



**Bertha Andrade Coelho**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM MULHERES COM  
CÂNCER DE MAMA**

**Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva  
Filho**

**Co-orientador: Prof. Dr. Gilberto Uemura**

**Mestrado**

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU  
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

UNESP

2013

**BERTHA ANDRADE COELHO**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MULHERES  
COM CÂNCER DE MAMA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, para obtenção do título de Mestre.**

**ORIENTADOR: PROF. DR. AGNALDO LOPES DA SILVA FILHO**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO UEMURA**

**BOTUCATU**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Coelho, Bertha Andrade.

Avaliação da resposta inflamatória em mulheres com câncer de mama /  
Bertha Andrade Coelho. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Medicina de Botucatu

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho

Co-orientador: Gilberto Uemura

Capes: 40101150

1. Mamas – Câncer. 2. Endotélio vascular – crescimento. 3. Enzimas.  
4. Mamas – Inflamação.

Palavras-chave: Câncer de mama; Inflamação; MPO; NAG; VEGF.



*“Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.”*

*João Guimarães Rosa*

# **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação à minha família:  
Gustavo, Pai, Mãe, Sophia, Alexandre e Roberto.

# **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**





Sou imensamente grata ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, pessoa tão jovem e de tão grande saber, por quem tenho profunda admiração. Muito obrigada pela oportunidade deste estudo e por sempre ter deixado abertas as portas da Pós-Graduação.

Ao Professor Gilberto Uemura, pela acolhida e disponibilidade desde sempre, muito obrigada.

# **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à vida, e à felicidade de ter encontrado algumas pessoas em meus caminhos:

Ao Professor Washington Cançado de Amorim, que há mais de 30 anos faz parte da história da minha família – por suas mãos nasci, por meio delas aprendi minha profissão.

Ao Professor Jaime Escallon, seu exemplo e conselhos direcionaram minha carreira para a Mastologia.

Aos Drs. Cláudio Saliba de Avelar, Gabriel de Almeida Silva Júnior e Henrique Lima Couto, que me ensinaram a ver além do palpável.

Aos médicos do Serviço de Mastologia do Hospital das Clínicas da UFMG, pela grande oportunidade de aprendizado e crescimento.

À Professora Andrezza Vilaça Belo, pela constante orientação, disponibilidade, e pontuações fundamentais.

Às Professoras Suzane Pretti Figueiredo Neves e Sílvia Passos Andrade, do Laboratório de Sorologia do Hospital das Clínicas e do Laboratório de Angiogênese do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por disponibilizarem seus laboratórios para que este estudo pudesse acontecer.

À Professora Helenice Gobbi, por seus valiosos comentários nas disciplinas eletivas de Patologia Mamária.

À Luciana Cangussu, pelo carinho e feliz convivência em minhas idas à Botucatu.

Aos meus tios Alexandre e Dione Coelho, pelas amorosas acolhidas em minhas passagens por São Paulo.

Aos meus colegas residentes, que sempre estiveram presentes quando precisei me ausentar.

À Júnia Boroni, pela grande ajuda em momento importante deste estudo.

À Ana Cláudia, pela disponibilidade na Pós-Graduação sempre que precisei.

# ÍNDICE

<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>14</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Câncer de Mama.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Sistema Imunológico e Tumorigênese.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Marcadores Inflamatórios.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.1 NAG.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.2 MPO.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.3 VEGF.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4 Conclusão.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5 Referências.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>36</b>
<b>3. Publicação.....</b>	<b>37</b>
<b>Artigo.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>62</b>
<b>5. Anexos.....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo III – Ficha Clínica.....</b>	<b>68</b>

# **LISTA DE ABREVIATURAS**

### Lista de Abreviaturas

<b>NAG</b>	<i>N-acetilglucosaminidase</i>
<b>MPO</b>	<i>Myeloperoxidase</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>ACS</b>	<i>American Cancer Society</i>
<b>PROs/ROS</b>	Produtos Reatores do Oxigênio / <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>TH1</b>	<i>T Helper 1</i>
<b>TH2</b>	<i>T Helper 2</i>
<b>MATs</b>	Macrófagos Associados a Tumor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa
<b>mL/dL</b>	Mililitro / Decilitro
<b>rpm</b>	Rotações por Minuto
<b>OD</b>	<i>Optical Density</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>ng</b>	Nanograma
<b>BMI</b>	<i>Body Mass Index</i>
<b>ER</b>	<i>Estrogen Receptor</i>
<b>PR</b>	<i>Progesterone Receptor</i>
<b>Her-2</b>	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>



# **RESUMO**

As células inflamatórias estão presentes no câncer de mama e podem promover o desenvolvimento do tumor assim como estimular imunidade anti-tumoral. A N-acetilglucosaminidase (NAG) é utilizada para detectar o acúmulo/ativação de macrófagos teciduais. A mieloperoxidase (MPO) é considerada marcador de acúmulo/ativação de neutrófilos. O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é potente citocina pró-angiogênica. O objetivo deste estudo foi medir a resposta inflamatória sistêmica, medindo os níveis séricos de MPO, NAG, e VEGF em mulheres diagnosticadas com câncer de mama e associar esta resposta ao infiltrado inflamatório peritumoral e a fatores prognósticos. As amostras de soro obtidas de mulheres sem evidências de doenças (n=31) e com câncer de mama (n=68) foram analisadas por meio de ensaio enzimático para obter-se a atividade de MPO, NAG, e VEGF. Os níveis séricos de NAG e VEGF foram maiores em voluntários saudáveis ( $p<0,0001$ ) e os níveis séricos de MPO foram maiores em pacientes com câncer de mama ( $p=0,002$ ). Os níveis séricos de NAG apresentaram correlação positiva com os níveis séricos de MPO e VEGF ( $p<0,0001$  e  $p=0,0012$ , respectivamente), assim como os níveis de MPO e VEGF ( $p=0,0018$ ). O infiltrado inflamatório não foi associado aos níveis séricos dos marcadores inflamatórios, e níveis mais elevados de MPO foram associados à negatividade para invasão linfovascular ( $p=0,0175$ ).

**Palavras-chave:** Câncer de mama; N-acetilglucosaminidase (NAG); Mieloperoxidase (MPO); Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).

# **INTRODUÇÃO**

## **1. Introdução**

### **1.1. Câncer de Mama**

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 20% a 29% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA, 2012; Siegel et al, 2012). O número de casos novos desta patologia que foram esperados para o Brasil em 2012 foi de 52.680, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

Os fatores de risco tradicionais para o câncer de mama, excetuando-se a presença de câncer de mama em um parente de primeiro grau, são primariamente relacionados a eventos hormonais e reprodutivos (Ambrosone, 2000). Características ou comportamentos que resultam em exposição prolongada a estrógenos, tais como menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, terapia de reposição hormonal e menopausa tardia, estão associadas a risco aumentado para câncer de mama (Ambrosone, 2000; INCA, 2012; ACS, 2012). Fatores genéticos também estão associados ao maior risco de desenvolvimento do câncer de mama. Mulheres que apresentam mutação nos genes BRCA1, BRCA2 e p53 têm risco aumentado de desenvolver esta neoplasia (INCA, 2012).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (INCA, 2012). A sobrevida média após cinco anos de diagnóstico e tratamento na população em países desenvolvidos é de 85%, enquanto em países em desenvolvimento está em torno de 60% (INCA, 2012). Um estudo recente relatou sobrevida média em cinco anos de 12% em alguns países da África e de até 90% nos

Estados Unidos da América, Canadá e Austrália (Youlden et al, 2012). Esta diferença provavelmente está ligada à detecção precoce, melhor acesso a tratamento e também a diversidades culturais (Youlden et al, 2012). Melhorias observadas na sobrevida do câncer de mama em países desenvolvidos nas últimas décadas têm sido atribuídas à introdução da mamografia como método de rastreamento com base populacional e ao uso sistêmico de terapias adjuvantes (ACS, 2012).

A alta prevalência do câncer de mama motiva o desenvolvimento de melhores tecnologias para o rastreamento e diagnóstico desta patologia. Para complementar a mamografia, método que possui sensibilidade e especificidade moderadas, principalmente em mulheres jovens, algumas proteínas têm sido investigadas quanto à sua eficácia em detectar o câncer de mama. Proteínas oferecem informações detalhadas sobre as condições dos tecidos, permitem a identificação do tipo de câncer e do seu grau de agressividade, potencialmente contribuindo para diagnóstico e tratamento direcionados e mais efetivos para a doença (Jesneck et al, 2009).

