 34,8 meses.

Durante o período de acompanhamento, 12 pacientes (33.3%) foram a óbito em decorrência da doença e o tempo médio de sobrevida destas pacientes foi de 24,2 meses. As demais pacientes apresentam sobrevida global média de 43,7 meses.

Estes dados encontram-se detalhados nas tabelas 2 e 3. Já, as curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global podem ser vistas nos gráficos 1 e 2.

Tabela 2. Resposta das 36 pacientes ao tratamento quimioterápico neoadjuvante e implicação cirúrgica do mesmo.

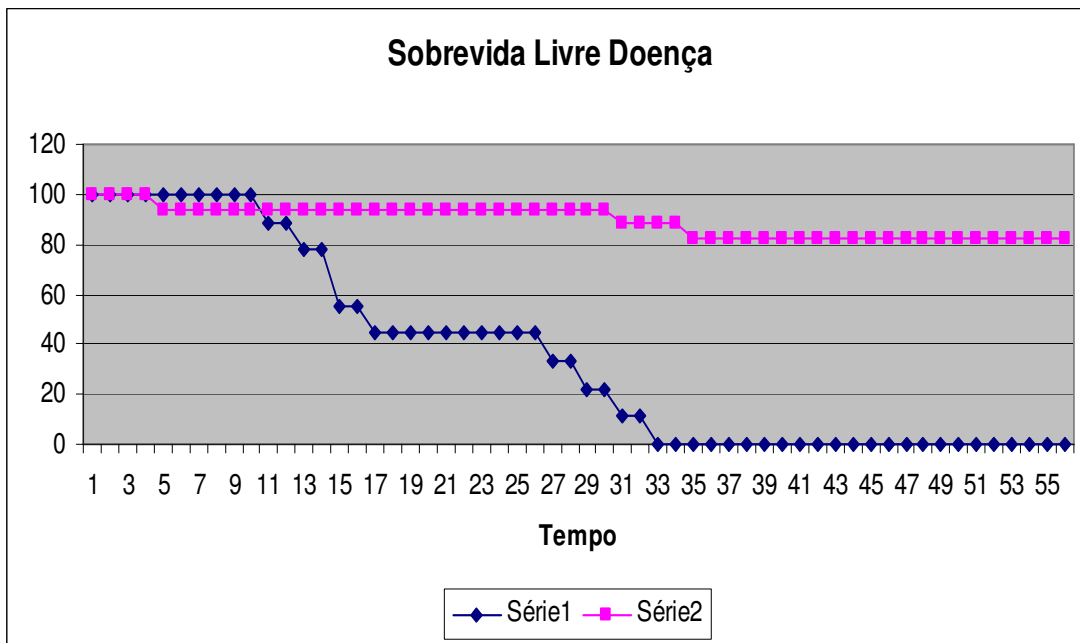
Características	n = 36	(%)
Resposta a QTX neo		
Sem resposta	6	16.7
Com resposta	30	83.3
Toxicidade neo	10	27.7
Tratamento cirúrgico		
Conservadora	29	80.5
Radical	7	19.5
Status axilar		
Axila negativa	4	11.1
< 3 gg positivos	10	27.8
3 ou + gg positivos	22	61.1

Tabela 3. Evolução das 36 pacientes com carcinoma mamário invasor e submetidas a quimioterapia neoadjuvante e tratamento cirúrgico pós terapia primária.

Características	n = 36	(%)
Recorrência		

Loco-regional apenas	0	0
Distância apenas	7	19.4
Ambas	2	5.5
Sítios metastáticos		
Osso	6	16.7
Pulmão	2	5.5
Cerebral	2	5.5
Fígado	1	2.7
Ovário	1	2.7
Sobrevida livre doença		
Com recorrência	18.1 meses	
Sem recorrência	34.8 meses	
Óbito		
Decorrência da doença	9	25
Sobrevida global		
Com recidiva	24.2	
Sem recidiva	43.7	

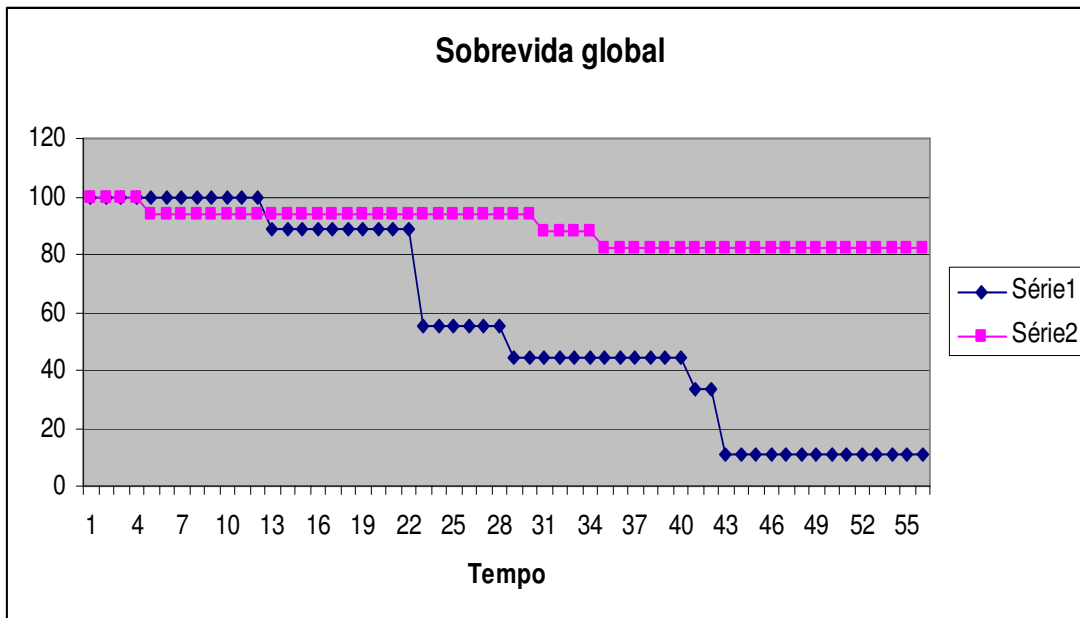
Gráfico 1. Curva sobrevida livre doença de acordo com recorrência loco-regional e à distância.



Série 1 = pacientes com meta

Série 2 = pacientes sem meta

Gráfico 2. Curva sobrevida global de acordo com recorrência loco-regional e à distância.



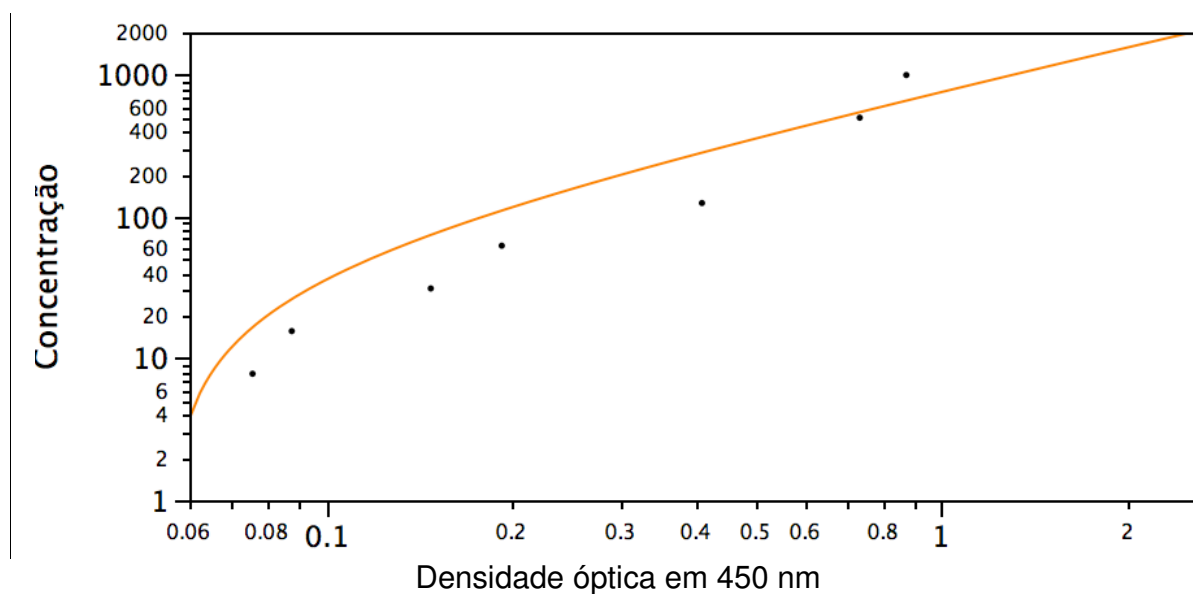
6.2 Série 1 = pacientes com meta

Série 2 =

pacientes sem meta *Avaliações laboratoriais*

Resultados da análise do VEGF.

