

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

**“Polimorfismos do Gene VEGFA: avaliação de impacto sobre a evolução  
clínica do câncer de mama”**

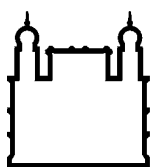
*por*

***Hayra de Andrade Vieira Monteiro***

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em  
Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.*

*Orientadora principal: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Vianna-Jorge  
Segunda orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jamila Alessandra Perini*

*Rio de Janeiro, fevereiro de 2015.*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

*Esta dissertação, intitulada*

***“Polimorfismos do Gene VEGFA: avaliação de impacto sobre a evolução clínica do câncer de mama”***

*apresentada por*

***Hayra de Andrade Vieira Monteiro***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Vitória de Moura Gallo

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosalina Jorge Koifman

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Vianna-Jorge — Orientadora principal

Catalogação na fonte  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

M775p Monteiro, Hayra de Andrade Vieira  
Polimorfismos do Gene VEGFA: avaliação de impacto  
sobre a evolução clínica do câncer de mama. / Hayra de  
Andrade Vieira Monteiro. -- 2015.  
xvi, 115 f. : tab. ; graf.  
Orientador: Rosane Vianna-Jorge  
Jamila Alessandra Perini  
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde  
Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.  
1. Neoplasias da Mama - patologia. 2. Fator A de  
Crescimento do Endotélio Vascular. 3. Polimorfismo  
Genético. 4. Sobrevida. 5. Evolução Clínica. I. Título.  
CDD - 22.ed. – 616.99449

*Dedico este trabalho a minha mãe e meu tio, pelo incentivo, apoio e aprendizado em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter permitido mais essa conquista, me guiado e protegido em todos os momentos.

A minha mãe Cely, por toda paciência, carinho e amor incondicional, que mesmo com o coração apertado pela distância, me incentivou a correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu tio Vidigal, pelos ensinamentos científicos e de vida, que sempre acreditou e confiou em mim. Obrigada pelas longas conversas, discussões e conselhos que hoje, me tornaram uma pessoa melhor.

As minhas orientadoras, Rosane Vianna Jorge e Jamila Alessandra Perini, por terem acreditado em mim, pela paciência, orientação, ensinamentos e incentivos importantes para o meu crescimento acadêmico. Em especial nessa etapa final, obrigada pela dedicação e ajuda.

As minhas madrinhas Célia, Heloiza, Guiomar e Denise, pelo colo, o ombro amigo e a torcida de sempre.

Aos meus tios Marcos e Raquel, pelo acolhimento e apoio desde o início.

Aos meus amigos e familiares, principalmente meu PAIdastro Cláudio, por entenderem minha ausência e encorajarem minhas conquistas.

A minha amiga-irmã Lara, que se tornou muito mais que amiga durante essa trajetória, e que se fez presente em todos os momentos me dando todo carinho e apoio. Obrigada pelas longas conversas “jogadas” no sofá.

Ao Thales, meu parceiro de todas as horas, pela amizade, parceria, pelos conselhos e momentos de desabafos. Sofremos, rimos e aprendemos muito juntos. Ter você do meu lado, tornou o mestrado um pouco mais leve.

Ao presente mais lindo que o mestrado me trouxe, Dany, FOFINHA do meu coração, obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos, pelas risadas, conversas e pelo carinho nos momentos de maior desespero. Espero ter você sempre por perto.

Ao meu querido amigo Igor, pelos papos científicos, ombro amigo e conselhos que não me deixaram desistir nos momentos mais difíceis. Sua amizade é muito importante na minha vida.

A minha querida roommate Aline, que vivenciou comigo todos os momentos, pelos momentos de descontração, apoio, torcida e compreensão durante essa jornada.

Ao Luis pelo apoio e por me proporcionar momentos de reflexão importantes para o meu amadurecimento.

A cada componente do Grupo “Poli” pela ajuda e amizade, Sheyla, Marcelo Sobral, Tatá, João Delou e Clarissa. E aqueles que já não fazem mais parte, mas que contribuíram para o meu aprendizado, Camila Telles e Vanessa Índio do Brasil.

Ao professor Guilherme Kurtz, por permitir o acesso às instalações do laboratório e os colegas de laboratório Renata, Giu, Vera, Ana, Thales, João Sellos, Vanessa, Ivone pelos momentos de descontração.

Ao Mateus, que em momentos de desespero e dúvida, estava sempre disposto a ajudar.

A Joyce, do Serviço de Pesquisa Clínica, por permitir que terminasse minhas análises.

A equipe de Fisioterapia do HCIII, Ricardo, Érica, Justina, Flavinha, Daniele, Janete, Mariana e tantos outros pelo carinho, receptividade e ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de Mestrado. Que turma caótica e unida! Nos desesperamos, rimos, estudamos e enfim vencemos mais essa etapa. Em especial a Débora, Luis Fernando e Flavinha, pelas caronas no início do período. E a sempre unida turma de Tóxico, Daniel, Isabele, Leandro e Cris obrigada pelos ótimos momentos que deram início a uma linda amizade.

A todos os professores que participaram da minha formação acadêmica.

As pacientes do estudo, pela confiança no nosso trabalho.

As agências de fomento FAPERJ e CNPq, pelo apoio financeiro.

*“E quando você pensar em desistir, lembre-se dos motivos que te fizeram aguentar até  
agora”.*

Sharpie Thoughts



## RESUMO

O câncer de mama é uma doença heterogênea com alta incidência, sendo a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. Dentre os processos que contribuem para a carcinogênese e que dependem do microambiente do hospedeiro, destaca-se o processo de angiogênese, sendo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGFA) o principal fator pró-angiogênico com influente papel no desenvolvimento do câncer de mama. O gene que codifica o *VEGFA* é altamente polimórfico e seus polimorfismos estão associados a diferentes padrões de expressão gênica, afetando os níveis de VEGFA em diversos modelos celulares, incluindo o câncer de mama. O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) do *VEGFA* (rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 e rs3025039) e características histopatológicas com valor prognóstico no câncer de mama, bem como avaliar o potencial de genótipos e haplótipos *VEGFA* como preditores do risco de progressão da doença. A população do estudo consistiu de uma coorte de mulheres brasileiras com câncer de mama unilateral e não metastático, submetidas à ressecção tumoral ou à quimioterapia neoadjuvante como primeira abordagem terapêutica (N=1043). O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico, e usado para genotipagem de *VEGFA* (N=895). Os resultados foram divididos em dois manuscritos. O primeiro avaliou a associação dos SNPs do *VEGFA* ou seus haplótipos com as características histopatológicas com valor prognóstico para o tratamento do câncer de mama; e o segundo avaliou o impacto de genótipos e haplótipos *VEGFA* sobre a evolução clínica de pacientes tratadas inicialmente com cirurgia curativa. As associações entre SNPs e características histopatológicas foram estimadas pelas razões de chance (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%), sendo os preditores independentes validados por regressão logística. As curvas de sobrevida livre de doença foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e o impacto dos de genótipos e haplótipos *VEGFA* sobre o risco de recorrência foi avaliado com modelos multivariados de regressão de risco proporcional de COX, sendo calculadas as razões de risco ajustadas (HR) e seus respectivos IC95%. Em relação à associação com as características histopatológicas, os genótipos variantes do rs699947 (CA + AA) foram mais prevalentes entre os tumores de mama não-luminais, ou seja, dos tipos *HER2-like* ou Triplo-Negativo (OR<sub>ajustado</sub> = 1,49; IC95% = 1,03-2,16), e o haplótipo \*4, formado por rs699947A, rs833061C, rs1570360G, rs2010963G, mostrou um aumento significativo entre os tumores negativos para o receptor de estrogênio (OR<sub>ajustado</sub> = 1,59; IC95% = 1,03-2,47) e entre os tumores não-luminais (OR<sub>ajustado</sub> = 1,61; IC95% = 1,02-2,53). Em relação à sobrevida livre de doença após tratamento cirúrgico, os SNPs de *VEGFA* ou seus haplótipos não mostraram impacto significativo sobre o risco de progressão, caracterizado pela presença de recorrências ou metástases, tanto considerando toda a coorte de estudo, como após a estratificação das pacientes de acordo com os subtipos tumorais. Também não foram observadas diferenças significativas nas curvas de sobrevida livre de doença quando apenas os indivíduos com diplótipos homozigotos foram considerados. Como conclusão, os haplótipos *VEGFA* não foram validados como preditores independentes da progressão rápida do câncer de mama em pacientes de câncer de mama inicial, tratadas com terapias padronizadas. Apesar disso, em vista da associação do SNP rs699947 ou o haplótipo \*4 do gene *VEGFA* com tumores não-luminais, estudos futuros a respeito da relevância dos SNPs *VEGFA* para o prognóstico do câncer de mama devem abordar em especial os tumores dos tipos *HER2-like* ou Triplo-Negativo, que têm menos opções terapêuticas, e podem se beneficiar de novas terapias.

**Palavras-chave:** Neoplasia da mama, Fator de crescimento endotelial vascular, Polimorfismo genético, Características histopatológicas, Sobrevida

## ABSTRACT

Breast cancer is a heterogeneous disease with high incidence among women, being the leading cause of cancer death. Among the host microenvironment processes that contribute to carcinogenesis, angiogenesis plays a central role, and the Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) is the main pro-angiogenic factor, with impact in the development of breast cancer. The gene encoding *VEGFA* is highly polymorphic, and their polymorphisms have been associated with different patterns of gene expression, affecting VEGFA levels in different cell models, including breast cancer. The present study aimed to investigate the association between *single nucleotide polymorphism* (SNP) of *VEGFA* (rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 and rs3025039) and histopathological features with prognostic value in breast cancer, and to evaluate the potential of *VEGFA* genotypes and haplotypes as risk predictors of disease progression. The study population consisted of a cohort of Brazilian women with unilateral and non-metastatic breast cancer, who underwent tumor resection or neoadjuvant chemotherapy as their first therapeutic approach (N=1043). Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples, and used for *VEGFA* genotyping (N=895). The results were divided into two manuscripts. The first shows the association of *VEGFA* SNPs or haplotypes with histopathological characteristics with prognostic value for the treatment of breast cancer. The second evaluates the impact of *VEGFA* genotypes and haplotypes on the risk of breast cancer progression among patients initially treated with curative surgery. The associations between SNPs and histopathological characteristics were estimated by odds ratios (OR) and their respective confidence intervals of 95% (CI 95%), and the independent predictors were validated by logistic regression. Disease-free survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method and the impact of *VEGFA* genotypes and haplotypes on the risk of breast cancer progression (characterized by the incidence recurrence or metastasis) was evaluated using multivariate regression models of COX proportional hazards, with calculation of the adjusted hazard ratios (HR) and their 95% CI. Regarding the association with the histopathologic features, rs699947 variant genotypes (CA + AA) were more prevalent among non-luminal breast tumors, ie HER2-like or triple negative (OR<sub>adjusted</sub> = 1.49; 95% CI = 1.03 to 2.16), and the haplotype \*4, formed by rs699947 A, rs833061 C, rs1570360 G, rs2010963 G, was significantly increased among tumors with negative estrogen receptor status (OR<sub>adjusted</sub> = 1.59; 95% CI = 1.03 to 2.47), as well as among non-luminal tumors (HER2-like or triple negative) (OR<sub>adjusted</sub> = 1.61, 95% CI 1.02 to 2.53). With regards to disease-free survival, *VEGFA* genotypes or haplotypes showed no significant impact on the risk of breast cancer progression, either considering the entire study cohort, or after patient stratification according to tumor subtypes. There were also no significant differences in disease-free survival curves when only individuals with homozygous diplotypes were considered. In conclusion, *VEGFA* haplotypes were not validated as independent predictors of early-onset breast cancer progression in early-stage breast cancer patients treated with standard first-line therapies. Nevertheless, in view of the apparent association between *VEGFA* rs699947 or haplotype \*4 and non-luminal tumors, future studies on the functional relevance of *VEGFA* SNPs in breast cancer prognosis should focus in specific subtypes, especially in *HER2-like* tumors or Triple-negative, which have fewer treatment options, and are more likely to benefit from new therapies.

**Keywords:** Breast cancer, Vascular endothelial growth factor, Polymorphisms, Histopathological features, Disease-free survival

## SUMÁRIO

|                                                                                 | <b>Página</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                       | <b>17</b>     |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                             | <b>19</b>     |
| <b>2.1 O câncer de mama como problema de Saúde Pública.....</b>                 | <b>19</b>     |
| <b>2.2 Anatomia da mama feminina normal.....</b>                                | <b>20</b>     |
| <b>2.3 Caracterização tumoral do câncer de mama e fatores prognósticos.....</b> | <b>22</b>     |
| 2.3.1 Tamanho tumoral.....                                                      | 23            |
| 2.3.2 Linfonodos axilares .....                                                 | 24            |
| 2.3.3 Grau histológico .....                                                    | 24            |
| 2.3.4 Receptores.....                                                           | 25            |
| 2.3.4.1 Receptor de Estrogênio .....                                            | 25            |
| 2.3.4.2 Receptor de Progesterona.....                                           | 26            |
| 2.3.4.3 Receptor HER2.....                                                      | 26            |
| 2.3.5 Subtipos moleculares.....                                                 | 26            |
| 2.3.6 Estadiamento.....                                                         | 28            |
| <b>2.4 Definição da conduta terapêutica.....</b>                                | <b>28</b>     |
| <b>2.5 Angiogênese.....</b>                                                     | <b>29</b>     |
| 2.5.1 Angiogênese tumoral.....                                                  | 31            |
| 2.5.2 VEGFA.....                                                                | 33            |
| <b>2.6 Individualização da terapia: Farmacogenômica.....</b>                    | <b>35</b>     |
| 2.6.1 Polimorfismos genéticos.....                                              | 35            |
| 2.6.2 SNPs do gene <i>VEGFA</i> e câncer de mama.....                           | 36            |
| <b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>                                                    | <b>41</b>     |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>                                                        | <b>42</b>     |
| <b>4.1 Geral.....</b>                                                           | <b>42</b>     |

|                                                                                                                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.2 Específicos.....</b>                                                                                                                                               | <b>42</b>  |
| <b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                        | <b>43</b>  |
| <b>5.1 Delineamento do estudo.....</b>                                                                                                                                    | <b>43</b>  |
| <b>5.2 População do estudo.....</b>                                                                                                                                       | <b>43</b>  |
| 5.2.1 Critério de Inclusão.....                                                                                                                                           | 43         |
| 5.2.2 Critério de exclusão.....                                                                                                                                           | 43         |
| 5.2.3 Caracterização clínica e histopatológica.....                                                                                                                       | 44         |
| 5.2.4 Caracterização dos desfechos clínicos.....                                                                                                                          | 44         |
| 5.2.5 Coleta e extração do DNA genômico.....                                                                                                                              | 44         |
| 5.2.6 Identificação dos SNPs.....                                                                                                                                         | 45         |
| 5.2.7 Análise estatística.....                                                                                                                                            | 47         |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                                 | <b>49</b>  |
| <b>6.1 Manuscrito “Association between <i>VEGFA</i> polymorphisms or haplotypes and histopathological features of breast cancer patients from a Brazilian cohort.....</b> | <b>50</b>  |
| <b>6.2 Manuscrito “Influence of <i>VEGFA</i> genotypes and haplotypes on the recurrence risk of breast cancer”.....</b>                                                   | <b>73</b>  |
| <b>7. DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                                                  | <b>95</b>  |
| <b>8. CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                                  | <b>99</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                  | <b>100</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                                                                                                        | <b>111</b> |

**LISTA DE TABELAS****Página**

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 Estudos dos SNPs do <i>VEGFA</i> sobre a susceptibilidade do câncer de mama.....         | 38 |
| Tabela 2 Estudos dos SNPs do <i>VEGFA</i> sobre a agressividade do câncer de mama.....            | 39 |
| Tabela 3 Estudos dos SNPs do <i>VEGFA</i> sobre a sobrevida do câncer de mama.....                | 40 |
| Tabela 4 Oligos e sondas utilizados no ensaio de fluorescência com TaqMan Applied Biosystems..... | 46 |

## LISTA DE QUADROS

### Página

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 Doenças dependentes de angiogênese..... | 30 |
|--------------------------------------------------|----|

## LISTA DE FIGURAS

### Página

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Incidência e mortalidade das localizações de câncer mais frequentes na população feminina mundial em 2012..... | 19 |
| Figura 2 Anatomia da mama durante a puberdade não gravídica.....                                                        | 21 |
| Figura 3 Glândula mamária inativa e ativa.....                                                                          | 22 |
| Figura 4 Tecido mamário normal e tipos histológicos dos carcinomas mamários.....                                        | 23 |
| Figura 5 Fases da angiogênese fisiológica.....                                                                          | 30 |
| Figura 6 Principais etapas da angiogênese tumoral.....                                                                  | 32 |
| Figura 7 Interação das diferentes isoformas do VEGFA com seus respectivos receptores.....                               | 34 |
| Figura 8 Estrutura do gene <i>VEGFA</i> e a posição dos SNPs em relação ao sítio de início da transcrição.....          | 36 |
| Figura 9 Exemplo de determinação do genótipo VEGFA rs699947 por PCR em tempo real.....                                  | 47 |

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA**

|                 |                                              |
|-----------------|----------------------------------------------|
| ANGPT           | Angiopietina                                 |
| CDis            | Carcinoma ductal <i>in situ</i>              |
| CDS             | Região codificante                           |
| EGFR            | Receptor do fator de crescimento epitelial   |
| FGF             | Fator de crescimento de Fibroblasto básico   |
| HIF -1 $\alpha$ | Fator indutor de hipóxia 1                   |
| HER2            | Receptor do fator de crescimento epitelial-2 |
| HR              | Hazard ratio ( Razão de risco)               |
| IARC            | International Agency for Research on Cancer  |
| INCA            | Instituto Nacional de Câncer                 |
| OR              | <i>OddsRatio</i> ( Razão de Chance)          |
| PCR             | Reação em cadeia da Polimerase               |
| PDGF            | Fator de crescimento derivado de plaquetas   |
| RE              | Receptor de Estrogênio                       |
| RP              | Receptor de Progesterona                     |
| SDF             | Fator derivado do estroma                    |
| SNP             | Polimorfismo de um único nucleotídeo         |
| TCLE            | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido   |
| TNM             | Tamanho, linfonodo, metástase                |
| UICC            | União Internacional Contra o Câncer          |
| VEGFA           | Fator de crescimento endotelial vascular A   |
| WHO             | <i>World Health Organization</i>             |



## 1. INTRODUÇÃO

A incidência de câncer vem aumentando rapidamente nos últimos anos em decorrência do envelhecimento da população mundial e da crescente exposição a fatores de risco ambientais [1,2]. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) estima um incremento substancial com a ocorrência de 19,3 milhões de novos casos de câncer por ano até 2025, devido ao crescimento e envelhecimento da população mundial [2,3]. Em 2012, cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes foram observadas [2]. No Brasil, as estimativas do Ministério da Saúde para o ano 2014, apontam a ocorrência de 576.000 casos novos de câncer [4], reforçando a importância do câncer como um problema de saúde pública.

Dentre as diferentes localizações anatômicas do câncer, a mama é o que apresenta maior incidência [2,5] entre as mulheres, sendo a principal causa de morte por câncer [2,3]. É uma doença heterogênea e, mesmo considerando sua evolução a partir de estádios iniciais, seu curso clínico é altamente variável, dependendo não apenas da idade e do estado geral de saúde da paciente, mas também das características do tumor e da resposta da paciente ao tratamento [6]. Os fatores prognósticos clássicos, usados para estimar a sobrevida das pacientes são baseados em características tumorais, incluindo tamanho, tipo e grau histológico, bem como metástases em linfonodos ou em outros tecidos [7]. Além destes parâmetros morfológicos, a busca por novas terapias sistêmicas baseadas em alvos específicos levou à caracterização de novos biomarcadores, cuja presença possa ser preditiva do perfil de resposta terapêutica. Como exemplos, destacam-se o receptor de estrogênio (RE) e o receptor de fator de crescimento epidermal (HER2), cuja caracterização permitiu melhoras significativas na sobrevida de pacientes com câncer de mama [7,8].

Apesar dos avanços alcançados com a incorporação da caracterização dos receptores hormonais, a grande heterogeneidade fenotípica do câncer de mama, levou à proposição de novas formas de subcategorização, com base no perfil de expressão gênica do tumor [9], que têm permitido identificar perfis moleculares mais específicos, melhorando a avaliação dos riscos de recorrência e de metástase, contribuindo assim para a individualização da terapia a ser adotada [10–12].

Além da identificação das variações moleculares do tumor, o aperfeiçoamento da terapia individualizada requer a caracterização de variáveis genéticas individuais constitutivas, em genes potencialmente envolvidos com a progressão da doença. Dentre os processos que

contribuem para a carcinogênese, e que dependem do microambiente do hospedeiro, o processo de angiogênese, caracterizado pelo crescimento de novos vasos a partir de uma vasculatura pré-existente, se destaca em função da sua contribuição para a manutenção do tumor, invasão tecidual e disseminação à distância, sendo um alvo potencial para o desenvolvimento de novas terapias alvo-dirigidas [13].

Dentre os fatores pró-angiogênicos, com importante contribuição na fisiopatologia tumoral, destaca-se o fator de crescimento vascular endotelial (VEGFA). Em câncer de mama, por exemplo, elevados níveis tumorais de VEGFA têm sido associados a piores prognósticos [14–16]. Em virtude do potencial carcinogênico do VEGFA, anticorpos anti-VEGFA, como por exemplo bevacizumab, estão sendo extensamente investigados como novas alternativas terapêuticas para tumores de mama avançados ou não-responsivos às primeiras linhas de tratamento [17–24]. Os resultados até o momento mostram benefício quanto à sobrevida livre de doença, porém sem efeitos significativos para a sobrevida global [17,18,20,21].

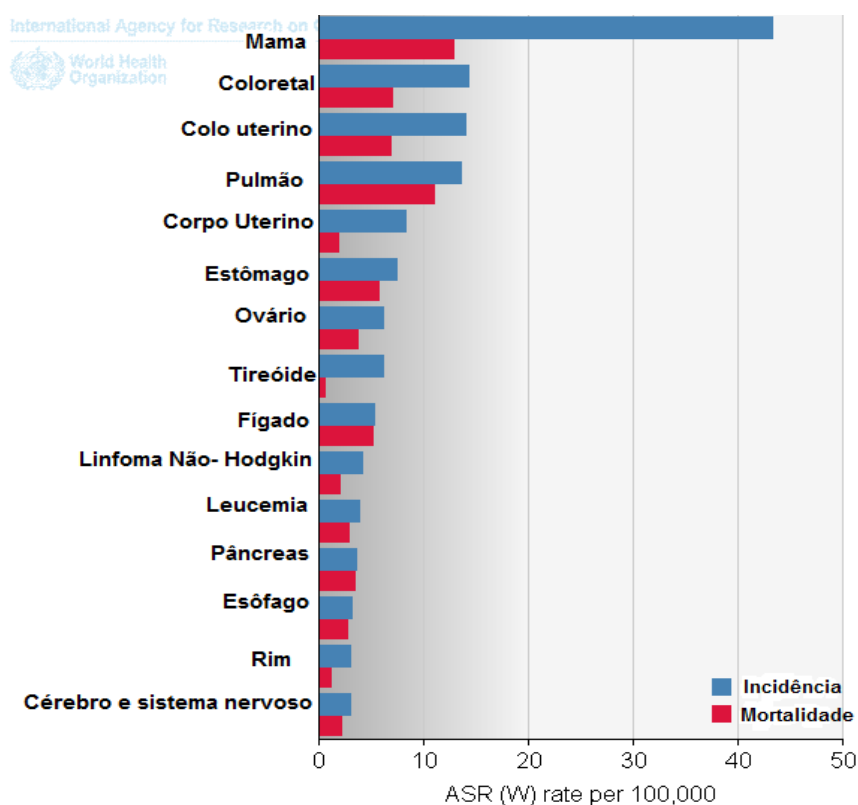
O gene *VEGFA* é altamente polimórfico, com polimorfismos na região promotora: rs699947, rs1570360 e rs833061; na região 5' não traduzida (5'-UTR): rs2010963, rs25648; e na região 3' não traduzida (3'-UTR): rs3025039, rs10434. Tais polimorfismos situam-se próximos a potenciais elementos reguladores [25–27], o que parece justificar seus efeitos sobre os níveis de VEGFA em diferentes modelos celulares [27–30], incluindo câncer de mama [31].

Em decorrência desta variabilidade genética, os polimorfismos do gene *VEGFA* podem representar alvos interessantes para avaliação farmacogenômica, em função de sua potencial contribuição como biomarcadores de evolução clínica ou de resposta terapêutica do câncer de mama. Desta forma, este trabalho teve como objetivo investigar a associação entre polimorfismos do gene *VEGFA* e características histopatológicas com valor prognóstico no câncer de mama, bem como avaliar o potencial de genótipos e haplótipos *VEGFA* como preditores do risco de progressão da doença.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O câncer de mama como problema de Saúde Pública

O câncer de mama é considerado um problema de saúde pública por ser a segunda localização neoplásica mais comum no mundo e por ser o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres (Figura 1), com uma estimativa de 1,67 milhões de novos casos de câncer diagnosticados em 2012 (25% de todos os cânceres) [2,32]. Em 2012, 1,7 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama [32].



**Figura 1:** Incidência e mortalidade das localizações de câncer mais frequentes na população feminina mundial em 2012.

ASR=Taxa ajustada por idade. Adaptado de [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx) [32].

O câncer de mama é o mais comum em mulheres, tanto em regiões desenvolvidas (794.000 casos) quanto em regiões menos desenvolvidas (883.000 casos) [32]. Contudo, as taxas de incidência variam quase quatro vezes entre as regiões do mundo, sendo de 27 por 100.000 mulheres na África e no Oriente Médio (Ásia) e 96 por 100.000 mulheres na Europa Ocidental [32]. As variações nos perfis de incidência por câncer de mama no mundo devem-se, sobretudo, a diferenças populacionais e de hábitos de vida como fatores reprodutivos e hormonais, história menstrual longa, uso de contraceptivos orais e nunca ter filhos [2].

