

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

**Expressão de VEGF em tumores de mama de  
pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante**

**Viviane Fernandes Schiavon**

**Ribeirão Preto**

**2010**

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

***Expressão de VEGF em tumores de mama de  
pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante***

***Viviane Fernandes Schiavon***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação em Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia

**Ribeirão Preto**

**2010**

### Ficha Catalográfica

Schiavon, Viviane Fernandes

Expressão de VEGF em tumores de mama de pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante. Ribeirão Preto, 2010.

45 p; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Heitor Ricardo Cosiski Marana

1. Câncer de mama, 2. Fator preditivo,  
3. VEGF, 4. Quimioterapia neoadjuvante

Data da Defesa: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

“O médico, que pode não estar sofrendo nada (se ele estiver sofrendo será um médico mais compassivo...), sofre um sofrimento que não é seu, é de um outro. E é só porque ele sofre com os sofrimentos dos outros que ele se impõe a disciplina de estudar, pesquisar e desenvolver habilidades: para que o outro sofra menos ou deixe de sofrer.”

Rubem Alves

Aos meus pais, João Batista Schiavon e Marlene Fernandes,  
que com amor e dedicação, sempre me estimularam a estudar  
e abriram todas as portas para minha formação.

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus, que, com certeza, me amparou em todos os momentos e me impediu de desistir sem chegar ao final;

- Às pacientes, que durante período de dor e tristeza, concordaram em doar atenção ao meu projeto;

- Ao Marcus Vinícius da Silva Silvano, meu companheiro e amigo, que me estimulou a continuar nesta jornada;

- À minha irmã Luciane Fernandes Schiavon, que, ao seu modo, sempre demonstrou o orgulho pela irmã médica;

- Ao meu grande amigo Luiz Gustavo Oliveira Brito, peça fundamental para a realização e conclusão desde mestrado, que não mediu esforços para me ajudar em tudo;

- Aos meus avós, Amélia Salvaterra Fernandes e João Francisco Fernandes, que com certeza continuam a cuidar dos meus passos e a torcer por mim, mesmo não estando mais conosco;

- Ao amigo Alexandre Pavan Garieri, que me abriu as portas para a experiência da vida profissional além dos muros da universidade e me ensinou a me apaixonar mais pela minha profissão;

- À amiga Prof. Dra. Alessandra Cristina Marcolin, que com sua dedicação e persistência, me ensinou a buscar meus sonhos;

- Ao amigo Joaquim Moraes Sarmiento, mestre e amigo, pelo muito que me ensinou da mastologia e pelo exemplo maior do que é ser médico;

- Ao amigo Willian Simões Clagnan, que me auxilia na vida profissional e divide as dificuldades do dia-a-dia;

- Ao Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade, co-orientador e chefe do setor de Mastologia, por me receber como médica assistente e acreditar na minha capacidade;

- Aos professores Dr. Hélio Humberto Carrara e Dr. Paulo Meyer de Paula Philbert, pelo convívio no setor de mastologia;

- Ao Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi, pelos ensinamentos no campo cirúrgico e apoio para o desenvolvimento deste trabalho;

- Ao chefe da pós-graduação, Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira, por acreditar neste projeto;

- Aos professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que me ensinaram e me estimularam a arte desta ciência;

- Aos amigos Ilza Mazzocato, Suellen Soares, Reinaldo Tavares, Rosane Casula e Ricardo Perussi, pelo apoio e disposição em ajudar;

- Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia, pela preparação das lâminas em curto espaço de tempo;

- Ao meu orientador Dr. Heitor Ricardo Cosiski Marana, que desde o início da minha formação como mastologista, me ensinou a arte de operar e me motivou a buscar novos conhecimentos. À ele, meus agradecimentos pela persistência e credibilidade que depositou em mim e minha admiração como profissional e pessoa.



## RESUMO

**Objetivos:** A avaliação da angiogênese no câncer de mama é um importante fator prognóstico e preditivo. A expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) tem sido relatada como metodologia adequada posto sua relação com a densidade microvascular tumoral (MVD), a dosagem de VEGF plasmático assim como com a expressão de outros genes relacionados a angiogênese.

**Pacientes e Métodos:** este estudo avaliou 30 pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama localmente avançado tratadas inicialmente pela quimioterapia neoadjuvante e foi correlacionada a expressão da proteína VEGF e outros caracteres clínico-patológicos destas pacientes.

**Resultados:** A expressão da proteína VEGF foi significamente correlacionada com a resposta patológica completa ( $p= 0,04$ ). Não houve correlação entre expressão de VEGF e tamanho tumoral ( $p= 0,76$ ), envolvimento axilar ( $p= 0,70$ ), RP ( $p= 0,92$ ), RE ( $p= 0,98$ ), superexpressão de HER-2 ( $p= 0,79$ ), grau tumoral ( $p= 0,68$ ) ou menopausa ( $p= 0,07$ ).

**Conclusões:** A expressão de VEGF foi consistentemente associada a resposta patológica completa e pode ser utilizada como fator preditivo para selecionar pacientes com CMLA para tratamento primário pela quimioterapia.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; fatores preditivo; VEGF; quimioterapia neoadjuvante

## SUMMARY

**Purpose:** The assessment of angiogenesis in breast cancer is an important predictive and prognostic factor. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression has been reported as a reliable methodology to evaluate the relationship between microvascular density (MVD), VEGF plasma level and the expression of other angiogenesis related genes.

**Patients and Methods:** This study examined 30 locally advanced breast cancer patients submitted to neoadjuvant chemotherapy. We analyzed the correlation between VEGF protein expression and clinicopathological characteristics.