Curva Logarítmica da densidade óptica versus concentração plasmática do VEGF em pg/ml obtida pelas concentrações padrões de VEGF fornecidas pelo fabricante (R & D), utilizada como base de cálculo das dosagens plasmáticas do ensaio.

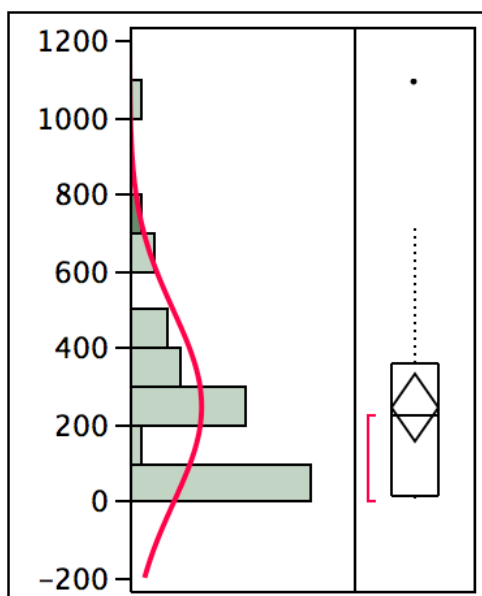


— Ajuste linear da curva de concentração

Ajuste linear da curva de concentração para obtenção da equação de cálculo da concentração de VEGF plasmático

$$\text{Concentração} = (803.37063 \times \text{DO}) - 44.45322$$

Distribuição da concentração de VEGF no plasma de pacientes com carcinoma localmente avançado de mama no período pré-quimioterapia.



— Normal(245.26,251.24)

Quartis

100.0%	Máximo	1091.5
75.0%	Quartil	361.3
50.0%	Mediana	225.5
25.0%	Quartil	17.4
0.0%	Mínimo	0.0

Momentos

Mediana	245.26
Desvio Padrão	251.23987
Erro Médio Padrão	42.467288
95% Mediana Superior	331.56391
95% Mediana Inferior	158.95609
N	36

Ajuste à normalidade

Tipo	Parâmetro	Estimado	95% do Limite inferior	95% do Limite superior
Localização	M	245.26	158.95609	331.56391
Dispersão	Σ	251.23987	203.22091	329.175

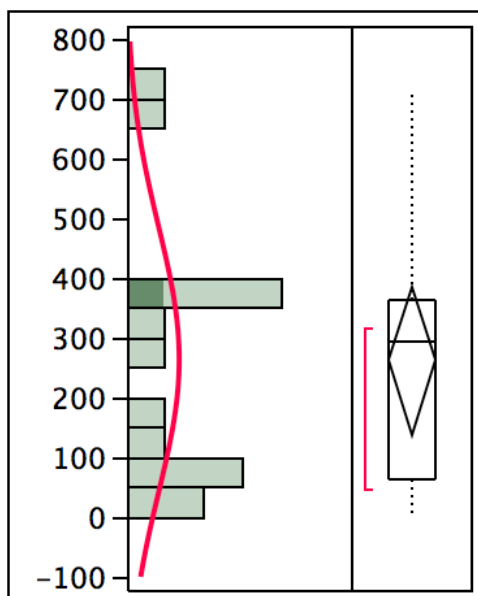
Melhor ajuste pelo teste de Shapiro-Wilk W

W	Prob<W
0.853934	0.0003

A hipótese do teste seria H_0 = Os dados estão dentro de uma distribuição Normal. Para a rejeição de H_0 teríamos o valor de p menor do que o valor do teste, portanto H_0 foi rejeitada e a distribuição dos valores não seguem uma distribuição normal. Assim, as

análises estatísticas serão realizadas por testes não paramétricos.

Distribuição da concentração de VEGF no plasma de pacientes com carcinoma localmente avançado de mama no período pós-quimioterapia.



— Normal(263.473,222.288)

Quartis

100.0%	Máximo	713.90
75.0%	Quartil	366.90
50.0%	Mediana	294.60
25.0%	Quartil	64.00
0.0%	Mínimo	0.00

Momentos

Mediana	263.47333
Desvio Padrão	222.28756
Erro Médio Padrão	57.394402
95% Mediana Superior	386.57208
95% Mediana Inferior	140.37458
N	15

Ajuste à normalidade

Tipo	Parâmetros	Estimado	95% do Limite inferior	95% do Limite superior
Localização	M	263.47333	140.37458	386.57208
Dispersão	Σ	222.28756	162.74263	350.5695

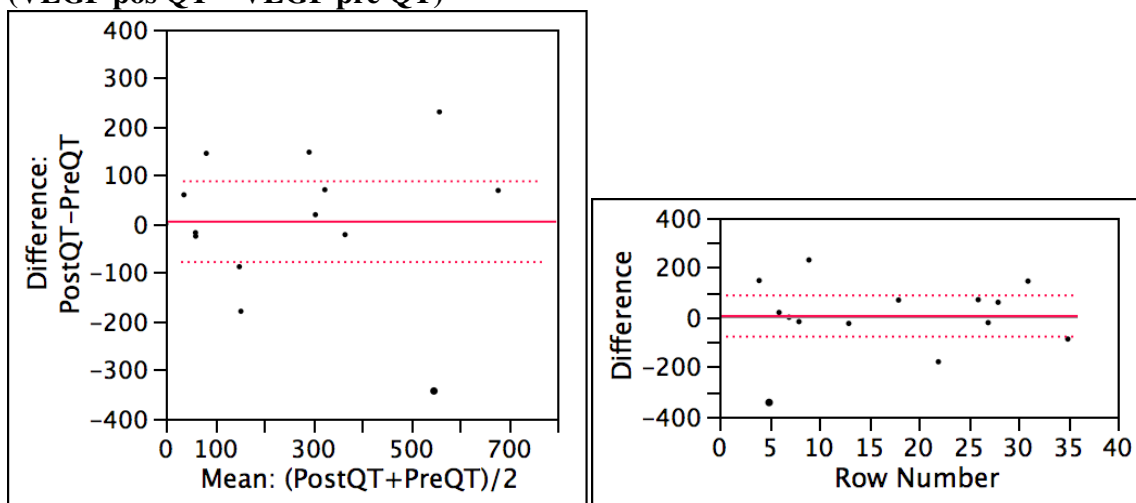
Melhor ajuste pelo teste de Shapiro-Wilk W

W	Prob<W
0.881946	0.0507

A hipótese do teste seria $H_0 =$ Os dados estão dentro de uma distribuição Normal. Para a rejeição de H_0 teríamos o valor de p menor do que o valor do teste, portanto H_0 foi rejeitada e a distribuição dos valores não seguem uma distribuição normal. Assim, as análises estatísticas serão realizadas por testes não paramétricos.