Nos países desenvolvidos, a implantação de políticas de rastreamento e detecção precoce no início da década de 1980 resultou em aumento da incidência, que atingiu seu pico em 2000 [33]. Entre 2002 e 2003, as taxas de incidência caíram drasticamente devido à diminuição do uso de hormônios na menopausa e das taxas de mamografias nas triagens de diagnóstico. Desde então, a incidência de câncer de mama tem-se mantido estável [2,33].

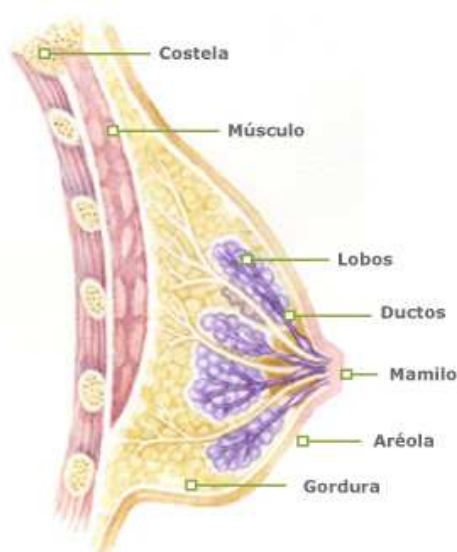
Com relação à mortalidade, o câncer de mama é também a causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres tanto em regiões desenvolvidas quanto nas regiões menos desenvolvidas, sendo responsável por 522.000 mortes em 2012 [32]. Os países que conseguiram sucesso nas estratégias de rastreamento e detecção precoce do câncer de mama têm apresentado redução progressiva das taxas de mortalidade [2]. Na Europa Ocidental, a incidência de câncer de mama já atingiu mais de 90 novos casos por 100.000 mulheres por ano, em comparação com 30 por 100.000 mulheres no leste da África. Entretanto, as taxas de mortalidade por câncer de mama nestas duas regiões são quase idênticas, em torno de 15 por 100.000 habitantes, o que aponta claramente para um diagnóstico tardio e pior sobrevida para as mulheres da África oriental [32].

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer [4], excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais comum entre mulheres, com 57.120 casos novos esperados para 2014, com uma incidência estimada de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Com base nos dados disponíveis de Registros Hospitalares, 60% dos tumores de mama, em média, são diagnosticados no estágio III ou IV [34,35], o que favorece maior risco de mortalidade.

## **2.2 Anatomia da mama feminina normal**

O tecido mamário é composto de epitélio especializado e estroma. A maioria do estroma mamário consiste em tecido conjuntivo fibroso denso misturado com tecido adiposo (estroma interlobular). Os lóbulos são confinados por um estroma mamário específico hormonalmente responsivo, delicado e mixomatoso que contém uma disseminação de linfócitos (estroma intralobular) [36]. Seis a dez dos principais sistemas ductais originam-se no mamilo. O epitélio escamoso queratinizado da pele sobrejacente continua dentro dos ductos e então muda abruptamente para um epitélio cubóide de camada dupla. A pele areolar circunjacente é pigmentada e sustentada por musculatura lisa [36].

Do nascimento até a puberdade, a glândula mamária é imatura e encontra-se no estado de quiescência, no qual não há crescimento. Sua composição nessa fase envolve apenas os seios e ductos galactóforos, constituídos por porções dilatadas e ramificações [37]. Durante a puberdade, hormônios ovarianos estimulam um rápido alongamento dos ductos e conseqüentemente a diferenciação em células do epitélio luminal e células mioepiteliais que compõem o sistema de ductos (FIGURA 2) [37]. Na mulher adulta, as ramificações do ducto terminal criam um agrupamento de ácinos pequenos semelhante à uva para formar o lóbulo [36].

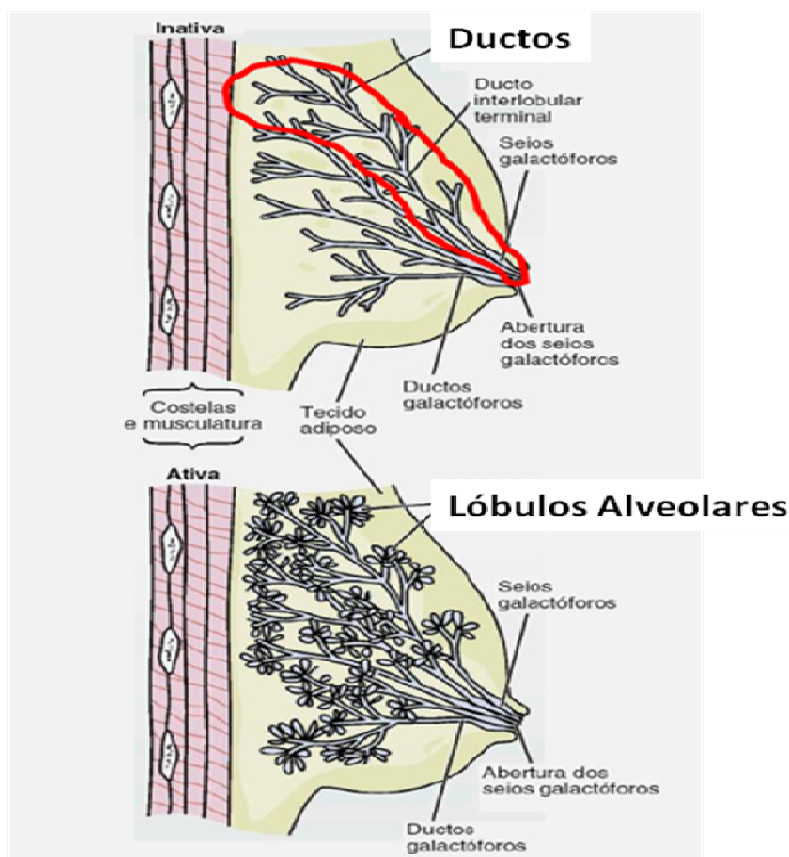


**Figura 2:** Anatomia de mama durante a puberdade não gravídica

Fonte: <http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/qual-a-estrutura-normal-da-mama.html>

Na mama normal, os ductos e lóbulos são forrados por dois tipos de células. Uma camada inferior, plana e descontínua de células contráteis contendo miofilamentos (células mioepiteliais) que ficam sobre a membrana basal [36] e uma segunda camada de células epiteliais que demarcam os lúmens. As células luminais do ducto terminal e do lóbulo produzem leite, porém aquelas que revestem o grande sistema ductal não [36].

Alterações hormonais durante a gravidez dão início a uma fase cíclica de desenvolvimento, na qual há a transição de uma morfologia predominante de ductos para uma morfologia de glândula lóbulo-alveolar (FIGURA 3) devido à ação de vários hormônios como estrógenos, progesterona, prolactina e lactogênio placentário [38].



**Figura 3:** Glândula mamária inativa e ativa

Fonte: <http://dc307.4shared.com/doc/JMVjM-tH/preview.html>

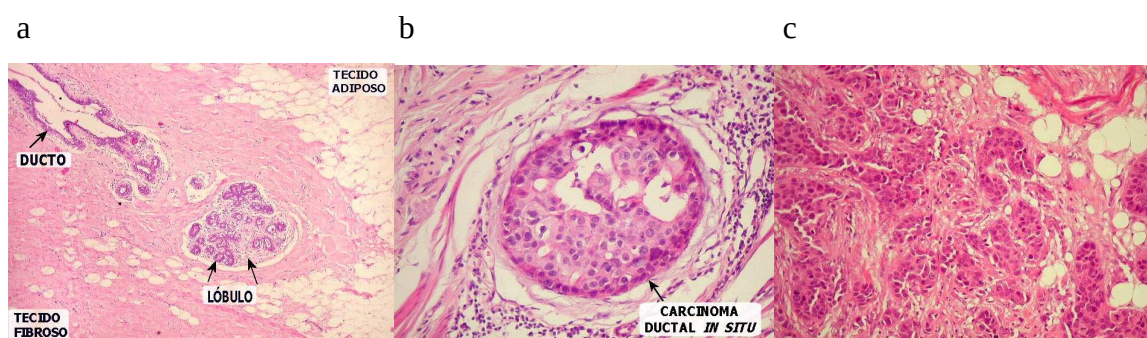
Durante a lactação, o leite é produzido pelas células epiteliais dos alvéolos e ao final dessa fase, grande parte dos alvéolos desenvolvidos durante a gestação degenera, sofrem apoptose e são eliminados por ação de macrófagos [38]. Ao se aproximar da menopausa, o tecido mamário sofre um processo de atrofia e é substituído progressivamente por tecido adiposo, até se constituir quase exclusivamente por esse tecido e resquícios de tecido glandular na fase de pós- menopausa (38). A transição entre essas fases é sinalizada e controlada pela ação de hormônios, principalmente o estrogênio. Entretanto, pouco se sabe sobre como as células epiteliais e estromais são preparadas para responder a esses sinais e seus efeitos sobre a saúde no início da vida e nas doenças na vida adulta, como a susceptibilidade ao câncer [39].

### 2.3 Caracterização tumoral do câncer de mama e fatores prognósticos

As neoplasias de mama têm apresentação variada de tecidos envolvidos na gênese das lesões epiteliais, mesenquimais e mioepiteliais. Morfologicamente, os tumores de mama podem ser classificados como:

- Carcinoma *in situ* – carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Refere-se ao câncer no qual as células se mantiveram dentro do local de origem (ducto ou lóbulo), que não se espalharam para o tecido mamário. O tipo mais comum de câncer não invasivo é o ductal *in situ*, que se limita à membrana basal dos ductos e pela classificação por estadiamento pode ser considerado estágio 0 [40].
- Carcinoma invasivo – quando as células tumorais extravasaram as membranas que revestem os ductos ou ultrapassam o interior dos lóbulos, invadindo os tecidos mamários aumentando o risco de metástase. O tipo mais frequente é o ductal, seguido pelo carcinoma lobular. Entre os tipos especiais, alguns têm comportamento biológico mais favorável em relação ao tipo ductal, como os carcinomas tubular, mucinoso do tipo colóide, cribriforme infiltrativo, secretor e adenocístico, enquanto outros têm comportamento mais agressivo, tais como o metaplásico e o micropapilar invasivo [41].

A figura 4 ilustra o um tecido mamário normal e alguns dos tipos histológicos dos carcinomas mamários.



**Figura 4:** a) Tecido mamário normal; b) Carcinoma ductal *in situ*; c) Carcinoma lobular invasivo.

Fonte: <http://anatpat.unicamp.br>.

### 2.3.1 Tamanho tumoral

O tamanho do tumor e a condição dos linfonodos axilares são os mais importantes indicadores prognósticos para câncer de mama e constituem a base do estadiamento TNM (T: tumor; N: linfonodo; M: Metástase). Com o advento da mamografia e a gradual difusão do método, associada a uma maior conscientização da população sobre sua importância, vem-se observando em alguns países desenvolvidos a redução significativa no tamanho dos tumores no momento do diagnóstico [42].

Os tumores de menor tamanho apresentam melhor prognóstico, tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença, independentemente do tipo de tratamento aplicado [7,42].

### 2.3.2 Linfonodos axilares

A detecção de células neoplásicas em linfonodos adjacentes a um tumor primário caracteriza-se pela ocorrência de metástase linfonodal [43]. As células malignas chegam à linfa muito mais facilmente do que à circulação ou a outros órgãos distantes, sendo o sistema linfático, portanto, o sítio mais comum de metástases [44].

O impacto negativo do status linfonodal nas sobrevidas global e livre de doença é modulado pelo tamanho da metástase, número de linfonodos acometidos e localização das estruturas envolvidas (axilar, supra ou infraclavicular [43,45]. No câncer de mama, pacientes diagnosticados com invasão metastática linfonodal possuem um risco 60% maior de mortalidade quando comparados com pacientes sem invasão linfonodal [46,47].

### 2.3.3 Grau Histológico

A graduação histológica foi introduzida por Pattey e Scarff, em 1928 [48], e modificada por Ellston e Ellis, em 1991, sendo chamada de classificação de Nottingham [49]. Este sistema de classificação busca estimar o quanto as células neoplásicas se distanciam de um fenótipo normal [50]. A União Internacional Contra o Câncer (UICC) utiliza o sistema de Nottingham para graduação histológica de 1 a 3 de acordo com a formação tubular [porcentagem de câncer composto por estruturas tubulares, o pleomorfismo nuclear (alteração no tamanho das células e uniformidade) e a contagem mitótica (taxa de divisão celular) presente na análise microscópica tumoral [51]. O aumento do grau histológico é associado a piores desfechos clínicos. A caracterização é relativamente simples, com custo econômico baixo, requerendo apenas a avaliação de um patologista treinado para análise microscópica de um corte de tecido tumoral corado com hematoxilina-eosina.



### 2.3.4 Receptores

Os receptores hormonais (RH) destacam-se dentre os marcadores moleculares como definidores de perfil tumoral. De acordo com o nível de amplificação, o status dos RH exibe uma associação com o perfil proliferativo da neoplasia [52]. Existem diferenças na probabilidade de sobrevida e nas taxas e locais de recidiva entre o status positivo e negativo para RH (de estrogênio, e em menor extensão o de progesterona). Estas diferenças aumentam de acordo com a fração de células positivas e negativas e o valor prognóstico desaparece após dois anos [53].

#### 2.3.4.1 Receptor de Estrogênio

O RE é um regulador de crescimento celular, proliferação e diferenciação. É o mais importante marcador biológico de resposta terapêutica para o tratamento hormonal adjuvante do câncer de mama [54]. A presença de receptores de estrogênio com status positivo (RE+) no tumor é indicativo para terapia antiestrogênica, embora a positividade do receptor não defina obrigatoriamente uma resposta favorável [53].

O tamoxifeno, fármaco utilizado em terapias endócrinas, é um modulador seletivo do RE e inibe a ligação deste receptor ao estradiol, interrompendo uma série de mecanismos que regulam a replicação e proliferação celular. Os tumores com status negativo de RE (RE-) associam-se a maiores taxas de recidiva e óbito nos primeiros anos após cirurgia [53,55].

#### 2.3.4.2 Receptor de Progesterona

O receptor de progesterona (RP) é codificado pelo gene de mesmo nome, *RP*, que é regulado pela atividade do receptor de estrogênio (RE- $\alpha$ ) [56]. Quando o RP está presente nas células neoplásicas, frequentemente significa que a atividade do RE- $\alpha$  está funcional. O RP é crucial no desenvolvimento do lóbulo alveolar da mama, e é responsivo ao hormônio progesterona, ativando algumas funções celulares, incluindo proliferação [57].

Com relação ao desfecho clínico, mulheres diagnosticadas com tumores com status RP negativo (RP-) possuem pior sobrevida global do que quando o RP é positivo (RP+) [58,59]. Porém, o status de RP sozinho tem um valor preditivo fraco [57,60]. Apesar de existir uma associação entre a expressão de RE e RP, suas expressões podem ter status diferentes nos

tumores de mama [50]. O status do RP também tem valor preditivo de resposta à terapia hormonal adjuvante no câncer de mama: pacientes com status RP- apresentam pior tempo livre de recorrência para este tratamento, independentemente do status do RE [58,61].

#### 2.3.4.3 HER2

A expressão tumoral do HER2 (HER2, ErbB2 ou HER2/neu) também compõe o perfil de evolução da doença e a definição da conduta terapêutica. Entre 15 a 30% dos tumores de mama super-expressam HER2, o que implica em menor sobrevida global e livre de doença para estas pacientes [62,63]. Tumores que têm alta expressão de HER2 (HER2+) mais frequentemente apresentam anormalidades na via da proteína tumoral p53, possuem status de receptores hormonais negativos, apresentam infiltração de nódulos linfáticos e alto índice mitótico, sendo que todos estes marcadores são de mau prognóstico para o câncer de mama [64,65].

A avaliação do status de expressão de HER2 por imunohistoquímica tem sido muito valiosa no momento da predição da resposta tumoral a tratamentos com o anticorpo monoclonal trastuzumab ou outras terapias-alvo [66].

#### 2.3.5 Subtipos moleculares

Estudos de caracterização do perfil de expressão gênica em tumores de mama levaram à proposição de um novo sistema de classificação, baseado na expressão de RE, RP, HER2 e de outros marcadores moleculares, visando melhor personalização dos tratamentos e condutas médicas (Revisado por Eroles *et al.*, 2012) [67]. De acordo com este sistema, os tumores de mama podem ser de quatro subtipos, conforme descrito abaixo.

Luminal A, é o subtipo mais comum, representando 50 a 60% do total de casos e é caracterizado pela expressão de genes ativados por fatores de transcrição que são tipicamente expressos no epitélio luminal dos ductos mamários. Apresentam expressão RE, RP, gene linfoma de células B2 (Bcl-2), citoqueratina CK8/18, ausência da expressão do receptor HER2, baixa taxa de proliferação e baixo grau histológico. A expressão do fator de transcrição específica de células T (GATA3) é maior neste subgrupo. A taxa de recorrência é cerca de 27,8% e o tratamento baseia-se na 3ª geração de inibidores hormonal de aromatase em

mulheres na fase pós-menopausa, moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), como tamoxifeno e reguladores seletivos do RE, como fulvestrante [67].

O Luminal B, corresponde de 10 a 20% dos cânceres de mama e, se comparados ao Luminal A, são mais agressivos, com maior grau histológico e índice proliferativo e pior prognóstico. A metástase óssea é a mais comum (30%), seguida da metástase hepática [13,8%]. A principal diferença entre os tipos luminal B e luminal A é que no primeiro há o aumento da expressão de genes de proliferação como Ki67 e ciclina B1 e também expressão de EGFR e HER2 [67].

O subtipo HER2 corresponde a cerca de 15 a 20% dos cânceres de mama e são caracterizados por maior expressão do HER2 e de outros genes associados a via do HER2, com aumento da expressão de genes relacionados com a proliferação. Em contra-partida, esses tumores são negativos para RE e RP. Morfologicamente, são altamente proliferativos, sendo que 75% têm alto grau histológico e mais de 40% possuem mutações no gene p53 [67].

O subtipo basal representa de 10 a 20% de todos os carcinomas de mama. Este termo foi usado porque este subtipo expressa genes geralmente presentes em células mioepiteliais de mama normal [68]. Clinicamente, esse subtipo é caracterizado por maior frequência em pessoas mais jovens, apresenta maior tamanho tumoral, alto grau histológico e alta frequência de linfonodos positivos. Tumores do subtipo basal tendem a ser CDI com alto índice mitótico e necrose tumoral. Um dos fatores mais importantes é a ausência da expressão de RE, PR e HER2. O subtipo basal tem pior prognóstico em relação aos tipos luminal A e B, com maior taxa de recorrência nos primeiros 3 anos, apesar da alta taxa de resposta à quimioterapia [67].

Na prática clínica, a avaliação histopatológica incorporou a caracterização da presença de receptores hormonais e de HER2 por análise imunohistoquímica em espécimes tumorais, levando a uma adaptação da subclassificação dos tumores de mama com base nos perfis de imunomarcção [69]. Neste sistema, os tumores são definidos conforme descrição abaixo:

- ☐ luminal A: tumores RE+, RP+, HER2 -;
- ☐ luminal B: tumores RE+, RP-, HER2- ou RE+, RP-, HER2+ ou RE-, RP+, HER2- ou RE+, RP+, HER2+;
- ☐ tipo HER2: tumores RE-, RP+, HER2+ ou RE-, RP-, HER2+;
- ☐ triplo negativo: RE-, RP-, HER2-.

Embora esta classificação baseada na análise imuno-histoquímica de espécimes tumorais parafinadas tenha vantagens práticas para a definição de condutas terapêuticas, reduzindo as dificuldades operacionais em relação à avaliação de material genético em tumores frescos ou congelados, deve-se observar que tumores triplo negativos abrangem, mas

não correspondem necessariamente ao subtipo basal. A definição do subtipo basal requer a avaliação de outros alvos moleculares, incluindo (pelo menos) citoqueratina 5 e 6 e EGFR [70–72].

### 2.3.6 Estadiamento

O sistema mais comum para descrever a extensão do câncer de mama é o TNM, proposto pela UICC (*União Internacional Contra o Câncer*) [73]. Neste sistema, T categoriza o tamanho do tumor, em centímetros; N indica o número de linfonodos acometidos e M informa se o tumor se estende a outros órgãos à distância (vide Anexo I).

O estadiamento é a combinação das categorias TNM (vide Anexo II), levando a 5 estágios do câncer de mama segundo a gravidade e o alcance do tumor.

## 2.4 Definição da conduta terapêutica

Atualmente, o tratamento do câncer de mama pode ser realizado através de cirurgia, radioterapia e/ou tratamento sistêmico com inibidores hormonais, antineoplásicos e anticorpos monoclonais. A escolha da melhor conduta terapêutica depende do tamanho e da localização da lesão, da relação entre o tamanho da mama e do tumor, de uma avaliação minuciosa da mamografia e do desejo da paciente [74].

As opções cirúrgicas incluem cirurgia conservadora da mama, quando o tumor tem diâmetro inferior a 2 centímetros e margens cirúrgicas livres de comprometimento; mastectomia simples ou mastectomia radical modificada, com retirada do músculo pequeno peitoral, quando é impossível assegurar a obtenção de margens livres em função da extensão ou multicentricidade do tumor [75].

A radioterapia é indicada em mulheres antes ou após o tratamento cirúrgico, para reduzir o tamanho do tumor ou o risco de recorrência, respectivamente, aumentando as chances de sobrevida [74].

O tratamento farmacológico do carcinoma de mama envolve, atualmente, a utilização de uma variedade de compostos, como quimioterápicos antineoplásicos, incluindo a quimioterapia de compostos citostáticos, compostos hormonais e modificadores de resposta

biológica, em particular representados pelos anticorpos monoclonais e os inibidores de tirosina-cinase [75–77].

Existem dois tipos de tratamento sistêmico disponíveis: a terapia adjuvante e a neoadjuvante [77]. A terapia adjuvante consiste em tratamento feito após a cirurgia de ressecção tumoral, com a finalidade de aumentar o tempo livre de recorrência da doença [78,79]. Já o tratamento quimioterápico neoadjuvante consiste na aplicação de procedimentos sistêmicos em pacientes portadores de carcinoma localmente avançado da mama, contribuindo para cirurgias menores, com possível benefício na sobrevida [80,81].

Nos últimos anos, estudos clínicos e meta-análises vêm abordando o favorecimento do uso de agentes como as antraciclinas e os taxanos no tratamento antineoplásico adjuvante [78,79]. A hormonioterapia no tratamento adjuvante do câncer de mama tem tido grande impacto positivo, beneficiando mulheres cujas neoplasias expressam receptores hormonais positivos. Inúmeros estudos têm demonstrado que a utilização de tamoxifeno, um antagonista do receptor de estrogênio, por 5 anos após tratamento cirúrgico, reduz efetivamente o risco de recorrência, a incidência de câncer de mama contralateral e a mortalidade em mulheres, independentemente da faixa etária [82]. O advento da terapia anti-HER2 trouxe uma nova linha de tratamento para inibir a progressão da doença [83]. A partir daí, novos candidatos a terapia-alvo vêm sendo estudados.

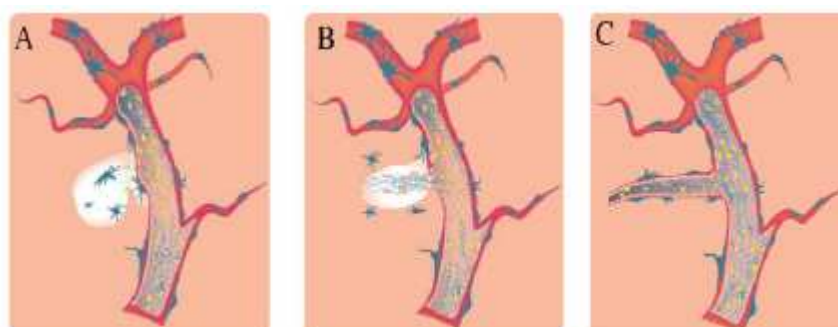
Cerca de 15 a 30% dos tumores de mama super-expressam HER2 [62], o que implica em menor sobrevida global e livre de doença a estes pacientes [84]. Os anticorpos contra o receptor HER2, como o trastuzumab (Herceptin®, Genentech, South San Francisco, Califórnia), podem inibir o crescimento das células tumorais. Este medicamento é um anticorpo monoclonal formado por uma imunoglobulina G1 humanizada de DNA recombinante que se liga seletivamente e com alta afinidade ao HER2 [85]. A introdução do tratamento com trastuzumab permitiu modificar a história natural dos tumores positivos para HER2 [86], já que em combinação com a quimioterapia apresenta taxas de resposta de até 84% [87].

## 2.5 Angiogênese

O termo angiogênese é uma palavra de origem grega (aggeîon: vaso, gênesis: formação) utilizada para designar a produção de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, e posterior remodelamento e maturação para a formação da neovasculatura [88,89]. A angiogênese fisiológica ocorre durante a reprodução, desenvolvimento e reparo de feridas, e

é essencial para restabelecer o suprimento de oxigênio e nutrientes durante a cicatrização de tecidos [90–92] sendo geralmente direcionada e autolimitada no tempo (Figura 5).

O controle da angiogênese ocorre por meio da regulação de fatores pró e anti-angiogênicos no organismo. Em condições normais, o organismo é capaz de manter um perfeito equilíbrio entre os moduladores angiogênicos. Nos casos em que o organismo perde o controle sobre a formação de novos sanguíneos, surgem estados patológicos, nos quais a angiogênese pode ser excessiva ou insuficiente [93].



**Figura 5:** Fases da angiogênese fisiológica. A: degradação da matriz extracelular por metaloproteinasas de matriz e subsequente desagregação dos pericitos; B: proliferação e migração de células endoteliais na matriz extracelular provisória; C: formação tubular do capilar (Adaptado de Rundhaug, 2005) [94].