**Results:** VEGF expression was significantly correlated to complete pathological response ( $p=0,04$ ). There were no correlation between a VEGF expression and tumor size ( $p=0,76$ ), axillary involvement ( $p=0,70$ ), PR ( $p=0,92$ ), ER ( $p=0,96$ ), HER-2 overexpression ( $p=0,79$ ), tumor grade ( $p=0,68$ ) or menopausal status ( $p=0,07$ ).

**Conclusion:** VEGF expression was consistently associated to complete pathological response and may be used as a predictive factor to select patients to primary chemotherapy in LABC patients.

**Key-Words:** breast cancer; predictive factor; VEGF; neoadjuvant chemotherapy

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CISH	chromogenic in situ hybridization
CMLA	Câncer de Mama Localmente Avançado
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
HIF	Fator indutor de hipóxia
HIF- $\alpha$	Fator de resposta a hipóxia
PIGF	Fator de crescimento placentário
TAMs	Macrófagos Associados ao Tumor
MVD	Densidade microvascular tumoral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 O Câncer de Mama no Brasil e no Mundo .....	12
1.2 Tratamento de tumores localmente avançados .....	13
1.3 Angiogênese e Câncer de Mama.....	15
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA .....</b>	<b>18</b>
3.1 Critérios de Seleção de Pacientes .....	18
3.2 Coleta de Material .....	19
3.3 Características das pacientes .....	19
3.4 Processamento do Material .....	21
3.5 Análise dos Dados .....	24
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>32</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>33</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>37</b>
Apêndice 1 - Formulário de Coleta de Dados Amostrais .....	37
Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	39
Apêndice 3 – Classificação Clínica TNM para Câncer de Mama.....	41
Apêndice 4 – Agrupamento dos Estádios Clínicos TNM.....	43
Apêndice 5 – Termo de Aprovação pelo Conselho de Ética .....	44

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O Câncer de Mama no Brasil e no Mundo

O câncer é um problema de saúde pública, com estimativas de 16 milhões de casos novos em 2020, com 12 milhões de óbitos. Destes, 60% ocorrerão em países em desenvolvimento (UICC/2005). É uma das principais causas de morte em mulheres ocidentais. Nos EUA, estima-se que para 2009, 192.370 mulheres apresentaram-se com esta patologia, com 40.170 mortes (JEMAL et al, 2009). No Brasil, o tumor de mama é a principal causa de mortes por doença maligna entre as mulheres, sendo responsável por 15,6% das mortes por câncer entre elas, contabilizando mais de nove mil óbitos por ano, segundo dados de 2006 (INCA, 2010) . Este também é o segundo tipo mais incidente de câncer na população feminina, contabilizando cerca de 49 mil casos novos por ano, sendo ultrapassado apenas pelos tumores de pele não melanoma. Apenas no estado de São Paulo, a estimativa para 2010, revela aproximadamente 65 casos novos para cada 100.000 mulheres, com total de 27.620 pacientes, sendo o tipo de câncer mais incidente nesta região. O aumento da expectativa de vida da população mundial e conseqüente aumento da população feminina em idade avançada promoverá um aumento da incidência de câncer de mama (INCA, 2010).

Dados analisados através de estudos clínicos randomizados mostraram, entre 1976 a 1990, que a detecção precoce através da avaliação mamográfica pode reduzir a mortalidade por câncer de mama em até 25% em mulheres entre 50 e 69 anos. Mais recentemente, análises de bases populacionais mostraram que

programas de rastreamento em mulheres de 40 a 69 anos pode promover a redução da mortalidade em 40 a 45% dos casos (UICC, 2010).

Apesar das políticas de incentivo ao rastreamento mamográfico para detecção precoce do câncer de mama, aproximadamente 10% dos tumores, mundialmente, são diagnosticados como câncer de mama localmente avançados, com aumento do risco de metástases subseqüentes e prognóstico mais sombrio (AHERN et al, 2005). Com a incorporação de avanços, tanto na detecção precoce através do rastreamento mamográfico, quanto na terapêutica, a mortalidade tende a cair. No Brasil, no entanto, sessenta por cento dos casos novos são diagnosticados em fase avançada (estadio III ou IV), o que determina tratamentos mais dispendiosos, agressivos, com uma sobrevida menor e nas avaliações epidemiológicas, há elevação nas taxas de mortalidade pela neoplasia (INCA, 2003).

## **1.2 Tratamento de tumores localmente avançados**

A definição de câncer de mama localmente avançado (CMLA) inclui os seguintes critérios: tumores com diâmetro superior a 5cm, envolvimento linfonodal extenso (adenomegalia axilar fixa – N2 – ou supra-clavicular ipsilateral – N3), envolvimento da pele ou parede torácica ou carcinoma inflamatório de mama. Assim, reúne pacientes portadoras de doença em estágio IIIA, IIIB, IIIC e subgrupo do estágio IIB (T3N0).

Nas pacientes portadoras de doença localmente avançada, a terapia multidisciplinar, com combinação de quimioterapia, radioterapia e cirurgia, torna-se obrigatória (AHERN et al, 2005). No caso das pacientes com CMLA, onde a cirurgia primária não é possível, ou quando possível, esta é restrita ao procedimento radical,

a utilização do tratamento neoadjuvante ou tratamento primário pela quimioterapia ou hormonioterapia torna-se uma opção terapêutica (MACASKILL et al, 2006).

A utilização isolada de cirurgia em casos considerados operáveis mostrou resultados ruins em função das elevadas taxas de recidiva local e sistêmica, com sobrevida de 5 anos inferior a 20% (ATKINS et al, 1961). Mesmo a adição de radioterapia, com melhor controle local, não contribuiu para reduzir os índices de recidiva a distância (FLETCHER GH, 1972).

Os primeiros dados do benefício da quimioterapia primária, neoadjuvante ou pré-operatória são da década de 70 (DE LENA et al, 1978). O objetivo da terapia neoadjuvante é reduzir o volume do tumor primário, proporcionando operabilidade nos casos inoperáveis e aumentando as taxas de cirurgia conservadora da mama nos casos operáveis.