Marcadores tumorais podem ser utilizados em rastreamento populacional quando têm elevada sensibilidade e baixo custo, mas não necessariamente elevada especificidade. De maneira inversa, para detecção de recorrência de doença, o marcador deve ser altamente específico, e a sensibilidade não necessariamente alta. Tumores sólidos causam alterações nos tecido adjacentes, e é provável que alguns marcadores possam medir a resposta do organismo ao câncer. Proteínas séricas ou plasmáticas são utilizadas rotineiramente para rastreamento para algumas neoplasias, como acontece no câncer de ovário e no de próstata (Jesneck et al, 2009).

Neoplasias malignas são o resultado do acúmulo de mutações em oncogenes e em genes supressores tumorais (van Kempen et al, 2006). No entanto, as interações que mantêm células mutadas vivas e provém estímulo para seu crescimento permanecem

desconhecidas (DeNardo & Coussens, 2007). Durante o crescimento tumoral diversas proteínas são secretadas na corrente sanguínea. Estas proteínas séricas podem refletir o estado fisiológico ou patológico do organismo, servindo como marcadores para melhor compreensão sobre o comportamento e atividade da doença.

## **1.2. Sistema Imunológico e Tumorigênese**

A presença de leucócitos ao redor de tumores, observada no século XIX por Rudolf Virchow, foi a primeira sinalização de uma possível conexão entre inflamação e câncer (Balkwill & Mantovani, 2001; van Kempen et al, 2006; Grivennikov et al, 2010). No entanto, foi durante a última década que evidências foram obtidas, elucidando o papel crítico da inflamação na tumorigênese (Grivennikov et al, 2010).

Existem diversas áreas de evidência que conectam câncer e inflamação: muitas doenças inflamatórias crônicas estão associadas a risco aumentado de câncer; neoplasias surgem em locais de inflamação crônica; muitas das células associadas a processos inflamatórios crônicos são encontradas em tumores; mediadores inflamatórios são encontrados em diversos cânceres; a deleção de mediadores celulares ou químicos da inflamação inibe o crescimento e disseminação do câncer; e uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroidais reduz o risco de mortalidade por determinados tipos de cânceres (Balkwill, 2006).

Tumores são tecidos complexos constituídos por células neoplásicas em constante evolução. Respostas inflamatórias precoces e persistentes são identificadas em neoplasias em desenvolvimento. Estas células inflamatórias regulam o crescimento dos tumores (remodelamento da matriz extra-celular, angiogênese, potencial metastatizante) por meio da produção de mediadores que mantém a homeostase tecidual, como fatores

de crescimento, enzimas, produtos reatores do oxigênio (PROs) e outras moléculas bioativas (van Kempen et al, 2006).

A inflamação exerce impacto em cada etapa da tumorigênese, desde a iniciação tumoral até a instalação de doença metastática. Células do sistema imunológico afetam células malignas por meio de produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas, PROs e nitrogênio. Em tumores em desenvolvimento coexistem mecanismos antitumorigênicos e protumorigênicos, imunes e inflamatórios. A inflamação crônica aumenta o risco de câncer, como demonstrado nas doenças inflamatórias intestinais (Grivennikov et al, 2010). Desta forma, o conceito de que apenas mutações pontuais são necessárias para o desenvolvimento de um tumor é incompleto. Células do sistema imune inato e adaptativo são necessárias para os tumores adquirirem características teciduais malignas (van Kempen et al, 2006; DeNardo & Coussens, 2007).

O microambiente tumoral contém células da imunidade inata (incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e *natural killers* (NK)), células da imunidade adaptativa (linfócitos T e B), além das células neoplásicas e seu estroma adjacente (fibroblastos, células endoteliais, células mesenquimais). Estas células diversas comunicam-se por meio da produção de citocinas ou quimiocinas, agindo de maneira autócrina ou parácrina para controlar e moldar o crescimento tumoral. É a expressão de mediadores e moduladores imunológicos variados assim como a abundância e ativação de diferentes tipos celulares no microambiente tumoral que dita qual via será a predominante – a via promotora ou a imunidade anti-tumoral. Em tumores estabelecidos, é a inflamação pró-tumoral a via dominante, como visto em tumores avançados que, sem intervenção terapêutica, raramente regridem (Grivennikov et al, 2010).

Historicamente, pensava-se que leucócitos encontrados dentro ou ao redor de tumores tinham a função de erradicar células neoplásicas. No entanto, estes mesmos leucócitos podem propiciar o crescimento e desenvolvimento tumorais. Células do sistema imune adaptativo controlam a atividade de células da linhagem mielóide, alterando o equilíbrio entre suas atividades pró e anti-tumorigênicas. Quando a resposta do hospedeiro a células neoplásicas resulta em produção de citocinas da resposta TH1, as células mielóides agem propiciando a regressão tumoral. Quando o sistema imune adaptativo induz a produção de citocinas TH2, as células mielóides contribuem para a progressão tumoral e metástase, por meio de imunossupressão, angiogênese, remodelamento tecidual e invasão (DeNardo et al, 2010).

O desenvolvimento do câncer de mama e sua progressão são dependentes de complexas interações entre o tumor e a resposta inflamatória do hospedeiro. No entanto, a relação entre diferentes aspectos do infiltrado inflamatório e o câncer de mama é pouco conhecida. Um estudo recente demonstrou que a presença de infiltrado inflamatório no câncer de mama relaciona-se positivamente a diversos fatores prognósticos, como alto grau histológico, negatividade para receptores de estrógeno e progesterona e invasão vascular (Mohammed et al, 2012). Este estudo também demonstrou que linfócitos e macrófagos são as principais células presentes no infiltrado inflamatório peritumoral no câncer de mama (Mohammed et al, 2012). Macrófagos associados a tumor (MATs) são componentes importantes no infiltrado da maioria dos tumores. Um estudo prévio demonstrou que a presença de MATs está fortemente correlacionada à intensidade da inflamação tumoral (Schoppmann et al, 2006).

Quando ativados, estes macrófagos podem destruir células tumorais ou provocar reações de destruição tecidual principalmente no endotélio vascular (Leek et al, 1998; Balkwill & Mantovani, 2001). No entanto, MATs também produzem fatores de



crescimento e angiogênicos assim como proteases que degradam a matriz extracelular. Portanto estes macrófagos podem estimular a proliferação de células tumorais, promover a angiogênese e favorecer invasão e metástase (Balkwill & Mantovani, 2001). Interessantemente, um estudo prévio demonstrou em modelo experimental que quando a atividade tumoral de macrófagos está suprimida, neutrófilos são recrutados, provendo um suporte alternativo à angiogênese e progressão tumoral (Pahler et al, 2008).

Tumores possuem e adquirem características e habilidades para manter sua sobrevivência e desenvolvimento. Entre elas estão a capacidade de manter a sinalização proliferativa, evadir a mecanismos supressores de crescimento, resistir à morte celular, perpetuar sua capacidade replicativa, induzir a angiogênese e ativar a invasão e metástase. Subjacentes a estas características estão a instabilidade genômica, a inflamação, o desequilíbrio do metabolismo energético celular e a capacidade de evasão à destruição imune, objetos de incontáveis estudos na última década (Mantovani et al, 2008; Hanahan & Weinberg, 2011).

### **1.3. Marcadores Inflamatórios**

#### **1.3.1. N-Acetilglucosaminidase (NAG)**

A N-Acetilglucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossomal amplamente distribuída nas células humanas e está relacionada a uma variedade de doenças, incluindo microangiopatia e diabetes. Sua atividade sérica pode estar aumentada em algumas neoplasias, como em cânceres de estômago, fígado, pâncreas e mama, em comparação com sua atividade em amostras de sangue de indivíduos aparentemente normais (Luqmani et al, 1999). No entanto, um estudo prévio demonstrou que níveis séricos de NAG estão diminuídos em pacientes portadoras de câncer de colo uterino quando comparados a mulheres saudáveis (Lages et al, 2011). O mecanismo de

liberação celular tumoral da n-acetilglucosaminidase provavelmente envolve exocitose lisossomal. Mudanças nos níveis plasmáticos das glucosaminidases podem levar a mudanças estruturais e funcionais em uma célula em uma multiplicidade de locais. Níveis aumentados de glucosidases podem promover aumento na liberação de células do tumor primário, invasão local e podem ser responsáveis por mudanças na estrutura de superfície das células tumorais. Estas mudanças favorecem a formação de trombos de células neoplásicas e sua implantação secundária na microcirculação (Bernacki et al, 1985).