Pares relacionados de concentrações plasmáticas de VEGF e suas diferenças entre avaliações pré e pós quimioterapia.

(VEGF pós QT – VEGF pré QT)



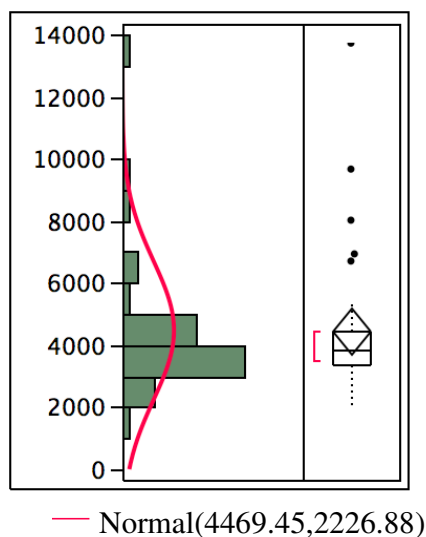
Post-QT	261.25	t-Ratio	0.128135
Pre-QT	256.329	DF	13
Diferença Mediana	4.92143	Prob > t	0.9000
Erro padrão	38.4081	Prob > t	0.4500
95% do Limite superior	87.8972	Prob < t	0.5500
95% do Limite inferior	-78.054		
N	15		

Correlação	0.80419
Wilcoxon Sign-Rank	
PostQT-PreQT	
Teste estatístico	5.500
Prob > z	0.7354
Prob > z	0.3677
Prob < z	0.6323

Pela análise de correlação não há diferença entre os valores obtidos nos períodos pré quimioterapia comparado com o pós quimioterapia, nas análises do VEGF plasmático.

Resultados da análise do HIF-1 α .

Distribuição da concentração de HIF-1 α no plasma de pacientes com carcinoma localmente avançado de mama no período pré quimioterapia.



Quartis

100.0%	Máximo	13716
75.0%	Quartil	4489
50.0%	Mediana	3884
25.0%	Quartil	3385
0.0%	Mínimo	1998

Momentos

Média	4469.4486
Desvio padrão	2226.8781
Erro Médio padrão	376.4111
95% da Média superior	5234.408
95% da Média inferior	3704.4892
N	36

Ajuste à normalidade

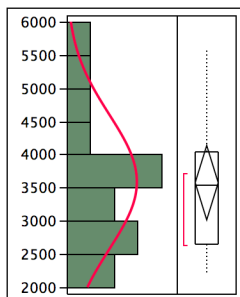
Tipo	Parâmetros	Estimado	95% do Limite inferior	95% do Limite superior
Localização	M	4469.4486	3704.4892	5234.408
Dispersão	Σ	2226.8781	1801.2595	2917.6604

Melhor ajuste pelo teste de Shapiro-Wilk W

W	Prob<W
0.701575	<.0001

A hipótese do teste seria $H_0 =$ Os dados estão dentro de uma distribuição Normal. Para a rejeição de H_0 teríamos o valor de p menor do que o valor do teste, portanto H_0 foi rejeitada e a distribuição dos valores não segue uma distribuição normal. Assim, as análises estatísticas serão realizadas por testes não paramétricos.

Distribuição da concentração de HIF-1 α no plasma de pacientes com carcinoma localmente avançado de mama no período pós quimioterapia.



— Normal(3586.7,1015.94)

Quartis

100.0%	Máximo	5599.4
75.0%	Quartil	4042.4
50.0%	Mediana	3549.5
25.0%	Quartil	2661.9
0.0%	Mínimo	2230.0

Momentos

Média	3586.7
Desvio padrão	1015.9426
Erro Médio padrão	262.31525
95% da Média superior	4149.3103
95% da Média inferior	3024.0897
N	15

Ajuste à normalidade

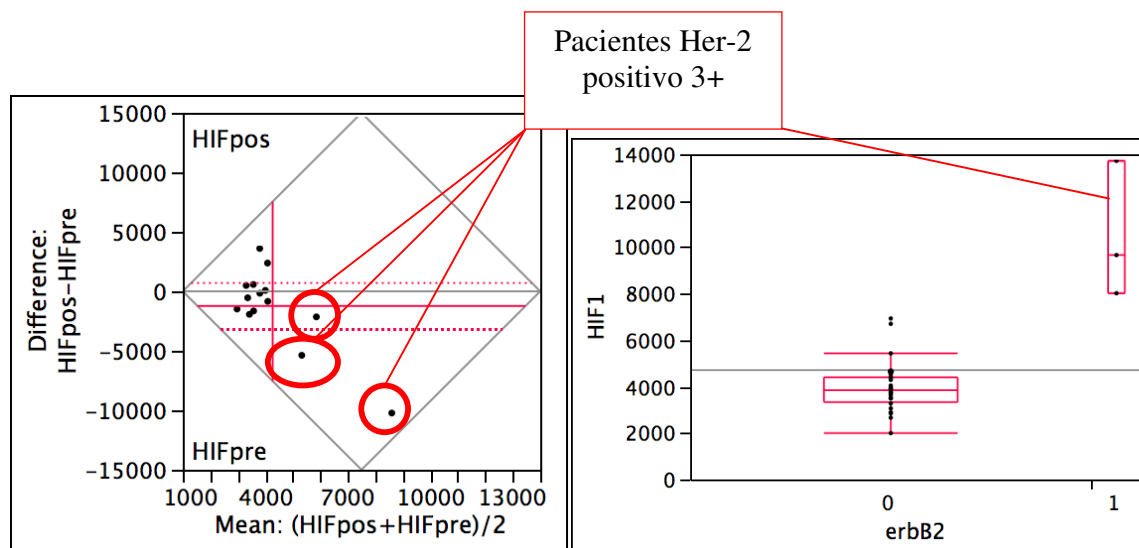
Tipo	Parâmetros	Estimado	95% do Limite inferior	95% do Limite superior
Localização	M	3586.7	3024.0897	4149.3103
Dispersão	Σ	1015.9426	743.79858	1602.2421

Melhor ajuste pelo teste de Shapiro-Wilk W

W	Prob<W
0.933418	0.3067

A hipótese do teste seria H_0 = Os dados estão dentro de uma distribuição Normal. Para a rejeição de H_0 teríamos o valor de p menor do que o valor do teste, portanto H_0 foi rejeitada e a distribuição dos valores não segue uma distribuição normal. Assim, as análises estatísticas serão realizadas por testes não paramétricos.

Pares relacionados de concentrações plasmáticas de HIF-1 α e suas diferenças entre avaliações pré e pós quimioterapia.



HIF pós QT	3652.76	t-Ratio	-1.37827
HIF pré QT	4886.33	DF	13
Diferença Mediana	-1233.6	Prob > t	0.1914
Erro padrão	895.017	Prob > t	0.9043
95% do limite superior	699.995	Prob < t	0.0957
95% do limite inferior	-3167.1		
N	15		
Correlação	-0.2109		

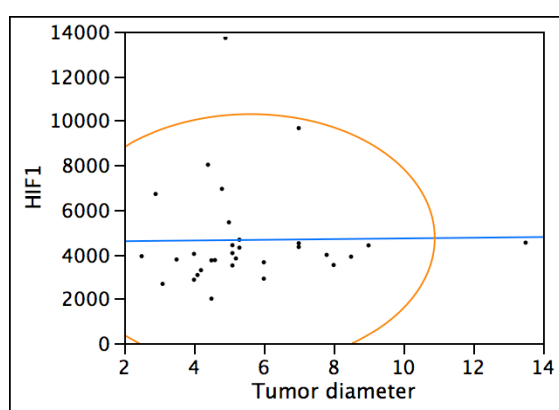
Wilcoxon Sign-Rank

	HIF pós - HIF pré
Teste estatístico	-20.500
Prob > z	0.2166
Prob > z	0.8917
Prob < z	0.1083

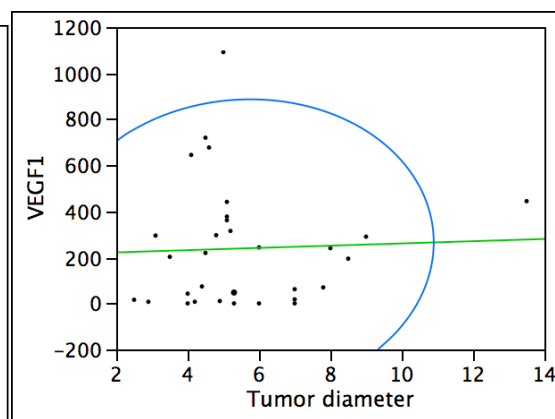
Pela análise de correlação não há diferença entre os valores obtidos no pré quimioterapia comparado com o pós quimioterapia, nas análises do HIF-1 α plasmático. Já o grupo de pacientes HER-2 positivas apresentou uma forte correlação com um valor de $p=0.0055$.