As premissas que corroboram 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).

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 (MAURI et al, 2005), exceção feita àquelas que apresentam respostas patológica completa (BEAR et al, 2006; PEINTINGER et al, 2008), subgrupo este de extrema importância clínica, pois, à luz dos conhecimentos atuais é o único grupo de pacientes que realmente têm benefício em termos de sobrevida global ou sobrevida livre de doença do tratamento primário pela quimioterapia.

Detectar, através de fatores preditivos, quais pacientes apresentarão resposta objetiva ao tratamento neoadjuvante, podendo selecioná-las para o tratamento e evitar quimioterapia naquelas que não serão beneficiadas, através da divisão em grupos biológicos distintos, torna-se imperativo.

### 1.3 Angiogênese e Câncer de Mama

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.

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 e o HIF1- $\alpha$ , superexpressos em carcinomas ductais de mama, induz diretamente a expressão de mediadores pró-angiogênicos, notadamente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores (SCHOPPMANN et al, 2002; BOS et al, 2005). Alguns dados mostram que não há diferença estatística entre os níveis plasmáticos de HIF-1 $\alpha$  e VEGF antes e após quimioterapia neoadjuvante (GARIERI, 2008).

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



de VEGF é formada pelo VEGF-A (VEGF), PlGF, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. VEGF-A atua através dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, PlGF 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 a 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, como 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, dirigido especificamente contra o VEGF-A, impedindo a ligação da isoforma aos seu receptores, em estudos pré-clínicos e em pacientes com doença metastática, associados aos quimioterápicos, apresentam resultados benéficos no controle tumoral (ROSEN et al, 2005).

Este conjunto de evidências favorece a hipótese de 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. Sendo assim, o estudo e caracterização tumoral, em relação a estes dados, associado aos efeitos dos quimioterápicos sobre eles, pode oferecer dados consistentes ao benefício da quimioterapia e potencializar estratégias de tratamento para pacientes com neoplasias malignas de mama.

## 2. OBJETIVOS

O estudo objetivou:

- 1) Correlacionar a expressão do VEGF em tumores de mama localmente avançado a resposta ao tratamento neoadjuvante.
- 2) Correlacionar a expressão do VEGF com os fatores prognósticos clássicos como tamanho do tumor e comprometimento axilar.
- 3) Correlacionar a expressão do VEGF com os marcadores de comportamento biológico tumoral como os receptores de estrogênio, progesterona e o cerbB2.

### 3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

#### 3.1 Critérios de Seleção de Pacientes

Tornaram-se elegíveis para a participação neste estudo do tipo transversal as pacientes pertencentes ao ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), com idade entre 30 e 70 anos, com tumor localmente avançado de mama ou com tumores estágio clínico II, que, em decorrência da relação tamanho do tumor/mama não eram candidatas a tratamento conservador, e confirmado o diagnóstico de neoplasia maligna de mama, seriam submetidas à quimioterapia neoadjuvante e tratadas posteriormente com cirurgia.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP, de acordo com o processo HCRP número 9345/2007 (Apêndice 5).

As pacientes receberam quimioterapia neoadjuvante conforme esquemas de tratamento protocolados pelo Setor de Mastologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, com esquemas usando-se taxanes e antraciclinas, combinados ou não.

Após o fim do tratamento quimioterápico, as pacientes foram avaliadas definitivamente e a resposta ao tratamento foi estabelecida usando-se os critérios RECIST versão 1.1: (I) resposta completa, consistindo de ausência clínica de neoplasia residual; (II) resposta parcial, consistindo de pelo menos 30% de diminuição na soma dos diâmetros da lesão, (III) progressão da doença, quando aumento de pelo menos 20% na soma dos diâmetros da lesão, e (IV) doença estável, quando o tumor não apresentou diminuição suficiente para caracterizar

como resposta parcial ou aumento suficiente para caracterizar como progressão da doença (EISENHAUE et al, 2009). Para fins de análise, dividimos as respostas em completa e incompleta/ausente (engloba resposta parcial, progressão da doença e doença estável). Quanto a resposta patológica, consideramos completa quando não foi encontrado neoplasia invasora ou in situ residual na peça cirúrgica e quando todos os linfonodos dissecados apresentavam-se negativos.

### **3.2 Coleta de Material**

Amostras do tumor primário foram obtidas de 30 pacientes submetidas à biópsia cirúrgica diagnóstica (biópsia incisional) no HC-FMRP-USP, antes da quimioterapia neoadjuvante, conforme protocolo deste serviço.

As amostras foram obtidas assepticamente no ato cirúrgico a partir da amostra inicial enviada para a rotina histológica. Após retirada a biópsia, foi amostrado um fragmento de  $0,125\text{cm}^3$  (0,5 x 0,5 x 0,5cm), que foi armazenado em meio de congelamento OCT.

### **3.3 Características das pacientes**

A Tabela 1 mostra a distribuição das pacientes conforme as características epidemiológicas; verifica-se que a maioria da amostragem encontra-se na menopausa (53,3%), com tumores agressivos do ponto de vista histológico (90%) e em estádios avançados (73,4%).

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

Variável	Número	%
<b>Idade (anos)</b>		
< 50	10	33,3
50 +	20	66,7
<b>Tamanho tumoral (cm)</b>		
Até 5	15	50,0
5,1-10	13	43,3
>10	2	6,7
<b>Estado hormonal</b>		
Pré-menopausa	14	46,7
Menopausa	16	53,3
<b>Subtipo histológico</b>		
Ductal	28	93,3
Lobular	2	6,7
<b>Grau histológico</b>		
I	3	10,0
II	16	53,3
III	11	36,7
<b>Estadio clínico (TNM)</b>		
IIA	4	13,3
IIB	4	13,3
IIIA	10	33,4
IIIB	7	23,3
IIIC	2	6,7
IV	3	10,0
<b>Total</b>	30	100,0

### 3.4 Processamento do Material

O material obtido foi encaminhado parcialmente para o departamento de Patologia deste serviço, onde foi fixado em parafina e seccionado em micrótomo. Após fixação em lâmina de vidro, foi, então, submetida a coloração com hematoxilina-eosina a fim de ser feito diagnóstico histológico e definição do grau tumoral (Classificação de Elston e Ellis). Com a execução da técnica de imunohistoquímica, foram usados anticorpos primários específicos para a definição do status de receptores para progesterona e estrogênio, além da presença do HER2.