A NAG é enzima predominantemente produzida por macrófagos, e sua atividade sérica pode ser empregada como meio de avaliação indireta da concentração ou ativação de macrófagos teciduais (Xavier et al, 2010; Lamaita et al, 2012). Estudos prévios associam a presença de MATs a fatores de pior prognóstico em câncer de mama (Al Murri et al, 2008; Pollard, 2008; Heys et al, 2012).

### **1.3.2. Mieloperoxidase (MPO)**

Neutrófilos são células da imunidade inata que aumentam a capacidade de invasão de células neoplásicas quando associados a tumores. Também estão relacionados à carcinogênese por produzirem os PROs (van Kempen et al, 2006).

O estresse oxidativo tem um papel importante na carcinogênese (Josephy, 1996). Oxidantes são formados em resposta a processos endógenos e exógenos, causando danos a importantes macromoléculas celulares. Em resposta ao aumento de oxidantes, defesas anti-oxidantes, incluindo moléculas enzimáticas e não-enzimáticas são ativadas por meio de inúmeras vias de sinais de transdução que contrabalanceiam os efeitos dos PROs. O desequilíbrio entre processos pró e anti-oxidantes é incriminado na patogênese de muitas doenças crônicas, inclusive neoplásicas (Ambrosone, 2000; Li et al, 2009).

A variabilidade na exposição a fatores que podem aumentar os níveis dos PROs determina os níveis de estresse oxidativo teciduais. Os PROs são gerados por inúmeras enzimas, como a mieloperoxidase (MPO) (Ambrosone, 2000; Li et al, 2009; He et al, 2009), ou por processos regulatórios como os estimulados pelo fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Defesas endógenas que combatem os PROs incluem a glutathione peroxidase, a catalase e a superóxido desmutase. Estas enzimas formam a primeira linha de defesa contra os superóxidos e o peróxido de hidrogênio. Os produtos resultantes da oxidação podem danificar o DNA, proteínas e lipídeos, e requerem detoxificação posterior. Esta segunda linha de defesa contra os PROs é realizada por enzimas como a glutathione peroxidase e as glutathione S-transferases. Muitas destas enzimas são polimórficas e o risco de câncer de mama relacionado ao estresse oxidativo pode ser alterado por variabilidades interindividuais (Ambrosone, 2000).

Estudos sugerem que um microambiente inflamatório pode aumentar as taxas de mutação, além de aumentar a proliferação de células previamente mutadas. Células inflamatórias ativadas são fontes de PROs, que são capazes de induzir dano ao DNA e a instabilidade genômica (Grivennikov, 2010). Os PROs sabidamente têm um papel central na iniciação, promoção e progressão do câncer. Mutações pontuais, devidas aos PROs, podem ativar oncogenes como o ras-oncogene ou inativar genes supressores tumorais como o p53 (Brandacher et al, 2006).

A MPO é uma enzima que atua como agente antimicrobiano, catalizando a reação entre o peróxido de hidrogênio e o cloreto para gerar o ácido hipocloroso, um agente oxidante tóxico. Esta enzima está presente em neutrófilos (Ambrosone, 2000; He et al, 2009; Koduru et al, 2010; do Carmo et al, 2012), que invadem tecidos inflamados, incluindo a mama, para combater infecção e presumivelmente proteger o leite durante a lactação. Além de sua presença no leite materno, a MPO foi detectada em tecido

mamário neoplásico por meio de imunohistoquímica (Ambrosone, 2000). A MPO, produzida por neutrófilos ativados, pode catalizar a conversão de procarcinogênicos em carcinogênicos e, desta forma, contribuir para o desenvolvimento de neoplasias (Klebanoff, 2005).

A MPO foi considerada uma das melhores proteínas séricas para indicar a presença de neoplasia de mama em mulheres na pré-menopausa (Jesneck et al, 2009), mas, em outro estudo, níveis séricos de MPO não apresentaram diferença estatisticamente significantes entre mulheres portadoras de câncer de mama e mulheres saudáveis (Kim et al, 2009).

### **1.3.3. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)**

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes, e é reconhecida como elemento chave em diversos eventos fisiológicos e patológicos que envolvem neovascularização, como a embriogênese, crescimento tumoral e cicatrização de feridas (Hormbrey et al, 2002; Hanahan & Weinberg, 2011).

A angiogênese tumoral é uma das características biológicas mais importantes que são relacionados ao crescimento de tumores e metástases (Duranyildiz et al, 2009). Para que ocorra o crescimento da neoplasia é necessário que aconteça um aumento no suprimento sanguíneo intratumoral, o que é mediado por hipóxia. Além da hipóxia, a angiogênese tumoral também depende do recrutamento de TAMs (Grivennikov et al, 2010). Estes macrófagos promovem a angiogênese por meio da síntese de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Lin et al, 2006; DeNardo & Coussens, 2007; Pollard, 2008). A produção de VEGF é mecanismo

utilizado pelos leucócitos para aumentar a angiogênese e estimular o crescimento tumoral (de Visser et al, 2006).

O VEGF, por sua vez, é potente citocina responsável pela indução da angiogênese. Foi primeiramente descrito como um fator responsável pelo aumento da permeabilidade vascular em veias da cavidade peritoneal de mamíferos portadores de ascite neoplásica (Carpini et al, 2010). O VEGF é mediador de diversas etapas da vasculogênese tumoral, incluindo proliferação celular endotelial, permeabilidade vascular e vasodilatação, além de ser responsável pela migração, invasão, sobrevivência e recrutamento de progenitores mielóides (Ellis & Hicklin, 2008). É potente recrutador de monócitos e macrófagos, sendo sintetizado por células neoplásicas em uma grande variedade de tumores (Adams et al, 2000; Pollard, 2008). A expansão tumoral é dependente da neovascularização, o que levou ao desenvolvimento de terapias alvo anti-VEGF (Lee et al, 2007). A inibição do VEGF leva a regressão tumoral, mas também a outros efeitos colaterais, como hipertensão e proteinúria (Lee et al, 2007).

Ainda não é claro quais fatores levam ao aumento ou diminuição da síntese do VEGF, assim como sua expressão sérica, plasmática ou tumoral. Estudos prévios relataram aumento dos níveis séricos de VEGF em mulheres portadoras de câncer de mama quando comparadas a mulheres submetidas a cirurgia por doenças benignas da mama e aumento dos níveis plasmáticos em mulheres portadoras de câncer de mama quando comparadas a mulheres normais (Salven et al, 1999; Adams et al, 2000), enquanto outro estudo não encontrou diferença com significância estatística entre os dois grupos de mulheres (Duranyildiz et al, 2009). Já em modelo experimental, foi relatada diminuição da concentração tecidual de VEGF em camundongos portadores de neoplasia (Belo et al, 2004).

#### **1.4. Conclusão**

Medir a concentração sérica de enzimas e citocinas secretadas por tumores é uma maneira pouco invasiva e indireta de se avaliar a atividade tumoral e sua interação com a microcirculação. Evidências clínicas e patológicas indicam que neoplasias estimulam a resposta inflamatória. O estudo de marcadores da inflamação pode propiciar maior entendimento sobre o comportamento biológico do câncer de mama, assim como sinalizar para futuros marcadores de atividade de doença.

#### **1.5. Referências**

Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Breast Cancer: Comparison of Plasma, Serum, and Tissue VEGF and Microvessel Density and Effects of Tamoxifen. *Cancer Res.* 2000;60:2898–905.

Al Murri MA, Hilmy M, Bell J, Wilson C, McNicol a-M, Lannigan a, et al. The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. *Brit J Cancer.* 2008;99(7):1013–9.

Ambrosone CB. Oxidants and Antioxidants in Breast Cancer. *Antioxid Redox Sign.* 2000;2(4):903–17.

American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012. Disponível em: <http://www.cancer.org>

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539–45.

Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metast Rev*. 2006;25(3):409–16.

Belo AV, Barcelos LS, Ferreira M a ND, Teixeira MM, Andrade SP. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sci*. 2004;74(23):2827–37.

Bernacki RJ, Niedbala MJ, Korytnyk W. Glycosidases in cancer and invasion. *Cancer Metast Rev*. 1985;4(1):81–101.

Brandacher G, Winkler C, Schroecksnadel K, Margreiter R, Fuchs D. Antitumoral activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Curr Drug Metab*. 2006;7(6):599–612.

Brasil, Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil, M.d. Saúde, Editor. 2011, Instituto Nacional do Câncer: Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>.