Correlação com marcadores clínicos e com a sobrevida

O volume tumoral pré-quimioterapia não apresentou correlação com os valores de VEGF e HIF-1 α , detectados no plasma.

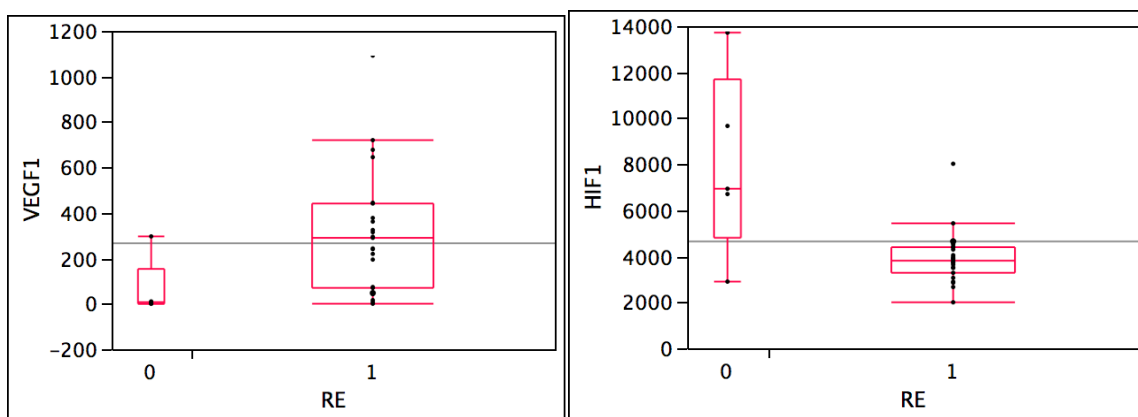


Correlação entre volume tumoral e dosagens plasmáticas de HIF-1 α .



Correlação entre volume tumoral e dosagens plasmáticas de VEGF.

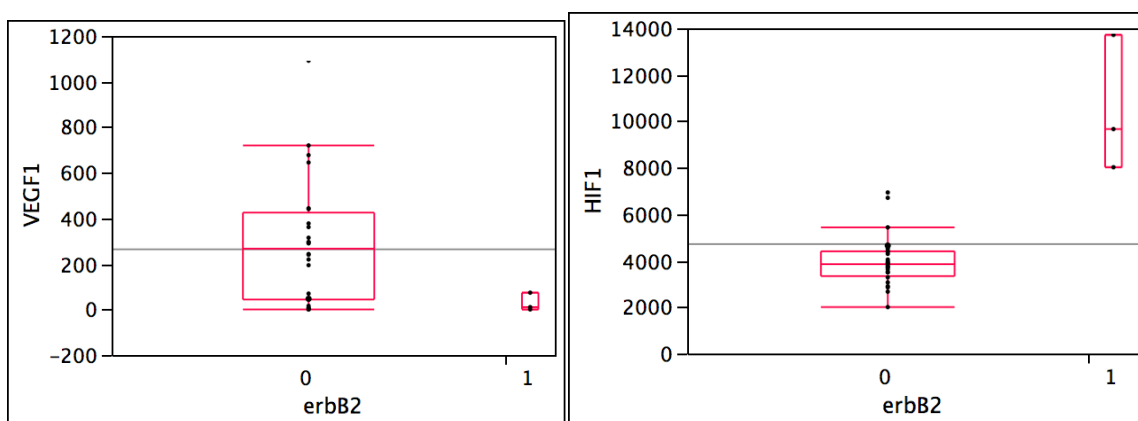
Os tumores com receptores hormonais de estrógeno e progesterona positivos pela imunohistoquímica (RE+/RP+), que caracterizam um grupo de lesões de melhor prognóstico, apresentaram altas concentrações plasmáticas de VEGF e baixas concentrações de HIF-1 α .



ChiSquare 5.7650 e
Prob>ChiSq de 0.0163

ChiSquare 4.7937 e
Prob>ChiSq de 0.0286

Inversamente, os tumores com superexpressão do HER-2, apresentam baixas concentrações plasmáticas de VEGF e altas concentrações do HIF-1 α .

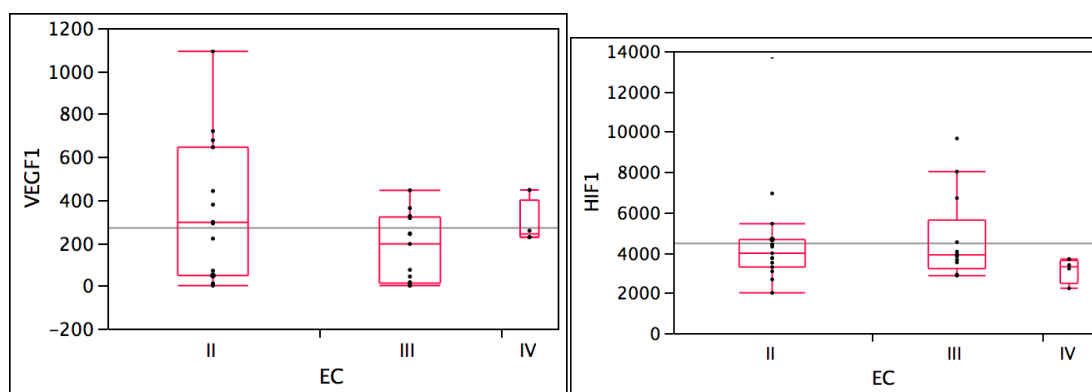


ChiSquare 3.1536 e
Prob>ChiSq de 0.0758

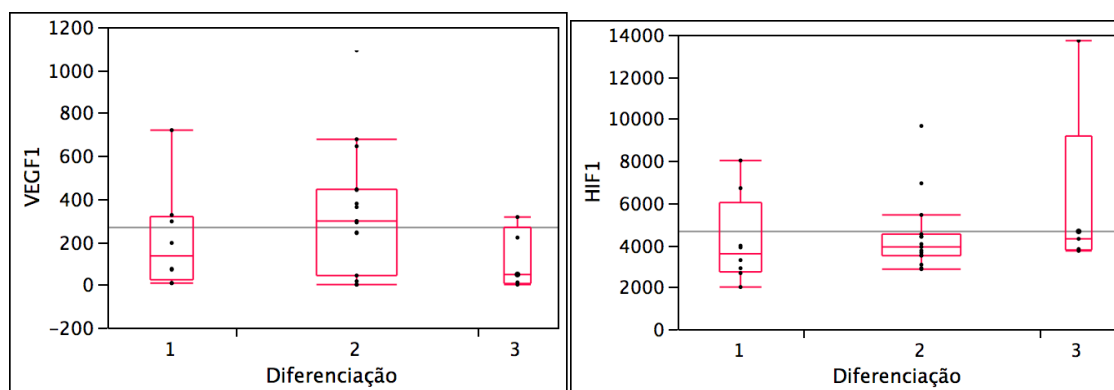
ChiSquare 7.7143e
Prob>ChiSq de 0.0055

Outro grupo de pacientes especiais, caracterizadas como do grupo basalóide (consideradas como RE e Her-2 negativos), apresentaram concentrações plasmáticas de HIF-1 α mais altas, mas sem diferença estaticamente significativa, caracterizando uma tendência, provavelmente relacionada ao pequeno número de casos existentes na análise.