Para a quantificação imunohistoquímica do antígeno HER-2, utilizou-se o HercepTest (DAKO System), cujo sistema de score analisa a intensidade e a completude da marcação de membrana das células tumorais para determinar o status do HER-2 (Figura 1). Um score de 3+ (10% das células tumorais evidenciando uma forte e completa coloração de membrana; marcação citoplasmática não é levada em conta) era indicativo de positividade para o HER-2. Casos negativos não mostravam nenhuma marcação (score 0) ou a marcação da membrana é ausente em mais de 10% das células tumorais (score 1+). (BARRETT et al., 2007; LEONG et al., 2006). Para os tumores intermediários entre essas duas categorias, era colocado um score 2+ (indeterminado) e realizado o CISH (Figura 2). O CISH identifica a amplificação gênica usando as reações enzimáticas comuns em material parafinado, com custo menor que a técnica FISH (CHANG et al., 2004).

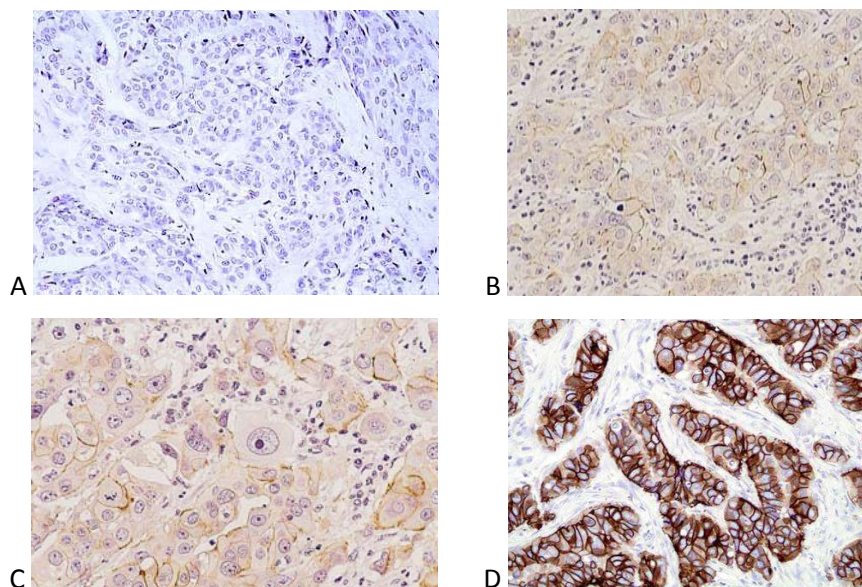


Figura 1: Superexpressão da proteína HER2 (IHQ): A- (0) negativo, B- (1+) negativo, C- (2+) positivo fraco e D- (3+) positivo forte.

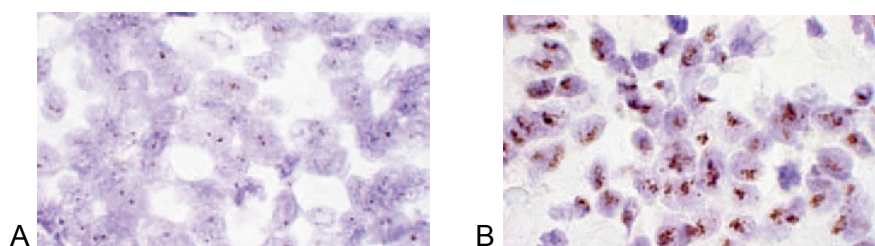


Figura 2: Amplificação do gene cerb-B2 através do CISH: A- ausência de amplificação, B- presença da amplificação do gene.

A marcação dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) foi realizada quando uma coloração nuclear era visualizada, considerando-se positiva quando um percentual de 10% ou mais de células tumorais eram marcadas (Figura 3).

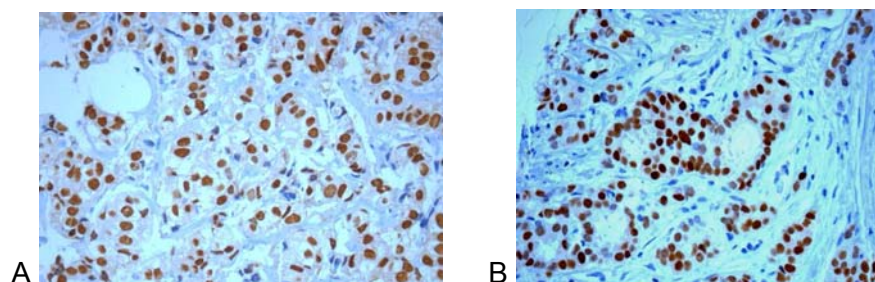


Figura 3: Imunohistoquímica para receptores hormonais: A – Receptores de estrogênio positivo; B – Receptores de progesterona positivo.

No laboratório de Imunologia deste serviço, o material previamente congelado em OCT, foi utilizado para definir a expressão ou não da proteína VEGF no tumor (Figura 4 e 5). Foi utilizado o anti-VEGFA, clone G153-694, isotipo Mouse IgG2b,  $\kappa$  da indústria BD Biosciences.

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

Em relação ao VEGF, a marcação citoplasmática foi considerada negativa quando menos de 10% das células estavam marcadas e positiva quando um valor igual ou maior que esta porcentagem foi encontrada (BOS et al., 2005).