Por outro lado, diversos processos patológicos (Quadro1), incluindo o câncer, podem envolver a indução de neovascularização, sendo que os novos vasos sanguíneos alimentam os tecidos doentes [92]. Quando a angiogênese é insuficiente e os tecidos são incapazes de produzir quantidades adequadas de fatores angiogênicos de crescimento podem ocorrer doenças coronarianas, retardo na cicatrização de ferimentos e derrame cerebral [93,95]. Dessa forma, a modulação da angiogênese proporciona uma estratégia potencial para tratar tais doenças [88].

| Doenças                        | Sintomas                                                   |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Retinopatia Diabética          | Perda da visão                                             |
| Artrite Reumatóide             | Dor e imobilidade da cartilagem destruída                  |
| Aterosclerose                  | Dor no peito e dispnéia                                    |
| Endometriose                   | Dor abdominal devido a sangramento intraperitoneal         |
| Doença de Crohn                | Sangramento intestinal                                     |
| Psoríase                       | Comichão severo persistente                                |
| Fibrose Uterina                | Sangramento vaginal e dor abdominal                        |
| Hipertrofia prostática benigna | Retenção urinária                                          |
| Câncer                         | Sangramento, trombose, anemia, ascite abdominal, dor óssea |

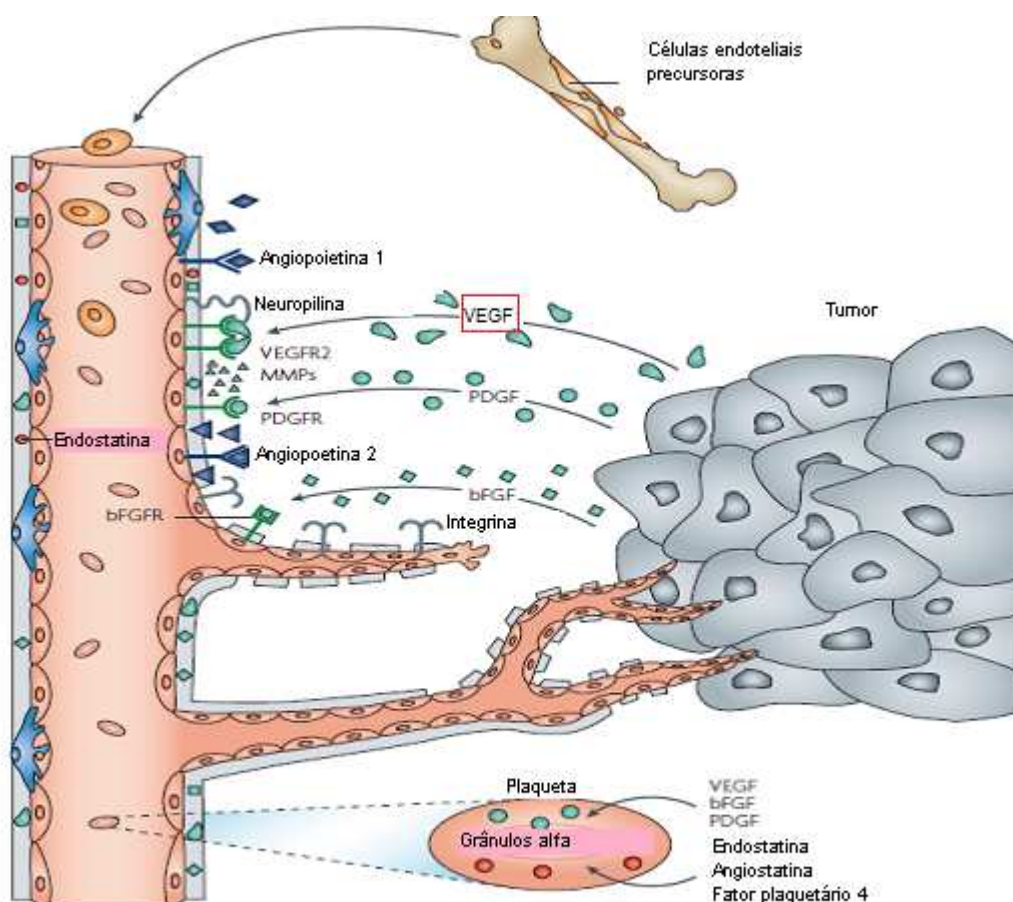
**Quadro 1:** Doenças dependentes de angiogênese (Adaptado de Folkman, 2007) [92].

### 2.5.1 Angiogênese tumoral

A angiogênese é um passo importante no desenvolvimento de câncer, sendo necessária para o crescimento do tumor primário, invasão e metástase [96]. As células tumorais liberam moléculas sinalizadoras aos vasos sanguíneos normais ao seu redor que ativam alguns genes do tecido endotelial que estimulam a formação de novos vasos, ocorrendo assim o desenvolvimento do tumor [92].

Novos vasos sanguíneos são exigidos pela maioria dos tumores sólidos, não só para abastecer demandas metabólicas, mas também para fornecer rotas potenciais para disseminação do tumor e metástase (Figura 6) [92,97].

Várias moléculas participam do complexo processo angiogênico, como o fator derivado do estroma 1 (SDF1), a angiopoietina 2 (ANGPT2), o fator de crescimento placentário, o fator crescimento derivado de plaquetas B (PDGFB) [98], e o VEGFA, que é um dos moduladores mais importantes, pois estimula a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos, e aumenta a permeabilidade vascular [25,88,99].



**Figura 6:** Principais etapas da angiogênese tumoral. A angiopoietina 1 (ANGPT1) liga-se ao TIE2 endotelial (também conhecido como TEK) do receptor e ajuda a manter um estado normalizado dos vasos sanguíneos. O VEGF é secretado pelas células tumorais e se liga ao seu receptor (VEGFR2) e ao seu co-receptor, a neuropilina, em células endoteliais. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são liberadas a partir de células tumorais, mas também por células endoteliais estimuladas por VEGF. As MMPs mobilizam as proteínas pró-angiogênicas do estroma, mas também podem decompor endostatina em colágeno na parede do vaso e participar na clivagem da angiostatina em plasminogênio circulante. As células tumorais secretam ANGPT2, o qual compete com ANGPT1 para a ligação com o receptor de TIE2 endotelial. A ANGPT2 aumenta a degradação da membrana basal vascular e migração de células endoteliais facilitando, portanto, a formação de vasos. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), uma proteína angiogênica secretada por alguns tumores, pode regular positivamente seu próprio receptor (PDGFR) em células endoteliais. O fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF, também conhecido como o FGF2) é secretado por outros tumores. As integrinas, sobre as células endoteliais, transportam sinais em ambas as direções e facilitam a ligação de células endoteliais na membrana extracelular, um requisito para as células manterem a viabilidade e a capacidade de resposta para as proteínas reguladoras do crescimento. Certas proteínas pró-angiogênicas regulam positivamente as integrinas endoteliais e sustentam a viabilidade de células endoteliais durante os destacamentos intermitentes necessários para migrar para um tumor e, simultaneamente, aumentar a sua sensibilidade aos reguladores de crescimento, tanto mitogênico (VEGF ou bFGF) quanto anti-mitogênico (endostatina). Novas células endoteliais não se originam de vasos vizinhos, algumas chegam como células endoteliais precursoras da medula óssea e os fatores de crescimento não são todos entregues ao endotélio local pelas células tumorais. Algumas proteínas angiogênicas reguladoras (tanto pró quanto anti-angiogênicas) são excretadas por plaquetas, armazenadas em grânulos alfa (representado em verde e vermelho, respectivamente) e parecem serem lançadas dentro da vasculatura do tumor (Traduzido de Folkman, 2007) [92].

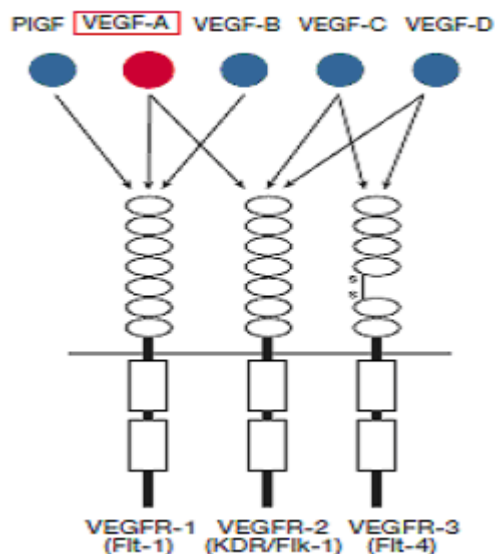


A formação de novos vasos também fornece ao tumor uma rota por onde as células tumorais podem entrar na circulação sanguínea e formar metástases à distância. A elevada produção de VEGFA está associada à ocorrência de metástase, quimioresistência e pior prognóstico quando comparados com os tumores negativos para VEGFA. Os níveis de VEGFA circulantes no soro também estão elevados em tumores de mama, de pulmão e do aparelho gastrointestinal [100,101].

### 2.5.2 VEGFA

O VEGFA é uma glicoproteína homodimérica de 30 – 46 kDa, que atua como fator de crescimento ligante de heparina, capaz de induzir proliferação de células endoteliais, angiogênese, permeabilidade microvascular a fluídos e a proteínas plasmáticas, e quimiotaxia [102]. As células do endotélio vascular possuem receptores específicos para o VEGFA, que é secretado por células mesenquimais e do estroma, dentre as quais a principal é o macrófago [89].

O gene *VEGFA* está localizado no cromossomo 6p21.3 (Gene ID 7422) e é composto por oito éxons, exibindo splicing alternativo para formar uma família de proteínas [103,104]. O splicing alternativo na região exônica foi inicialmente demonstrado que resulta na geração de quatro diferentes isoformas, VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189 e VEGFA206, tendo, respectivamente, 121, 165, 189 e 206 aminoácidos após a sequência do sinal de clivagem [105,106]. A família de genes *VEGF* consiste de *VEGFA* (ou *VEGF*), *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, *VEGFE* e o fator de crescimento placentário (PGF). O *VEGFA* está principalmente envolvido na angiogênese, enquanto o *VEGFC* e *VEGFD* estão envolvidos na linfangiogênese [89,100,107]. Os principais receptores de VEGF que parecem estar envolvidos na iniciação da cascata de transdução de sinais compreendem uma família de receptores tirosina-cinase, constituída de três membros: VEGFR1 (anteriormente conhecido como Flt-1), VEGFR2 (anteriormente conhecido como KDR ou Flk-1) e VEGFR3 (previamente conhecido como Flt-4) (Figura 7) [108].



**Figura 7:** Interação das diferentes isoformas de VEGFA com seus respectivos receptores. (Yancopoulos *et al.*, 2000) [108].

Embora o crescimento e a maturação de vasos sejam processos altamente complexos, cuja coordenação requer a ativação sequencial de diversos fatores, há um consenso de que a sinalização do VEGFA representa um passo crucial para a angiogênese fisiológica e tumoral [109]. As células tumorais secretam proteínas no espaço extracelular que modulam a produção e secreção de VEGFA por fibroblastos do estroma tumoral, que se liga ao seu receptor (VEGFR2) e à neuropilina nas células endoteliais [92,100,110].

A hipóxia é o principal estímulo que induz a angiogênese [111,112]. De acordo com Rey & Semenza (2010) [98], a expressão dos fatores de crescimento angiogênicos incluindo o VEGFA, é induzida por hipóxia, pela atividade de transcrição de HIF-1 $\alpha$  (fator indutor de hipóxia). O HIF-1 $\alpha$  se liga à sequência de uma região específica no gene *VEGFA* aumentando sua transcrição [112]. A hipóxia existe no microambiente de diversos tumores devido à anormalidade estrutural e funcional dos vasos e ao aumento do consumo de oxigênio causada pela rápida proliferação de células tumorais [113]. A super-expressão de HIF-1 $\alpha$  está associada com pior evolução e resposta ao tratamento de tumores humanos [109]. A produção elevada de VEGFA e a alta vascularização encontrada em tumores de mama avançados do tipo HER2-positivo pode, em parte, ser devida à super-expressão de HIF-1 $\alpha$  [114]. Portanto, HIF-1 $\alpha$  e hipóxia são determinantes fatores angiogênicos que regulam o processo de invasão e metástase, influenciando na agressividade do tumor [113].

## 2.6 Individualização da terapia: Farmacogenômica

A farmacogenética ou farmacogenômica estuda a variação da resposta aos fármacos devido a fatores genéticos ou hereditários [115] e pode ser considerada como um caso especial de interação gene-ambiente, no qual a exposição ambiental (um fármaco) pode ser bem avaliada e direcionada a um indivíduo específico [116].

As variações na resposta ao tratamento podem ser decorrentes de vários fatores, tais como doenças, diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos, fatores ambientais e fatores genéticos. Considerando que os fatores genéticos possam contribuir para a eficácia e a segurança de um medicamento, a farmacogenética e/ou farmacogenômica vem sendo fomentada recentemente [117].

Após a conclusão do projeto genoma humano, um mapa de haplótipos (HapMap) foi desenvolvido pelo Consórcio Internacional HapMap com a intenção de identificar polimorfismos em todo o genoma humano fornecendo uma poderosa ferramenta para entender as variações genéticas e respostas aos medicamentos. Esse conhecimento pode permitir o desenvolvimento de medicamentos personalizado baseados na presença de polimorfismos genéticos e consequentemente no genótipo de cada paciente [117].

### 2.6.1 Polimorfismos genéticos

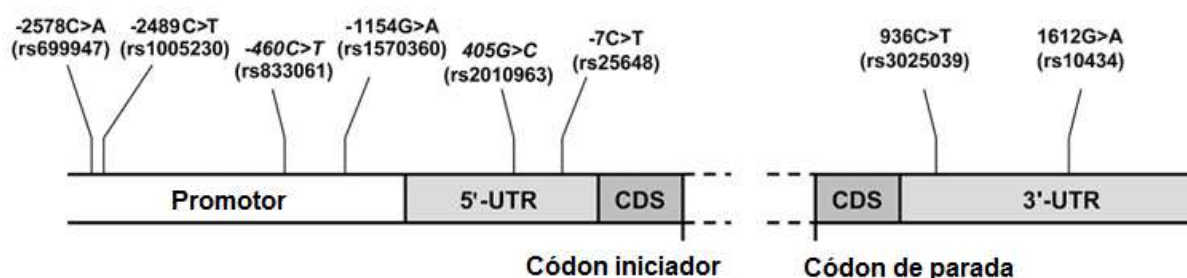
O polimorfismo genético é a ocorrência simultânea em uma mesma população de duas ou mais formas distintas de um gene (alelos), que se caracterizam por variações nas sequências de nucleotídeos, tais como substituições, deleções, inserções, duplicação ou deleção de genes. Por definição, um gene é considerado polimórfico quando o alelo menos frequente ocorre na população com uma frequência de pelo menos 1% e não manifesta uma doença [25,118].

É muito comum a ocorrência de duas possibilidades de nucleotídeos na sequência do DNA do genoma humano, o que é chamado de substituição de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* – SNP). Os SNPs ocorrem cerca de uma vez a cada 1.000 pares de bases. As combinações possíveis geralmente formam 3 possibilidades de genótipos, que podem ou não diferir em fenótipos. As variações alélicas podem resultar em alteração da expressão ou da funcionalidade dos produtos gênicos [119]. Estudos anteriores sugerem o

papel de SNPs do *VEGFA* na susceptibilidade e na agressividade de diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama [25,120].

## 2.6.2 SNPs do gene *VEGFA* e câncer de mama

O gene *VEGFA* é altamente polimórfico e vários SNPs na região promotora, região 5'-UTR e 3'-UTR do gene *VEGFA* foram identificados. Dentre eles, destacam-se os SNPs representados na figura 8 (Adaptado de Jain *et al.*, 2009) [121]. Na região promotora encontram-se os SNPs -2578C>A (rs699947), -2489C>T (rs1005230), -460C>T (rs833061) e -1154G>A (rs1570360) [26,27]. Na região 5'-UTR estão os SNPs 405G>C (rs2010963) e o -7C>T (rs25648), enquanto que na região 3'-UTR encontram-se o 936C>T (rs3025039) e 1612G>A (rs10434) [25].



**Figura 8:** Estrutura do gene *VEGFA* e a posição dos SNPs em relação ao sítio de início da transcrição. A linha tracejada indica a região codificante (CDS) e sete íntrons. UTR é a região não traduzida do gene (Adaptado de Jain *et al.*, 2009) [121].

Os nas regiões promotoras, 5'-UTR e 3'-UTR afetam potenciais elementos reguladores que são sensíveis a hipóxia e contribuem para a alta variabilidade da produção de VEGFA entre os tecidos [25–27]. Os SNPs rs699947, rs833061 e rs1570360, presentes na região promotora do gene, mostram maior atividade de transcrição e associação com alto nível da proteína final [122]. O SNP rs2010963, localizado na região 5'-UTR, afeta a eficiência da tradução de proteínas e está significativamente correlacionado com a produção de VEGFA a partir de células mononucleadas do sangue periférico [27]. Já o SNP rs3025039, na região 3'-UTR, influencia a concentração de VEGFA plasmático circulante e a expressão de VEGFA nos tecidos tumorais [23,29,123]. Tal efeito parece se dever ao impacto destes SNPs sobre a estabilidade do RNAm de *VEGFA* [123].

Em relação a frequência dos SNPs, na população brasileira, um estudo caso-controle de mulheres com endometriose demonstrou que, entre os casos, o SNP rs699947 apresentou uma frequência do alelo variante de 42%, o rs833061 de 52%, o rs 1570360 de 18,6%, o rs 2010963 de 53% e o rs 3025039 de 18% [124].

No câncer de mama, alguns SNPs no gene *VEGFA* têm mostrado grande importância no prognóstico da doença [22,23,31,96,97,101,121,125–131], sendo associados com maior susceptibilidade [22,31,96,97,101,128,130] ou agressividade da doença [31,101,128,129,131], bem como com piores desfechos [23,125–127,129]. As tabelas 1, 2 e 3, adaptadas da revisão de Sa-nguanraksa & O-charoenrat (2012), resumem os principais achados acerca da influência dos SNPs do *VEGFA* no câncer de mama [25].

Os dados sobre o papel do *VEGFA* no câncer de mama ainda são controversos. Em relação à susceptibilidade dos tumores, não há um consenso sobre a influência do SNP rs699947. Jacobs *et al.* (2006) encontraram um aumento do risco de câncer de mama invasivo para o alelo C [130], enquanto Schneider *et al.* (2008) encontraram maior risco para o genótipo AA [132]. Para os SNPs rs1570360, rs833061 e rs2010963, Sa-nguanraksa & O-charoenrat (2012) sugerem ausência de efeito sobre a susceptibilidade ao câncer de mama [25]. Para o SNP rs3025039, diversos autores, avaliando populações europeias, sugerem que o alelo T esteja associado à redução do risco para câncer de mama [31,96,97,133,134]. Contudo, Jacobs *et al.* (2006) encontraram uma redução do risco para o carcinoma *in situ* considerando o genótipo CC na população americana [130].

Em relação à influência dos SNPs de *VEGFA* sobre a agressividade dos tumores, os dados são bastante heterogêneos devido à variedade de condições clínicas e desfechos observados, sendo difícil obter um consenso [25]. Nesse contexto, surge a necessidade de estudos mais abrangentes para avaliar a real contribuição dos SNPs do *VEGFA* sobre as características histopatológicas com valor prognóstico no câncer de mama, bem como avaliar o potencial de genótipos e haplótipos *VEGFA* como preditores do risco de progressão da doença.

Tabela 1: Estudos dos SNPs do *VEGFA* sobre a susceptibilidade ao câncer de mama

| SNP              | População                               | Tipo de estudo            | Autor                           | Susceptibilidade ao câncer de mama |                                           |                    |
|------------------|-----------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|
|                  |                                         |                           |                                 | Alelo/Genótipo                     | Efeito                                    | OR                 |
| <b>rs699947</b>  | Americana<br>Caucasiana, Afro-Americana | Caso-controle (504/501)   | Jacobs <i>et al.</i> , 2006     | Alelo C                            | Maior risco câncer de mama invasivo       | 1,46 (1,00- 2,14)  |
|                  |                                         | Caso-controle (175/520)]  | Schneider <i>et al.</i> , 2008  | Genótipo AA                        | Maior risco                               | 1,99 (1,06- 3,74)  |
| <b>rs833061</b>  | Caucasiana, Afro-Americana              | Caso-controle (175/520)   | Schneider <i>et al.</i> , 2008  | Genótipo CC                        | Maior risco                               | 2,01 (1,08- 3,76)  |
| <b>rs1570360</b> | Americana                               | Caso-controle (504/501)   | Jacobs <i>et al.</i> , 2006     | Alelo G                            | Maior risco câncer de mama invasivo       | 1,64 (1,02- 2,64)  |
| <b>rs2010963</b> | Caucasiana, Afro-Americana              | Caso-controle (235/235)   | Oliveira <i>et al.</i> , 2011   | Genótipo CC                        | Maior risco comparado a GC + GG           | 2,20 (1,20 - 4,00) |
| <b>rs3025039</b> | Austríaca                               | Caso-controle (500/500)   | Krippel <i>et al.</i> , 2003    | Alelo T                            | Proteção                                  | 0,51 (0,38- 0,70)  |
|                  | Austríaca                               | Caso-controle (500/500)   | Gerger <i>et al.</i> , 2007     | Alelo T                            | Proteção                                  | 0,58 (0,44- 0,76)  |
|                  | Americana                               | Caso-controle (504/501)   | Jacobs <i>et al.</i> , 2006     | Genótipo CC                        | Menor risco para carcinoma <i>in situ</i> | 0,59 (0,37 - 0,93) |
|                  | Polonesa com mutação em BRCA1           | Caso-controle (190/319)   | Jakubowska <i>et al.</i> , 2008 | Alelo T                            | Proteção                                  | 0,63 (0,41- 0,98)  |
|                  | Chinesa                                 | Caso-controle (1184/1093) | Kataoka <i>et al.</i> , 2006    | Alelo T                            | Menor risco em mulheres na pré-menopausa  | 0,45 (0,25- 0,79)  |
|                  | Espanhola                               | Caso-controle (453/461)   | Rodrigues <i>et al.</i> , 2012  | Alelo T                            | Proteção                                  | 0,67 (0,48- 0,92)  |

Tabela 2: Estudos de impacto dos SNPs do *VEGFA* sobre a agressividade do câncer de mama

| SNP       | População               | Tipo de estudo                                                                        | Autor                                 | Agressividade do câncer de mama |                                                          |                        |
|-----------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------|
|           |                         |                                                                                       |                                       | Alelo/Genótipo                  | Efeito                                                   | Teste                  |
| rs699947  | Polonesa, Alemã e Sueca | Caso-controle (1525/1503)<br>Coorte hospitalar de pacientes <i>HER2-like</i> (N= 116) | Jin <i>et al.</i> , 2005              | Genótipo AA                     | Menor tamanho tumoral                                    | Ptrend = 0,04          |
|           | Dinamarquesa            |                                                                                       | Maae <i>et al.</i> , 2012             | Genótipo CC                     | Maior tamanho tumoral                                    | P = 0,014              |
| rs2010963 | Sueca                   | Caso-controle (941/936)                                                               | Jin <i>et al.</i> , 2005              | Genótipo CC                     | Tamanho tumoral maior que 20 mm e maior grau histológico | OR = 2,20 (1,27- 3,82) |
|           | Austríaca               | Caso-controle (804/804)                                                               | Langsenlehner <i>et al.</i> , 2008    | Alelo C                         |                                                          |                        |
|           | Dinamarquesa            | Coorte hospitalar de pacientes <i>HER2-like</i> (N= 116)                              | Maae <i>et al.</i> , 2012             | Genótipo CC                     | Maior tamanho tumoral                                    | P = 0,001              |
| rs3025039 | Austríaca               | Caso-controle (500/500)                                                               | Krippel <i>et al.</i> , 2003          | NS                              | NS                                                       | NS                     |
|           | Caucasiana              | Estudo clínico (N= 137)                                                               | Etienne-Grimaldi <i>et al.</i> , 2011 | Alelo T                         | Tempo de progressão longo da doença                      | P = 0,022              |
|           | Turcos                  | Caso-controle (60/60)                                                                 | Eroglu <i>et al.</i> , 2008           | NS                              | NS                                                       | NS                     |

Abreviações: NS: Não significativa

Tabela 3: Estudos do impacto dos SNPs do *VEGFA* sobre a sobrevida do câncer de mama

| SNP              | População    | Tipo de estudo                                                               | Autor                          | Sobrevida do câncer de mama |                                                                 |                         |
|------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|
|                  |              |                                                                              |                                | Alelo/Genótipo              | Efeito                                                          | Teste                   |
| <b>rs699947</b>  | Caucasiana   | Caso – caso<br>(441/441)                                                     | Kidd et al., 2010              | Genótipo CC                 | Pacientes ER e PR positivos,<br>maior incidência de recorrência | Ptrend = 0,026          |
| <b>rs833061</b>  | Chinesa      | Coorte<br>(N= 1193)                                                          | Lu et al., 2005                | Genótipo CC                 | Menor sobrevida global                                          | HR = 1,5 (0,9 - 2,5)    |
| <b>rs1570360</b> | Chinesa      | Coorte<br>(N= 1193)                                                          | Lu et al., 2005                | GG                          | Menor sobrevida global                                          | HR = 1,6 (1,0 - 2,5)    |
| <b>rs2010963</b> | Dinamarquesa | Coorte hospitalar de<br>pacientes HER2-like<br>(N= 116)                      | Maae et al., 2012              | Genótipo CC                 | Maior risco de recorrência                                      | HR = 2,96 (1,33 - 6,59) |
| <b>rs3025039</b> | Caucasiana   | Estudo clínico<br>(N= 137)                                                   | Etienne- Grimaldi et al., 2011 | Alelo T                     | Menor tempo de progressão                                       | P = 0,022               |
|                  | Austríaca    | Caso (hospitalar)-<br>Controle (populacional)<br>com seguimento<br>(539/539) | Absenger et al., 2013          | Alelo T                     | Maior tempo de progressão                                       | HR = 1,88 (1,02 – 3,46) |



### 3. JUSTIFICATIVA

Sendo o câncer de mama uma doença heterogênea, não é surpreendente que as respostas aos tratamentos também possam variar. Os fatores prognósticos são parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico e servem como preditores da sobrevida do paciente ou do tempo livre de doença. Tais fatores são baseados em características morfológicas do tumor, incluindo tamanho, tipo e grau histológico, bem como presença de metástase em linfonodos ou à distância e de marcadores moleculares que auxiliem a caracterização fenotípica do câncer de mama. Nesse contexto, a busca para melhorar a acurácia dos modelos de predição de resposta terapêutica e evolução clínica tem motivado diversos estudos nas últimas décadas. Tendo em vista que o *VEGFA* parece ter papel crucial no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, sendo um alvo terapêutico em casos mais avançados, e que os SNPs do gene *VEGFA* podem afetar a expressão gênica e potencialmente impactar nos desfechos clínicos, este trabalho pretende avaliar suas implicações no prognóstico do câncer de mama em mulheres brasileiras, de forma a contribuir para a individualização da terapia.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Investigar a associação entre SNPs do gene *VEGFA* e características prognósticas do câncer de mama em pacientes brasileiras e avaliar seu impacto sobre a evolução clínica da doença.