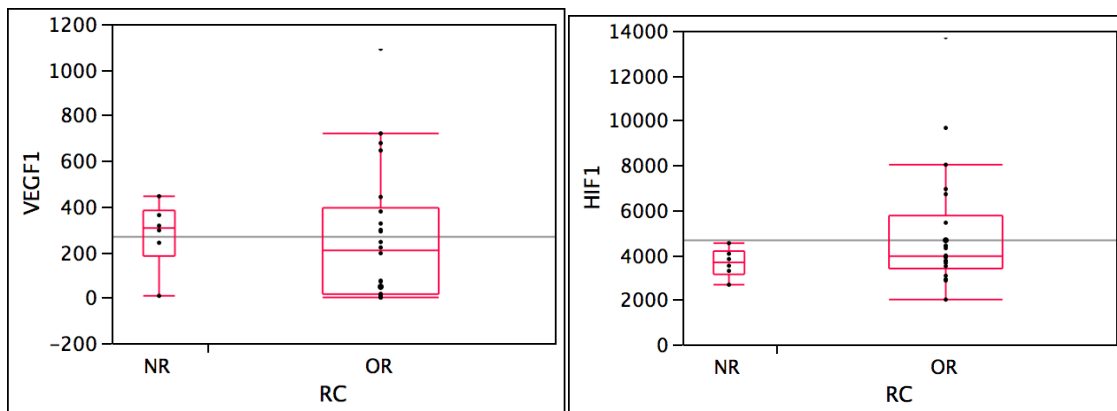
Não encontramos correlação entre as dosagens plasmáticas tanto do VEGF quanto do HIF-1 α , quando comparados com outros marcadores clínicos, resposta ao tratamento, ou mesmo a forma de tratamento cirúrgico:



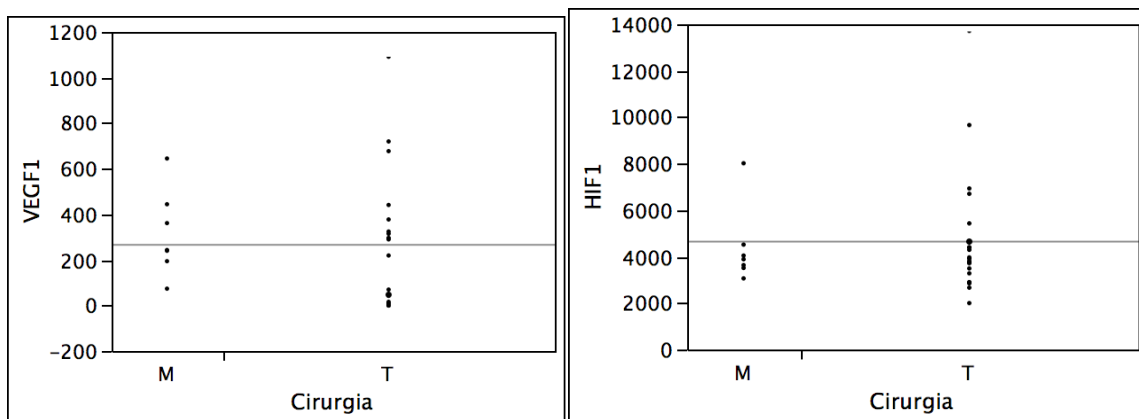
Sem correlação com estágio clínico.



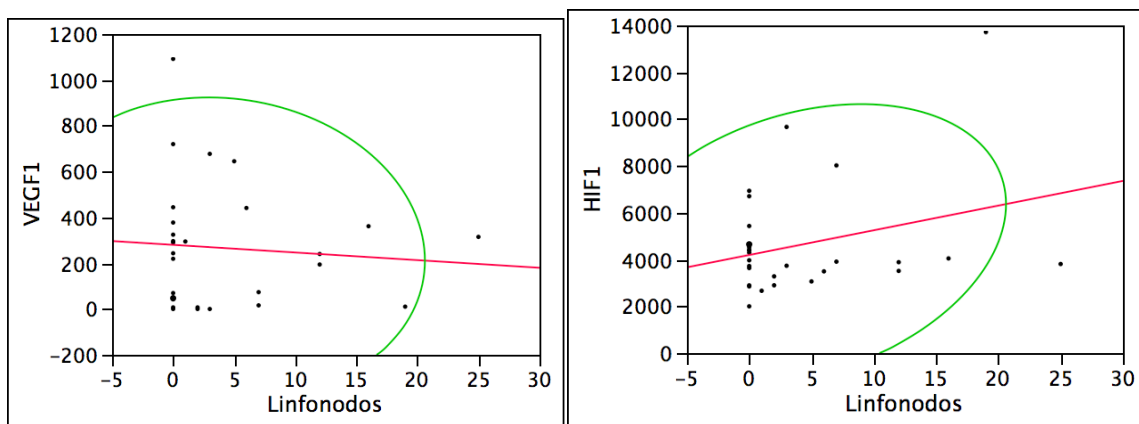
Sem correlação com grau de diferenciação tumoral.



Sem correlação com resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante.



Sem correlação com o tipo da cirurgia realizada (Mastectomia=M ou Tumorectomia=T).



Sem correlação com o comprometimento axilar pó tumor.

Ao utilizarmos o percentil 90 como ponto de corte na concentração plasmática do HIF-1 α , obtivemos uma forte correlação como mau prognóstico na sobrevida das pacientes deste grupo. No entanto, há também neste mesmo grupo uma sobreposição com pacientes Her-2 positivas, e que sabidamente são de pior prognóstico, assim não podemos afirmar que a concentração plasmática do HIF-1 α seja causa do mau prognóstico, mas sim consequência deste e que pode servir de marcador prognóstico confiável.

7. Discussão

Os carcinomas de mama localmente avançados (CMLA) têm sido considerados um desafio terapêutico dentro da oncologia, posto que o seu prognóstico seja bastante reservado. Entre um terço a metade destas pacientes já se apresentam com comprometimento axilar, refletindo sua agressividade, sendo a sobrevida inversamente relacionada à extensão deste comprometimento axilar e ao volume tumoral (Hortobagyi GN, 1990; Kuerer HM et al., 1999 e Bear HD, 1998; Bear *et al.*, 2006).

A forma mais aceita de se iniciar o tratamento dos CMLA é pela quimioterapia primária ou também chamada de neoadjuvante, que visa conhecer a sensibilidade do tumor às drogas utilizadas, aumentar o número de cirurgias conservadoras da mama, e nos casos de resposta patológica completa, aumentar a sobrevida global (Bear *et al.*, 2006, NSABP -B27).

Durante o processo de crescimento e disseminação tumoral a angiogênese se torna um passo crucial, propiciando não só a oferta de nutrientes essenciais ao crescimento, mas também, uma via de disseminação (Folkman J., 1998; Toi M, *et al.*, 2001). Neste

sentido, fatores relacionados a angiogênese vêm sendo estudados como marcadores da intensidade deste processo, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que apresenta duas formas solúveis e detectáveis no sangue periférico (Ferrara N, 1999; Ferrara N, *et al* 2003). Estes valores foram correlacionados tanto com o volume tumoral quanto com o prognóstico de pacientes com câncer de mama (Foekens JA, *et al.*, 2001; Linderholm B, *et al* 2000). Estudos preliminares mostraram níveis elevados de células endoteliais circulantes em pacientes com carcinoma mamário invasor, e queda destes níveis após aplicação primária de terapia quimioterápica (Frustenberger *et al*, 2006).