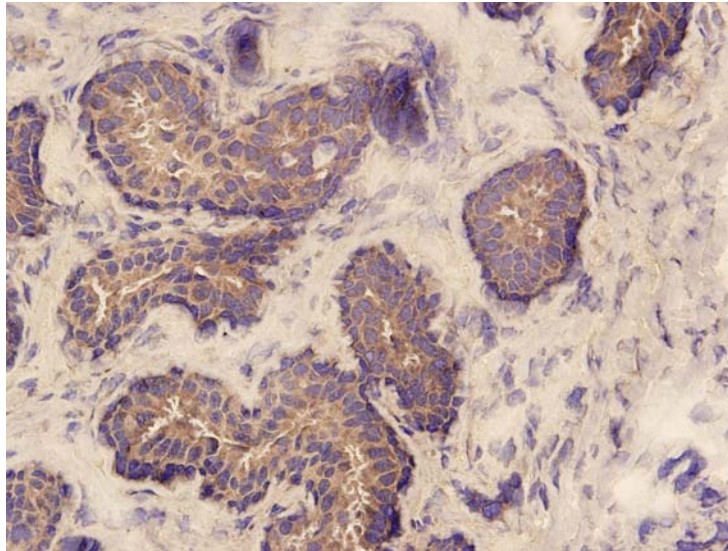


Figura 4: Paciente com forte expressão de VEGF em análise imunohistoquímica. DAB, 400x.

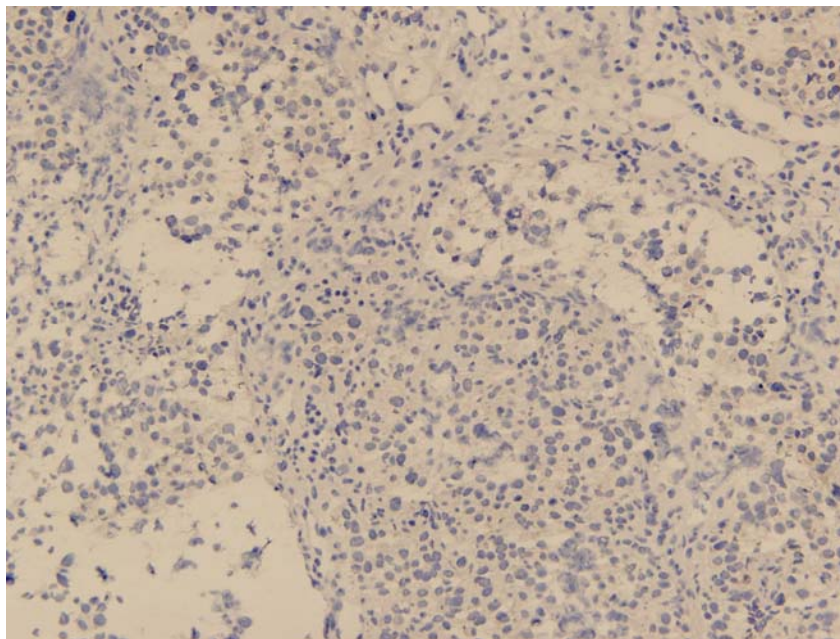


Figura 5. Paciente com ausência de marcação pelo VEGF em microscopia. DAB, 100x.

### 3.5 Análise dos Dados

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

#### 4. RESULTADOS

Do total de 30 pacientes, a média/desvio-padrão e mediana de idade foram de, respectivamente,  $51,6 \pm 12,6$  e 52 anos. Em relação ao tamanho tumoral, a média dos nódulos mamários observados nas pacientes do estudo foram de  $6,0 \pm 4,2$  (2,7-25) cm.

Com relação a expressão dos receptores hormonais, 36,7% dos casos de nossa amostra foram negativos para receptores de estrogênio e 63,3% positivos para RE. Nesta amostragem, 46,7% foram positivos para receptores de progesterona e 53,3% negativos para RP. A superexpressão de HER-2 foi presente em 33,3% dos tumores e ausentes em 66,7% deles. A expressão da proteína do VEGF foi positiva em 19 casos (63,3%).

Na amostragem, 13 casos apresentaram resposta clínica completa, sendo que destes, 6 casos tiveram resposta patológica completa.

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

Variável	Número	%
<b>RE</b>		
Negativo	11	36,7
Positivo	19	63,3
<b>RP</b>		
Positivo	14	46,7
Negativo	16	53,3
<b>Cerb-B2</b>		
Positivo	10	33,3
Negativo	20	66,7
<b>VEGF</b>		
Negativo	11	36,7
Positivo	19	63,3
<b>Total</b>	30	100,0

Não houve relação da expressão da proteína VEGF com a condição clínica de menopausa ( $p=0,91$ ), assim como também não houve relação entre expressão da proteína VEGF e tamanho tumoral ( $p=0,76$ ), comprometimento axilar ( $p=0,70$ ), ou estágio clínico ( $p=0,74$ ). Foi avaliada ainda a correlação com grau tumoral ( $p=0,68$ ), receptores estrogênicos ( $p=0,98$ ), receptores de progesterona ( $p=0,92$ ) e cerb-B2 ( $p=0,79$ ), todos sem significância.

A avaliação entre resposta clínica ao tratamento e expressão da proteína VEGF não demonstrou correlação ( $p=0,46$ ), porém a resposta patológica está diretamente relacionada à expressão de VEGF pré tratamento ( $p=0,04$ ).

Tabela 3. Comparação entre a expressão do VEGF e características das pacientes e tumorais. Ribeirão Preto, 2010.