### 4.2 Específicos

- Estimar a frequência dos alelos, genótipos e haplótipos dos SNPs do gene *VEGFA* em coorte hospitalar de mulheres brasileiras com câncer de mama unilateral e não-metastático;
- Avaliar a magnitude de associação entre os genótipos e haplótipos do gene *VEGFA* e características histopatológicas com valor prognóstico para a progressão do câncer de mama;
- Avaliar o impacto dos genótipos e haplótipos do gene *VEGFA* sobre a sobrevida livre de doença.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo observacional exploratório em coorte hospitalar de mulheres diagnosticadas com câncer de mama no Hospital do Câncer III do Instituto Nacional de Câncer (HC-III/INCA), no período compreendido entre fevereiro de 2009 a março de 2013, submetidas à cirurgia curativa ou indicação de quimioterapia neoadjuvante, como primeiras abordagens terapêuticas (N=1043).

As participantes do estudo fizeram parte do projeto “Polimorfismos genéticos e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer de mama”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (vide Anexo III). Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O projeto ora em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ sob número CAAE: 36047514.5.0000.5240 (vide Anexo IV).

### **5.2 População do estudo**

#### **5.2.1 Critérios de inclusão**

Foram consideradas elegíveis para o estudo mulheres com diagnóstico primário de câncer de mama unilateral, sem metástase à distância, que receberam indicação inicial de tratamento cirúrgico com intenção curativa ou de quimioterapia neoadjuvante, que aceitaram participar da investigação e conseguiram responder às perguntas durante entrevista inicial.

#### **5.2.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo as mulheres com malignidade prévia ou concomitante, câncer de mama bilateral sincrônico, detecção de metástase à distância antes do início do

tratamento, diagnóstico histopatológico pós-cirúrgico de sarcoma mamário, que solicitaram desligamento da participação no estudo ou abandonaram o tratamento.

### 5.2.3 Caracterização clínica e histopatológica

Após o recrutamento, as pacientes foram entrevistadas para coleta de informações sobre seu histórico clínico. A caracterização histopatológica dos tumores de mama foi baseada na 3ª edição do WHO Classification of Tumours (2013) e no sistema de graduação histológica de Elston & Ellis (1991) [49]. Os dados sobre os receptores hormonais e status HER-2 foram utilizados para a classificação biológica dos tumores, como proposto por Huober *et al.* (2010) [69].

### 5.2.4 Caracterização dos desfechos clínicos

A recorrência da doença foi caracterizada pela ocorrência de recidiva locorregional ou contralateral ou pela detecção de qualquer metástase à distância. O tempo para recorrência (TPR) foi definido como o período de tempo entre a data da cirurgia de ressecção tumoral e a data do primeiro exame indicativo de recorrência da doença. As pacientes foram consideradas livres de doença se não apresentaram nenhum sintoma clínico sugestivo ou diagnóstico por imagem de recorrência da doença até a última consulta médica. A sobrevida livre de recorrência foi calculada como o período entre a data da cirurgia de ressecção tumoral e a data da última consulta médica. Novos tumores primários ou óbitos por causas não relacionadas com a recorrência da doença foram censurados na curva de sobrevida.

### 5.2.5 Coleta de sangue e extração do DNA genômico

Para identificação de variações do gene *VEGFA*, amostras de sangue periférico (5 mL) foram colhidas em frasco com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e armazenadas em refrigerador em temperatura de 2 a 8°C até 48 horas para posterior realização da extração do DNA genômico.

A extração do DNA genômico foi feita a partir de células mononucleadas, utilizando-se o sistema Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK Limited, Amersham Place, UK) ou RealGenomics (RBC, USA) de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante.

O DNA extraído foi quantificado usando-se o equipamento Spectrophotometer NanoDrop ND-100 (Uniscience, USA).

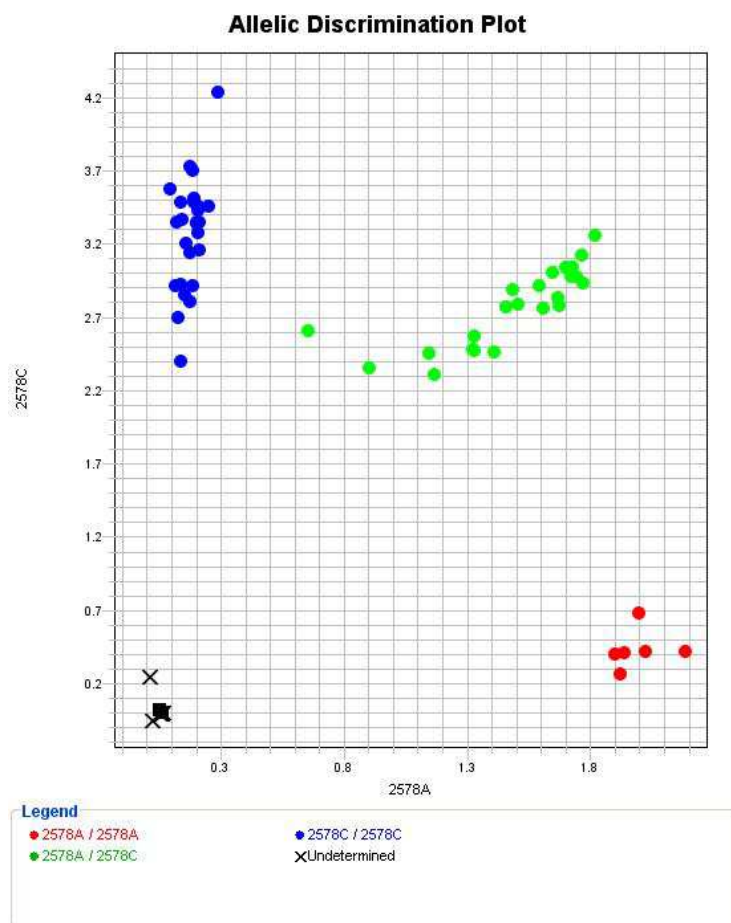
#### 5.2.6 Identificação dos SNPs

Os SNPs rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 e rs3025039 foram identificados pela técnica de PCR em tempo real, utilizando os ensaios TaqMan validados (VIC e FAM-rotuladas) e adquiridos da Applied Biosystems, como descrito na tabela 4.

A reação de amplificação por PCR para todos os SNPs foi realizada com volume total de 8  $\mu$ l, contendo 30 ng de DNA molde, 1x TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1x ensaio de cada um dos iniciadores e da sonda, e H<sub>2</sub>O qsp. A ciclagem térmica foi iniciada com um primeiro passo de desnaturação de 10 min a 95° C, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 92° C durante 15 s e de recozimento a 60° C durante 1 min. A detecção dos alelos foi realizada após 1 minuto a 60° C no aparelho Fast 7500 Real-Time System (Applied Biosystems), e, em seguida, os genótipos foram determinados diretamente, conforme ilustrado na figura 9.

Tabela 4: Oligos e sondas utilizados no ensaio de fluorescência com TaqMan Applied Biosystems.

| SNP       | Código Sonda Applied | Oligos                                                         | Sondas [diferença do nucleotídeo entre as duas sondas]  |
|-----------|----------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| rs699947  | C_8311602_10         | 5'-GGATGGGGCTGACT AGGTAAGC-3'<br>5'-AGCCCCCTTTTCCT CCAAC-3'    | GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA[A/C]GATCTGGGTGGATAATCAGACTGAC |
| rs833061  | C_1647381_10         | 5'-TGTGCGTGTGGGGTTGAGAG-3'<br>5'-TACGTGCGGACAGGGCCTGA-3'       | GAGTGTGTGCGTGTGGGGTTGAGGG[C/T]GTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGG |
| rs1570360 | C_1647379_10         | 5'-TCCTGCTCCCTCCT CGCCAATG-3'<br>5'-GGCGGGGACAGGC GAGCATC-3'   | AGCCCGGGCCCGAGCCGCGTGTGGA[A/G]GGGCTGAGGCTCGCCTGTCCCCGCC |
| rs2010963 | C_8311614_10         | 5'-TTGCTTGCCATTCCCCACTTGA-3'<br>5'-CCGAAGCGAGAACAGCCCAGAA-3'   | CGCGCGGGCGTGCGAGCAGCGAAAG[C/G]GACAGGGGCAAAGTGAGTGACCTGC |
| rs3025039 | C_16198794_10        | 5'-AAGGAAGAGGAGAC TCTGCGC-3'<br>5'-TATGTGGGTGGGT GTGTCTACAG-3' | GCATTCCCGGGCGGGTGACCCAGCA[C/T]GGTCCCTCTTGGAATTGGATTGCGC |



**Figura 9:** Exemplo de determinação do genótipo *VEGFA* rs699947 por PCR em tempo real. Em azul, estão os indivíduos com genótipo homozigoto selvagem -2578CC; em verde, os heterozigotos -2578CA, em vermelho, e os homozigotos variantes -2578AA. No quadrado em preto, é mostrado o controle negativo (branco) e o x em preto representam as amostras em que a reação não funcionou (indeterminadas quanto ao genótipo).

### 5.2.7 Análise Estatística

Foi realizado um estudo descritivo da população, com base na análise das medias de tendência central, e de dispersão e distribuição de frequência para as categorias de desfecho e demais variáveis independentes.

Os resultados encontrados na identificação dos SNPs foram utilizados para estimar a frequência alélica e genotípica obtidas por contagem gênica. A aderência ao princípio de *Hardy-Weinberg* foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. O teste do qui-quadrado foi usado para comparação de dados de frequência, com exceção das comparações com frequência menor que 5, em que usou-se o teste de Fisher. Os padrões de haplótipos foram inferidos usando o programa Haploview versão 4.2 [136], com base no algoritmo de expectância-

maximização (EM). As comparações das distribuições haplotípicas entre as categorias dos grupos histopatológicos foram realizados através do teste do qui-quadrado para proporções.

Características clínicas e histopatológicas, bem como genótipos ou haplótipos *VEGFA* foram avaliados quanto à associação com os desfechos com uso dos testes do qui-quadrado ou de Fisher. Nos casos de associações significativas, foram calculadas as razões de chance (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC). As variáveis individuais com associações significativas na análise univariada foram testadas ainda mais em um modelo multivariado, realizado em método de adição progressiva (*stepwise forward*).

Curvas de sobrevida foram estimadas utilizando o método do produto limite de Kaplan-Meier, e a influência de variáveis individuais sobre as taxas de sobrevida livre de doença foi avaliada com o teste de log-rank. O impacto de fatores prognósticos identificados sobre o risco de recorrência do câncer de mama foi avaliado com modelos multivariados de regressão de riscos proporcionais de Cox, com cálculo de razão de risco ajustada ( $HR_{\text{ajustado}}$ ) e respectivos 95% IC. Para gerenciamento das análises estatísticas, foi utilizado o programa SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois).



## 6. RESULTADOS

A sessão de resultados foi dividida em dois manuscritos. O primeiro aborda a associação dos SNPs e haplótipos do gene *VEGFA* com as características histopatológicas dos tumores de mama. O segundo aborda a associação dos SNPs e haplótipos do gene *VEGFA* como fatores prognósticos na progressão do câncer de mama.

## 6.1 Manuscrito “Association between *VEGFA* polymorphisms or haplotypes and histopathological features of Brazilian breast cancer patients”

### Association between *VEGFA* polymorphisms or haplotypes and histopathological features of Brazilian breast cancer patients

Hayra de Andrade Vieira-Monteiro<sup>1,2</sup>, Daniely Regina Freitas-Alves<sup>1</sup>, Sheyla Maria Torres Goulart-Citrangulo<sup>1</sup>, Marcelo Sobral-Leite<sup>1,3#</sup>, Thales Nascimento e Castro<sup>1,2</sup>, Vanessa Índio-do-Brasil<sup>1,2</sup>, Sérgio Koifman<sup>2†</sup>, Jamila Alessandra Perini<sup>2,4</sup>, Rosane Vianna-Jorge<sup>1,2,5</sup>

#### Authors' Affiliations

<sup>1</sup>Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente - Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>3#</sup>Division of Molecular Pathology, Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands; <sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>5</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

#Current affiliation; †*In memoriam*

#### Email Addresses

HAV-M: hayraav@hotmail.com; DRF-A: danielyrfalves@gmail.com; SMTG-C: sheylacitrangulo@gmail.com; MS-L: m.leite@nki.nl; VI-do-B: vicosta@inca.gov.br; TNC: thalescastro2@hotmail.com; JAPM: jamilaperini@uezo.rj.gov.br; RV-J: farmaco@inca.gov.br, rosanevj@gmail.com

#### Corresponding Author

Prof<sup>a</sup>. Rosane Vianna-Jorge, Programa de Farmacologia, Coordenação de Pesquisa - Instituto Nacional do Câncer - INCA, RJ, Brazil – Rua André Cavalcanti, 37, 3º andar CEP: 20231-050. Phone: +55 21 32076526 Email: farmaco@inca.gov.br.

334 Words in Abstract

2259 Words of text

1 Figures

4Tables

33 References

## Abstract

**Introduction:** Breast cancer is a very heterogeneous disease, and new biomarkers are urgently needed to improve response prediction, and minimize treatment failure. Angiogenesis is a crucial step for development of tumors and metastases, and VEGF is a key mediator of this process.

**Aim:** The aim of the present study was to evaluate the association between *VEGFA* single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 and rs3025039 or their haplotypes, and histopathological features with prognostic value for breast cancer treatment.

**Methods:** A cohort of Brazilian women ( $\geq 18$  years old) with unilateral non-metastatic breast cancer was evaluated. Genomic DNA was extracted from blood samples, and *VEGFA* SNPs were identified by TaqMan Real Time-PCR. The association between histopathological features and *VEGFA* SNPs was evaluated by the Chi-square test and by logistic regression analysis, with calculation of adjusted odds ratio (OR), with their respective 95% confidence intervals (95% CI).

**Results:** A total of 1043 breast cancer patients were included, and *VEGFA* genotypes were evaluated for those with available DNA ( $N = 895$ ). All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium. The results revealed that rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 were in strong linkage disequilibrium, forming a single haploblock, whereas rs3025039 was not linked to the other SNPs. A total of 11 haplotypes were inferred, but only 5 were analyzed, since they summed 95.7% of all occurring combinations. Variant genotypes of rs699947 (CA + AA) were more prevalent among non-luminal breast tumors, i.e. HER2-like or Triple Negative ( $OR_{adjusted} = 1.49$ ; 95%CI = 1.03 – 2.16), and the haplotype \*4, which contains the variant alleles of both rs699947 and rs833061, was significantly increased among ER negative tumors ( $OR_{adjusted} = 1.59$ ; 95%CI = 1.03 – 2.47) and among non-luminal (HER2-like or Triple Negative) tumors ( $OR_{adjusted} = 1.61$ ; 95%CI = 1.02 – 2.53).

**Conclusion:** The present results provide evidence that the *VEGFA* variant allele of rs699947 (-2578A), as well as the -2578A-containing haplotype \*4 (rs699947 A, rs833061 C, rs1570360 G, rs2010963 G, are associated with non-luminal tumors (HER2-like or Triple Negative) in Brazilian breast cancer patients.

## Keywords

Breast cancer, *VEGFA*, polymorphisms, SNPs, haplotypes, histopathological features

## Introduction

Breast cancer is the leading type of cancer among women [1–3], with increasing incidence all over the world [3]. Although the efforts for early detection and the advances in chemotherapeutic protocols have contributed for a reduction in the rates of mortality in developing countries, breast cancer remains the first cause of death by cancer among women worldwide [2].

One of the challenges for defining the therapeutic approach of breast cancer is its heterogeneous presentation [4,5]. The classical prognostic factors are based on morphological characteristics of the tumor, such as histological type and grade, and on the presence of metastasis in lymph nodes or in other sites [6]. In addition, tumor subtypes have been defined based on the tumor status for hormone receptors (estrogen and progesterone), and for the epidermal growth factor receptor 2 (HER2) [7]. However, the search for additional prognostic markers continues in order to improve therapeutic strategies [8].

VEGFA plays a central role in angiogenesis, which is essential for tumor growth, invasion and metastasis [9,10]. *VEGFA* gene is highly polymorphic, with single nucleotide polymorphisms (SNP) in the promoter region: rs699947, rs1570360 and rs833061, in the 5'-untranslated region: rs2010963 and rs25648, and in the 3'-untranslated region: rs3025039, rs10434, next to many potential regulatory elements [10–12]. Accordingly, *VEGFA* SNPs were shown to affect VEGFA levels in different cell models [12–15], including breast cancer [16], and high VEGFA levels in breast tumors have been associated with poor outcomes [17–19].

The present study investigated the association between five *VEGFA* polymorphisms and histopathological features of breast cancer among Brazilian women.

## Materials and Methods

### Subjects and Study Design

The study population consisted of an exploratory observational study in a hospital cohort of Brazilian women with first diagnosis of unilateral breast cancer and no identification of distant metastases, who were assigned for curative surgery or neoadjuvant chemotherapy at the Brazilian National Cancer Institute (INCA), during the period from February 2009 to April 2013. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute (INCA #129/08), and all patients gave written consent to participate. The REMARK guidelines (REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies) were followed [20].

### Histopathological Characterization

The histopathological evaluation was performed with tumor biopsies obtained for diagnostic purposes, as part of institutional routine procedures. All individual data were obtained from electronic medical records, and the data on hormone receptors and HER2 status were used for biological classification of the tumors, as proposed by Huober *et al.* (2010) [7].

### Genotyping Analyses

Peripheral blood samples (3 mL) were collected from all subjects, and DNA was extracted using the Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), following the procedures recommended by the manufacturer. Patients were genotyped for rs699947 (-2578C>A), rs833061(-460T>C), rs1570360 (-1154G>A), rs2010963 (405G>C) and rs3025039 (936C>T) by allelic discrimination using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Warrington, UK), as previously described [21].

## Statistical Analyses

A descriptive study of the cohort was conducted, presenting measures of central tendency and dispersion for continuous variables, or relative frequencies for each categorical variable. Allelic and genotypic frequencies were derived by gene counting, and the adherence to the Hardy–Weinberg principle was evaluated by the *Chi*-square test for goodness of-fit. The haplotype patterns were inferred using Haploview 4.2 [22], based on the algorithm of expectation and maximization [23]. Individual diplotypes were inferred using the Haplo Stats software, version 1.3 [24].

The histopathological features were dichotomized for better and worse prognostic values, and their associations with *VEGFA* genotypes or alleles were evaluated by the *Chi*-square or Fisher's exact tests. Significant associations ( $p < 0.05$ ) were further tested in multiple regression analyses, with calculation of adjusted odds ratios ( $OR_{adjusted}$ ), and respective 95% confidence intervals (95%CI). All statistical analyses were conducted using SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

## Results

Figure 1 depicts the flowchart of the study, describing the number of patients in the cohort and the availability of DNA samples. A total of 1132 patients were recruited when admitted for surgery or neoadjuvant chemotherapy, and 1043 were included after revision of eligibility criteria.

Table 1 presents the main clinical and histopathological characteristics of the study cohort (N = 1043) and the distribution of *VEGFA* genotypes and haplotypes for patients with available DNA (N = 895). With regards to the clinical data, there was a wide age range (20-99 years). Most tumors 57.0% were classified as Luminal A subtype, which represents the best prognostic group. However, there was a predominance (89.3%) of poorly differentiated histological grades (G2 or G3). All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium. The results revealed that rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 were in strong linkage disequilibrium, forming a single haploblock, whereas rs3025039 was not linked to the other SNPs (Figure 2). A total of 11 haplotypes were inferred, but only 5 are presented in Table 1, since they summed 95.7% of all haplotypes occurring in the cohort.

Table 2 presents the distribution of *VEGFA* genotypes and alleles according to histopathological features of breast tumors. Significant differences were found for the distribution of rs699947 and for rs833061 according to estrogen receptor (ER) status and tumor subtype. After multivariate analysis, with adjustment for other covariates (histopathological type and grade), no significant associations were found for rs833061, whereas variant genotypes of rs699947 (CA + AA) were shown to be more prevalent among non-luminal breast tumors, i.e. HER2-like or Triple Negative (Table 3).

Table 4 presents the distribution of *VEGFA* haplotypes according to ER status or tumor subtype. Although no significant differences were found regarding the overall distribution of *VEGFA* haplotypes, the results indicate that haplotype \*4, which contains the

variant alleles of both rs699947 and rs833061, is significantly increased among ER negative tumors and among non-luminal (HER2-like or Triple Negative) tumors.



## Discussion

The present study aimed to evaluate the association between five common SNPs of the *VEGFA* (rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963, rs3025039), or its haplotypes, and histopathological parameters with prognostic value in breast cancer. The study was conducted in a Brazilian reference institution for cancer treatment, and involved a prospective cohort of women with first diagnosis of unilateral non-metastatic breast cancer. *VEGFA* SNPs were selected based on their frequency and previous reports of functional effect on the regulation of *VEGFA* expression [12–15].

Five previous studies have explored the association between *VEGFA* SNPs and breast cancer histopathological features [16,25–28]. Such studies were mostly based on sporadic cases of primary breast cancer, but Jin *et al.* (2005) also included familial cases [25], Maae *et al.* (2012) restricted their analysis to HER2+ tumors [26], and Eroglu *et al.* (2008) evaluated only invasive tumors [28]. Maae *et al.* (2012) included the five allele variants studied here, and they also evaluated the SNP rs25648 [26]. Langsenlehner *et al.* (2008) studied seven *VEGFA* SNPs (rs699947, rs1005230, rs833061, rs2010963, rs25648, rs3025039, rs10434), but they did not evaluate rs1570360 [27]. Jin *et al.* (2005) [25] studied four SNPs (rs699947, rs1570360, rs2010963, rs3025039), whereas Eroglu *et al.* (2008) and Krippel *et al.* (2003) limited their analysis to rs3025039 [16,28].

Only two *VEGFA* SNPs (rs699947 and rs2010963) have shown positive associations with breast cancer histopathological features results in previous reports [25–27]. With regards to rs699947, the study by Jin *et al.* (2005), in Polish, German and Swedish patients, showed that the variant genotype -2578AA was associated with low grade tumor [25]. However, Langsenlehner *et al.* (2008), who evaluated Austrian patients [27], and Maae *et al.* (2012), who studied HER2+ tumors in Denmark [26] found no association with tumor histological grade. Nevertheless, Maae *et al.* (2012) reported that patients with variant genotypes -2578CA and -

2578AA had significantly smaller tumor size (20 mm) than those with the reference - 2578CC genotype (23.5 mm) [26].

Similarly to previous studies of *VEGFA* SNPs and breast cancer characteristics [25–27], our results only point significant results for rs699947, although the findings differ from those reported before. In our study, tumor size was not evaluated, since we considered only the histopathological features obtained from biopsies at the time of diagnosis, and not the clinical measures of the macroscopic tumor. We found no significant association with tumor grade, but our results indicate that the combined variant genotypes (-2578CA and -2578AA) were more prevalent among non-luminal breast tumors, i.e. HER2-like or Triple Negative. Such association was only seen when tumor subtypes were considered, as there were no individual associations with HER2, estrogen or progesterone receptor status. Likewise, previous publications reported no significant associations between rs699947 and HER2 status [26] or estrogen and progesterone receptor status [25–27]. However, such studies have not evaluated breast cancer subtypes. Although HER2 and hormonal receptor status are used individually to guide therapy selection, breast cancer subtypes based on expression patterns [5,29,30] or on immunohistochemical surrogates [31] are more accurate prognostic markers of clinical evolution and survival [32].

With regards to rs2010963, we found no significant associations, and the literature reports are also contradictory. Thus, Maae *et al.* (2012) [26] and Jin *et al.* (2005) [25] reported significantly larger tumor size for patients with the variant 405CC genotype when compared to those with 405CG or 405GG genotypes. These findings appear to corroborate the study by Balasubramanian *et al.* (2007) who reported the association between 405C allele and maximum size of invasive component in Caucasian population [33]. In contrast, Langsenlehner *et al.* (2008) found that the C allele was associated with lower tumor size in Austrian population [27].

*VEGFA* haplotypes were evaluated in only two previous studies [25,27], but different haploblocks were considered. Jin *et al.* (2005) tested haplotypes formed by rs699947 and rs699947, which were the only ones significantly associated with histopathological parameters of prognostic value (*i.e.* tumor size and histological grade). The authors reported the haplotype formed by -2578C and 405C was associated with larger tumor size [25]. Langsenlehner *et al.* (2008) found two separate blocks of linkage disequilibrium, one formed by five SNPs upstream of the coding sequence and another with two SNPs downstream of the coding sequence. They reported a significant association between the haplotype formed by -2578C, -2498C, -460C, 405C, -7C and lower tumor size [27]. In our population, we found a single haploblock, formed by 4 SNPs (rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963), whereas rs3025039 was not linked to the others. This pattern of haploblock was the same as reported previously [21,27].

Our results indicate that haplotype \*4, composed by -2578A, -460C, -1154G, -405G, is significantly increased among ER negative tumors and among non-luminal (HER2-like or Triple Negative) tumors. However, haplotype \*3 (-2578A, -460C, -1154A, -405G), which also contains the variant allele of rs699947, showed no association with ER status or tumor subtypes. This result suggests that the apparent association between rs699947 and poorer prognostic breast cancer subtypes may actually depend on a specific combination of *VEGFA* SNPs. Because haplotype \*3 is more frequent (20.3%) than haplotype \*4 (11.6%) in our population, it is unlikely that the lack of significant association for the first is due to low statistical power.

In conclusion, although there is no clear consensus regarding the association between *VEGFA* SNPs or haplotypes and breast cancer characteristics, our results suggest they might contribute for further classification of tumor subtypes, and should be evaluated for their

potential role as prognostic biomarkers, especially among HER2-like or Triple Negative tumors.

## **Ethical Standards**

The study was conducted following the international precepts of ethics in research and of good clinical practice. The authors complied with the Brazilian regulation of clinical research. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute (INCA #129/08), and all patients gave written consent to participate.