Por outro lado o crescimento tumoral anárquico produz áreas onde a vascularização tem menor penetração, chegando a produzir áreas de necrose por hipóxia nas regiões mais centrais do tumor. Nestas regiões ocorre a produção de um outro fator denominado fator indutor de hipóxia (HIF) que tem um papel crucial na progressão do tumor através de mecanismos regulatórios da angiogênese, sobrevivência celular com baixos níveis de oxigenação, e resistência a drogas (Salceda S, *et al.*, 1997; Huang LE, *et al.*, 1998). Recentemente tem sido responsabilizado pela ativação da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Kimbrow & Simons, 2006).

O volume tumoral tem sido relacionado como um fator determinante das concentrações de VEGF. Existe uma correlação positiva entre lesões carcinomatosas da mama progressivamente maiores e aumento dos valores de VEGF (Bos *et al.*, 2001). Furstenberger *et al.*, (2006) avaliando pacientes em estádios variados, com franca predominância de estádios iniciais, encontrou valores de VEGF de 132 pg/ml para o grupo de tumores e 92 pg/ml para os controles. Em nossa avaliação não houve correlação significativa entre volume tumoral e valores plasmáticos de VEGF ($p=0.736$), o que se deve ao fato de termos em nossa casuística somente tumores localmente avançados, e não uma

variação de tamanhos. Por outro lado, a dosagem do VEGF teve como valor médio 225.5 pg/ml (17.4 a 361.3 - percentis 25% e 75%, respectivamente), valor este muito acima dos 132 pg/ml, variando nos percentis 25% e 75% de 106 e 170 pg/ml respectivamente. Assim é possível inferir que haja realmente esta correlação positiva entre volume tumoral e dosagem plasmática de VEGF, mas que em nosso estudo foi apenas uma tendência. Assim também fica claro que a ausência de mudança nos valores plasmáticos de VEGF no período pós quimioterapia reflete a falta de impacto deste tipo de tratamento na produção deste marcador de angiogênese, ou seja, provavelmente este processo não é afetado pela quimioterapia, mas sim por mudanças de expressão gênica induzidas na população de células tumorais. Isto fica claro se levarmos em conta que, a quimioterapia é um processo de tratamento sistêmico e que não afeta também o processo de angiogênese gerais da economia metabólica de organismo em tratamento.

Os tumores mais bem diferenciados, de menor grau nuclear e citoplasmático estão relacionados à expressão positiva dos receptores hormonais de estrogênio (RE+) e progesterona (RP+). Estes tumores têm como característica biológica comum um crescimento lento, manter a axila negativa mesmo com tumores localmente avançados e terem melhor prognóstico em termos de sobrevida global e livre de doença. Assim, parece que neste grupo a angiogênese é organizada de forma mais lenta e elaborada, como é a própria biologia do tumor, cursando com níveis mais baixos de VEGF, como detectado em nosso experimento. Por outro lado os tumores HER-2 superexpressos apresentam um crescimento rápido, desorganização estrutural e citológica importantes, axilas extensamente comprometidas, e um pior desempenho em termos de sobrevida global e livre de doença. Assim, os valores de VEGF são mais elevados, pois a angiogênese esta acelerada, e

diretamente relacionada com este comportamento biológico do tumor, também como detectado em nossa casuística.

A proteína HIF-1 α é superexpressa nos carcinomas primários da mama (Zhong *et al.* 1999). Este aumento da expressão do HIF-1 α é observado tanto nas pacientes Her2 superexpressas quanto nos tumores Her2 negativos (Zhong *et al.* 1999, Bos *et al.* 2004). A amplificação gênica do c-erbB2 está associada com um prognóstico ruim e subsequente resistência à quimioterapia, radioterapia e terapêutica antiestrogênica. A superexpressão do Her2 cursa com o aumento da atividade e da expressão do HIF-1 α *in vitro*. A produção do VEGF também se encontra elevada nos tumores HER-2 positivos, e as células tumorais Her2-positivas facilitam o processo de vascularização tumoral, em parte pela produção do HIF-1 α (Petit *et al.* 1997; Laughner *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2002). Altos níveis de expressão de HIF-1 α no câncer de mama humano estão relacionadas à carcinogênese mamária e modificações moleculares decorrentes deste processo. Isto é observado no carcinoma ductal *in situ* de alto grau que apresenta altos níveis de HIF-1 α (Zhong *et al.* 1999). No tecido mamário normal não existe produção significativa de HIF-1 α . Em um estudo retrospectivo envolvendo 745 pacientes, altos níveis de HIF-1 α detectados no diagnóstico foi preditivo de recorrência precoce e doença metastática (Dales *et al.* 2005). O HIF-1 α pôde ser correlacionado com um prognóstico desfavorável nos casos de tumores T1/T2 e axila positiva (Gruber *et al.* 2004). Bos *et al.* (2003) sugerem que altos níveis de HIF-1 α tenham um significado *borderline* no que diz respeito a sobrevida de pacientes com axila negativa.

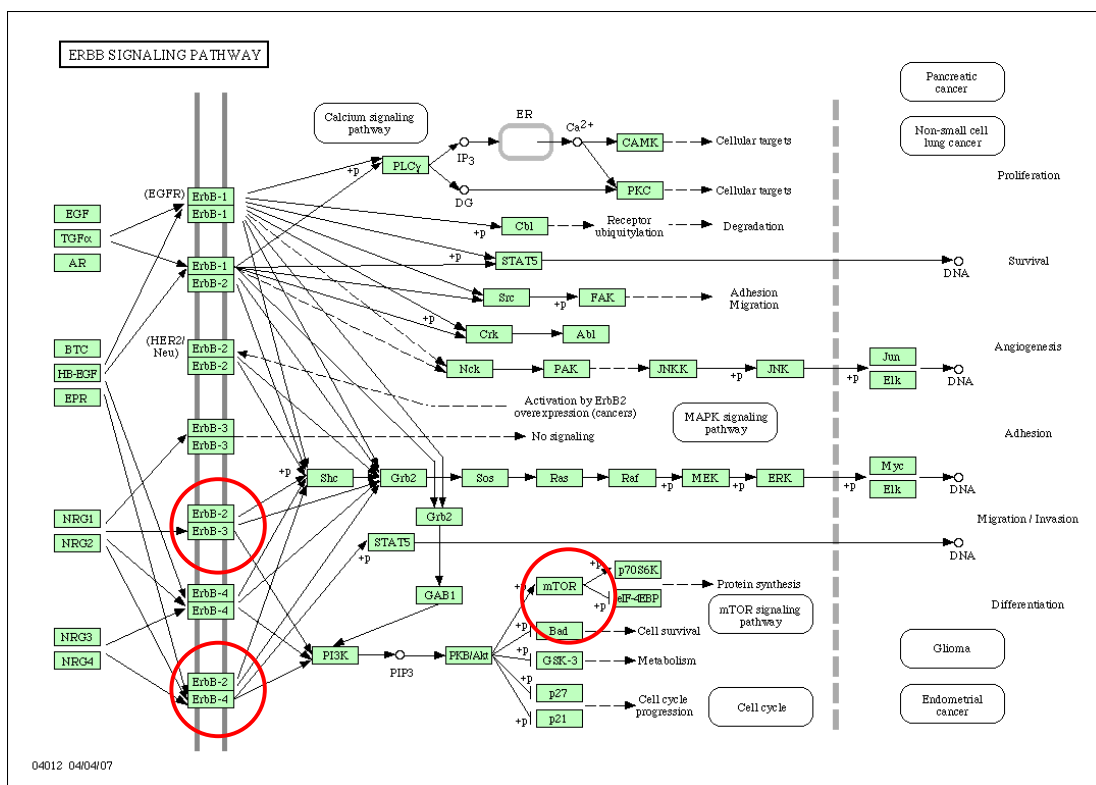
Em nossa casuística não observamos correlação entre volume tumoral ou axila positiva e níveis mais elevados de HIF-1 α , provavelmente pelo mesmo motivo da falta de correlação já mencionado para o VEGF. Nosso grupo de pacientes consiste apenas

de pacientes com tumores localmente avançados, e com um envolvimento axilar muito importante, onde dois terços delas têm axila positivas e um terço axilas extensamente tomada (mais de três linfonodos), impossibilitando assim uma análise de correlação, já que o grupo este polarizado para o lado do mau prognóstico.