Variáveis	Expressão de VEGF		p*
	Negativo (%)	Positivo(%)	
<b>Faixa etária (anos)</b>			0,79
< 50	4 (40)	6 (60)	
50 +	7 (35)	13 (65)	
<b>Tamanho tumoral (cm)</b>			0,76
Até 4,9	4 (33,3)	8 (66,7)	
5 e +	7 (38,89)	11 (61,11)	
<b>Estadio clínico (TNM)</b>			0,74
IIA	2 (50)	2 (50)	
IIB	2 (50)	2 (50)	
IIIA	4 (40)	6 (60)	
IIIB	2 (28,57)	5 (71,43)	
IIIC	1 (50)	1 (50)	
IV	0 (0)	3 (100)	
<b>Grau</b>			0,68
I	1 (33,33)	2 (66,67)	
II	7 (43,75)	9 (56,25)	
III	3 (27,27)	8 (72,73)	
<b>Status hormonal</b>			0,91
Menopausa	6 (37,50)	10 (62,50)	
Pré-menopausa	5 (35,71)	9 (64,29)	
<b>Resposta clínica</b>			0,46
Completa	4 (30,77)	9 (69,23)	
Incompleta/ausente	5 (45,5)	6 (54,5)	
<b>Resposta patológica</b>			0,04
Completa	0 (0)	6 (100)	
Incompleta/ausente	7 (33,33)	8 (53,33)	
<b>Status axilar</b>			0,70
Positivo	5 (33,33)	10 (66,67)	
Negativo	6 (40)	9 (60)	
<b>RE</b>			0,98
Positivo	7 (36,84)	12 (63,16)	
Negativo	4 (36,36)	7 (63,64)	
<b>RP</b>			0,92
Positivo	5 (35,71)	9 (64,29)	
Negativo	6 (37,50)	10 (62,50)	
<b>Cerb2</b>			0,79
Positivo	7 (35)	13 (65)	
Negativo	4 (40)	6 (60)	

\* Teste de Fisher – &lt; 0,05 – estatisticamente significante

## 5. DISCUSSÃO

Nosso estudo analisou a relação da expressão da proteína VEGF em carcinoma de mama de pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante. Nós observamos que pacientes com tumores com alta expressão da proteína VEGF apresentam uma maior taxa de resposta patológica completa quando comparadas com pacientes com baixa ou nenhuma expressão desta proteína. Podemos levantar a hipótese que este marcador poderia ser adequado para a seleção de pacientes com CMLA a serem submetidas à quimioterapia neoadjuvante com ganhos significativos em termos de sobrevida e intervalo livre de doença.

Os carcinomas de mama localmente avançados (CMLA) têm sido considerados um desafio terapêutico dentro da oncologia, posto que o seu prognóstico é 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, proporcionar o tratamento cirúrgico em pacientes com tumores inoperáveis bem como aumentar as taxas de cirurgias conservadoras da mama. Embora nenhum estudo tenha demonstrado benefício em termos de sobrevida global em pacientes submetidas a tratamento neoadjuvante quando comparadas com o grupo tratado com quimioterapia adjuvante, o subgrupo de

pacientes que apresenta resposta patológica completa apresenta ganho na sobrevida global (BEAR et al., 2006, NSABP -B27).

A observação de que pacientes com resposta completa ao tratamento apresentam melhor prognóstico está em acordo com a sensibilidade do tumor ao tratamento citotóxico utilizado. Assim, a busca por fatores de predição de resposta se faz necessária para selecionar pacientes que mais se beneficiarão do tratamento evitando os efeitos adversos em pacientes com baixa probabilidade de resposta.

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 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, que apresenta duas formas solúveis e detectáveis no sangue periférico (FERRARA N, 1999; FERRARA N, et al 2003), e outras duas que não são solúveis, e detectáveis somente por imunohistoquímica (PRADEEP et al, 2005). 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). 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 estadios variados, com franca predominância de estadios iniciais, encontrou valores de VEGF de 132 pg/ml para o grupo de tumores e 92 pg/ml para os controles. Garieri et al. (2008) não encontrou correlação significativa entre volume tumoral e valores plasmáticos de VEGF ( $p=0,7$ ), o que se deve ao fato de termos nesta

casuística somente tumores localmente avançados e não uma variação de tamanhos.

Os tumores mais bem diferenciados, de menor grau nuclear e citoplasmático estão relacionados à expressão positiva dos receptores hormonais de estrógeno (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 (ANDRADE et al, 1994). 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 trabalho prévio de nosso grupo (GARIERI et al, 2008). Na atual casuística, com avaliação da expressão desta proteína por imunohistoquímica não encontramos correlação positiva nesta condição, provavelmente pela pequena amostra estudada.

Os tumores que apresentam superexpressão da proteína HER-2 apresentam um crescimento rápido, desorganização estrutural e citológica importantes, axilas extensamente comprometidas, e uma pior performance em termos de sobrevida global e livre de doença (HENNESSY et al, 2005). Assim, os valores de VEGF são mais elevados, com a angiogênese acelerada e diretamente relacionada com este comportamento biológico do tumor (FIDLER et al, 1994). Em nossa casuística, no entanto, não encontramos tal correlação.

As hipóteses que justificam o achado do estudo da correlação entre a expressão da proteína VEGF e resposta patológica completa seriam a melhor perfusão tecidual e menor número de células primordiais nestes tumores. Uma vez que a presença da proteína VEGF promove aumento da neoangiogênese e da

permeabilidade vascular, poderíamos inferir que os agentes citotóxicos poderiam atuar mais facilmente nesta população celular.

Outra hipótese seria que os tumores com alta expressão da proteína VEGF apresentam menor número de células primordiais, que estariam relacionadas a resistência quimioterápica (DAVE et al, 2009). Estas células parecem depender de um microambiente caracterizado por hipóxia, o que não teríamos nos tumores com maior densidade vascular.

Novos trabalhos serão necessários para a consolidação da expressão do VEGF como fator preditivo e prognóstico do câncer de mama localmente avançado e fator decisivo para a indicação de tratamento quimioterápico neoadjuvante.