Carpini JD, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis*. 2010;13(1):43–58.

de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):24–37.

DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metast Rev*. 2010;29(2):309–16.

DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007;9(212):1-10.

do Carmo RF, de Almeida DB, Aroucha DCBL, Vasconcelos LRS, de Moraes ACP, de Mendonça Cavalcanti MDS, et al. Plasma myeloperoxidase levels correlate with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hum Immunol.* 2012;73(11):1127–31.

Duranyildiz D, Camlica H, Soydinc HO, Derin D, Yasasever V. Serum levels of angiogenic factors in early breast cancer remain close to normal. *Breast.* 2009;18(1):26–9.

Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):579–91.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883–99.

Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.

He C, Tamimi RM, Hankinson SE, Hunter DJ, Han J. A prospective study of genetic polymorphism in MPO, antioxidant status, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Tr.* 2009;113(3):585–94.

Heys SD, Stewart KN, McKenzie EJ, Miller ID, Wong SYC, Sellar G, et al. Characterisation of tumour-infiltrating macrophages: impact on response and survival in patients receiving primary chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Tr.* 2012;135(2):539–48.



Hormbrey E, Gillespie P, Turner K, Han C, Roberts a, McGrouther D, et al. A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clinical Exp Metastas*. 2002;19(8):651–63.

Jesneck JL, Mukherjee S, Yurkovetsky Z, Clyde M, Marks JR, Lokshin AE, et al. Do serum biomarkers really measure breast cancer? *BMC Cancer*. 2009;9(164):1–13.

Joseph PD. The role of peroxidase-catalyzed activation of aromatic amines in breast cancer. *Mutagenesis*. 1996 Jan;11(1):3–7.

Kim BK, Lee JW, Park PJ, Shin YS, Lee WY, Lee KA, et al. The multiplex bead array approach to identifying serum biomarkers associated with breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11(2):1–12.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase : friend and foe. *J Leukocyte Biol*. 2005;77:598–625.

Koduru B, Tejaswini, Thakur A, Kamath SU, Shenoy KR, Kamath U, et al. Indicators of oxidative stress in thyroid cancer. *Indian J Biochem Bio*. 2010;47(2):121–3.

Lages ELE, Belo AV, Andrade SP, Rocha MA, de Freitas GF, Lamaita RM, et al. Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. *Biomed Pharmacother*. 2011;65(7):496–9.

Lamaita RM, Pontes A, Belo AV, Caetano JP, Andrade SP, Cândido EB, et al. Evaluation of N-acetilglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Journal Obstet Gynaecol Re*. 2012;38(5):810–6.

Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*. 2007;130(4):691–703.

Leek RD, Landers R, Fox SB, Ng F, Harris a L, Lewis CE. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Brit J Cancer*. 1998;77(12):2246–51.

Li Y, Ambrosone CB, Mccullough J, Ahn J, Stevens VL, Thun MJ, et al. Oxidative stress-related genotypes , fruit and vegetable consumption and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009;30(5):777–84.

Lin EY, Li J-F, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik D a, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res*. 2006;66(23):11238–46.

Luqmani Y, Temmim L, Memon a, Abdulaziz L, Parkar a, Ali M, et al. Measurement of serum N-acetyl beta glucosaminidase activity in patients with breast cancer. *Acta Oncol*. 1999;38(5):649–53.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436–44.

Mohammed ZM a, Going JJ, Edwards J, Elsberger B, Doughty JC, McMillan DC. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Brit J Cancer*. 2012;107(5):864–73.

Pahler JC, Tazzyman S, Erez N, Chen Y, Murdoch C, Nozawa H, et al. Plasticity in Tumor-Promoting Inflammation : Impairment of Macrophage Recruitment Evokes a Compensatory Neutrophil Response. *Neoplasia*. 2008;10(4):329–39.

Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukocyte Biol*. 2008;84(3):623–30.

Salven P, Perhoniemi V, Tykkä H, Mäenpää H, Joensuu H. Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res Tr.* 1999;53(2):161–6.

Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, Unger S, Bayer G, Geleff S, et al. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery.* 2006;139(6):839–46.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA-Cancer J Clin.* 2012;62(1):10–29.

van Kempen LCL, de Visser KE, Coussens LM. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer.* 2006;42(6):728–34.

Xavier DO, Amaral LS, Gomes M a, Rocha M a, Campos PR, Cota BDCV, et al. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(3):220–5.

Youlden DR, Cramb SM, Dunn NAM, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(3):237–48.

# **OBJETIVOS**

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Medir a resposta inflamatória sistêmica por meio da dosagem das proteínas MPO, NAG e VEGF em mulheres com diagnóstico de câncer de mama.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Comparar a resposta inflamatória sistêmica entre mulheres saudáveis (grupo controle) e portadoras de câncer de mama.
- Associar a resposta inflamatória sistêmica à resposta inflamatória local em mulheres portadoras de câncer de mama.
- Avaliar a influência dos seguintes fatores prognósticos na concentração sérica de marcadores inflamatórios em mulheres portadoras de câncer de mama: tamanho tumoral, acometimento linfonodal, grau histológico, invasão linfovascular, receptores de estrogênio, progesterona e Her-2.

**PUBLICAÇÃO**

**Title: N-acetylglucosaminidase, Myeloperoxidase and Vascular Endothelial Growth Factor serum levels in breast cancer patients**

**Article Type:** Original article

**Keywords:** Breast cancer, N-acetylglucosaminidase (NAG), Myeloperoxidase (MPO), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

**Corresponding Author:** Agnaldo Lopes da Silva Filho, Ph.D.

**Authors:** Bertha Andrade Coelho<sup>a</sup>, Andrezza Vilaça Belo<sup>b</sup>, Sílvia Passos Andrade<sup>c</sup>, Washington Cançado Amorim<sup>b</sup>, Jaime Escallon<sup>d</sup>, Gilberto Uemura<sup>a</sup>, Agnaldo Lopes da Silva Filho<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, UNESP, Univ. Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, UFMG, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiology and Pharmacology, UFMG, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup> Department of Surgery, Faculty of Medicine, UofT, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

**Address for correspondence:** Department of Gynecology and Obstetrics of the School of Medicine of UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Distrito de Rubião Júnior s/n°. Zip Code: 18.618-970. Botucatu. São Paulo. Brazil.

**E-mail:** agnaldo.ufmg@gmail.com

**Abstract**

Inflammatory cells surround breast carcinomas and may act promoting tumor development or stimulating anti-tumor immunity. N-acetylglucosaminidase (NAG) has been employed to detect macrophage accumulation/activation. Myeloperoxidase (MPO) is considered a marker for neutrophils activity/accumulation. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is as potent pro-angiogenic cytokine. The aim of this study was to measure the systemic inflammatory response by measuring serum levels of NAG, MPO and VEGF in women diagnosed with breast cancer and associate this response to the peritumoral inflammatory infiltrate and to prognostic factors. Serum samples obtained from women with no evidence of disease (n=31) and with breast cancer (n=68) were analyzed for the activities of NAG, MPO and VEGF by enzymatic assay. Serum levels of NAG and VEGF were higher in healthy volunteers ( $p < 0.0001$ ) and serum levels of MPO were higher in patients with breast cancer ( $p = 0.002$ ). Serum levels of NAG were positively correlated to serum levels of MPO and VEGF ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0012$ , respectively) and MPO and VEGF serum levels had also a positive correlation ( $p = 0.0018$ ). The inflammatory infiltrate was not associated to serum levels of the inflammatory markers, and higher levels of MPO were associated to lymphovascular invasion negativity ( $p = 0.0175$ ).

**Keywords:** Breast cancer, N-acetylglucosaminidase (NAG), Myeloperoxidase (MPO), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).



## **Introduction**

Breast cancer is the most prevalent cancer in women worldwide. In 2012 breast cancer alone was expected to account for 29% of all new cancer cases among women in the United States and for 28% in Brazil (1, 2). Although it is considered a cancer of relatively good prognosis if diagnosed and treated in an adequate time, death rates from breast cancer remain high, especially in developing countries, probably because it is still diagnosed in advanced stages. Therefore, early detection in order to improve breast cancer outcome and survival remains the cornerstone of breast cancer control, what motivates the development of better technologies for screening and diagnosing this disease in a proper time.

