

**Universidade de São Paulo**

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Daniel Guimarães Tiezzi

**Quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama: valor da expressão das proteínas Her2, RE, RP, p21 e p53 como indicadores de resposta e prognóstico**

Ribeirão Preto  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL GUIMARÃES TIEZZI

**Quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama: valor da expressão das proteínas Her2, RE, RP, p21 e p53 como indicadores de resposta e prognóstico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Tocoginecologia  
Orientador: Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade

Ribeirão Preto  
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### Catálogo na Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**Tiezzi, Daniel Guimarães**

Quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama: valor da expressão das proteínas Her2, RE, RP, p21 e p53 como indicadores de resposta e prognóstico / Daniel Guimarães Tiezzi; orientador Jurandyr Moreira de Andrade – Ribeirão Preto, 2007.

96 f.:11 fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Área de Concentração: Tocoginecologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Câncer de mama - Tratamento. 2. Quimioterapia neoadjuvante - Efeitos. 3. Imunohistoquímica – Fatores prognósticos. 4. Ciclo celular

I. Título

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Guimarães Tiezzi

Quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama: valor da expressão das proteínas Her2, RE, RP, p21 e p53 como indicadores de resposta e prognóstico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Tocoginecologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

\_\_\_\_\_

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

## DEDICATÓRIA

A Maria Fernanda, Isabela, Maria Antônia e José Armando, minha esposa e queridos filhos, com amor, admiração e gratidão pela compreensão nas longas horas de ausência, carinho quando presente e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Roberto e Lígia pelo apoio constante.

Ao Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade, orientador e amigo.

## AGRADECIMENTOS

Ao amigo e co-orientador Prof. Alfredo Ribeiro Silva, e à meu irmão Dr. Marcelo Guimarães Tiezzi, pelo auxílio com a imunohistoquímica.

Aos médicos assistentes Dr. Heitor Ricardo C. Marana, Dr. Joaquim M. Sarmiento e Dr. Fábio E. Zola e aos professores Dr. Hélio H. Carrara, Dr. Francisco J. C. dos Reis e Dr. Paulo M. de P. Philbert por compartilharem a difícil tarefa de nosso dia a dia no tratamento de pacientes com câncer de mama.

À Ilza R. Mazzocato, além de excelente secretária junto ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, grande amiga que muito me auxiliou nos trâmites burocráticos em toda minha formação dentro da pós-graduação.

Ao Prof. Antônio Alberto Nogueira, coordenador do Serviço de Pós-graduação de nosso Departamento, por excelente atenção com todos os alunos.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP e ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP pela oportunidade da realização de minha pós-graduação.

Ao amigo Dr. Dauto de Almeida Campos pelas inúmeras horas de discussão sobre os mecanismos de controle do ciclo celular e à meu tio Dr. Edgar Guariento Guimarães por sempre estimular meus estudos.

## EPIGRAFE

“to have an eye as quick as a flashing sunbeam and a hand as light as floating perfume”