## 6. CONCLUSÕES

1. A expressão da proteína VEGF no período pré quimioterapia tem correlação, nesta casuística, com a resposta patológica completa pós quimioterapia.
2. Não há correlação entre a expressão da proteína VEGF com o tamanho tumoral, grau histológico e comprometimento axilar.
3. Não há correlação entre a expressão da proteína VEGF com a presença ou ausência de receptores de estrogênio e progesterona ou com a superexpressão do HER2.

## 7. BIBLIOGRAFIA

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

Andrade JM, Marana HCK, Sarmiento Filho JM, Murta EFC, Llorachvelludo MA, Bighetti S. Indicadores clínicos com valor prognóstico no tratamento neoadjuvante de carcinoma avançado de mama. *Acta Onc Brasil* 1994;14:180-6.

Atkins HL, Horrigan WD. Treatment of locally advanced carcinoma of the breast with roentgen therapy and simple mastectomy. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1961;85:860-4.

Barrett C, Magee H, O'Toole D, Daly S, Jeffers M. Amplification of the HER2 gene in breast cancers testing 2+ weak positive by HercepTest immunohistochemistry: false-positive or false-negative immunohistochemistry? *J Clin Pathol* 2007;60:690-3.

Bear HD. Indications for neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Semin Oncol* 1998;25:3-12.

Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al. 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. *J Clin Oncol* 2006;24:2019-27.

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

Bos R, van Diest PJ, van der Groep P, Shvarts A, Greijer AE, van der Wall E. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related. *Breast Cancer Res* 2004;6:R450-9.

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

Chang E, Lee A, Lee E, et al. HER-2/neu oncogene amplification by chromogenic in situ hybridization in 130 breast cancers using tissue microarray and clinical follow-up studies. *J Korean Med Sci* 2004;19:390-6.

Dave B, Chang J. Treatment resistance in stem cells and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;14:79-82.

De Lena M, Zucali R, Viganotti G, Valagussa P, Bonadonna G. Combined chemotherapy-radiotherapy approach in locally advanced (T3b-T4) breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1978;1:53-9.

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

Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77:527-43.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.

Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994;79:185-8.

Fletcher GH. Local results of irradiation in the primary management of localized breast cancer. *Cancer* 1972;29:545-51.

Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:5407-14.

Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-8.

Furstenberger G, von Moos R, Lucas R, et al. Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94:524-31.

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

Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN. Individualization of neoadjuvant therapy for breast cancer according to molecular tumor characteristics. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:598-9.

Hortobagyi GN. Comprehensive management of locally advanced breast cancer. *Cancer* 1990;66:1387-91.

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* 1999;17:460-9.

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

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* 2000;18:1423-31.

Macaskill EJ, Renshaw L, Dixon JM. Neoadjuvant use of hormonal therapy in elderly patients with early or locally advanced hormone receptor-positive breast cancer. *Oncologist* 2006;11:1081-8.

Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:188-94.

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

Peintinger F, Buzdar AU, Kuerer HM, et al. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol* 2008;19:2020-5.

Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther* 2005;4:315-21.

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

Sachelarie I, Grossbard ML, Chadha M, Feldman S, Ghesani M, Blum RH. Primary systemic therapy of breast cancer. *Oncologist* 2006;11:574-89.

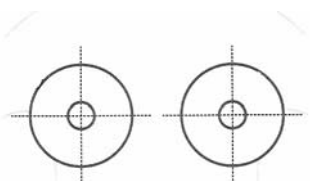
Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002;161:947-56.

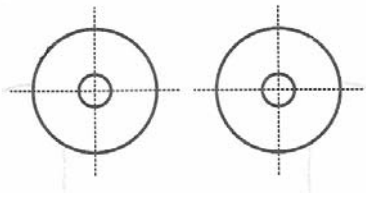
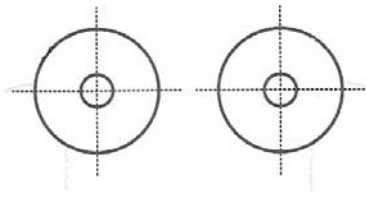
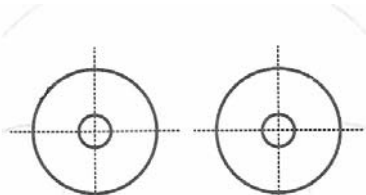
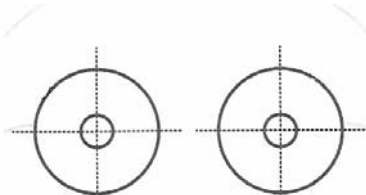
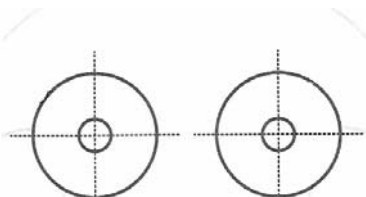
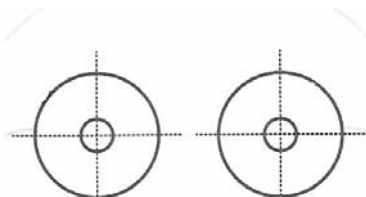
Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.

Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001;2:667-73.