## **Acknowledgements**

This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq 474522/2010-5), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/110.356/2010 and E-26/010.002644/2014), and INCT para Controle do Câncer (CNPq 573806/2008-0; FAPERJ E26/170.026/2008). HAVM, DRFA and TNC were awarded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro; MSL was awarded by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento; VI-B was awarded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and SMTG-C was awarded by Fundação do Câncer.

The authors thank Dr. Guilherme Suarez-Kurtz for the use of laboratory facilities, and the personnel from the Breast Cancer Hospital (HC3-INCA), and from the National Bank of Tumors in the Brazilian National Cancer Institute (BNT-INCA), for logistic support in sample and data collection.

The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Authors' Contributions**

HAV-M recruited patients, collected clinical data, performed genotyping assays and statistical analyses, generated tables and figures, and drafted the manuscript. DRF-A, SMTG-C and MS-L collected clinical and histopathological data, and helped generating tables. MS-L, TNC, SMTG-C and VI-do-B recruited patients and collected clinical data. SK conceived the epidemiological design. JAPM set and managed genotyping assays, contributed with critical discussion and revised the manuscript. RV-J conceived, designed, and coordinated the study, revised and analyzed data, wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar;61(2):69–90.
2. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
3. Ly D, Forman D, Ferlay J, Brinton LA, Cook MB. An international comparison of male and female breast cancer incidence rates. *Int J Cancer*. 2013 Apr 15;132(8):1918–26.
4. Guiu S, Michiels S, Andre F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, *et al*. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol*. 2012 Dec 1;23(12):2997–3006.
5. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al*. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
6. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Feb;107(3):309–30.
7. Huober J, Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, *et al*. Effect of neoadjuvant anthracycline–taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Nov;124(1):133–40.
8. Danova M, Delfanti S, Manzoni M, Mariucci S. Tissue and Soluble Biomarkers in Breast Cancer and Their Applications: Ready to Use? *JNCI Monogr*. 2011 Oct 1;2011(43):75–8.
9. Jakubowska A, Gronwald J, Menkiszak J, Górski B, Huzarski T, Byrski T, *et al*. The VEGF\_936\_C>T 3'UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer Lett*. 2008 Apr;262(1):71–6.
10. Sa-nguanraksa D, O-charoenrat P. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor A Polymorphisms in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 Nov 13;13(12):14845–64.
11. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol*. 1999 Dec;60(12):1245–9.
12. Watson CJ, Webb NJ., Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000 Aug;12(8):1232–5.
13. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, *et al*. A Common Polymorphism in the 5'-Untranslated Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2002 May 1;51(5):1635–9.

14. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivoridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth*. 2004 Dec 1;46(3):293–8.
15. Stevens A, Soden J, Brenchley PE., Ralph S, Ray D. Haplotype Analysis of the Polymorphic Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Promoter. *Cancer Research*. 2003 de fevereiro de;63:812 – 816.
16. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, *et al*. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2003 Sep 10;106(4):468–71.
17. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1998;16:3121–8.
18. Linderholm B, Lindahl T, Holmberg L, Sigrid Klaar, Lennerstrand J, Henriksson R, *et al*. The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Correlates with Mutant p53 and Poor Prognosis in Human Breast Cancer. *Cancer Research*. 2001;61:2256–60.
19. Gasparini G, Bonoldi E, Gatti C, Vinante O, Toi M, Tominaga T, *et al*. Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Protein in Node-Negative Breast Carcinoma. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1997 Jan 15;89(2):139–47.
20. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, *et al*. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2005 Aug 17;97(16):1180–4.
21. Perini J, Cardoso J, Berardo P, Vianna-Jorge R, Nasciutti L, Bellodi-Privato M, *et al*. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C> A, -460 T> C, -1154G> A, +405G > C and +936C> T) in endometriosis: a case–control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 2014;14(1):117.
22. Haploview version 4.2 [Internet]. Available from: <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/tutorial.php>
23. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15;21(2):263–5.
24. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score Tests for Association between Traits and Haplotypes when Linkage Phase Is Ambiguous. *Am J Hum Genet*. 2002 Feb;70(2):425–34.
25. Jin Q. Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms in Relation to Breast Cancer Development and Prognosis. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3647–53.
26. Maae E, Andersen RF, Steffensen KD, Jakobsen EH, Brandslund I, Sørensen FB, *et al*. Prognostic Impact of VEGFA Germline Polymorphisms in Patients with HER2-positive Primary Breast Cancer. *Anticancer Research*. 2012;32:3619 – 3628.
27. Langsenlehner U, Wolf G, Langsenlehner T, Gerger A, Hofmann G, Clar H, *et al*. Genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer risk. *The*



Austrian “tumor of breast tissue: incidence, genetics, and environmental risk factors” study. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 May;109(2):297–304.

28. Eroğlu A, Öztürk A, Çam R, Akar N. Vascular endothelial growth factor gene 936 C/T polymorphism in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2008 Mar;25(1):54–5.

29. Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012 Oct;38(6):698–707.

30. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Apr;120(2):293–308.

31. Raica M, Jung I, Cîmpean A, Suciuc C, Muresan A. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* 2009;50(1):5 – 13.

32. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Dec;7(12):683–92.

33. Balasubramanian SP, Cox A, Cross SS, Higham SE, Brown NJ, Reed MW. Influence of VEGF-A gene variation and protein levels in breast cancer susceptibility and severity. *Int J Cancer.* 2007 Sep 1;121(5):1009–16.

### Legends for Figures

**Figure 1.** Flowchart of the cohort of breast cancer patients

**Figure 2.** Haplotype association analysis for the five *VEGF* polymorphisms in the study cohort. Numbers in boxes indicate decimal places of  $D'$ . There was strong linkage disequilibrium across rs699947 (lane 1), rs833061 (lane 2), rs1570360 (lane 3) and 2010963 (lane 4), whereas rs3025039 (lane 5) was not linked to the other SNPs.

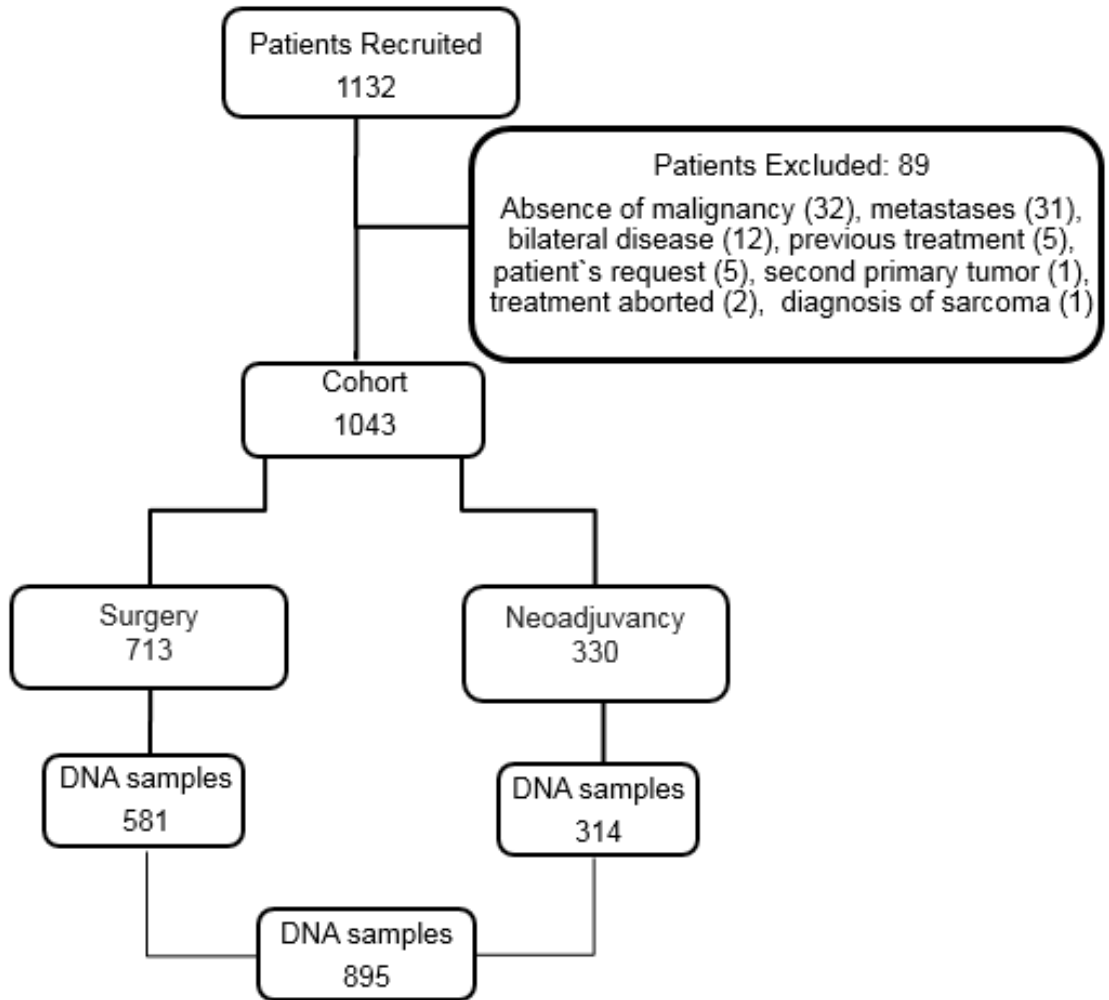
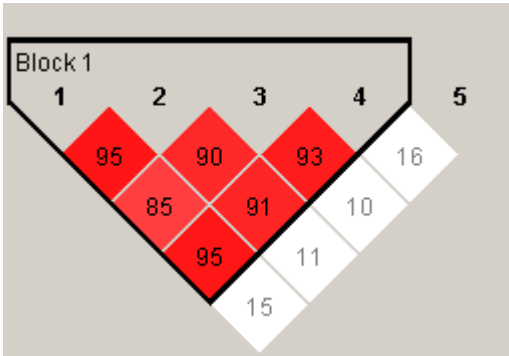
**Figure 1:**

Figure 2



**Table 1 Description of the study cohort (N=1043)**

| Features                                                   | N   | %    | Features                      | N   | %    |
|------------------------------------------------------------|-----|------|-------------------------------|-----|------|
| <b>Age at diagnosis</b>                                    |     |      | <b>ER Status</b>              |     |      |
| 20-39                                                      | 102 | 9.8  | Negative                      | 212 | 20.8 |
| 40-59                                                      | 533 | 51.1 | Positive                      | 804 | 79.2 |
| 60-79                                                      | 384 | 36.8 | Missing                       | 27  |      |
| 80-99                                                      | 24  | 2.3  |                               |     |      |
| <b>Menopausal Status</b>                                   |     |      | <b>PR Status</b>              |     |      |
| Premenopausal                                              | 306 | 30.0 | Negative                      | 351 | 34.6 |
| Postmenopausal                                             | 713 | 70.0 | Positive                      | 663 | 65.4 |
| Missing                                                    | 24  |      | Missing                       | 29  |      |
| <b>Histopathological Type</b>                              |     |      | <b>HER2 Status</b>            |     |      |
| Ductal Invasive                                            | 908 | 87.0 | Negative                      | 766 | 80.9 |
| Lobular Invasive                                           | 58  | 5.6  | Positive                      | 163 | 17.3 |
| <i>In situ</i> (ductal or lobular)                         | 48  | 4.6  | Undertermined                 | 17  | 1.8  |
| Others                                                     | 29  | 2.8  | Missing                       | 97  |      |
| <b>Tumor Grade (G)</b>                                     |     |      | <b>Tumor Subtype</b>          |     |      |
| G1                                                         | 101 | 10.7 | Luminal A                     | 537 | 57.0 |
| G2                                                         | 441 | 46.7 | Luminal B                     | 210 | 22.3 |
| G3                                                         | 402 | 42.6 | HER-2 like                    | 63  | 6.6  |
| Missing                                                    | 99  |      | Triple Negative               | 133 | 14.1 |
|                                                            |     |      | Missing                       | 100 |      |
| <b>VEGFA genotypes (N = 895) and haplotypes (N = 1790)</b> |     |      |                               |     |      |
| <b>rs699947</b>                                            |     |      | <b>rs2010963</b>              |     |      |
| CC                                                         | 407 | 45.6 | GG                            | 366 | 41.4 |
| CA                                                         | 379 | 42.5 | GC                            | 407 | 45.9 |
| AA                                                         | 106 | 11.9 | CC                            | 112 | 12.7 |
| A allele                                                   |     | 33.1 | C allele                      |     | 35.6 |
| Missing                                                    | 3   |      | Missing                       | 10  |      |
| <b>rs833061</b>                                            |     |      | <b>rs3025039</b>              |     |      |
| TT                                                         | 313 | 35.5 | CC                            | 664 | 75.2 |
| TC                                                         | 436 | 49.4 | CT                            | 206 | 23.3 |
| CC                                                         | 133 | 15.1 | TT                            | 13  | 1.5  |
| C allele                                                   |     | 39.8 | T allele                      |     | 13.1 |
| Missing                                                    | 13  |      | Missing                       | 12  |      |
| <b>rs1570360</b>                                           |     |      | <b>Haplotypes<sup>a</sup></b> |     |      |
| GG                                                         | 512 | 60.3 | *1 CTGG                       | 440 | 24.6 |
| GA                                                         | 279 | 32.9 | *2 CTGC                       | 607 | 33.9 |
| AA                                                         | 58  | 6.8  | *3 ACAG                       | 363 | 20.3 |
| A allele                                                   |     | 23.3 | *4 ACGG                       | 208 | 11.6 |
| Missing                                                    | 46  |      | *5 CCGG                       | 95  | 5.3  |
|                                                            |     |      | Others                        | 77  | 4.3  |

<sup>a</sup>Haplotypes composed by rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963. Abbreviations: ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: Human Epidermal growth factor Receptor

Table 2 Distribution of *VEGFA* genotypes or alleles according to histopathological features of breast tumors

| Genotype  | Histological Type |          |      | Grade |     | ER Status |          |          | PR Status   |          |          | HER2 Status |          |          | Tumor Subtype<br>HER2-like |         |      |             |
|-----------|-------------------|----------|------|-------|-----|-----------|----------|----------|-------------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------------------------|---------|------|-------------|
|           | <i>In situ</i>    | Invasive | Pχ2  | G1+G2 | G3  | Pχ2       | Positive | Negative | Pχ2         | Positive | Negative | Pχ2         | Negative | Positive | Pχ2                        | Luminal | + TN | Pχ2         |
| rs699947  |                   |          |      |       |     |           |          |          |             |          |          |             |          |          |                            |         |      |             |
| CC        | 25                | 382      |      | 222   | 147 |           | 329      | 73       |             | 270      | 131      |             | 304      | 64       |                            | 309     | 66   |             |
| CA        | 18                | 361      |      | 194   | 154 |           | 285      | 83       |             | 231      | 136      |             | 281      | 60       |                            | 263     | 81   |             |
| AA        | 7                 | 99       | 0.62 | 50    | 42  | 0.39      | 76       | 27       | 0.12        | 64       | 39       | 0.36        | 80       | 15       | 0.91                       | 73      | 26   | 0.06        |
| C         | 68                | 1125     |      | 638   | 448 |           | 943      | 229      |             | 771      | 398      |             | 889      | 218      |                            | 881     | 213  |             |
| A         | 32                | 559      | 0.80 | 294   | 238 | 0.18      | 437      | 137      | <b>0.03</b> | 359      | 214      | 0.17        | 441      | 90       | 0.18                       | 409     | 133  | <b>0.01</b> |
| rs833061  |                   |          |      |       |     |           |          |          |             |          |          |             |          |          |                            |         |      |             |
| TT        | 17                | 296      |      | 170   | 119 |           | 249      | 60       |             | 205      | 104      |             | 238      | 50       |                            | 237     | 55   |             |
| TC        | 25                | 411      |      | 227   | 168 |           | 341      | 85       |             | 279      | 145      |             | 325      | 65       |                            | 311     | 82   |             |
| CC        | 8                 | 125      | 0.96 | 61    | 57  | 0.41      | 90       | 38       | <b>0.04</b> | 73       | 55       | 0.14        | 97       | 21       | 0.94                       | 87      | 36   | 0.06        |
| T         | 59                | 1003     |      | 567   | 406 |           | 839      | 205      |             | 689      | 353      |             | 801      | 165      |                            | 785     | 192  |             |
| C         | 41                | 661      | 0.80 | 295   | 282 | 0.06      | 521      | 161      | 0.05        | 425      | 255      | 0.12        | 519      | 107      | 1.0                        | 485     | 154  | <b>0.03</b> |
| rs1570360 |                   |          |      |       |     |           |          |          |             |          |          |             |          |          |                            |         |      |             |
| GG        | 28                | 484      |      | 271   | 198 |           | 395      | 109      |             | 322      | 182      |             | 389      | 78       |                            | 375     | 101  |             |
| GA        | 13                | 266      |      | 140   | 110 |           | 215      | 57       |             | 180      | 90       |             | 206      | 46       |                            | 198     | 55   |             |
| AA        | 5                 | 53       | 0.47 | 28    | 21  | 0.89      | 41       | 14       | 0.76        | 31       | 24       | 0.33        | 38       | 9        | 0.82                       | 37      | 14   | 0.59        |
| G         | 69                | 1234     |      | 682   | 506 |           | 1005     | 275      |             | 824      | 454      |             | 984      | 202      |                            | 948     | 257  |             |
| A         | 23                | 372      | 0.68 | 196   | 152 | 0.71      | 297      | 115      | 0.07        | 242      | 138      | 0.77        | 282      | 64       | 0.52                       | 272     | 83   | 0.41        |
| rs2010963 |                   |          |      |       |     |           |          |          |             |          |          |             |          |          |                            |         |      |             |
| GG        | 17                | 349      |      | 193   | 136 |           | 287      | 71       |             | 236      | 121      |             | 277      | 56       |                            | 270     | 69   |             |
| GC        | 23                | 384      |      | 209   | 163 |           | 309      | 89       |             | 253      | 144      |             | 298      | 62       |                            | 283     | 81   |             |
| CC        | 10                | 102      | 0.23 | 59    | 44  | 0.80      | 87       | 23       | 0.69        | 71       | 39       | 0.79        | 86       | 18       | 0.98                       | 85      | 23   | 0.82        |
| G         | 57                | 1082     |      | 595   | 435 |           | 883      | 231      |             | 725      | 386      |             | 852      | 174      |                            | 823     | 219  |             |
| C         | 43                | 588      | 0.11 | 327   | 251 | 0.64      | 483      | 135      | 0.58        | 395      | 222      | 0.60        | 470      | 98       | 0.88                       | 453     | 127  | 0.67        |
| rs3025039 |                   |          |      |       |     |           |          |          |             |          |          |             |          |          |                            |         |      |             |
| CC        | 36                | 628      |      | 351   | 250 |           | 512      | 137      |             | 417      | 230      |             | 494      | 102      |                            | 476     | 129  |             |
| CT        | 13                | 193      |      | 103   | 85  |           | 156      | 46       |             | 131      | 71       |             | 156      | 32       |                            | 149     | 44   |             |
| TT        | 1                 | 12       | 0.85 | 5     | 7   | 0.38      | 12       | 1        | 0.42        | 9        | 4        | 0.93        | 9        | 2        | 0.99                       | 10      | 1    | 0.54        |
| C         | 89                | 1549     |      | 805   | 585 |           | 1180     | 320      |             | 965      | 531      |             | 1144     | 236      |                            | 1101    | 302  |             |
| T         | 15                | 217      | 0.52 | 113   | 99  | 0.20      | 180      | 48       | 0.92        | 149      | 79       | 0.80        | 174      | 36       | 1.0                        | 169     | 46   | 0.96        |

Abbreviations: ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: Human Epidermal growth factor Receptor; TN: Triple-Negative tumors; P $\chi^2$ : chi-square test

**Table 3 Association of VEGFA genotypes according to histopathological features of breast tumors**

| VEGFA Genotype   | ER Status |          | Tumor Subtype |             |         |                |             |                    |                        |                    |
|------------------|-----------|----------|---------------|-------------|---------|----------------|-------------|--------------------|------------------------|--------------------|
|                  | Positive  | Negative | OR            | 95% CI      | Luminal | HER2-like + TN | OR          | 95% CI             | OR <sub>adjusted</sub> | 95% CI             |
| <b>rs699947</b>  |           |          |               |             |         |                |             |                    |                        |                    |
| CC               | 329       | 73       | 1             |             | 309     | 66             | 1           |                    | 1                      |                    |
| CA + AA          | 361       | 110      | 1.37          | 0.99 - 1.91 | 336     | 107            | <b>1.50</b> | <b>1.05 - 2.10</b> | <b>1.49</b>            | <b>1.03 - 2.16</b> |
| <b>rs833061</b>  |           |          |               |             |         |                |             |                    |                        |                    |
| TT               | 249       | 60       | 1             |             | 237     | 55             | 1           |                    |                        |                    |
| TC + CC          | 431       | 123      | 1.18          | 0.84 - 1.67 | 398     | 118            | 1.27        | 0.89 - 1.82        | —                      | —                  |
| <b>rs1570360</b> |           |          |               |             |         |                |             |                    |                        |                    |
| GG               | 395       | 109      | 1             |             | 375     | 101            | 1           |                    |                        |                    |
| GA + AA          | 256       | 71       | 1.01          | 0.72 - 1.41 | 235     | 69             | 1.09        | 0.77 - 1.54        | —                      | —                  |
| <b>rs2010963</b> |           |          |               |             |         |                |             |                    |                        |                    |
| GG               | 287       | 71       | 1             |             | 270     | 69             | 1           |                    |                        |                    |
| GC + CC          | 396       | 112      | 1.14          | 0.82 - 1.60 | 367     | 104            | 1.10        | 0.78 - 1.55        | —                      | —                  |
| <b>rs3025039</b> |           |          |               |             |         |                |             |                    |                        |                    |
| CC               | 512       | 137      | 1             |             | 476     | 129            | 1           |                    |                        |                    |
| CT + TT          | 168       | 47       | 1.05          | 0.72 - 1.52 | 159     | 45             | 1.04        | 0.71 - 1.53        | —                      | —                  |

Abbreviations: ER: Estrogen receptor; HER2: Human Epidermal growth factor Receptor; TN: Triple Negative, OR: Odds ratio.

**Table 4 Association of VEGFA haplotypes according to histopathological features of breast tumors**

| Haplotype <sup>a</sup> | ER Status |          | Tumor Subtype |                    |                        |                    |                |     |             |                    |                        |                    |
|------------------------|-----------|----------|---------------|--------------------|------------------------|--------------------|----------------|-----|-------------|--------------------|------------------------|--------------------|
|                        | Positive  | Negative | Luminal       |                    |                        |                    | HER2-like + TN |     |             |                    |                        |                    |
|                        | 1384      | 368      | OR            | 95% CI             | OR <sub>adjusted</sub> | 95% CI             | 1294           | 348 | OR          | 95% CI             | OR <sub>adjusted</sub> | 95% CI             |
| <b>*1 CTGG</b>         | 358       | 77       | 1             |                    |                        |                    | 331            | 72  | 1           |                    |                        |                    |
| <b>*2 CTGC</b>         | 474       | 121      | 1.19          | 0.86 - 1.63        |                        |                    | 447            | 113 | 1.16        | 0.84 - 1.61        |                        |                    |
| <b>*3 ACAG</b>         | 271       | 78       | 1.34          | 0.94 - 1.90        |                        |                    | 251            | 76  | 1.39        | 0.97 - 2.00        |                        |                    |
| <b>*4 ACGG</b>         | 152       | 51       | <b>1.56</b>   | <b>1.04 - 2.33</b> | <b>1.59</b>            | <b>1.03 - 2.47</b> | 145            | 48  | <b>1.52</b> | <b>1.01 - 2.30</b> | <b>1.61</b>            | <b>1.02 - 2.53</b> |
| <b>*5 CCGG</b>         | 72        | 19       | 1.23          | 0.70 - 2.15        |                        |                    | 71             | 17  | 1.1         | 0.61 - 1.98        |                        |                    |
| <b>Others</b>          | 57        | 22       |               |                    |                        |                    | 49             | 22  |             |                    |                        |                    |
| <b>Px2</b>             | 0.245     |          | 0.240         |                    |                        |                    |                |     |             |                    |                        |                    |

Abbreviations: <sup>a</sup>Haplotypes composed by rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963; ER: estrogen receptor; HER2: Human Epidermal growth factor Receptor; TN: Triple-Negative tumors; OR: Odds ratio.



## 6.2 Manuscrito “Influence of *VEGFA* genotypes and haplotypes on the recurrence risk of breast cancer”

### Influence of *VEGFA* genotypes and haplotypes on the recurrence risk of breast cancer

Hayra de Andrade Vieira-Monteiro<sup>1,2</sup>, Daniely Regina Freitas-Alves<sup>1</sup>, Sheyla Maria Torres Goulart-Citrangulo<sup>1</sup>, João Marcos de Azevedo Delou<sup>1,3</sup>, Marcelo Sobral-Leite<sup>1,4#</sup>, Vanessa Índio-do-Brasil<sup>1,2</sup>, Sérgio Koifman<sup>2†</sup>, Jamila Alessandra Perini<sup>2,5</sup>, Rosane Vianna-Jorge<sup>1,2,6</sup>

#### Authors' Affiliations

<sup>1</sup>Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente - Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>3</sup>Programa de Bioquímica e Biologia Celular, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>4#</sup>Division of Molecular Pathology, Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands; <sup>5</sup>Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>6</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

#Current affiliation; †*In memoriam*

#### Email Addresses

HAV-M: hayraav@hotmail.com; DRF-A: danielyrfalves@gmail.com; SMTG-C: sheylacitrangulo@gmail.com; JMAD: jmdelou@gmail.com; MS-L: m.leite@nki.nl; VI-do-B: vicosta@inca.gov.br; JAPM: jamilaperini@uezo.rj.gov.br; RV-J: farmaco@inca.gov.br, rosanevj@gmail.com

#### Corresponding Author

Prof<sup>a</sup>. Rosane Vianna-Jorge, Programa de Farmacologia, Coordenação de Pesquisa - Instituto Nacional do Câncer - INCA, RJ, Brazil – Rua André Cavalcanti, 37, 3º andar CEP: 20231-050. Phone: +55 21 32076526 Email: farmaco@inca.gov.br.