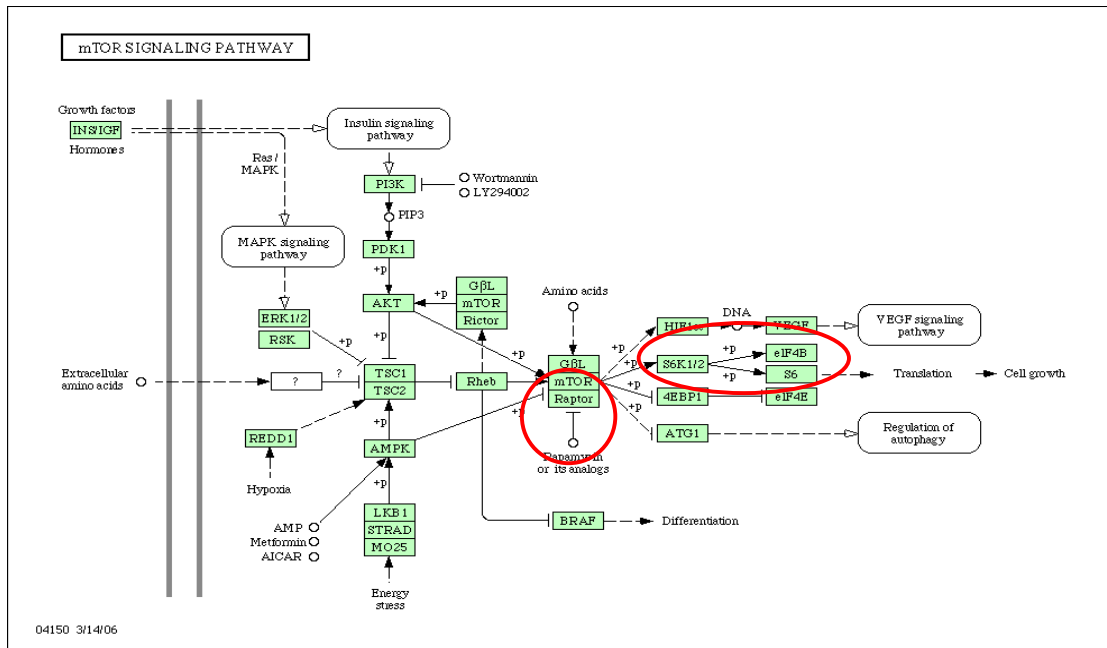
A proteína HER-2 esta definitivamente consolidada como um marcador de mau prognóstico em câncer de mama (Slamon et al., 1987; Rilke et al., 1991; Pegram et al., 1998). Laughner *et al.* (2001) demonstraram que a superexpressão do HER-2 em células 3T3 em camundongos, ou a estimulação de linhagens de células de câncer de mama MCF 7 pela heregulina, resultavam no aumento da expressão de proteínas HIF-1 α e mRNA do VEGF, e que esta expressão era dependente da atividade de PI3K, AKT e FRAP quinase. Em contraste com outros indutores de expressão de HIF-1 α , a estimulação pela heregulina do HIF-1 α resulta em uma síntese protéica tal que a combinação da expressão de HER2 e a hipóxia têm um efeito sinérgico na expressão gênica do VEGF (Laughner *et al.*, 2001). Assim, a mediação da angiogênese pela expressão de HIF-1 α pode contribuir diretamente para a letalidade dos tumores HER-2 positivos.

Nossa série de casos apresenta uma limitação importante que é o pequeno número de casos, no entanto estes casos são bastante homogêneos, o que torna os achados bastante consistentes para os casos de tumores de mama localmente avançados. Assim, ao obtermos como resultado valores plasmáticos de HIF-1 α significativamente mais elevados no grupo das pacientes HER-2 positivas, e este grupo apresentar recorrência precoce e sobrevida limitada, encontramos subsidio teórico e experimental para afirmar que estes resultados são verdadeiros e que merecem ser avaliados em novos estudos, já iniciados em nosso grupo de pesquisa.

Do ponto de vista das vias de expressão gênica encontramos uma correlação interessante em que a ativação do HER-2 em conjunto com o HER-3 e depois com o HER-4 vão desembocar na via comum do mTOR, um gene central da angiogênese, que por sua vez esta diretamente relacionado com a ativação do HIF1- α , e este ativa a expressão do VEGF.



Via de sinalização do HER-2 até o mTOR.



Via de sinalização do mTOR até o VEGF

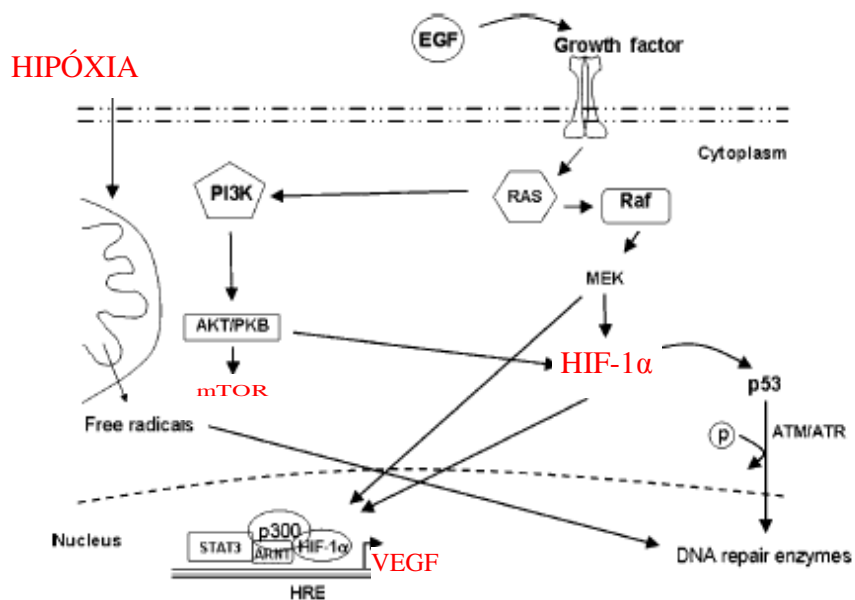


Figure 2 HIF-1 α signaling pathway. Hypoxia is signaled by PHDs which in turn release HIF-1 α and redirect HIF-1 α from the proteasome towards the signaling pathway to the nucleus. This pathway is a complex multi-responsive series of different phosphorylations originating from RAS to either PI3K/AKT or RAF/MEK pathway. In turn, HIF-1 α dimerizes with HIF-1 β /ARNT and translocates to the nucleus and interacts possibly with STAT3 and p300/CBP to initiate an increase in VEGF transcription.

Via de sinalização do HIF-1 α . A hipóxia é sinalizada pelos PHDs os quais liberam HIF-1 α e redirecionam HIF-1 α dos proteossomos através de vias de sinalização para o núcleo. Este complexo multi responsivo segue originando diferentes fosforilações pelas vias do RAS até PI3K/AKT ou RAF/MEK. O HIF-1 α dimeriza com o HIF-1 β /ARNT e é translocado para o núcleo e interage possivelmente com STAT3 e p300/CBP para iniciar e aumentar a transcrição do VEGF.