Joseph Pancoast em *Treatise on Operative Surgery*, 1844

## RESUMO

**TIEZZI, D. G. Quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama: valor da expressão das proteínas Her2, RE, RP, p21 e p53 como indicadores de resposta e prognóstico.** 2007 80f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O estudo foi realizado para avaliar a importância de marcadores biológicos como predição de resposta à quimioterapia neoadjuvante e prognóstico em pacientes com câncer de mama estágio clínico II e III. Pacientes e métodos: sessenta pacientes foram submetidas a quimioterapia pré-operatória com docetaxel (75mg /m<sup>2</sup>) em combinação com epirrubicina (50 mg/m<sup>2</sup>) em infusão endovenosa no dia 1 a cada 3 semanas após terem sido submetidas a biópsia incisional. Elas receberam quimioterapia adjuvante com CMF ou FEC de acordo com o estado axilar avaliada após a cirurgia definitiva. A resposta clínica e patológica foi avaliada após o tratamento neoadjuvante. Avaliamos a taxa de resposta ao tratamento neoadjuvante e a influência dos parâmetros clínicos e patológicos (RE, RP, p51, p21 e HER-2) na taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante bem como na sobrevida livre de doença e sobrevida global. A média da idade das pacientes foi 50,5 anos e tempo de seguimento médio de 48 meses após o diagnóstico. Resultados: a taxa de resposta clínica objetiva foi de 76,6% com 5% de resposta patológica completa. Os parâmetros clínicos e histopatológicos não foram capazes de prever a resposta clínica. Em análise multivariada, apenas a superexpressão da proteína HER-2 foi associada com uma redução significativa nas taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global (p= 0,0007 e p= 0,003, respectivamente). Conclusão: A expressão das proteínas p53, p21, HER-2, RE e RP pela imunohistoquímica no carcinoma de mama foi positiva em 28,3%, 33,3%, 18,3%, 75% e 53,3%, respectivamente. A combinação de docetaxel e epirrubicina neoadjuvante no câncer de mama reduz de forma significativa a expressão das proteínas p53 e p21 e não altera a expressão da proteína HER-2.

Os fenótipos baseados na expressão proteica não estão relacionados com a predição de resposta à quimioterapia neoadjuvante. A resposta clínica está inversamente correlacionada com o risco de morte pela doença em análise univariada e a superexpressão da proteína HER-2 é o principal fator prognóstico em pacientes com câncer de mama estágio clínico II e III submetidas à quimioterapia neoadjuvante com a combinação de docetaxel e epirrubicina.

## ABSTRACT

**TIEZZI, D. G. Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: the role of HER-2, ER, PR, p21 and p53 protein expression as predictive factors of response and prognosis.** 2007 80f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

This study was designed to evaluate the importance of biological markers to predict response to neoadjuvant chemotherapy and the overall survival in stage II and III breast cancer patients. Patients and methods: sixty patients received preoperative docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>) in combination with epirubicin (50 mg/m<sup>2</sup>) in i.v. infusion in D1 every 3 weeks after incisional biopsy. They received adjuvant chemotherapy with CMF or FEC, according attaining the axillary status following definitive breast surgery. Clinical and pathologic response rates were measured after preoperative therapy. We evaluated the response rate to neoadjuvant chemotherapy and the prognostic significance of clinicopathological and immunohistochemical parameters (ER, PR, p51, p21 and HER-2 proteins expression). The median patient age was 50.5 years with a median follow up of time 48 months from after the time of diagnosis. Results: Preoperative treatment achieved clinical response in 76.6% of patients and complete pathologic response in 5%. The clinical, pathological and immunohistochemical parameters were not able to predict response to therapy and, only HER2 protein overexpression were was associated with a decrease in disease free and overall survivals (P= 0.0007 and P= 0.003) in as shown by multivariate analysis. Conclusions: The immunohistochemical expression of p53, p21, HER-2, RE e RP proteins was positive in 28.3%, 33.3%, 18.3%, 75% e 53.3%, respectively. Docetaxel and epirubicin combination in neoadjuvant setting decreases the expression of p53 e p21 proteins and do not change the HER-2 protein expression. Immunohistochemical phenotypes were not able to predict

response to neoadjuvant chemotherapy. Clinical response is inversely correlated with a risk of death in patients submitted to neoadjuvant chemotherapy and HER2 overexpression is the major prognostic factor in stage II and III breast cancer patients treated with a neoadjuvant docetaxel and epirubicin combination.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Mecanismo de regulação do do complexo CDK-ciclina: associação com inibidores CKIs, fosforilação inibidora da treonina 14 e tirosina 15 e fosforilação ativadora da treonina 160/161\_\_\_\_\_pag. 21.

Figura 1.2 - Proteínas CKIs (inibidores que controlam a atividade de complexos CDK-ciclina). A família INK4 (p15, P16, p18 e p19) inibe a ciclina CDK4/6-ciclina D e a família CIP/KIP (p21, p27 e p57) inibe vários complexos de CDKs-ciclina\_\_\_\_\_pag. 22.