The role of the inflammatory response in cancer pathogenesis is still not clear. The presence of white blood cells surrounding tumors was firstly observed in the nineteenth century by Rudolf Virchow, signaling a possible link between inflammation and cancer (3, 4). However, it was during the last decade that evidence was obtained, elucidating the critical role of inflammation in tumorigenesis (4, 5). There are evidence areas that connect inflammation and cancer: chronic inflammatory diseases are associated with increased risk of cancer, cancers arise at sites of chronic inflammation, many of the cells associated with chronic inflammatory processes are found in tumors, inflammatory mediators are found in cancer samples, deletion of cellular or chemical inflammation mediators inhibits the growth and spread of cancer, and prolonged use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduces the risk of mortality by certain types of cancers (6). The expression of immune modulators and mediators as well as the activation of different cell types dictates how the inflammatory response will interact with the tumor microenvironment.

Inflammatory cells are found surrounding breast carcinomas and may act promoting tumor development or stimulating anti-tumor immunity. N-acetylglucosaminidase (NAG), an enzyme present in lysosomes and mainly produced by macrophages, has been employed to detect macrophage accumulation/activation (7, 8). Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme synthesized during myeloid differentiation (9). The main cellular source of MPO is the neutrophil (10). It mediates several inflammatory processes and can be considered a marker for leucocytes activity/accumulation (7, 8). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is potent pro-angiogenic cytokine, produced by a variety of cells. In the tumor microenvironment, macrophages are an important source of VEGF (11). VEGF expression is increased in tumor cells of numerous human cancers (12) but there is not a positive correlation between tumor and circulating VEGF levels (13).

The inter-relationship between local and systemic inflammatory responses and its significance in patients with breast cancer remains unclear. Therefore, the aim of this prospective study was to compare the activity of the inflammatory enzymes NAG and MPO and the cytokine VEGF in breast cancer patients and in healthy women. We also seek to determine the relationship between these inflammatory markers serum levels and the tumor inflammatory infiltrate, correlating these findings to clinical and pathological features.

## **Patients and Methods**

This study was carried out at Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais, a referral centre for breast surgery, and was conducted under the guidelines of the local ethics committee and in accordance to the tenets of the National Health Council. All patients were presented to an informed consent form. From June 2011 to August 2012 ninety nine patients were prospectively evaluated. Of those, 68 patients were breast cancer patients and 31 women were healthy volunteers, with no clinical evidence of any disease. Patients who underwent neoadjuvant chemotherapy, radiation therapy, who had any immune system disease or had chronically used nonsteroidal anti-inflammatories, corticosteroids or immunosuppressors in the previous three months were not included in the study.

The patients answered a questionnaire encompassing clinical, epidemiological and tumor relating variables. The samples were collected and identified in the operating room before anesthetic drugs administration or in a routine basis for the control group. The samples (4ml) were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes to serum to be obtained and stored at -80°C until the measurements were performed. The inflammatory infiltrate was determined in a qualitative fashion - absent, discrete, moderate or accentuated - at the tumor periphery and evaluated with hematoxylin-eosin routine staining. NAG and MPO serum activities were measured by enzymatic assay using an absorption spectrophotometer and were expressed as change in optical density (OD). VEGF serum levels were analyzed using a commercially available ELISA kit and were expressed in ng/ml.

Data management and analysis were performed using Prism 6.0 statistical program (Graphpad Software, San Diego, CA). The assumption of normality was

assessed and the Kolmogorov-Smirnov test was applied, which indicated that the distribution of serum levels of NAG, MPO and VEGF do not have a normal distribution ( $p < 0.001$ ). Therefore, in this analysis, nonparametric tests were used. The variables were described by their medians and interquartile ranges. Differences between groups were evaluated by Chi-square, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney, when indicated. The correlations between groups were performed using the Spearman correlation coefficient. The differences and correlations with  $p$  value  $< 0.05$  were considered significant.

## **Results**

Patients included in this study had a mean age of 50.8 years, ranging from 16 to 78 years old. There were no differences between groups regarding age, parity, breast feeding, menopause status, previous use of contraceptives or hormone therapy, previous breast biopsies, family history and body mass index. Twenty five (36.76%) breast cancer patients have had or have smoking habit compared with 5 (16.12%) patients in the control group, which was statistically significant ( $p = 0.0382$ ) (Table 1), but this difference did not change the enzymes behavior in subgroups analysis.

Serum levels of NAG and VEGF in women diagnosed with breast cancer were significantly lower ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$ ) when compared to the control group (Figure 1 and Figure 3) and serum levels of MPO in women diagnosed with breast cancer were significantly higher ( $p = 0.0002$ ) when compared to the control group (Figure 2).

No significant difference was found when NAG, MPO and VEGF serum levels were associated to the peripheral inflammatory infiltrate in breast tumors, graded as absent, discrete, moderate or accentuated. When tumor characteristics were evaluated concerning invasion, tumor size, lymph node involvement, histological grade, lymphovascular invasion, inflammatory infiltrate, estrogen and progesterone receptors and Her-2 expression, only lymphovascular invasion had a significant association with MPO levels (Table 2). Tumors in which lymphovascular invasion was not present had higher levels of serum MPO ( $p = 0.0175$ ).

Serum levels of NAG were positively correlated to serum levels of MPO and VEGF ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0012$ , respectively) and MPO and VEGF serum levels had also a positive correlation ( $p = 0.0018$ ) (Figure 4).

**Discussion**

NAG, MPO and VEGF serum levels were evaluated in this prospective study to determine potential markers of inflammatory response in breast cancer patients. The study of these inflammatory markers may provide better understanding of breast cancer biological behavior and perhaps will signalize future tumor markers.

Serum levels of NAG in women diagnosed with breast cancer were significantly lower when compared to the control group. According to previous data, infiltrating B lymphocytes are found in elevated concentrations in up to 70% of solid tumors, including breast cancers. Chronic activation of B cells may potentiate carcinoma development by suppressing macrophage cytotoxic activity (14). In this sense, macrophages, as tumors progress, become trophic instead of hostile to tumors (15). Tumor associated macrophages, when activated, can destroy tumor cells or cause tissue destruction reactions (3). Since NAG is employed to detect macrophage accumulation/activation (7, 16), our results of decreased NAG serum activity in breast cancer patients, may signify that macrophages in well established breast cancers have an impaired function or are present in low concentrations in the tumor environment.

Serum levels of MPO in women diagnosed with breast cancer were significantly higher when compared to the control group. Inflammatory leukocytes promote cancer development due to their capacity to produce cyto and chemokines, proteases, reactive oxygen species (ROS), histamine and other bioactive mediators (14). ROS, mainly produced by MPO, are capable of inducing DNA damage and genomic instability (4, 10). This enzyme is present in neutrophils (10, 17, 18) which invade inflamed tissues, including the breast. MPO has been previously considered one of the best serum proteins to indicate the presence of breast cancer in premenopausal women (19), what

has been confirmed by our results, where MPO levels are considerably higher in women diagnosed with breast cancer. These results possibly mean that cancer patients are high endogenous producers of MPO, what may increase their risk of developing the disease (17).

According to previous studies, solid tumors can impair leukocytes function (16). A prior research on cervical cancer showed that NAG activity was lower and MPO activity was higher in cancer patients when compared to healthy controls (20). These results are in agreement to what we now describe in breast cancer patients. Another study showed that impaired macrophage recruitment lead to a compensatory neutrophil response in mice tumors models, suggesting that neutrophils can, in some circumstances, compensate for macrophage loss in tumors, serving to similarly facilitate tumor progression (21).

VEGF is a potent and specific angiogenic factor. Some studies describe that serum VEGF is higher in patients with cancer than in normal controls (13, 22). However, other studies in melanoma and breast cancer showed no difference between serum concentrations of VEGF between healthy and cancer patients (12). It was also shown that expression of VEGF by the primary tumor does not correlate to serum VEGF (13). Our results, on the opposite, revealed lower levels of circulating VEGF in cancer patients. Macrophages have a direct effect on angiogenesis and progression to malignancy in primary mammary tumors, but when cancer is established fewer macrophages are found in the center of the tumor where the dense vessel network had developed (11). In the light of our results, it may signify that lower levels of NAG are associated to low macrophage tumor concentration which in turn leads to lower levels of circulating VEGF. Nevertheless, these results may not reflect the VEGF expression within the tumor.