314 Words in Abstract

2786 Words of text

2 Figure

4 Tables +1 Supplementary

43 References

## Abstract

**Purpose:** Angiogenesis is crucial for development of tumors and VEGFA is a key mediator of this process. The present study investigated the effect of *VEGFA* single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 and rs3025039 and their haplotypes on the risk of early-onset disease progression in patients with newly diagnosed non-metastatic breast cancer, as an attempt to explore new potential biomarkers for prognostic evaluation.

**Methods:** The study population was a cohort of 713 Brazilian women with unilateral breast cancer, who were submitted to tumor resection as their first therapeutic approach. The primary outcome was disease free-survival, whereas new primary cancer lesions or deaths unrelated to breast cancer progression were censored. Genomic DNA from blood samples was used for *VEGFA* genotyping. The impact of individual categories on disease-free survival was evaluated by Log-rank analysis of Kaplan-Meier curves. Independent predictors of breast cancer progression were validated using multivariate Cox proportional hazards regression models, with calculation of adjusted hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (95%CI).

**Results:** Total patient follow-up was 32,132 person-months, with a median follow-up time per person of 46.37 months. There were 13 negative outcomes unrelated to breast cancer progression (3 deaths and 10 new malignancies), 42 metastases and 10 recurrences. Histological grade 3 ( $HR_{adjusted} = 3.72$ ; 95%CI = 1.68 – 8.24), clinical stages II or III ( $HR_{adjusted} = 4.34$ ; 95%CI = 1.55 – 12.0) and tumor subtypes HER2-like or Triple-Negative ( $HR_{adjusted} = 1.92$ ; 95%CI = 1.02 – 3.59) were validated as independent predictors of breast cancer progression. *VEGFA* SNPs or haplotypes showed no significant impact on breast cancer progression, either for the entire study cohort or after patient stratification according to tumor subtypes. In addition, no significant differences in disease-free survival curves were observed when only individuals with homozygous diplotypes were considered.

**Conclusions:** *VEGFA* haplotypes were not validated as independent predictors of early-onset breast cancer progression in early-stage breast cancer patients treated with standard first-line therapies.

## Keywords

Breast cancer, *VEGFA*, SNP, haplotypes, prognostic factors, disease-free survival

## Introduction

Breast cancer is a very heterogeneous disease, with great interpatient variability on the histopathological and molecular profile [1,2], as well as on its clinical course after standard treatment protocols [3]. Conventional histopathological characteristics remain the most important prognostic determinants of survival [4], but new biomarkers and stage models are being searched, in attempt to improve prognostic evaluation and guide therapy selection [5]. Genes involved in carcinogenesis-related processes are natural candidates for exploring the potential of interindividual variations as new prognostic factors [6,7].

Angiogenesis is an important step in the development of cancer, being necessary to the growth of the primary tumor, invasion and metastasis [8,9], and the Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) is one of its key mediators [10]. In breast cancer, high tumoral levels of VEGFA have been associated with increased recurrence, metastatic disease, and poor survival [11–13].

The expression of *VEGFA* gene is highly modulated [14–16], and single nucleotide polymorphisms (SNP) occur in the promoter region (rs699947, rs1570360 and rs833061), in the 5'-untranslated region (rs2010963, rs25648) and in the 3'-untranslated region (rs3025039, rs10434), next to many potential regulatory elements [9,16,17]. *VEGFA* SNPs were shown to affect VEGFA levels in different cell models [16,18–20], including breast cancer [21]. *VEGFA* SNPs have also been associated with breast cancer susceptibility [8,21–26], increased risk of progression [10,27–30] or poor survival [10,30]. However, most of these works focused on the effects of single SNPs, and the results from different authors present great disparity [9].

The present study investigated the effect of *VEGFA* haplotypes on the risk of early-onset disease progression in patients with newly diagnosed non-metastatic breast cancer, in an attempt to explore their potential as new biomarkers of prognostic evaluation.

## Materials and Methods

### Subjects and Study Design

The study population was a prospective cohort of Brazilian women with first diagnosis of unilateral breast cancer and no distant metastases, who were admitted at the Brazilian Cancer Institute (Instituto Nacional de Câncer - INCA) during the period from February 2009 to December 2012, and assigned for tumor resection as their first therapeutic approach.

A total of 765 patients were included when admitted for breast cancer surgery. The exclusion criteria were: post-surgical histopathological diagnosis of non-malignant mammary lesions (N = 32) or of breast sarcoma (N = 1), bilateral synchronous breast cancer (N = 9), other primary tumor (N = 1), any previous or concomitant malignancy (N = 4), treatment aborted (N = 2) and patient's request to be excluded (N = 3). All patients in the study cohort (N = 713) had at least 24 months of post-surgical follow-up by the end of December 2014.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of INCA (#129/08), and all patients gave written consent to participate. The authors complied with the Brazilian regulation of clinical research, and followed the international precepts of ethics in research and of good clinical practice. The study protocol did not interfere with the post-surgical therapeutic conducts or routine clinical follow-up. The REMARK guidelines (REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies) were followed [31].

### Clinical and Histopathological Characterization

After recruitment, patients were interviewed to provide information on their clinical history. The histopathological characterization of excised breast tumors was based on the 3<sup>rd</sup> edition of the WHO Classification of Tumors (2003) [32] and on the Elston-Ellis histological grading system [33]. Immunohistochemistry analyses were used to define the tumor status for estrogen and progesterone receptors (ER and PR, respectively), whereas immunohistochemistry and FISH analyses were used to assess the human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2). The data on ER, PR and HER-2 were used for biological classification of the tumors, as proposed by Huober *et al.* [34]. In brief, tumors were defined as Luminal A if they were positive for both ER and PR, but negative for HER-2; as HER-2 like if they were negative for ER and positive for HER-2, irrespective of their status for PR; and as Triple-negative if they were negative for ER, PR and HER-2. Other combinations of ER, PR and HER-2 status were fit into the Luminal B category.

## Genotyping Analyses

DNA was extracted from peripheral blood samples (3 mL) using the Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), according to the procedures recommended by the manufacturer. Patients were genotyped for rs699947 (-2578C>A), rs833061(-460T>C), rs1570360 (-1154G>A), rs2010963 (405G>C) and rs3025039 (936C>T) by allelic discrimination using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Warrington, UK), as described previously [35].

## Characterization of survival outcomes

Disease-free survival and disease progression were defined as the primary endpoints of the study. Disease progression was characterized by the occurrence of loco-regional or contra-lateral recurrence of breast cancer, or by the detection of any distant metastasis. The time to progression (TTP) was calculated as the period of time between the surgery date and the date of the first exam indicating disease progression. Patients were considered disease-free if they had no suggestive clinical symptoms or imaging diagnosis of disease progression until their last medical consult. The disease-free survival was calculated as the period of time between the surgery date and the date of the last medical consult. New primary cancer lesions or deaths by causes unrelated to disease progression were censored in survival analyses.

## Statistical Analyses

A descriptive study of the cohort was conducted, with measures of central tendency and dispersion for continuous variables, or relative frequencies for categorical variables. Clinical and histopathological features were dichotomized for better and worse estimated prognostic values. Allelic and genotypic frequencies were derived by gene counting, and the adherence to the Hardy–Weinberg principle was evaluated by the Chi-square test for goodness of-fit. The haplotype patterns were inferred using Haploview 4.2 [36], based on the algorithm of expectation and maximization [37]. Individual diplotypes were inferred using the Haplo Stats software, version 1.3 [38].

Survival curves were estimated using the Kaplan–Meier product-limit method, with the influence of individual variables on the mean time to disease progression being evaluated with the two-sided log-rank test. The impact of individual variables on disease-free survival rates was estimated by calculation of their hazard ratios (HR), and 95% confidence intervals (95%CI). The significant covariates were included in multivariate Cox proportional hazards

regression models to calculate the adjusted HR ( $HR_{adjusted}$ ) and respective 95%CI of new identified independent prognostic factors of breast cancer progression.

All statistical analyses were conducted using SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois). The threshold for significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

Table 1 presents the main clinical and histopathological characteristics of the study cohort (N = 713) and the distribution of *VEGF* SNPs and haplotypes for patients with available DNA samples (N = 581). There was a wide age range (24-91 years), and most tumors (84.0%) could be considered as early-stage (staging group  $\leq$  II, with 63.1% being classified as Luminal A, which represents the best prognostic group. However, there was a predominance (87.4%) of poorly differentiated histological grades (G2 or G3), and 40.4% of patients were positive for lymph node metastases. All *VEGF* SNPs fitted Hardy-Weinberg equilibrium.

Total patient follow-up was 32,132 person-months, with a median follow-up time per person of 46.37 months. Table 2 shows a complete description of all primary negative outcomes (deaths, recurrences, metastases and new malignancies), indicating the time to the event (TTE) for cases unrelated to breast cancer progression (3 deaths and 10 new malignancies), or the TTP for cases of metastases (N = 42) or recurrences (N = 10).

The influence of clinical and histopathological characteristics, as well as of *VEGFA* genotypes and haplotypes, in the rates of breast cancer progression were estimated by the mean TTP and 95%CI. High histological grade (G3), advanced clinical stages (II and III), tumor subtypes HER-2 or Triple-Negative and adjuvant chemotherapy were significantly associated with shorter TTP when evaluated after two years of follow-up for all patients in the cohort (Table 3), as well as when all available follow-ups were considered (Table 4). Age was not significantly associated with worse outcomes in the study cohort, even if other cut-off values (e.g. 35 or 45 years-old) were used for categorization (data not shown).

*VEGFA* SNPs rs699947 and rs2010963 showed significant impact on the mean TTP when evaluated during the first two years of follow-up, i.e. the wild-type -2578CC genotype and the variant 405 GC and CC genotypes were associated with shorter breast cancer progression. As a consequence, the haplotype \*2 (CTGC) resulted in shorter breast cancer progression whereas the haplotype \*4 (ACGG) apparently improved the two-year disease-free survival (Table 3). After multivariate analysis, the individual covariates validated as independent predictors of early-onset breast cancer progression were tumor subtypes HER2-like or Triple-Negative ( $HR_{adjusted} = 4.74$ ; 95%CI = 1.67 – 13.40) and the wild-type -2578CC genotype of rs699947 ( $HR_{adjusted} = 5.87$ ; 95%CI = 1.64 – 20.95). The impact of the wild-type -2578CC genotype of rs699947 on the short-time disease-free survival was maintained when only evaluated exclusively for HER2-like or Triple-Negative tumors ( $HR_{adjusted} = 9.60$ ; 95%CI = 1.12 – 82.20). Figure 1 shows the impact of *VEGFA* rs699947 on the two-year

disease-free survival of all breast cancer patients (Panel A) or of HER2-like or Triple-Negative tumors (Panel B).

When all available follow-ups were included in the analysis, *VEGFA* SNPs or haplotypes were no longer associated with breast cancer progression (Table 4). The individual covariates validated as independent predictors of breast cancer progression were: Grade 3 ( $HR_{\text{adjusted}} = 3.72$ ; 95%CI = 1.68 – 8.24), clinical stages II or III ( $HR_{\text{adjusted}} = 4.34$ ; 95%CI = 1.55 – 12.0) and tumor subtypes HER2-like or Triple-Negative ( $HR_{\text{adjusted}} = 1.92$ ; 95%CI = 1.02 – 3.59). In order to rule out any possible effect of *VEGFA* haplotypes on disease-free survival curves of breast cancer patients, they were further evaluated in combination with the identified independent covariates (Figure 2). No significant effects were found for any of the haplotypes when evaluated individually for the entire study cohort (Panels A-E) or after patient stratification according to tumor subtypes. In addition, no significant differences in disease-free survival curves were observed when only individuals with homozygous diplotypes were considered (Panel F).



## Discussion

The present study aimed to evaluate the prognostic contribution of five common SNPs of the *VEGFA* (rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963, rs3025039), or its haplotypes, in breast cancer. The study was conducted in a prospective manner, based on a single-institution cohort of patients with first diagnosis of unilateral non-metastatic breast cancer. INCA is a reference institution for treatment of cancer in Brazil, and patients were mostly residents from different cities of the state of Rio de Janeiro (16.5 million inhabitants). Although relatively limited in the sample size and in the follow-up time, the study design allowed full verification of the patients' clinical history, as well as minimization of diversity in therapeutic conducts and in follow-up routines. Such design aspects contribute to reduce uncontrolled confounding factors that may affect risk analyses.

Five previous studies have explored the role of *VEGFA* SNPs on disease-free survival of breast cancer patients [10,27–30], but they differed regarding the study design, population characteristics and SNPs selected. Two reports [10,27] were case-control studies, with follow-up of the breast cancer patients: Lu *et al.* (2005) recruited all cases of diagnosed breast cancer, and evaluated rs833061, rs2010963 and rs3025039 [10], whereas Absenger *et al.* (2013) included only non-metastatic cases, and restricted their analysis to rs3025039 [27]. Kidd *et al.* (2010) evaluated rs699947, rs1570360, and rs2010963 in a case-only study with tumor samples from a biorepository [30]. Etienne-Grimaldi *et al.* (2011) and Maae *et al.* (2012) were the only studies to explore the five *VEGFA* SNPs studied here [28,29]. The first authors performed a clinical trial of bevacizumab in metastatic breast cancer patients [28], whereas the latter conducted a hospital-based cohort study of HER2+ cases [29], and included rs25648 in their analysis.

*VEGFA* haplotypes were evaluated in only three of the previous studies [10,29,30]. However, Lu *et al.* (2005) [10] and Kidd *et al.* (2010) [30] did not include all *VEGFA* SNPs, which present strong linkage disequilibrium. In fact, rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 constitute a single haploblock, whereas rs3025039 is not linked to the others [35,39]. In our population, this same pattern of haploblock was observed, with 5 haplotypes summing 97.5% of all inferred combinations (see Table 1).

Despite the design differences among the studies involving the impact of *VEGFA* SNPs on breast cancer survival, their findings were evaluated in comparison to ours. Regarding rs699947, rs833061 and rs1570360, no significant impact on disease-free survival was found when the SNPs were evaluated separately [10,28–30]. However, Kidd *et al.* (2010) report that the haplotype formed by -2578C (rs699947), -1154G (rs1570360) and 405G

(rs2010963) increases the risk of breast cancer recurrence (HR = 1.58, 95%CI 1.06–2.35;  $p = 0.03$ ) [30]. The authors claim that such effect might be related to -2578C allele, which was not independently predictive of breast cancer outcomes, but improved the 5- and 8-year predictive accuracy of standard prognostic indicators. Nevertheless, the haplotype formed by -2578C, -1154G, 405C was not associated with increased risk of disease recurrence, indicating that inheritance of the -2578C allele with this haplotype was not harmful [30].

With regards to rs2010963, among the four studies available [10,28–30], only Maae *et al.* (2012), who evaluated HER2+ tumors, found an increase in the risk of disease recurrence for the variant 405CC genotype (HR 2.96; 95%CI 1.33-6.59;  $P = 0.008$ ) [29]. Lu *et al.* (2005) and Kidd *et al.* (2010) also explored 405C-containing haplotypes, but found no significant effects on disease-free survival of breast cancer patients [10,30].

Finally, with respect to rs3025039, Lu *et al.* (2005) and Maae *et al.* (2012) found no associations with breast cancer recurrence [10,29], whereas Absenger *et al.* (2013) and Etienne-Grimaldi *et al.* (2011) reported conflicting results [27,28]. Thus, Etienne-Grimaldi *et al.* (2011) described a significantly beneficial effect for the 936T allele ( $P = 0.022$ ), with an increased time to progression (11.5 months) when compared to 936CC genotype (9.7 months) among metastatic breast cancer patients treated with bevacizumab [28]. The beneficial effect of the 936T (rs3025039) allele could be due to a reduction on the stability of mRNA transcripts of *VEGFA* [14], leading to lower VEGF plasma levels compared with subjects homozygous for the 936C allele [21,28,40]. However, Absenger *et al.* (2013) reported an increased risk of breast cancer recurrence for the 936T allele among non-metastatic patients (HR 1.880; 95%CI 1.020–3.465;  $P = 0.043$ ) [27].

Despite the disparity in results, the combined evaluation of previous studies on *VEGFA* SNPs or haplotypes in breast cancer survival do not point a clear prognostic contribution for the evaluation of disease recurrence or progression. In accordance, our results indicate no significant impact of *VEGFA* SNPs on the risk of disease progression (recurrence or metastasis) in early-stage breast cancer patients treated with curative surgery as their first therapeutic approach. Further studies on the functional relevance of the *VEGFA* SNPs in the prognosis of breast cancer should explore differential effects on specific subtypes, especially in HER2- or TN tumors, which have less therapeutic options, and are more likely to benefit from new therapies, including bevacizumab [41–43].

## **Ethical Standards**

The study was conducted following the international precepts of ethics in research and of good clinical practice. The authors complied with the Brazilian regulation of clinical research. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute (INCA #129/08), and all patients gave written consent to participate.

## **Acknowledgements**

This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq 474522/2010-5), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/110.356/2010 and E-26/010.002644/2014), and INCT para Controle do Câncer (CNPq 573806/2008-0; FAPERJ E26/170.026/2008). HAVM and DRFA were awarded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro; JMAD and MSL were awarded by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento; VI-B was awarded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and SMTG-C was awarded by Fundação do Câncer.

The authors thank Dr. Guilherme Suarez-Kurtz for the use of laboratory facilities, and the personnel from the Breast Cancer Hospital (HC3-INCA), and from the National Bank of Tumors in the Brazilian National Cancer Institute (BNT-INCA), for logistic support in sample and data collection.

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## **Authors' Contributions**

HAV-M recruited patients, collected clinical data and outcomes, performed genotyping assays and statistical analyses, generated tables and figures, and drafted the manuscript. DRF-A and SMTG-C collected clinical data and outcomes, and helped generating tables. JMAD and MS-L collected histopathological data. MS-L, VI-do-B and SMTG-C recruited patients and collected clinical data. SK conceived the epidemiological design. JAPM set and managed genotyping assays, contributed with critical discussion and revised the manuscript. RV-J conceived, designed, and coordinated the study, revised and analyzed data, wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Guiu S, Michiels S, Andre F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, *et al.* Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol.* 2012 Dec 1;23(12):2997–3006.
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci.* 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
3. Anderson WF, Matsuno R. Breast Cancer Heterogeneity: A Mixture of At Least Two Main Types? *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2006 Jul 19;98(14):948–51.
4. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Feb;107(3):309–30.
5. Danova M, Delfanti S, Manzoni M, Mariucci S. Tissue and Soluble Biomarkers in Breast Cancer and Their Applications: Ready to Use? *JNCI Monogr.* 2011 Oct 1;2011(43):75–8.
6. Ruiz C, Tolnay M, Bubendorf L. Application of personalized medicine to solid tumors: opportunities and challenges. *Swiss Med Wkly [Internet].* 2012 Jun 19 [cited 2014 Apr 4]; Available from: <http://doi.emh.ch/smw.2012.13587>
7. Chung CC, Chanock SJ. Current status of genome-wide association studies in cancer. *Hum Genet.* 2011 Jul;130(1):59–78.
8. Jakubowska A, Gronwald J, Menkiszak J, Górski B, Huzarski T, Byrski T, *et al.* The VEGF\_936\_C&T 3'UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer Lett.* 2008 Apr;262(1):71–6.
9. Sa-nguanraksa D, O-charoenrat P. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor A Polymorphisms in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2012 Nov 13;13(12):14845–64.
10. Lu H. Association of Genetic Polymorphisms in the VEGF Gene with Breast Cancer Survival. *Cancer Res.* 2005 Jun 15;65(12):5015–9.
11. Gasparini G, Bonoldi E, Gatti C, Vinante O, Toi M, Tominaga T, *et al.* Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Protein in Node-Negative Breast Carcinoma. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1997 Jan 15;89(2):139–47.
12. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology.* 1998;16:3121–8.
13. Linderholm B, Lindahl T, Holmberg L, Sigrid Klaar, Lennerstrand J, Henriksson R, *et al.* The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Correlates with Mutant p53 and Poor Prognosis in Human Breast Cancer. *Cancer Research.* 2001;61:2256–60.

14. Shih S-C, Claffey KP. Regulation of Human Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stability in Hypoxia by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1359–65.
15. Schultz A, Lavie L, Hochberg I, Beyar R, Stone T, Skorecki K, *et al.* Interindividual Heterogeneity in the Hypoxic Regulation of VEGF : Significance for the Development of the Coronary Artery Collateral Circulation. *Circulation.* 1999 Aug 3;100(5):547–52.
16. Watson CJ, Webb NJ., Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine.* 2000 Aug;12(8):1232–5.
17. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol.* 1999 Dec;60(12):1245–9.
18. Jin Q. Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms in Relation to Breast Cancer Development and Prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3647–53.
19. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, *et al.* A Common Polymorphism in the 5'-Untranslated Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2002 May 1;51(5):1635–9.
20. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Siviridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* 2004 Dec 1;46(3):293–8.
21. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, *et al.* A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer.* 2003 Sep 10;106(4):468–71.
22. Jacobs E, Feigelson H, Bain E, Brady K, Rodriguez C, Stevens V, *et al.* Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in the Cancer Prevention Study II cohort. *Breast Cancer Research.* 2006;8(2):1–6.
23. Schneider BP, Radovich M, Sledge GW, Robarge JD, Li L, Storniolo AM, *et al.* Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Sep;111(1):157–63.
24. Oliveira C, Lourenço GJ, Silva PMR, Cardoso-Filho C, Favarelli MHC, Gonçalves NSL, *et al.* Polymorphisms in the 5'- and 3'-untranslated region of the VEGF gene and sporadic breast cancer risk and clinicopathologic characteristics. *Tumor Biol.* 2011 Apr;32(2):295–300.
25. Gerger A, Langsenlehner U, Renner W, Weitzer W, Eder T, Yazdani-Biuki B, *et al.* A multigenic approach to predict breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Jul 17;104(2):159–64.
26. Rodrigues P, Furriol J, Tormo E, Ballester S, Lluch A, Eroles P. The single-nucleotide polymorphisms +936 C/T VEGF and -710 C/T VEGFR1 are associated with breast cancer protection in a Spanish population. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(2):769–78.

27. Absenger G, Szkandera J, Stotz M, Pichler M, Winder T, Langsenlehner T, *et al.* A common and functional gene variant in the vascular endothelial growth factor predicts clinical outcome in early-stage breast cancer: VEGF-A predicts outcome in breast cancer. *Mol Carcinog.* 2013 Nov;52(S1):96–102.
28. Etienne-Grimaldi M-C, Formento P, Degeorges A, Pierga J-Y, Delva R, Pivot X, *et al.* Prospective analysis of the impact of VEGF-A gene polymorphisms on the pharmacodynamics of bevacizumab-based therapy in metastatic breast cancer patients: VEGF-A gene polymorphisms and bevacizumab-based treatment. *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Jun;71(6):921–8.
29. Maae E, Andersen RF, Steffensen KD, Jakobsen EH, Brandslund I, Sørensen FB, *et al.* Prognostic Impact of *VEGFA* Germline Polymorphisms in Patients with HER2-positive Primary Breast Cancer. *Anticancer Research.* 2012;32:3619 – 3628.
30. Kidd LR, Brock GN, VanCleave TT, Benford ML, Lavender NA, Kruer TL, *et al.* Angiogenesis-associated sequence variants relative to breast cancer recurrence and survival. *Cancer Causes Control.* 2010 Oct;21(10):1545–57.
31. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, *et al.* Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2005 Aug 17;97(16):1180–4.
32. Compton CC. *AJCC cancer staging atlas a companion to the seventh editions of the AJCC cancer staging manual and handbook* [Internet]. New York, NY: Springer; 2012 [cited 2015 Jan 21]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-2080-4>
33. Elston CW, Ellis IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403–10.
34. Huober J, Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, *et al.* Effect of neoadjuvant anthracycline–taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Nov;124(1):133–40.
35. Perini J, Cardoso J, Berardo P, Vianna-Jorge R, Nasciutti L, Bellodi-Privato M, *et al.* Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C> A, -460 T> C, -1154G> A, +405G > C and +936C> T) in endometriosis: a case–control study with Brazilians. *BMC Womens Health.* 2014;14(1):117.
36. Haploview version 4.2 [Internet]. Available from: <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/tutorial.php>
37. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2):263–5.
38. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score Tests for Association between Traits and Haplotypes when Linkage Phase Is Ambiguous. *Am J Hum Genet.* 2002 Feb;70(2):425–34.

39. Langsenlehner U, Wolf G, Langsenlehner T, Gerger A, Hofmann G, Clar H, *et al.* Genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer risk. The Austrian “tumor of breast tissue: incidence, genetics, and environmental risk factors” study. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 May;109(2):297–304.
40. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A Common 936 C/T Mutation in the Gene for Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels. *J Vasc Res.* 2000;37(6):443–8.
41. Brufsky AM, Hurvitz S, Perez E, Swamy R, Valero V, O’Neill V, *et al.* RIBBON-2: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Bevacizumab in Combination With Chemotherapy for Second-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Nov 10;29(32):4286–93.
42. Kristensen T, Knutsson M, Wehland M, Laursen B, Grimm D, Warnke E, *et al.* Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec 11;15(12):23024–41.
43. Fakhrejehani E, Toi M. Antiangiogenesis Therapy for Breast Cancer: An Update and Perspectives from Clinical Trials. *Jpn J Clin Oncol.* 2014 Mar 1;44(3):197–207.

### Legends for Figures

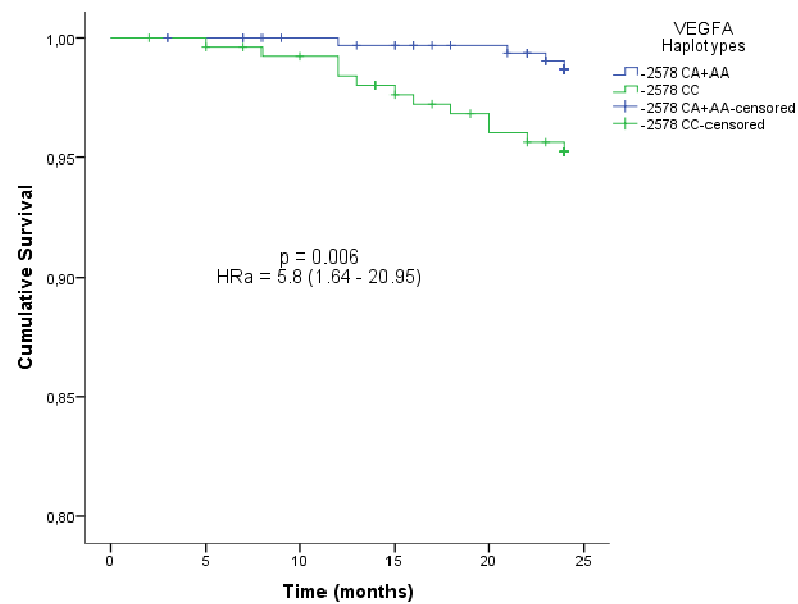
**Figure 1.** Two years disease-free survival curves in breast cancer patients according to -2578 *VEGFA* SNP. The p values were obtained from the Cox model with adjustment for only tumor subtype.