8. Conclusões

- I. Pela análise de correlação não há diferença entre os valores obtidos nos períodos pré quimioterapia comparado com o pós quimioterapia, nas análises do VEGF e HIF-1 α plasmáticos. Já o grupo de pacientes HER-2 positivas apresentou uma forte correlação nas análises do HIF-1 α plasmático.
- II. Os níveis plasmáticos de HIF-1 α apresentam correlação clínica com prognóstico de pacientes com carcinoma localmente avançado da mama. Esta associação se faz através da co-expressão do HER-2, e se sobrepõem a um grupo de pacientes de mau prognóstico.

- III. O VEGF não apresentou relação com o prognóstico, destas pacientes, mas sim uma tendência a se correlacionar com o volume tumoral, tanto no período pré como no pós quimioterapia.
- IV. Com relação a intervalo livre de doença e sobrevida global das pacientes, àquelas com fatores de pior prognóstico apresentaram intervalos de tempo bem menores para estes dois parâmetros.
- V. A continuidade deste estudo se faz necessária a fim de se consolidar a dosagem plasmática destes marcadores como fatores prognósticos, assim como aprofundar o seu entendimento e compreensão das suas vias de ativação gênica.

9. Bibliografia

- Ahern, V., Brennan, M., Ung, O., Kefford, R. (2005). Locally advanced and inflammatory breast cancer. *Australian Family Physician*, 34, 1027-32.
- Bear HD: Indications for neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Semin Oncol* 25:3-12, 1998 (suppl 3).
- 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* 97 1573–1581, 2003.
- Bos R, van Diest PJ, van der Groep P, Shvarts A, Greijer AE & van der Wall E 2004 Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related. *Breast Cancer Research* 6 R450–R459.

Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers ECM, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1 α During Breast Carcinogenesis. *J Nat Cancer Inst* 2001;93:309–14.

Boudreau, N., Myers, C. (2003). Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Research*, 5, 140-6.

Breast cancer risk reduction. Bevers TB, Armstrong DK, Arun B, Carlson RW, Cowan KH, Daly MB, Fleming I, Garber JE, Gemignani M, Gradishar WJ, Krontiras H, Kulkarni S, Laronga C, Lawton T, Loftus L, Macdonald DJ, Mahoney MC, Merajver SD, Seewaldt V, Sellin RV, Shapiro CL, Singletary E, Ward JH; National Comprehensive Cancer Network (NCCN). *J Nat Compr Canc Netw*. 2007 Sep;5(8):676-701

Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P & Charpin C Over expression of hypoxia-inducible factor HIF-1 alpha predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *International Journal of Cancer* 116 734–739, 2005.

Estimativas da incidência de câncer no Brasil em 2006. Câncer de mama femino - <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/>.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-676, 2003.

Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77:527-543, 1999.

Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Geurts-Moespot A, van der Kwast TH, Sweep CG, Klijn JG: High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 61:5407-5414, 2001.

Folkman J: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 1998;29:15-18.

Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G & Djonov V Hypoxiainducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Research* 6 R191–R198, 2004.

Harry D. Bear, Stewart Anderson, Roy E. Smith, Charles E. Geyer, Jr, Eleftherios P. Mamounas, Bernard Fisher, Ann M. Brown, Andre Robidoux, Richard Margolese, Morton S. Kahlenberg, Soonmyung Paik, Atilla Soran, D. Lawrence Wickerham, Norman Wolmark. Sequential Preoperative or Postoperative Docetaxel Added to Preoperative Doxorubicin Plus Cyclophosphamide for Operable Breast Cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 24, No 13 (May 1), 2006: pp. 2019-2027.

Hayward JL, Carbone PP, Heusen JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*, 1977: 35, 292-8.

Hortobagyi GN: Comprehensive management of locally advanced breast cancer. *Cancer* 66:1387- 391, 1990 (suppl 6).

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 a is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7987–92.

International Union Against Cancer: Introduction UICC Global Cancer Control. Geneva, Switzerland, UICC, 2005.

Kimbro K S & Simons J W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-Related Câncer*; 2006, 13 739–749.

- Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al: Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 17:460-469, 1999
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC & Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and Cellular Biology* 21 3995–4004, 2001.
- Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R: Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 18:1423-1431, 2000.
- Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ.. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat* 52:65–77, 1998.
- Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B & Kerbel RS Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *American Journal of Pathology* 151 1523–1530, 1997.
- Pradeep, C.R., Sunila, E.S., Kuttan, G. (2005). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptors in Tumor Angiogenesis and Malignancies. *Integrative Cancer Therapies*, 4, 315-21.
- Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, Della Porta G, Menard S, Pierotti MA, Testori A. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer* 49:44–49, 1991.

Rosen, S.L. (2005). VEGF-Targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist*, 10, 382-91.

Sachelarie, I., Grossbard, M.L., Chadha, M., Feldman, S., Ghesani, M., Blum, R.H. (2006). Primary Systemic Therapy of Breast Câncer. *The Oncologist*, 11, 574–89.

Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1 a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272:22642–7.

Schoppmann, S.F., Birner, P., Sto"ckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., Kerjaschki, D. (2002). *American Journal of Pathology*, 16, 947-56.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL.. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177–182, 1987.

Toi M, Matsumoto T, Bando H: Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2:667-673, 2001.

Yen L, Benlimame N, Nie ZR, Xiao D, Wang T, Al Moustafa AE, Esumi H, Milanini J, Hynes NE, Pages G et al. Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers. *Molecular Biology of the Cell* 13 4029–4044, 2002.

10. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL & Simons JW 1999 Over expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Research* 59 5830–5835.

Apêndice

Anexo A Folha de Coleta de Dados Amostrais

Etiqueta

Código

Idade: _____

Estadio: T_____N_____M_____EC_____

Trat. Ppto: _____

Trat. Real: _____

Data dos Atend.: _____/_____/_____

_____/_____/_____

_____/_____/_____

Avaliação ao final do Tratamento: _____

Status Axilar: _____+/_T

Data da Biópsia: _____/_____/_____

Número da Biópsia: _____

Histologia: _____

Outros materiais enviados:

Material armazenado no laboratório de Imunologia:

IDENTIFICAÇÃO RACK CAIXA DATA

MATERIAL

11. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecida sobre todas as condições que constam do documento “ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA”, de que trata o projeto de pesquisa intitulado “Produção de VEGF e HIF-1 α em Pacientes com Carcinoma de Mama Localmente Avançado submetidas à Quimioterapia Neoadjuvante”, que tem como pesquisador responsável o Sr. Alexandre Pavan Garieri, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos de pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto. **II.**

Esclarecimento ao Sujeito da Pesquisa

Sra _____, eu, Dr. Alexandre Pavan Garieri, peço a sua autorização para incluí-la na pesquisa **“Produção de VEGF e HIF-1 α em Pacientes com Carcinoma de Mama Localmente Avançado submetidas à Quimioterapia Neoadjuvante”**.

Esta pesquisa tem como objetivo estudar as alterações de substâncias no sangue e no tumor em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia. Não faremos nenhum exame ou cirurgia por causa da pesquisa, apenas aproveitaremos 5 ml de sangue e um fragmento do tumor, retirados durante os procedimentos de quimioterapia e da cirurgia mamária, realizados para o tratamento de seu problema de saúde.

Garantimos que seu nome não será exposto em nenhuma apresentação ou qualquer tipo de publicação e que a senhora poderá deixar de participar da pesquisa em qualquer momento que desejar. Caso a senhora não concorde com a participação no estudo ou deseje sair do mesmo, não haverá prejuízo em seu tratamento e seguimento. Ressaltamos ainda que a senhora terá liberdade de retirar este consentimento em qualquer momento que desejar sem prejuízo para o seu tratamento e seguimento neste serviço e que estamos a disposição para maiores esclarecimentos a qualquer momento que a senhora desejar.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2004.

Assinatura da Paciente

Dr. Alexandre Pavan Garieri – Pesquisador Responsável