When serum levels of NAG, MPO and VEGF were associated to tumor variables and prognostic factors, we found that tumors in which lymphovascular invasion was not present had higher levels of serum MPO. Lymphovascular invasion is strongly associated to the presence of lymph node metastasis. It is a poor prognostic factor for overall survival in women without lymph node metastasis and a risk factor for local recurrence. MPO is an indirect marker of neutrophil tissue accumulation. Granulocytes and macrophages represent the first line of defense against tissue aggression/disturbance. During acute antitumor inflammatory responses, T lymphocytes regulate tumor cell cytotoxicity and polarize innate immune cells toward tumor suppression. B lymphocytes facilitate recruitment of innate leukocytes and targeted destruction of neoplastic cells (14). In less aggressive breast tumors (negative for lymphovascular invasion) high levels of MPO may indicate an attempt of the inflammatory system to contain the neoplastic expansion. The reason why this association was not observed when we analyzed innumerable other tumor characteristics may be explained by the fact that breast cancer is an extremely heterogeneous disease and our breast cancer group was relatively small to demonstrate such differences.

When this study was designed, we expected to find a correlation between the systemic inflammatory response and the peripheral tumor inflammatory infiltrate. However, this study was unable to demonstrate that serum levels of NAG, MPO and VEGF correlate to the inflammatory infiltrate in breast cancer. The inflammatory infiltrate was described in a qualitative fashion, therefore, in a gross manner. Concentrations of inflammatory cells surrounding tumors probably do not reflect the delicate and intricate reactions that occur in tumors microenvironment.

Breast cancer is a disease that has only one name, but manifests itself in a myriad of ways. Recently, an interesting study showed that there are ten distinct



molecular subtypes of breast cancers (23). Despite being an extremely studied cancer, we still know little about its biology and behavior. This study demonstrated that serum levels of the inflammatory markers NAG, MPO and VEGF behave differently in patients with breast cancer when compared to healthy women.

There are several reports on NAG, MPO and VEGF serum levels described separately in the literature (22, 24, 25). To our knowledge, this study was the first one to evaluate these enzymes and cytokine together in breast cancer patients and correlate these findings to clinical and pathological prognostic factors. In conclusion, we observed that NAG, MPO and VEGF behave differently in cancer and healthy patients. We also demonstrated and highlight that breast cancer patients are high MPO producers. In a future perspective, we can validate our results in a wider population, study these markers behavior in a different breast cancer setting (e.g., metastatic disease) and also study these inflammatory markers expression within the tumors by immunohistochemistry.

**Disclosure**

The authors have no association with any companies that may have a financial interest in the information contained in this manuscript.

## **Tables and Figures Legends**

### Table 1 Legend: General Patients' Characteristics

Note: BMI: Body Mass Index. The values represent the median and interquartile range (P25-P75) or number of individuals and percentage. The comparisons between groups were performed by Wilcoxon Chi<sup>2</sup> or Mann-Whitney tests, when appropriate.

### Table 2 Legend: NAG, MPO and VEGF and Tumors Characteristics

Note: 1: Estrogen receptor; 2: Progesterone receptor; 3: Human epidermal growth factor receptor 2 expression. The values represent the median and interquartile range (P25-P75). The comparisons between groups were performed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests, when appropriate.

Figure 1 Legend: Serum levels of NAG in women diagnosed with breast cancer and in women with no clinical evidence of any disease.

Note: NAG: N-acetylglucosaminidase. Difference between groups was assessed by Mann Whitney test.  $p < 0.0001$ .

Figure 2 Legend: Serum levels of MPO in women diagnosed with breast cancer and in women with no clinical evidence of any disease.

Note: MPO: Myeloperoxidase. Difference between groups was assessed by Mann Whitney test.  $p = 0.0002$ .

Figure 3 Legend: Serum levels of VEGF in women diagnosed with breast cancer and in women with no clinical evidence of any disease.

Note: VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor. Difference between groups was assessed by Mann Whitney test.  $p < 0.0001$ .

Figure 4 Legend: Correlation between NAG, MPO and VEGF serum levels in women diagnosed with breast cancer.

Note: NAG: N-acetylglucosaminidase; MPO: Myeloperoxidase; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor. Correlations between proteins levels were performed using Spearman correlation coefficient. NAG x MPO,  $p < 0.0001$ ,  $r = 0,7004$ . NAG x VEGF,  $p = 0.0012$ ,  $r = 0,3852$ . MPO x VEGF,  $p = 0.0018$ ,  $r = 0,3720$ .

## References

1. Brasil, Estimativa 2012:Incidência de Câncer no Brasil, M.d. Saúde, Editor. 2011, Instituto Nacional do Câncer: Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA-Cancer J Clin.* 2012;62(1):10–29.
3. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539–45.
4. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883–99.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
6. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metast Rev.* 2006;25(3):409–16.
7. Xavier DO, Amaral LS, Gomes M a, Rocha M a, Campos PR, Cota BDCV, et al. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(3):220–5.
8. Lamaita RM, Pontes A, Belo AV, Caetano JP, Andrade SP, Cândido EB, et al. Evaluation of N-acetilglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Journal Obstet Gynaecol Re.* 2012;38(5):810–6.
9. Kleijn A, Chen JW, Buhrman JS, Wojtkiewicz GR, Iwamoto Y, Lamfers ML, et al. Distinguishing inflammation from tumor and peritumoral edema by myeloperoxidase magnetic resonance imaging. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4484–93.

10. van der Veen BS, de Winther MPJ, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Sign.* 2009;11(11):2899–937.
11. Lin EY, Li J-F, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik D a, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* 2006;66(23):11238–46.
12. Duranyildiz D, Camlica H, Soydinc HO, Derin D, Yasasever V. Serum levels of angiogenic factors in early breast cancer remain close to normal. *Breast.* 2009;18(1):26–9.
13. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Breast Cancer: Comparison of Plasma, Serum, and Tissue VEGF and Microvessel Density and Effects of Tamoxifen. *Cancer Res.* 2000;60:2898–905.
14. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):212.
15. Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukocyte Biol.* 2008;84(3):623–30.
16. Belo AV, Barcelos LS, Ferreira M a ND, Teixeira MM, Andrade SP. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sci.* 2004;74(23):2827–37.
17. He C, Tamimi RM, Hankinson SE, Hunter DJ, Han J. A prospective study of genetic polymorphism in MPO, antioxidant status, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Tr.* 2009;113(3):585–94.

18. Ambrosone CB, Barlow WE, Reynolds W, Livingston RB, Yeh I-T, Choi J-Y, et al. Myeloperoxidase genotypes and enhanced efficacy of chemotherapy for early-stage breast cancer in SWOG-8897. *J Clin Oncol.* 2009;27(30):4973–9.
19. Jesneck JL, Mukherjee S, Yurkovetsky Z, Clyde M, Marks JR, Lokshin AE, et al. Do serum biomarkers really measure breast cancer? *BMC Cancer.* 2009;9:164.
20. Lages ELE, Belo AV, Andrade SP, Rocha MA, de Freitas GF, Lamaita RM, et al. Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. *Biomed Pharmacother.* 2011;65(7):496–9.
21. Pahler JC, Tazzyman S, Erez N, Chen Y, Murdoch C, Nozawa H, et al. Plasticity in Tumor-Promoting Inflammation : Impairment of Macrophage Recruitment Evokes a Compensatory Neutrophil Response. *Neoplasia.* 2008;10(4):329–39.
22. Carpini JD, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis.* 2010;13(1):43–58.
23. Curtis C, Shah SP, Chin S-F, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012;486(7403):346–52.
24. Luqmani Y, Temmim L, Memon a, Abdulaziz L, Parkar a, Ali M, et al. Measurement of serum N-acetyl beta glucosaminidase activity in patients with breast cancer. *Acta Oncol.* 1999;38(5):649–53.
25. Koduru B, Tejaswini, Thakur A, Kamath SU, Shenoy KR, Kamath U, et al. Indicators of oxidative stress in thyroid cancer. *Indian J Biochem Bio.* 2010;47(2):121–3.