**APÊNDICE**

**Apêndice 1 - Formulário de Coleta de Dados Amostrais**

<b>Nome:</b>								
<b>Número da biópsia:</b>	<b>Registro:</b>	<b>Data da biópsia:</b>						
<b>Data do caso novo:</b>		<b>Data de nascimento:</b>						
<b>Idade:</b>		<b>Consentimento:</b>						
<b>Procedência:</b>		<b>Telefone:</b>						
<b>Menarca:</b>		<b>DUM:</b>						
<b>Paridade:</b>		<b>Primeira gestação:</b>						
<b>Antecedentes familiares:</b>		<b>Hábitos:</b>						
<b>Uso de ACO:</b>		<b>Uso de TH:</b>						
<b>Patologias:</b>		<b>Medicações em uso:</b>						
<b>H.M.A.:</b>								
<b>Exame Físico:</b>		<b>Pele:</b>						
		<b>Parede torácica:</b>						
		<b>Axila:</b>						
								
<b>Estadiamento Clínico: T</b>								
<table border="0"> <tr> <td style="text-align: center;">N</td> <td style="text-align: center;">EC</td> <td style="text-align: center;">➔</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">M</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			N	EC	➔	M		
N	EC	➔						
M								
<b>Mamografia:</b>								
<b>Us de mamas:</b>								
<b>RNM de mamas:</b>								
<b>Punção biópsia aspirativa:</b>								
<b>Exames de estadiamento</b>								
<b>Rx de tórax:</b>								
<b>Us de abdome:</b>								
<b>Cintilografia:</b>								
<b>Outros exames de imagem:</b>								
<b>Diagnóstico histológico</b>								
<b>Número da biópsia na patologia:</b>								
<b>Tipo:</b>								
<b>Grau de diferenciação:</b>		<b>Invasão angiolinfática:</b>						
<b>Receptor de estrogênio:</b>		<b>Receptor de progesterona:</b>						
<b>c-erb-B2:</b>		<b>p53:</b>						
<b>Data:</b>		<b>Data:</b>						
<b>Quimioterapia:</b>		<b>Quimioterapia:</b>						
<b>Toxicidade da quimioterapia:</b>		<b>Toxicidade da quimioterapia:</b>						

	
<p><b>Data:</b> <b>Quimioterapia:</b></p> <p><b>Toxicidade da quimioterapia:</b></p> 	<p><b>Data:</b> <b>Quimioterapia:</b></p> <p><b>Toxicidade da quimioterapia:</b></p> 
<p><b>Data:</b> <b>Quimioterapia:</b></p> <p><b>Toxicidade da quimioterapia:</b></p> 	<p><b>Data:</b> <b>Quimioterapia:</b></p> <p><b>Toxicidade da quimioterapia:</b></p> 
<p><b>Resposta clínica:</b></p>	
<p><b>Data da cirurgia:</b></p>	
<p><b>Cirurgia realizada:</b></p>	
<p><b>Patologia:</b></p> <p><b>Tipo histológico:</b></p> <p><b>Grau:</b></p> <p><b>Receptor de estrogênio:</b></p> <p><b>c-erb-B2:</b></p> <p><b>Tamanho do tumor:</b></p> <p><b>Margens:</b></p> <p><b>Axila:</b></p> <p><b>Invasão angiolinfática:</b></p> <p><b>Receptor de progesterona:</b></p> <p><b>p53:</b></p>	
<p><b>Resposta patológica:</b></p>	
<p><b>Programação de tratamento:</b></p>	
<p><b>Dados do experimento pré-Qtx:</b></p>	

## Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, Viviane Fernandes Schiavon, médica e pós-graduanda do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, estou desenvolvendo um estudo com pacientes portadoras de tumor maligno na mama, como é o seu caso. O título do estudo é: Avaliação da produção de VEGF por macrófagos intratumorais em tumores de mama submetidos a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina. O objetivo é analisar algumas substâncias que são produzidas pelo tumor, avaliando se após a quimioterapia houve diferença na sua produção.

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

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

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

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

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

Como todos estes procedimentos que a senhora realizará fazem parte do seu tratamento, não ocorrendo nenhuma mudança ou necessitando de nenhuma consulta



adicional, a senhora não receberá nenhuma ajuda financeira ou ressarcimento e não terá nenhum custo adicional para participar do estudo.

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

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

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

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

Eu, \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, aceito participar da pesquisa intitulada **“Avaliação da produção de VEGF por macrófagos intratumorais em tumores de mama submetidos a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina”**.

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Dra. Viviane Fernandes Schiavon

\_\_\_\_\_  
Ribeirão Preto, / / Testemunha\*

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

## Apêndice 3 – Classificação Clínica TNM para Câncer de Mama

### Estadiamento do AJCC 2002

T- Tumor primário

T1 – Tumor  $\leq$  2 cm na maior extensão

T1 mic – microinvasão  $\leq$  0,1cm

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

T1b -  $>$  0,5cm e  $\leq$  1cm

T1c -  $>$  1cm e  $\leq$  2cm

T2 – Tumor  $>$  2cm e  $\leq$  5cm na maior dimensão

T3 – Tumor  $>$  5cm na maior dimensão

T4 – Tumor de qualquer tamanho com:

T4a – extensão à parede torácica

T4b – extensão à pele

T4c – ambos

T4d – câncer inflamatório

N- Linfonodos regionais

N1 – Linfonodos axilares ipsilaterais móveis

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

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

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

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

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

M- Metástases à distância

M1 – metástase à distância

**Apêndice 4 – Agrupamento dos Estádios Clínicos TNM**

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

## Apêndice 5 – Termo de Aprovação pelo Conselho de Ética



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

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 12 de junho de 2008

Ofício nº 2079/2008  
CEP/MGV

**Prezados Senhores,**

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VEGF POR MACRÓFAGOS INTRATUMORAIS EM TUMORES DE MAMA SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE COM DOCETAXEL E EPIRRUBICINA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **“AD REFERENDUM”** e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9345/2007.

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

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

Atenciosamente.

**DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores  
**PROF. DR. HEITOR RICARDO COSISKI MARANA**  
**VIVIANE FERNANDES SCHIAVON (Orientanda)**  
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

## Autorização

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte

Viviane Fernandes Schiavon

Instituição: Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Local: Ribeirão Preto, São Paulo

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900

CEP.: 14048-900

Ribeirão Preto – São Paulo

E-mail: vfschiavon@hotmail.com