**Figure 2.** Five years disease-free survival curves in breast cancer patients according to *VEGFA* haplotypes. The p values were obtained from the Cox model with adjustment for grade, staging group and tumor subtype.



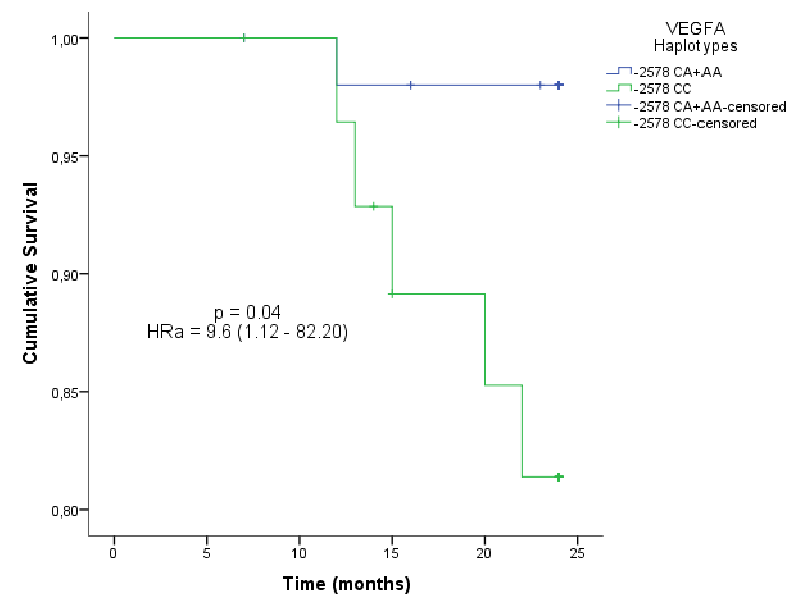
Figure 1

A



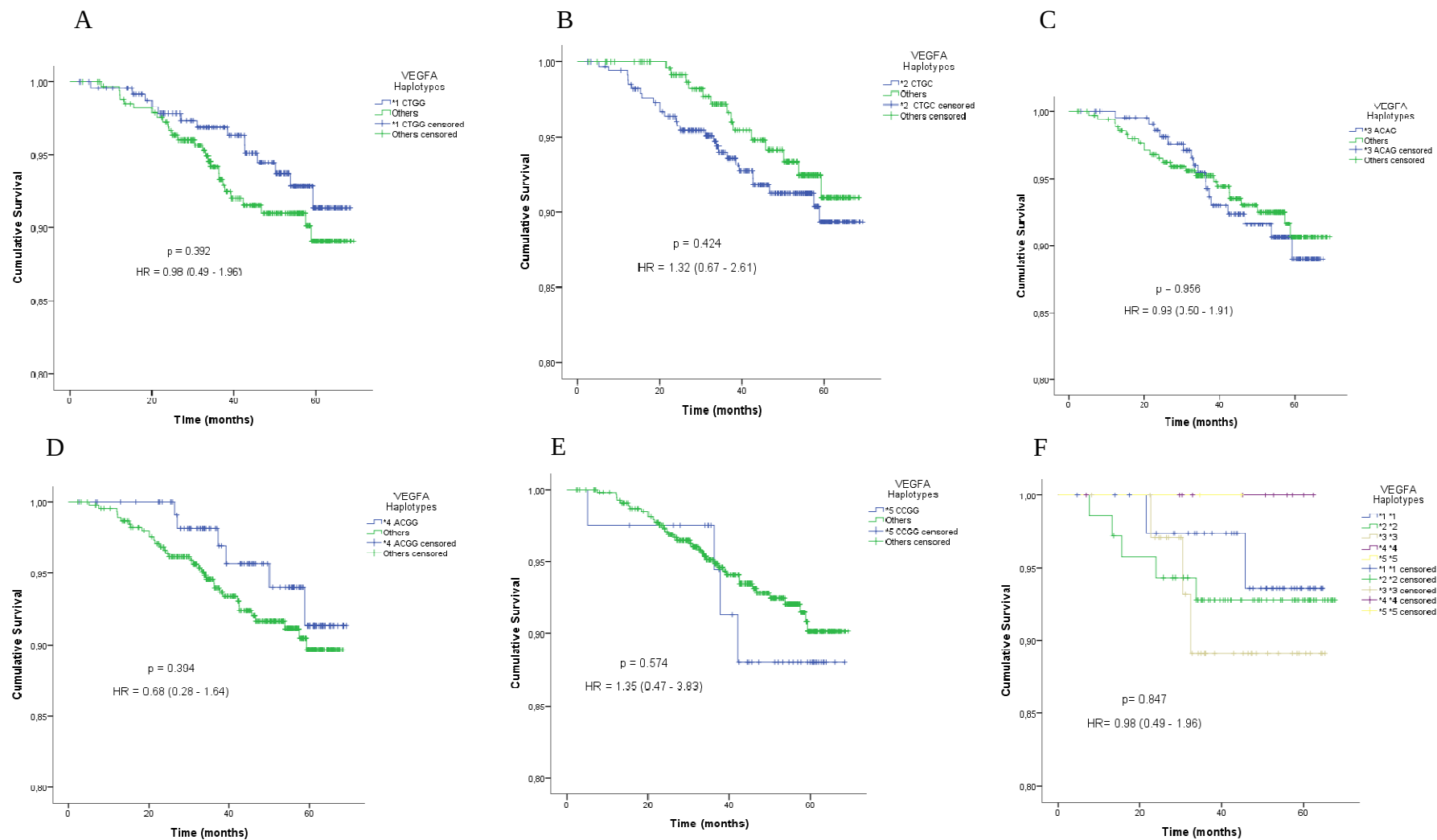
All of cohort

B



Her2-like or Triple Negative

Figure 2



**Table 2 Description of negative outcomes of breast cancer patients in the study cohort**

| <b>Outcomes unrelated to disease progression</b> | <b>N</b> | <b>TTE</b> | <b>Disease progression</b> | <b>N</b> | <b>TTP</b>   |
|--------------------------------------------------|----------|------------|----------------------------|----------|--------------|
| <b>Second primary tumors</b>                     |          |            | <b>Local recurrence</b>    |          |              |
| Lung adenocarcinoma                              | 1        | 3.2        | Loco-regional              | 4        | 12.0 – 28.0* |
| Papillary thyroid carcinoma                      | 1        | 7.2        | Contra-lateral             | 5        | 25.0 – 59.0* |
| Endometrial adenocarcinoma                       | 2        | 26.9; 59.5 | Axillary lymph nodes       | 1        | 53.8         |
| Rectal adenocarcinoma                            | 1        | 14.7       |                            |          |              |
| Desmoplastic melanoma                            | 1        | 28.6       | <b>Distant metastases</b>  |          |              |
| Basocelular carcinoma                            | 2        | 33.0; 39.0 | Brain                      | 4        | 12.0 – 50.0* |
| Xantastrocitona                                  | 1        | 32.5       | Bone                       | 16       | 2.0 – 47.0*  |
| Colon adenocarcinoma                             | 1        | 63.0       | Lung                       | 9        | 25.0 – 59.0* |
|                                                  |          |            | Liver                      | 6        | 16.0 - 39.0* |
|                                                  |          |            | Pancreas                   | 1        | 31.1         |
| <b>Deaths</b>                                    |          |            | Peritoneum                 | 1        | 13.1         |
| Post-surgical complications                      | 1        | 0.17       | Multiple organ lesions     | 2        | 36.0; 40.0   |
| Febrile neutropenia                              | 1        | 4.0        | Pleural                    | 3        | 15.0 – 36.0* |
| Intestinal obstruction (non-metastatic)          | 1        | 7.0        |                            |          |              |

Abbreviations: TTE, time to the event (elapsed time, in months, between the surgery and the event); TTP, time to progression (elapsed time, in months, between the surgery and the diagnosis of disease progression)

\*Minimum and maximum values

**Table 3 Influence of individual features on two-years the disease-free survival of breast cancer patients (N = 713)**

| Variables                      | TTP (months)      |             | P Log-Rank     |
|--------------------------------|-------------------|-------------|----------------|
|                                | Mean <sup>a</sup> | 95% CI      |                |
| <b>Age</b>                     |                   |             |                |
| < 70 years                     | 23.7              | 23.5 – 23.9 | 0.61           |
| 70 years or more               | 23.9              | 23.8 – 24.1 |                |
| <b>Histological type</b>       |                   |             |                |
| Ductal                         | 23.8              | 23.7 – 23.9 | 0.43           |
| Lobular                        | 23.5              | 22.5 – 24.4 |                |
| <i>In situ</i>                 | -                 | -           | 0.22           |
| Invasive                       | -                 | -           |                |
| <b>Staging group</b>           |                   |             |                |
| ≤ IIA                          | 23.9              | 23.7 – 24.1 | <b>0.04</b>    |
| ≥ IIB                          | 23.7              | 23.5 – 23.9 |                |
| <b>Tumor grade (G)</b>         |                   |             |                |
| G1 + G2                        | 23.9              | 23.8 – 24.0 | <b>0.02</b>    |
| G3                             | 23.6              | 23.4 – 23.9 |                |
| <b>Tumor subtype</b>           |                   |             |                |
| Luminal A                      | 23.8              | 23.6 – 24.0 | < <b>0.001</b> |
| Luminal B                      | 23.8              | 23.5 – 24.1 |                |
| HER2- like                     | 23.6              | 23.2 – 24.1 |                |
| Triple-Negative                | 22.8              | 22.0 – 23.7 |                |
| <b>Post-surgical treatment</b> |                   |             |                |
| Othres                         | 23.9              | 23.7 – 24.0 | 0.21           |
| Chemotherapy                   | 23.6              | 23.4 – 23.9 |                |
| <b>VEGFA genotype</b>          |                   |             |                |
| rs699947                       |                   |             | <b>0.01</b>    |
| CC                             | 23.6              | 23.3 – 23.9 |                |
| CA + AA                        | 24.0              | 23.9 – 24.0 |                |
| rs833061                       |                   |             | 0.18           |
| TT                             | 23.7              | 23.4 – 23.9 |                |
| TC + CC                        | 23.8              | 23.7 – 24.0 |                |
| rs1570360                      |                   |             | 0.22           |
| GG                             | 23.7              | 23.5 – 23.9 |                |
| GA + AA                        | 23.9              | 23.8 – 24.0 |                |
| rs2010963                      |                   |             | <b>0.02</b>    |
| GG                             | 24.0              | 23.9 – 24.0 |                |
| GC + CC                        | 23.7              | 23.5 – 23.9 |                |
| rs3025039                      |                   |             | 0.42           |
| CC                             | 23.8              | 23.7 – 23.9 |                |
| CT + TT                        | 23.7              | 23.4 – 24.0 |                |
| <b>VEGFA haplotype</b>         |                   |             |                |
| *1 CTGG                        | 23.8              | 23.6 – 24.0 | 0.41           |
| *2 CTGC                        | 23.6              | 23.4 – 23.8 | <b>0.01</b>    |
| *3 ACAG                        | 23.9              | 23.8 – 24.0 | 0.25           |
| *4 ACGG                        | -                 | -           | <b>0.04</b>    |
| *5 CCGG                        | 23.5              | 22.6 – 24.4 | 0.90           |

<sup>a</sup>Values are presented as means, because medians were not achieved

**Table 4 Influence of individual features on the disease-free survival of breast cancer patients (N = 713)**

| Variables                      | TTP (months)      |             | P Log-Rank |
|--------------------------------|-------------------|-------------|------------|
|                                | Mean <sup>a</sup> | 95% CI      |            |
| <b>Age</b>                     |                   |             |            |
| < 70 years                     | 65.4              | 64.3 – 66.5 | 0.09       |
| 70 years or more               | 66.6              | 65.1 – 68.1 |            |
| <b>Histological type</b>       |                   |             |            |
| Ductal                         | 65.9              | 64.9 – 66.8 | 0.59       |
| Lobular                        | 63.1              | 59.0 – 67.2 |            |
| <i>In situ</i>                 | 67.1              | 65.1 – 69.1 | 0.16       |
| Invasive                       | 65.6              | 64.6 – 66.6 |            |
| <b>Staging group</b>           |                   |             |            |
| ≤ IIA                          | 67.5              | 66.7 – 68.3 | < 0.001    |
| ≥ IIB                          | 64.2              | 62.8 – 65.6 |            |
| <b>Tumor grade (G)</b>         |                   |             |            |
| G1 + G2                        | 67.7              | 66.7 – 68.6 | < 0.001    |
| G3                             | 62.6              | 61.0 – 64.3 |            |
| <b>Tumor subtype</b>           |                   |             |            |
| Luminal A                      | 66.8              | 65.7 – 67.8 | < 0.001    |
| Luminal B                      | 65.2              | 63.1 – 67.2 |            |
| HER2- like                     | 57.9              | 52.7 – 63.0 |            |
| Triple-Negative                | 57.0              | 53.3 – 62.3 |            |
| <b>Post-surgical treatment</b> |                   |             |            |
| Othres                         | 67.0              | 66.0 – 68.0 | 0.001      |
| Chemotherapy                   | 64.5              | 63.2 – 65.7 |            |
| <b>VEGFA genotype</b>          |                   |             |            |
| rs699947                       |                   |             | 0.57       |
| CC                             | 64.6              | 63.0 – 66.3 |            |
| CA + AA                        | 66.4              | 65.2 – 67.5 |            |
| rs833061                       |                   |             | 0.93       |
| TT                             | 65.1              | 63.4 – 66.8 |            |
| TC + CC                        | 66.0              | 64.7 – 67.1 |            |
| rs1570360                      |                   |             | 0.72       |
| GG                             | 66.0              | 64.7 – 67.4 |            |
| GA + AA                        | 65.0              | 63.4 – 66.9 |            |
| rs2010963                      |                   |             | 0.40       |
| GG                             | 66.0              | 64.6 – 67.2 |            |
| GC + CC                        | 65.5              | 64.2 – 67.0 |            |
| rs3025039                      |                   |             | 0.21       |
| CC                             | 66.5              | 65.4 – 67.5 |            |
| CT + TT                        | 64.3              | 62.0 – 66.5 |            |
| <b>VEGFA haplotype</b>         |                   |             |            |
| *1 CTGG                        | 65.9              | 64.6 – 67.2 | 0.26       |
| *2 CTGC                        | 65.3              | 64.0 – 66.8 | 0.31       |
| *3 ACAG                        | 64.3              | 63.0 – 65.8 | 0.74       |
| *4 ACGG                        | 67.1              | 65.4 – 69.0 | 0.32       |
| *5 CCGG                        | 64.0              | 59.9 – 68.2 | 0.59       |

<sup>a</sup>Values are presented as means, because medians were not achieved

**Supplementary Table 1 Description of post-surgical therapeutic approaches in the study cohort (N = 713)**

| <b>First post-surgical therapy</b>     | <b>Main criteria for therapeutic choice</b> | <b>N</b> | <b>%</b> |
|----------------------------------------|---------------------------------------------|----------|----------|
| <b>No intervention</b>                 | Tis or T1; N0 or N1                         | 65       | 9.1      |
| <b>Radiotherapy</b>                    | Tis, T1 or T2; N0 or N1                     | 41       | 5.7      |
| <b>Radiotherapy + Hormonal therapy</b> | T1 or T2; N0 or N1; ER+ or PR+              | 77       | 10.7     |
| <b>Hormonal therapy</b>                | T1 or T2; N0 or N1; ER+ or PR+              | 92       | 13.0     |
| <b>Chemotherapy</b>                    | $T \geq 2$ or $N \geq 1$                    | 438      | 61.5     |

## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o impacto dos genótipos e haplótipos do *VEGFA* formados pelos SNPs rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 e rs3025039 sobre as características histopatológicas com valor prognóstico no tratamento do câncer de mama e sobre o risco de recorrência da doença, com o objetivo de avaliar seu potencial como novo biomarcador de resposta terapêutica.

O estudo foi realizado de forma prospectiva, a partir de uma coorte única, constituída de pacientes com primeiro diagnóstico de câncer de mama unilateral e não-metastático, que foram diagnosticadas e acompanhadas em uma instituição de referência para o tratamento do câncer de mama no Brasil. O desenho do estudo permitiu a verificação completa da história clínica das pacientes, bem como a minimização da diversidade de condutas terapêuticas e das rotinas de acompanhamento. Tais aspectos do projeto contribuíram para a redução dos fatores de confundimento que poderiam afetar as análises de risco.

As pacientes foram incluídas a partir da indicação de primeira estratégia terapêutica como cirurgia curativa ou quimioterapia neoadjuvante. Pacientes que já se apresentavam ao diagnóstico com metástases, doença bilateral ou tratamento prévio não foram selecionadas, uma vez que o estudo pretendia avaliar o risco de progressão do câncer de mama a partir de estágios iniciais. Contudo, pode-se observar a diversidade de parâmetros histopatológicos, como por exemplo, a alta frequência de graus histológicos avançados pouco diferenciados observada tanto nas pacientes submetidas inicialmente à cirurgia (87,3%) quanto nas pacientes tratadas primeiramente com quimioterapia neoadjuvante (93,4%). A diversidade das demais características histopatológicas, tais como receptores hormonais, HER2 e a distribuição dos subtipos tumorais refletem a heterogeneidade fenotípica do câncer de mama.

Embora o estudo tenha sido conduzido de forma prospectiva, a inclusão das pacientes de quimioterapia neoadjuvante foi iniciada mais tardiamente (aproximadamente dois anos após o início da coorte) e, portanto, a proporção destas pacientes não reflete necessariamente a frequência desta indicação terapêutica na instituição.

O gene *VEGFA* é altamente polimórfico e seus SNPs podem afetar os níveis de *VEGFA* em modelos diferentes de células [27–30], incluindo câncer de mama [31], sendo que elevados níveis de *VEGFA* em tumores de mama têm sido associados com pior prognóstico [14–16].

A distribuição dos haplótipos do *VEGFA* na coorte estudada foi semelhante à distribuição relatada anteriormente para um grupo diferente de pacientes brasileiras com

endometriose, sendo o haplótipo \*2 (CTGC) mais frequente [124]. Na nossa população, encontramos um único haplobloco, formado por quatro SNPs (rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963), enquanto o rs3025039 não estava em desequilíbrio de ligação com os outros SNPs conforme já relatado anteriormente por [124,128].

Com relação à distribuição dos genótipos e alelos do *VEGFA* em função das características histopatológicas, os genótipos variantes de rs699947 (CA + AA) mostraram-se mais prevalentes entre os tumores de mama não luminais (tipos *HER2-like* ou Triplo-Negativo). Estudos anteriores também apontaram associação entre rs699947 e as características histopatológicas do câncer de mama [101,128,129]. Contudo, os resultados diferem dos nossos e são discordantes entre si. Estudo realizado por Jin *et al.* (2005), em pacientes polonesas, alemãs e suecas, mostrou que o genótipo variante do SNP rs699947 (-2578AA) foi associado com tumores de baixo grau histológico [101]. Maae *et al.* (2012), que estudou tumores *HER2-like* na Dinamarca relataram que pacientes com genótipos variantes -2578CA e -2578AA apresentavam tamanho tumoral significativamente menor (20 mm) quando comparados com o genótipo -2578CC (23,5 mm) [129]. Em nosso estudo, o tamanho do tumor não foi avaliado, uma vez que se considerou apenas as características histopatológicas obtidas de biópsias no momento do diagnóstico e não as medidas clínicas do tumor macroscópico. Contrariamente, Langsenlehner *et al.* (2008), não encontraram associação entre o SNP rs699947 e o tamanho tumoral quando estudou pacientes austríacas com câncer de mama [128].

Dentre os demais SNPs do *VEGFA*, apenas rs2010963 também apresentou associações significativas com parâmetros histopatológicos do câncer de mama em estudos anteriores, embora os resultados sejam contraditórios. Maae *et al.* (2012) [129] e Jin *et al.* (2005) [101] relataram tamanho tumoral significativamente maior para os pacientes com o genótipo variante do SNP rs2010963 (405CC) quando comparado com aqueles com 405CG ou 405GG genótipos. Estes resultados parecem corroborar com estudo de Balasubramanian *et al* (2007) que relataram a associação entre o alelo 405C e maior tamanho tumoral na população caucasiana [137]. Em contraste, Langsenlehner *et al.* (2008) constataram que o alelo C foi associado com o menor tamanho tumoral na população austríaca [128].

Com relação aos haplótipos do gene *VEGFA* e as características histopatológicas nossos resultados indicam que haplótipo \*4, que contém os alelos variantes de rs699947 e rs833061, foi mais frequente entre os tumores negativos para RE e entre os tumores não luminais. Este resultado sugere que a aparente associação entre rs699947 e os subtipos de câncer de mama com pior prognóstico pode realmente depender de uma combinação



específica de SNPs do *VEGFA*, pois o haplótipo \*3 é mais frequente (20,3%) do que o haplótipo \*4 (11,6%) na nossa população e, portanto, é pouco provável que a falta de associação significativa para o primeiro seja devida ao baixo poder estatístico. Os haplótipos do *VEGFA* foram avaliados em apenas dois estudos anteriores [101,128], entretanto, diferentes haploblocos foram considerados. Jin *et al.* (2005) relataram que o haplótipo formado pelos alelos -2578C e 405C foi associado com maior tamanho tumoral [101], enquanto Langsenlehner *et al.* (2008) relataram uma associação significativa entre o haplótipo formado por -2578C (*rs699947*), -2489C (*rs1005230*), -460C (*rs833061*), 405C (*rs2010963*), -7C (*rs25648*) e menor tamanho do tumor [128]. Embora não haja um consenso claro sobre a associação entre os SNPs do *VEGFA* ou haplótipos e as características de câncer de mama, os resultados sugerem que eles podem contribuir para uma melhor classificação de subtipos de tumor, podendo ser avaliado por seu papel potencial como biomarcadores de prognóstico, especialmente entre *HER2-like* ou Triplo-Negativo.

Para estimar o impacto dos SNPs *VEGFA* sobre a evolução clínica do câncer de mama, a coorte foi avaliada quanto à sobrevida livre de doença, caracterizada pela ausência de recorrência contralateral ou metástase à distância, entretanto, os nossos resultados não sugerem um valor prognóstico para os SNPs ou haplótipos do *VEGFA* em relação à progressão do câncer de mama. O tempo de acompanhamento das pacientes foi de 32.132 pessoas-mês, com um tempo médio de acompanhamento por pessoa de 46,37 meses. Embora este tempo de acompanhamento seja inferior ao habitualmente utilizado nos estudos clínicos e epidemiológicos de sobrevida, todas as pacientes tinham pelo menos dois anos de seguimento, e foi o período que, no presente estudo, observamos maior risco de recorrência.

Cinco estudos anteriores exploraram o papel dos SNPs do *VEGFA* na sobrevida livre de doença das pacientes com câncer de mama [23,125–127,129], contudo os estudos divergiram quanto ao desenho e aos resultados apontados. Dois trabalhos foram estudos do tipo caso-controle [126,127], um foi estudo caso-caso com amostras de tumores de um biorrepositório [125], outro realizou um ensaio clínico com o uso de bevacizumab em pacientes com câncer de mama metastático [23], e Maae *et al.* (2012) conduziram um estudo de coorte de base hospitalar com tumores *HER2-like* [129].

Em relação aos SNPs *rs699947*, *rs833061* e *rs1570360*, não foi encontrado nenhum impacto significativo na sobrevida livre de doença quando os SNPs foram avaliados separadamente [23,125,126,129]. No entanto, Kidd *et al.* (2010) relatam que o haplótipo formado por -2578C (*rs699947*), -1154G (*rs1570360*) e 405G (*rs2010963*) aumentou o risco de recorrência do câncer de mama (HR = 1,58, IC 95%; 1,06-2,35;  $p = 0,03$ ) [125]. Com relação

ao rs2010963, entre os quatro estudos disponíveis [23,125,126,129], apenas Maae *et al.* (2012), que avaliaram tumores *HER2-like*, encontraram um aumento no risco de recorrência da doença para o genótipo 405CC variante (HR 2,96; IC 95% 1,33-6,59;  $p = 0,008$ ) [129]. No que diz respeito ao SNP rs3025039, Lu *et al.* (2005) e Maae *et al.* (2012) não encontraram associações com recorrência do câncer de mama [126,129], enquanto Absenger *et al.* (2013) e Etienne-Grimaldi *et al.* (2011) relataram resultados conflitantes [23,127]. Etienne-Grimaldi *et al.* (2011) relataram um efeito significativamente benéfico para o alelo 936T do SNP rs3025039 ( $p = 0,022$ ), com um aumento do tempo para a progressão da doença (11,5 meses) em relação ao genótipo 936CC (9,7 meses) quando estudou pacientes com câncer de mama metastático tratados com bevacizumab [23]. Contrariamente, Absenger *et al.* (2013) relataram um aumento do risco de recorrência do câncer de mama para o alelo 936T entre pacientes não-metastáticos (HR 1,880; IC 95% 1,020-3,465;  $p = 0,043$ ) [127].

Apesar da disparidade dos resultados, a avaliação combinada de estudos anteriores e o nosso não apontam uma contribuição prognóstica clara para os SNPs ou haplótipos do *VEGFA* na sobrevida livre de doença do câncer de mama. Outros estudos sobre a relevância funcional do SNPs do *VEGFA* no prognóstico do câncer de mama devem explorar os efeitos diferenciais sobre subtipos específicos, especialmente em tumores *HER2-like* ou Triplo-Negativo, que têm menos opções terapêuticas, e são mais propensos a se beneficiar de novas terapias, incluindo o bevacizumab [17,138,139] .