## Tables

Table 1:

	Breast Group (n=68)	Cancer	Control Group (n=31)	<i>P</i> Values
Age (Years)	51.0(44.0-61.5)		51.0(43.5-57.0)	0.6158
Parity (Births)	2.0(1.0-3.5)		2.0(0.5-3.0)	0.2699
Breast-feeding				0.3591
Yes	48(70.58%)		19(61.29%)	
No	20(29.41%)		12(38.70%)	
Menopause				1
Yes	35(51.47%)		16(51.61%)	
No	33(48.52%)		15(48.38%)	
Oral Contraceptives <sup>1</sup>	50(73.52%)		24(77.41%)	0.6792
Yes	18(26.47%)		7(22.58%)	
No				
Hormone Therapy <sup>2</sup>				0.8537
Yes	10(14.70%)		5(16.12%)	
No	58(85.29%)		26(83.87%)	
Previous Biopsies <sup>3</sup>				0.5633
Yes	12(17.64%)		7(22.58%)	
No	56(82.35%)		24(77.41%)	
Family History				0.3599
Yes	16(23.52%)		10(32.25%)	
No	52(76.47%)		21(67.74%)	
BMI <sup>4</sup> (Kg/m <sup>2</sup> )	25.87(22.57-28.95)		24.24(20.88-27.97)	0.2037
Smoking Habit				<b>0.0382</b>
Yes	25(36.76%)		5(16.12%)	
No	43(63.23%)		26(83.87%)	



Table 2:

	NAG	P Values	MPO	P Values
Invasion		1		0.8706
Yes	19.74(14.39-29.86)		0.0980(0.0710-0.1295)	
No	20.03(15.58-27.31)		0.1070(0.0705-0.1450)	
T Stage		0.6947		0.8466
Tis	20.03(15.58-27.31)		0.1070(0.0705-0.1450)	
T1	19.82(13.04-25.24)		0.1085(0.0745-0.1350)	
T2	24.03(12.96-32.27)		0.0890(0.0685-0.1340)	
T3	18.06(16.53-22.08)		0.0995(0.0815-0.1195)	
Lymph Node Involvement		0.6838		0.7683
Yes	18.43(14.46-29.04)		0.0960(0.0752-0.1340)	
No	19.96(14.07-29.17)		0.1000(0.0710-0.1370)	
Histological Grade		0.0732		0.4857
1	16.76(11.27-20.87)		0.0935(0.0660-0.1135)	
2	26.09(15.24-34.30)		0.0930(0.0685-0.1495)	
3	19.81(17.18-30.44)		0.1065(0.0900-0.1365)	
Lymphovascular Invasion		0.6136		0.0175
Yes	17.45(14.11-35.77)		0.0740(0.0555-0.1020)	
No	20.22(15.12-29.86)		0.1030(0.0765-0.1425)	
Inflammatory Infiltrate		0.9595		0.4227
Absent/Discrete	19.74(15.98-29.69)		0.0960(0.0730-0.1155)	
Mod./Accentuated	22.99(13.27-30.56)		0.1240(0.0660-0.1610)	
ER <sup>1</sup>		0.8403		0.4377
Positive	20.26(13.20-28.60)		0.0970(0.0710-0.1265)	
Negative	19.59(16.21-28.43)		0.1070(0.0865-0.15-5)	
PR <sup>2</sup>		0.5146		0.4928
Positive	20.26(13.20-30.40)		0.0960(0.0700-0.1375)	
Negative	19.59(16.21-26.61)		0.1070(0.0865-0.1415)	
Her-2 <sup>3</sup>		0.9869		0.7000
Positive	19.59(12.20-29.39)		0.1050(0.0705-0.1455)	
Negative	19.82(15.12-28.60)		0.0990(0.0745-0.1225)	

Figures

Figure 1

FIGURE 1

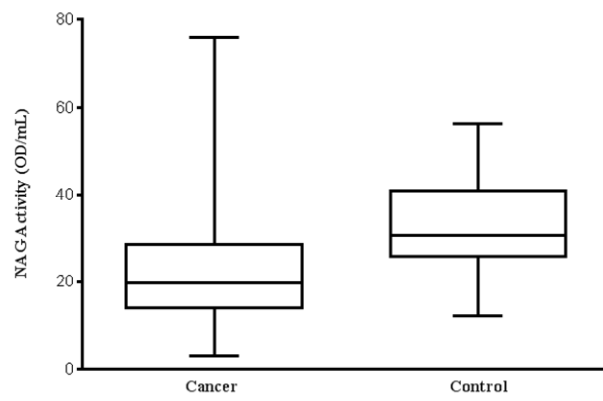


Figure 2

FIGURE 2

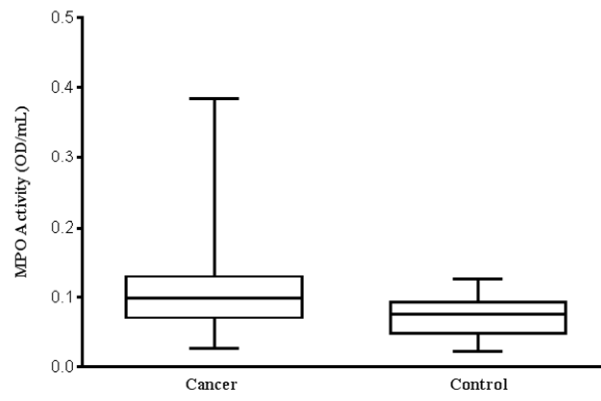


Figure 3

FIGURE 3

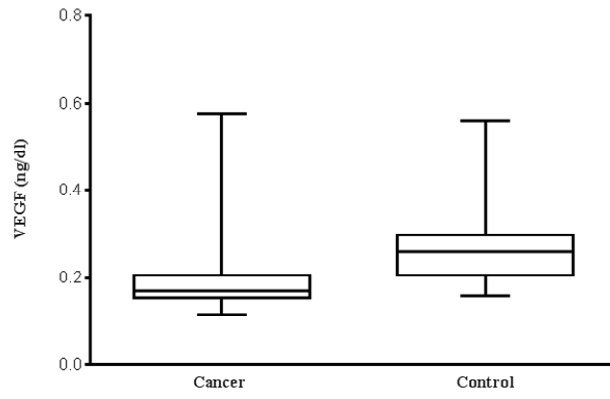


Figure 4

FIGURE 4A

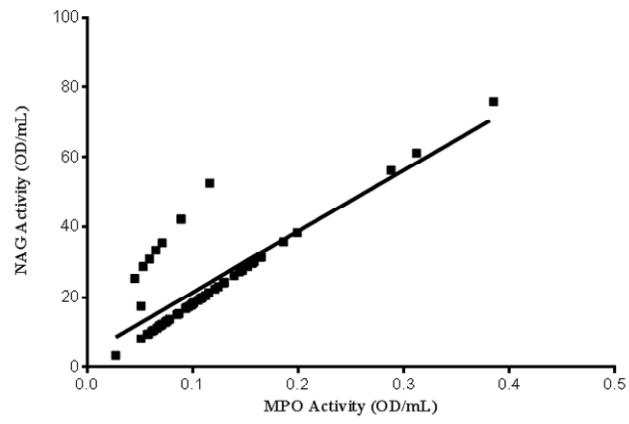


FIGURE 4B

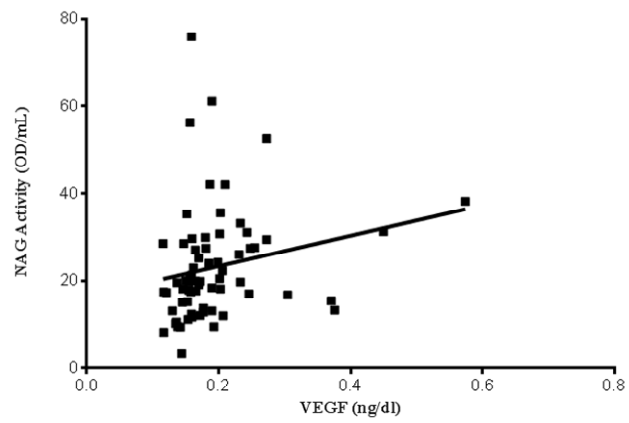
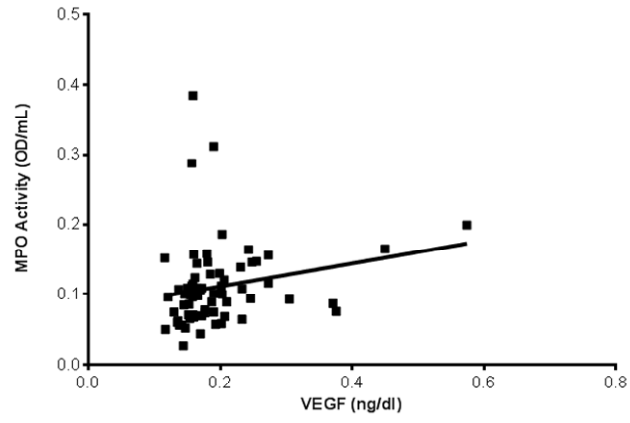


Figure 4

FIGURE 4C



# **CONCLUSÕES**

1 – Mulheres portadoras de câncer de mama apresentam níveis séricos mais elevados de MPO que mulheres saudáveis ( $p=0.0002$ ).

2 – Mulheres portadoras de cancer de mama apresentam níveis séricos mais baixos de NAG e VEGF que mulheres saudáveis ( $P<0,0001$ ).

3 – Os níveis séricos de NAG, MPO e VEGF correlacionam-se positivamente entre si, sendo que a correlação mais forte foi entre NAG e MPO ( $p<0.0001$ ,  $r=0,7004$ ).

4 – Pacientes que não apresentam invasão linfovascular em seus tumores têm maiores níveis de MPO circulantes ( $p=0.0175$ )

5 – Não houve relação entre invasão, tamanho tumoral, comprometimento linfonodal, grau histológico, infiltrado inflamatório peritumoral, receptores de estrógeno e progesterona e expressão de Her-2 com níveis séricos de NAG, MPO e VEGF.



# **ANEXOS**

## 5.1. Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Minas Gerais

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Avaliação da Resposta Inflamatória em Mulheres com Câncer de Mama

**Área Temática:**

**Pesquisador:** Agnaldo Lopes da Silva Filho

**Versão:** 3

**Instituição:** Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

**CAAE:** 01536112.3.0000.5149

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 28803

**Data da Relatoria:** 30/05/2012

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal a ser realizado no Serviço Mastologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Serão incluídas no estudo todas as mulheres atendidas no Serviço Mastologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com diagnóstico de câncer de mama e proposta de tratamento cirúrgico, com diagnóstico de doenças benignas da mama, e mulheres submetidas a exames de rotina, sem evidências de quaisquer doenças. Após o cálculo do tamanho amostral, serão estudadas 180 mulheres, divididas nos seguintes grupos: (1) grupo controle (n=30); (2) grupo de mulheres com doença benigna (n=30); e (3) grupo de mulheres com doença maligna (n=120). Serão considerados critérios de exclusão tratamento prévio de radioterapia e/ou quimioterapia, diagnóstico prévio de doença do sistema imune, uso regular de imunossupressores, corticosteróides e/ou anti-inflamatórios nos últimos três meses e não concordância em participar do estudo. As pacientes serão apresentadas a termo de consentimento livre e esclarecido e posteriormente serão submetidas a questionário que englobará variáveis clínicas e epidemiológicas, assim como variáveis relativas ao tumor. As amostras de sangue serão colhidas e identificadas no pré-operatório ou durante a realização de exames de rotina e, após centrifugação, o plasma será armazenado até o momento das dosagens laboratoriais, a saber: atividade das enzimas Mieloperoxidase e NAcetilglucosaminidase por ensaio enzimático; e níveis plasmáticos das citocinas (interferon-gama e fator de necrose tumoral alfa) por ELISA. Os blocos de parafina serão estudados após a análise rotineira do Serviço de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Pelo exposto, a metodologia é bem clara e fundamentada.

#### Objetivo da Pesquisa:

**OBJETIVO PRIMÁRIO:**

Medir a resposta inflamatória sistêmica, por meio da dosagem de proteínas plasmáticas como a mieloperoxidase, a n-acetilglucosaminidase, o fator de necrose tumoral alfa e o interferon-gama, em mulheres com diagnóstico de câncer de mama.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto é claro quanto aos riscos e benefícios para os sujeitos.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto visa basicamente comparar a resposta inflamatória de mulheres com câncer de mama com a de mulheres portadoras de doenças benignas da mama e mulheres saudáveis. O projeto tem grande relevância para o avanço científico na área de ciências da saúde, especialmente no campo da oncologia. Será desenvolvido por pesquisador com competência na área.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

**DOCUMENTAÇÃO APRESENTADA CORRETAMENTE:** Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do CONEP; Protocolo de Pesquisa; TCLE; Carta de Anuência do Laboratório de Angiogênese do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG; Comprovante de Recebimento no DEPE do Hospital das Clínicas da UFMG; Parecer consubstanciado do Departamento de origem do pesquisador.

TCLE: O TCLE está adequado à resolução 196 do CNS

#### Recomendações:

SMJ, somos pela aprovação do projeto.

## 5.1. Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Continuação

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após atendidas as diligências, não há pendências ou inadequações na documentação em anexo.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 30 de Maio de 2012

---

Assinado por:

Maria Teresa Marques Amaral

## 5.2. Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida relacionada à pesquisa você pode procurar o Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho pelo telefone (31) 92250909. Em caso de dúvida relacionada a aspectos éticos da pesquisa procure o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais pelo telefone (31) 3409-4592 ou pelo endereço Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG - Brasil (31270-901).

**Título do Projeto: Avaliação da resposta inflamatória em mulheres com câncer de mama**

**Pesquisador Responsável: Dr. Agnaldo L. Silva Filho**

Este projeto tem o objetivo de investigar a presença de algumas substâncias no sangue relacionadas à inflamação (especificamente, mieloperoxidase, n-acetilglucosaminidase, interferon-gama e fator de necrose tumoral alfa), que possam nos ajudar a fazer o diagnóstico precoce dos tumores de mama.

A participação no estudo consiste em doar uma amostra de sangue para ser analisada. Essa participação não modifica o tratamento proposto para a sua doença. Não haverá aumento do risco de complicações devido à coleta do sangue. A coleta de sangue será realizada no momento da punção para administração do soro ou durante a realização de exames pré-operatórios. A sua identidade será preservada e o seu direito de não participar no estudo não a prejudicará no seu tratamento.

Após ler e receber explicações sobre a pesquisa, e ter meus direitos de:

1. receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa;
2. retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
3. não ser identificado e ser mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à privacidade.

Declaro estar ciente do exposto e desejar participar do projeto de pesquisa.

Belo Horizonte, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

Nome do sujeito/ ou do responsável: \_\_\_\_\_

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

Eu, Agnaldo L. Silva Filho, declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto ao participante e/ou responsável.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Telefone : 31 92250909

## 5.3. Anexo III – Ficha Clínica

**“Avaliação da Resposta Inflamatória em Mulheres com Câncer de Mama”****Ficha de Inclusão****1 – Identificação**

- a) Nome: \_\_\_\_\_ b) Registro: \_\_\_\_\_  
 c) Data Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ d) Data Exame: \_\_/\_\_/\_\_\_\_  
 e) Unidade:  HC  JAF f) Raça: \_\_\_\_\_  
 g) Endereço: \_\_\_\_\_ h) Telefone: \_\_\_\_\_

**2 – Fatores de Risco**

- a) H. Pessoal:  Sim  Não  
 b) H. Familiar:  Sim  Não  
     b.1) Mama  Sim  Não  
     b.2) Ovário  Sim  Não  
     b.3) Cólon  Sim  Não  
 c) Lesões Precursoras:  Sim  Não  
 d) Lesão Prol. Benigna:  Sim  Não  
 e) Exp. à Radioatividade:  Sim  Não  
 f) Menarca:  Não se aplica  
 g) Menopausa:  Não se aplica  
 h) Paridade: \_\_\_\_\_  
 i) Idade Primeiro Parto: \_\_\_\_\_  Não se aplica  
 j) Amamentação:  Sim (Tempo): \_\_\_\_\_  Não  
 k) ACO:  Sim (Tempo): \_\_\_\_\_  Não  
 l) TH:  Sim (Tempo): \_\_\_\_\_  Não  
 m) Obesidade (IMC):  Peso: \_\_\_\_\_  Altura: \_\_\_\_\_  
 n) Etilismo:  Sim  Não  
 o) Tabagismo:  Sim  Não

**3 – Patologia**

- a) Cirurgia (Data): \_\_\_\_\_ EC: \_\_\_\_\_  
 b) Tipo Histológico: \_\_\_\_\_  
 c) Tamanho Tumoral: \_\_\_\_\_ cm  
 d) Grau Histológico:  G1  G2  G3  
 e) Componente *In Situ*:  Sim  Não  
     (Tamanho): \_\_\_\_\_  
 f) Invasão Linfovascular:  Sim  Não  
 g) Margens Acometidas:  Sim  Não  
 h) Número de Linfonodos Ressecados: \_\_\_\_\_ Linfonodos  
 i) Número de Linfonodos Acometidos: \_\_\_\_\_ Linfonodos  
 j) Receptores:  ER  EP  Her-2  
 k) Mx: \_\_\_\_\_

**4 – Não Inclusão**

- a) QT Neo                      b) RT Neo                      c) Dç. Sist. Imune                      d) Uso AINH  
 e) Uso Corticóide                      f) Imunossupressor