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados de associação entre SNPs ou haplótipos do gene *VEGFA* e características histopatológicas do câncer de mama sugerem que o haplótipo \*4 ou os genótipos variantes rs699947 têm o potencial de contribuir para melhor classificação de tumores reconhecidos atualmente como *HER2-like* ou Triplo-Negativo, identificando novos subgrupos cujo prognóstico ainda precisa ser estabelecido.

Em relação à sobrevida livre de doença, a avaliação combinada de estudos anteriores e dos nossos resultados não aponta uma contribuição prognóstica clara para os SNPs ou haplótipos do *VEGFA* em relação ao câncer de mama inicial.

Estudos futuros sobre a relevância prognóstica dos SNPs do *VEGFA* para o câncer de mama devem explorar os efeitos diferenciais sobre subtipos específicos, especialmente tumores dos tipos *HER2-like* ou Triplo-Negativo, que têm menos opções terapêuticas, e podem se beneficiar de novas terapias, tais como o bevacizumabe.

## REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization [Internet]. 2014 [cited 2013 Jul 4]. Available from: <http://www.who.int/en/>
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Jan;n/a–n/a.
3. International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Facts & Figures. 2ns edition. American Cancer Society. 2011.
4. Instituto Nacional do Câncer(INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil; 2014.
5. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar;61(2):69–90.
6. Hayes, Isaacs, Stearns. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2001;6(4):375–92.
7. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Feb;107(3):309–30.
8. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest*. 2011 Oct 3;121(10):3786–8.
9. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):790–800.
10. Chung CC, Chanock SJ. Current status of genome-wide association studies in cancer. *Hum Genet*. 2011 Jul;130(1):59–78.
11. Danova M, Delfanti S, Manzoni M, Mariucci S. Tissue and Soluble Biomarkers in Breast Cancer and Their Applications: Ready to Use? *JNCI Monogr*. 2011 Oct 1;2011(43):75–8.
12. Ruiz C, Tolnay M, Bubendorf L. Application of personalized medicine to solid tumors: opportunities and challenges. *Swiss Med Wkly* [Internet]. 2012 Jun 19 [cited 2014 Apr 4]; Available from: <http://doi.emh.ch/smw.2012.13587>
13. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
14. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1998;16:3121–8.
15. Linderholm B, Lindahl T, Holmberg L, Sigrid Klaar, Lennerstrand J, Henriksson R, *et al*. The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Correlates with Mutant p53 and Poor Prognosis in Human Breast Cancer. *Cancer Research*. 2001;61:2256–60.

16. Gasparini G, Bonoldi E, Gatti C, Vinante O, Toi M, Tominaga T, *et al.* Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Protein in Node-Negative Breast Carcinoma. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1997 Jan 15;89(2):139–47.
17. Brufsky AM, Hurvitz S, Perez E, Swamy R, Valero V, O'Neill V, *et al.* RIBBON-2: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Bevacizumab in Combination With Chemotherapy for Second-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Nov 10;29(32):4286–93.
18. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, *et al.* Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2007 Dec 27;357(26):2666–76.
19. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortes J, Pivot X, Tomczak P, *et al.* Phase III Study of Bevacizumab Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel for the First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 10;28(20):3239–47.
20. Gianni L, Romieu GH, Lichinitser M, Serrano SV, Mansutti M, Pivot X, *et al.* AVEREL: A Randomized Phase III Trial Evaluating Bevacizumab in Combination With Docetaxel and Trastuzumab As First-Line Therapy for HER2-Positive Locally Recurrent/Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2013 May 10;31(14):1719–25.
21. Thomssen C, Pierga J-Y, Pritchard KI, Biganzoli L, Cortes-Funes H, Petráková K, *et al.* First-Line Bevacizumab-Containing Therapy for Triple-Negative Breast Cancer: Analysis of 585 Patients Treated in the ATHENA Study. *Oncology.* 2012;82(4):218–27.
22. Schneider BP, Wang M, Radovich M, Sledge GW, Badve S, Thor A, *et al.* Association of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Genetic Polymorphisms With Outcome in a Trial of Paclitaxel Compared With Paclitaxel Plus Bevacizumab in Advanced Breast Cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol.* 2008 Oct 1;26(28):4672–8.
23. Etienne-Grimaldi M-C, Formento P, Degeorges A, Pierga J-Y, Delva R, Pivot X, *et al.* Prospective analysis of the impact of VEGF-A gene polymorphisms on the pharmacodynamics of bevacizumab-based therapy in metastatic breast cancer patients: VEGF-A gene polymorphisms and bevacizumab-based treatment. *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Jun;71(6):921–8.
24. Coltelli L, Allegrini G, Orlandi P, Giuntini N, Alì G, Fioravanti A, *et al.* Discordant somatic and germline VEGF-A genotype in a cancer patient resistant to paclitaxel/bevacizumab with chemosensitive hepatic metastasis. *Pharmacogenomics.* 2009 Aug;10(8):1225–9.
25. Sa-nguanraksa D, O-charoenrat P. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor A Polymorphisms in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2012 Nov 13;13(12):14845–64.
26. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol.* 1999 Dec;60(12):1245–9.

27. Watson CJ, Webb NJ., Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000 Aug;12(8):1232–5.
28. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, *et al.* A Common Polymorphism in the 5'-Untranslated Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2002 May 1;51(5):1635–9.
29. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Siviridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth*. 2004 Dec 1;46(3):293–8.
30. Stevens A, Soden J, Brenchley PE., Ralph S, Ray D. Haplotype Analysis of the Polymorphic Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Promoter. *Cancer Research*. 2003 de fevereiro de;63:812 – 816.
31. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, *et al.* A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2003 Sep 10;106(4):468–71.
32. International Agency for Research on Cancer (IARC). Breast cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012 [Internet]. 2012. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) >
33. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin*. 2011 Nov;61(6):408–18.
34. Simon S, Bines J, Barrios C, Nunes J, Gomes E, Pacheco F, *et al.* Clinical Characteristics and Outcome of Treatment of Brazilian Women with Breast Cancer Treated at Public and Private Institutions - The AMAZONE Project of the Brazilian Breast Cancer Study Group (GBECAM). *Cancer Res*. 2009 Dec 15;69(24 Supplement):3082–3082.
35. Thuler LCS, Mendonça GA. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras. *Rev Bras Ginecol E Obstetrícia*. 2005 Nov;27(11):656–60.
36. Robbins, Contran. *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 1616 p.
37. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012 Jul;1(4):533–57.
38. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Geral*. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
39. Macon MB, Fenton SE. Endocrine Disruptors and the Breast: Early Life Effects and Later Life Disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2013 Mar;18(1):43–61.
40. Henry-Tillman RS, Klimberg VS. In situ breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2000 Jun;1(3):199–209.

41. Di Saverio S, Gutierrez J, Avisar E. A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Oct;111(3):541–7.
42. Abreu, E, Koifman, S. Fatotes prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2002;48(1):113–31.
43. Nakamura R, Sakakibara M, Nagashima T, Sangai T, Arai M, Fujimori T, *et al.* Accumulation of regulatory T cells in sentinel lymph nodes is a prognostic predictor in patients with node-negative breast cancer. *Eur J Cancer.* 2009 Aug;45(12):2123–31.
44. Wong SY, Hynes RO. Tumor–lymphatic interactions in an activated stromal microenvironment. *J Cell Biochem.* 2007 Jul 1;101(4):840–50.
45. Zwaans BMM, Bielenberg DR. Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. *Microvasc Res.* 2007 Sep;74(2-3):145–58.
46. Lee AHS, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, *et al.* Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer.* 2006 Feb;42(3):357–62.
47. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, *et al.* Prognostic Value of Lymphangiogenesis and Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Cancer: *Ann Surg.* 2004 Aug;240(2):306–12.
48. Patey D., Scarff R. The position of histology in the prognosis of carcinoma os the breast. *The Lancet.* 1928 Apr;211(5460):801–4.
49. Elston CW, Ellis IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403–10.
50. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Apr;120(2):293–308.
51. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham prognostic index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992 Oct;22(3):207–19.
52. Berry DA, Cirrincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, *et al.* Estrogen-Receptor Status and Outcomes of Modern Chemotherapy for Patients With Node-Positive Breast Cancer. *JAMA.* 2006 Apr 12;295(14):1658.
53. Hess *et al.* Estrogen Receptors and distinct patterns of breast relapse. *Breast Cancer Research.* 2003 Mar;78(1):105–18.
54. Partridge AH. Nonadherence to Adjuvant Tamoxifen Therapy in Women With Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Feb 15;21(4):602–6.
55. Dinh P, Sotiriou C, Piccart MJ. The evolution of treatment strategies: Aiming at the target. *The Breast.* 2007 Dec;16:10–6.

56. Thakkar JP, Mehta DG. A Review of an Unfavorable Subset of Breast Cancer: Estrogen Receptor Positive Progesterone Receptor Negative. *The Oncologist*. 2011 Mar 1;16(3):276–85.
57. Allred DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol*. 2010 May;23:S52–S59.
58. Bardou V-J. Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction Over Estrogen Receptor Status Alone for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases. *J Clin Oncol*. 2003 May 15;21(10):1973–9.
59. Hoefnagel LDC, Moelans CB, Meijer SL, van Slooten H-J, Wesseling P, Wesseling J, *et al*. Prognostic value of estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases: Prognostic Impact of Receptor Conversion. *Cancer*. 2012 Oct 15;118(20):4929–35.
60. Stingl J. Estrogen and Progesterone in Normal Mammary Gland Development and in Cancer. *Horm Cancer*. 2011 Apr;2(2):85–90.
61. Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK, Horwitz KB. Progesterone-Independent Effects of Human Progesterone Receptors (PRs) in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: PR Isoform-Specific Gene Regulation and Tumor Biology. *Mol Endocrinol*. 2005 Mar;19(3):574–87.
62. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, Willman K, Tierens A, Skovlund E, *et al*. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*. 2002 Jan;196(1):17–25.
63. Yonemori K, Tsuta K, Shimizu C, Hatanaka Y, Hirakawa A, Ono M, *et al*. Immunohistochemical expression of HER1, HER3, and HER4 in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol*. 2010;n/a–n/a.
64. Ferrero- Pöus, M, Hacène, K, Bouchet, C, Le Doussal, V, Tubiana-Hulin, M, Spyrtos, F. Relationship between c-erbB-2 and Other Tumor Characteristics in Breast Cancer Prognosis. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(12):4745– 4754.
65. Ménard, S, Balsari, A, Casalini, P, Tagliabue, E, Campiglio, M, Bufalino, R, *et al*. HER-2-positive Breast Carcinomas As a Particular Subset with Peculiar Clinical Behaviors. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(2):520–5.
66. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, *et al*. HER2 and Responsiveness of Breast Cancer to Adjuvant Chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006 May 18;354(20):2103–11.
67. Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012 Oct;38(6):698–707.
68. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Viña JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev*. 2010 May;36(3):206–15.



69. Huober J, Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, *et al.* Effect of neoadjuvant anthracycline–taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Nov;124(1):133–40.
70. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Dec;7(12):683–92.
71. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, *et al.* Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1368–76.
72. Nielsen TO. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5367–74.
73. Union for International Cancer Control (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours. 2002.
74. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet.* 2005 May;365(9472):1687–717.
75. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn H-J, *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009 Aug 1;20(8):1319–29.
76. Bouchalova, K, Cizkova, M, Cwierka, K, Trojanec, R, Friedecky, D, Hajduch, M. Lapatinib in breast cancer - the predictive significance of HER2, PTEN and PIK3CA genes and Lapatinib plasma level assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154(4):281–8.
77. Sanpaolo P, Barbieri V, Pedicini P, Fusco V. Her-2 prognostic value in very early-stage breast cancer: a single-institution retrospective analysis. *Med Oncol.* 2012 Jun;29(2):459–65.
78. Guimarães, JRQ. Manual de Oncologia. São Paulo; 2008.
79. Jacquin J-P, Jones S, Magné N, Chapelle C, Ellis P, Janni W, *et al.* Docetaxel-containing adjuvant chemotherapy in patients with early stage breast cancer. Consistency of effect independent of nodal and biomarker status: a meta-analysis of 14 randomized clinical trials. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Aug;134(3):903–13.
80. Fisher, B, *et al.* Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 1997;2483–93.
81. Von Minckwitz G, Kummel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, *et al.* Intensified Neoadjuvant Chemotherapy in Early-Responding Breast Cancer: Phase III Randomized GeparTrio Study. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2008 Apr 16;100(8):552–62.

82. Hind, D, Ward, S, De Nigris, E, Simpson, E, Carroll, C, Wyld, L. Hormonal therapies for early breast cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2007;11(26):1–134.
83. Gilmer TM, Cable L, Alligood K, Rusnak D, Spehar G, Gallagher KT, *et al.* Impact of Common Epidermal Growth Factor Receptor and HER2 Variants on Receptor Activity and Inhibition by Lapatinib. *Cancer Res.* 2008 Jan 15;68(2):571–9.
84. Yonemori K, Tsuta K, Shimizu C, Hatanaka Y, Hirakawa A, Ono M, *et al.* Immunohistochemical expression of HER1, HER3, and HER4 in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol.* 2010;n/a–n/a.
85. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther.* 1999 Feb;21(2):309–18.
86. Saad ED, Maluf FC, Hoff PM. *Oncologia em Evidências – Epidemiologia, patologia e princípios terapêuticos dos principais tumores sólidos.* São Paulo: Dendrix edição e design Ltda; 2009.
87. Burstein, HJ, Kuter, I, Campos, SM, Gelman, RS, Tribou, L, Parker, LM, *et al.* Clinical Activity of Trastuzumab and Vinorelbine in Women With HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2001;19(10):2772–2730.
88. Chu, H, Wang, Y. Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors. *Ther Deliv.* 2012;3(6):693–714.
89. Matos, FR. Expressão imuno-histoquímica das proteínas MMP-9, VEGF e FvW em lesões centrais e periféricas de células gigantes. [Rio Grande do Norte]: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2010.
90. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research.* 2001;49:507–21.
91. Bauer SM. Angiogenesis, Vasculogenesis, and Induction of Healing in Chronic Wounds. *Vasc Endovascular Surg.* 2005 Jul 1;39(4):293–306.
92. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Apr;6(4):273–86.
93. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene.* 2003 Sep 29;22(42):6549–56.
94. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005 Apr;9(2):267–85.
95. Sweeney SM. Angiogenesis in Collagen I Requires 2 1 Ligation of a GFP\*GER Sequence and Possibly p38 MAPK Activation and Focal Adhesion Disassembly. *J Biol Chem.* 2003 Jun 4;278(33):30516–24.

96. Jakubowska A, Gronwald J, Menkiszak J, Górski B, Huzarski T, Byrski T, *et al.* The VEGF\_936\_C&T 3'UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer Lett.* 2008 Apr;262(1):71–6.
97. Kataoka N. Population-Based Case-Control Study of VEGF Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk among Chinese Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jun 1;15(6):1148–52.
98. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2010 May 1;86(2):236–42.
99. Bluff JE, Menakuru SR, Cross SS, Higham SE, Balasubramanian SP, Brown NJ, *et al.* Angiogenesis is associated with the onset of hyperplasia in human ductal breast disease. *Br J Cancer.* 2009 Aug 18;101(4):666–72.
100. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005 Oct;9(4):777–94.
101. Jin Q. Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms in Relation to Breast Cancer Development and Prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3647–53.
102. Hsueh K-C, Lin Y-J, Chang J-S, Wan L, Tsai Y-H, Tsai C-H, *et al.* Association of Vascular Endothelial Growth Factor C-634 G Polymorphism in Taiwanese Children With Kawasaki Disease. *Pediatr Cardiol.* 2008 Mar;29(2):292–6.
103. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park E-C, Lu N, *et al.* Tumor Induction of VEGF Promoter Activity in Stromal Cells. *Cell.* 1998 Sep;94(6):715–25.
104. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, *et al.* VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003 Aug;34(4):383–94.
105. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The Vascular Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991 Dec;5(12):1806–14.
106. Tischer, E, Mitchell, R, Hartman, T, Silva, M, Gospodarowicz, D, Fiddes, JC, *et al.* The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry.* 1991;266(18):11947–54.
107. Murukesh N, Dive C, Jayson GC. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. *Br J Cancer.* 2010 Jan 5;102(1):8–18.
108. Yancopoulos, GD, Davis, S, Gale, NW, Rudge, JS, Wiegand, SJ, Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407:242–8.
109. Chouaib S, Messai Y, Couve S, Escudier B, Hasmim M, Noman MZ. Hypoxia Promotes Tumor Growth in Linking Angiogenesis to Immune Escape. *Front Immunol.* 2012;3:1 – 10.

110. Watnick RS. The Role of the Tumor Microenvironment in Regulating Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Dec 1;2(12):1 – 21.
111. Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med*. 2013 Feb;273(2):114–27.
112. Fátima, Papa. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular ( VEGF): regulação transcricional e pós transcricional. *Revista de Biologia USP*. 2010;4:22–7.
113. Chaudary, Hill. Hypoxia and Metastasis in Breast Cancer. *Breast Disease*. 2006;26:55–64.
114. Kimbro KS. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Sep 1;13(3):739–49.
115. Kalow, W. Pharmacogenetics. Heredity and the response to drugs. London: Saunders Company; 1962.
116. REFARGEN. Rede Nacional de Farmacogenética. Marcos históricos na evolução da Farmacogenética [Internet]. 2013 [cited 2013 Nov 20]. Available from: [http://www.refargen.org.br/article.php3?id\\_article=59](http://www.refargen.org.br/article.php3?id_article=59)
117. Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J*. 2006 Jan;6(1):16–21.
118. Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett*. 2001 Mar;120(1-3):269–80.
119. Voet, D, Voet, G. Bioquímica. Porto Alegre: Artmed; 2013.
120. Pharoah PDP, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet*. 2002 May;31(1):33–6.
121. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, *et al*. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther*. 2009 Sep 1;8(9):2496–508.
122. Wang K, Liu L, Zhu Z-M, Shao J-H, Xin L. Five polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) and risk of breast cancer: A meta-analysis involving 16,703 individuals. *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):167–73.
123. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A Common 936 C/T Mutation in the Gene for Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels. *J Vasc Res*. 2000;37(6):443–8.
124. Perini J, Cardoso J, Berardo P, Vianna-Jorge R, Nasciutti L, Bellodi-Privato M, *et al*. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C> A, -460 T> C, -1154G> A, +405G > C and +936C> T) in endometriosis: a case–control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 2014;14(1):117.

125. Kidd LR, Brock GN, VanCleave TT, Benford ML, Lavender NA, Kruer TL, *et al.* Angiogenesis-associated sequence variants relative to breast cancer recurrence and survival. *Cancer Causes Control*. 2010 Oct;21(10):1545–57.
126. Lu H. Association of Genetic Polymorphisms in the VEGF Gene with Breast Cancer Survival. *Cancer Res*. 2005 Jun 15;65(12):5015–9.
127. Absenger G, Szkandera J, Stotz M, Pichler M, Winder T, Langsenlehner T, *et al.* A common and functional gene variant in the vascular endothelial growth factor a predicts clinical outcome in early-stage breast cancer: VEGF-A predicts outcome in breast cancer. *Mol Carcinog*. 2013 Nov;52(S1):96–102.
128. Langsenlehner U, Wolf G, Langsenlehner T, Gerger A, Hofmann G, Clar H, *et al.* Genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer risk. The Austrian “tumor of breast tissue: incidence, genetics, and environmental risk factors” study. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 May;109(2):297–304.
129. Maae E, Andersen RF, Steffensen KD, Jakobsen EH, Brandslund I, Sørensen FB, *et al.* Prognostic Impact of *VEGFA* Germline Polymorphisms in Patients with HER2-positive Primary Breast Cancer. *Anticancer Research*. 2012;32:3619 – 3628.
130. Jacobs E, Feigelson H, Bain E, Brady K, Rodriguez C, Stevens V, *et al.* Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in the Cancer Prevention Study II cohort. *Breast Cancer Research*. 2006;8(2):1–6.
131. Eroğlu A, Öztürk A, Çam R, Akar N. Vascular endothelial growth factor gene 936 C/T polymorphism in breast cancer patients. *Med Oncol*. 2008 Mar;25(1):54–5.
132. Schneider BP, Radovich M, Sledge GW, Robarge JD, Li L, Storniolo AM, *et al.* Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Sep;111(1):157–63.
133. Gerger A, Langsenlehner U, Renner W, Weitzer W, Eder T, Yazdani-Biuki B, *et al.* A multigenic approach to predict breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Jul 17;104(2):159–64.
134. Rodrigues P, Furriol J, Tormo E, Ballester S, Lluch A, Eroles P. The single-nucleotide polymorphisms +936 C/T VEGF and –710 C/T VEGFR1 are associated with breast cancer protection in a Spanish population. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jun;133(2):769–78.
135. Donegan, WL. Cancer of the breast. Staging methods, primary treatment options and end results. *Major Probl Clin Surg*. 1979;5:221–301.
136. Haploview version 4.2 [Internet]. Available from: <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/tutorial.php>
137. Balasubramanian SP, Cox A, Cross SS, Higham SE, Brown NJ, Reed MW. Influence of VEGF-A gene variation and protein levels in breast cancer susceptibility and severity. *Int J Cancer*. 2007 Sep 1;121(5):1009–16.

138. Kristensen T, Knutsson M, Wehland M, Laursen B, Grimm D, Warnke E, *et al.* Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec 11;15(12):23024–41.
139. Fakhrejahani E, Toi M. Antiangiogenesis Therapy for Breast Cancer: An Update and Perspectives from Clinical Trials. *Jpn J Clin Oncol.* 2014 Mar 1;44(3):197–207.

## ANEXO I

---

### Classificação clínica e histopatológica do câncer de mama pelo sistema TNM

---

#### T - tamanho do tumor

- Tx - O tumor primário não pode ser avaliado
- T0 - Sem evidência de tumor primário
- Tis - Carcinoma *in situ*: carcinoma intraductal ou carcinoma lobular *in situ* ou doença de Paget
- T1 - Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
  - T1a - tumor com 0,5 cm ou menos em sua maior dimensão
  - T1b - tumor com mais de 0,5 cm e até 1 cm em sua maior dimensão
  - T1c - tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
- T2 - Tumor com mais de 2 cm e até 5 cm em sua maior dimensão
- T3 - Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
- T4 - Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácica ou à pele
  - T4a - extensão para parede torácica
  - T4b - edema (incluindo peau d'orange) ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites, confinados à mesma mama
  - T4c - T4a e T4b associados
  - T4d - carcinoma inflamatório

#### N - linfonodos regionais

- Nx - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
- cN0 - Ausência de metástases nos linfonodos regionais
- cN1 - Crescimento tumoral ipsilateral, sem acometimento dos linfonodos axilares
- cN2 - Crescimento tumoral ipsilateral, acometendo linfonodos axilares ou internos
- cN3 - Acometimento linfonodos supraclavicular ou ambos axilares ipsilateral e internos
- pN0 - Sem acometimento dos linfonodos
- pN1 - Acometimento de 1 a 3 linfonodos
- pN1mi - Tumor no linfonodo com tamanho  $\leq 2,0$
- pN2 - Acometimento de 4 a 9 linfonodos
- pN3 - Acometimento  $\geq 10$  linfonodos

#### M - metástases a distância

- Mx - A presença de metástases a distância não pode ser avaliada
- M0 - Ausência de metástases a distância
- M1 - Metástases a distância (incluindo as metástases nos linfonodos supraclaviculares)

---

A categoria N possui duas classificações. A primeira é a clínica, representado pela letra c e a segunda é a classificação patológica, representado pela letra p

Fonte: Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama, Sociedade Brasileira de Mastologia,

## ANEXO II

| Estadiamento do câncer de mama                 |            |            |    |
|------------------------------------------------|------------|------------|----|
| 0                                              | Tis        | N0         | M0 |
| IA                                             | T1         | N0         | M0 |
| IB                                             | T0         | N1mi       | M0 |
|                                                | T1         | N1mi       | M0 |
| IIA                                            | T0         | N1         | M0 |
|                                                | T1         | N1         | M0 |
|                                                | T2         | N0         | M0 |
| IIB                                            | T2         | N1         | M0 |
|                                                | T3         | N0         | M0 |
| IIIA                                           | T0         | N2         | M0 |
|                                                | T1         | N2         | M0 |
|                                                | T2         | N2         | M0 |
|                                                | T3         | N1         | M0 |
|                                                | T3         | N2         | M0 |
| IIIB                                           | T4         | N0         | M0 |
|                                                | T4         | N1         | M0 |
|                                                | T4         | N2         | M0 |
| IIIC                                           | Qualquer T | N3         | M0 |
| IV                                             | Qualquer T | Qualquer N | M1 |
| Fonte: NCCN Guidelines for Pacientes. V.2.2011 |            |            |    |



## ANEXO III



Memo 33/09-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2009.

A(o): Dr(a) Rosanne Vianna Jorge  
Pesquisador(a) Principal

**Registro CEP nº 129/08** (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)  
**Título do Estudo:** Polimorfismo genético e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer de mama

Prezada Pesquisadora,

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprovou** após re-análise, o estudo intitulado: **Polimorfismo genético e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer mama**, bem como seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 2)**, em 2 de fevereiro de 2009.

**Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo. As datas previstas são: Agosto/2009 e Fevereiro/2010.**

A documentação pertinente será encaminhada a CONEP com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

C/c – Dr. Guilherme Kurtz – Chefe da Divisão de Farmacologia/CPQ  
Dra. Marisa Breitenbach – Coordenadora Pesquisa/CPQ  
Dr. César Augusto Lasmar – Diretor do HCIII

ANEXO IV

Saúde  
Ministério da Saúde

Plataforma  
Brasil

 principal  central de suporte  sair

Público

Pesquisador

Alterar Meus Dados

Hayra de Andrade Vieira Monteiro - Pesquisador | V2.21

Projeto de Pesquisa:

| Tipo | Número CAAE          | Título da Pesquisa                                                                              | Pesquisador Responsável          | Versão | Última Modificação | Situação | Gestão da Pesquisa                                                                                                                                                                                                                                          |
|------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------|--------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| P    | 36047514.5.0000.5240 | Polimorfismos do gene VEGFA: avaliação de impacto sobre a evolução clínica do câncer de ma(...) | Hayra de Andrade Vieira Monteiro | 2      | 27/11/2014         | Aprovado |    |