Figura 1.3 - Via de sinalização do ErbB2 por meio da formação de heterodímeros com o ErbB3 e ErbB4 e ativação do ciclo celular\_\_\_\_\_pag. 24.

Figura 3.5.1 - Organograma de tratamento de 60 pacientes com câncer de mama estágio clínico (EC) II e III\_\_\_\_\_pag. 39.

Figura 3.7.3.1 - Expressão positiva para proteína p53 em carcinoma ductal invasivo da mama. A coloração nuclear de tom marrom é observada em praticamente todas as células neoplásicas (microscopia de luz; 400x)\_\_\_\_\_pag. 43.

Figura 3.7.3.2 - Expressão positiva para receptor de estrogênio (RE) em carcinoma ductal invasivo da mama. Notar a coloração nuclear de tom marrom em aproximadamente 80% de todas as células neoplásicas (microscopia de luz; 200x)\_\_\_\_\_pag. 44.

Figura 3.7.3.3 - Expressão positiva para receptor de progesterona (RP) em carcinoma ductal invasivo da mama. Notar a coloração nuclear de tom marrom em cerca de 90% de todas as células neoplásicas (microscopia de luz; 400x)\_\_\_\_\_pag. 45.

Figura 3.7.4.1 – Expressão imunohistoquímica para proteína p21. A coloração nuclear em tom de cinza pode ser observada em mais de 5% de todas as células neoplásicas. (Microscopia de luz; 400x)\_\_\_\_\_pag. 47.

Figura 3.7.5 Expressão da proteína HER-2 avaliada pela imunohistoquímica em carcinoma ductal invasivo da mama. Note as diferentes intensidades de marcação de membrana

(microscopia de luz; 400x). Classificação baseada no protocolo HercepTest (Jacobs, Gown *et al.*, 1999b; a; Bilous, Dowsett *et al.*, 2003). (a. Escore 0 = expressão negativa; b. Escore +1 = expressão negativa; c. Escore +2 = expressão positiva; d. Escore +3 = expressão positiva)\_\_\_\_\_pag. 49.

Figura 4.6.1. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença em sessenta pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão da oncoproteína HER-2\_\_\_\_\_pag. 63.

Figura 4.6.2. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em sessenta pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão da oncoproteína HER-2\_\_\_\_\_pag. 64.

## SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Objetivos	26
3. Materiais e métodos	28
3.1. Seleção de pacientes	29
3.2. Exames iniciais e complementares	32
3.3. Tratamento neoadjuvante	32
3.4. Tratamento Cirúrgico	37
3.5. Tratamento adjuvante	37
3.5.1. Radioterapia	37
3.5.2. Quimioterapia	38
3.5.3. Hormonioterapia	38
3.6. Seguimento clínico	39
3.7. Estudo histopatológico	40
3.7.1. Processamento do material	40
3.7.2. Imunohistoquímica para RE, RP e proteínas p53, p21 e HER-2	40
3.7.3. Análise da expressão de RE, RP e proteína p53	41
3.7.4. Análise da expressão da proteína p21	46
3.7.5. Análise da expressão da proteína HER-2	48
3.8. Análise estatística	50
4. Resultados	51
4.1. Expressão das proteínas p53, p21, HER-2 e receptores hormonais	52
4.2. Resposta clínica e patológica ao tratamento neoadjuvante e tratamento cirúrgico	54
4.3. Características clínicas e histopatológicas e suas relações com a resposta clínica	56

4.4. Expressão das proteínas p53,p21 e HER-2 antes e após a quimioterapia neoadjuvante	58
4.5. Expressão da proteína p21 e sua relação com as proteínas p53 e HER-2	60
4.6. Sobrevida livre de doença e sobrevida global	61
5. Discussão	65
6. Conclusões	70
7. Anexos	72
8. Referências bibliográficas	77
9. Apêndice	84

## **1. Introdução**

A quimioterapia neoadjuvante ou primária tem sido utilizada, na atualidade, como parte do tratamento multidisciplinar do câncer de mama com o objetivo de reduzir o volume da doença local e propiciar cirurgias menos agressivas. Sob este ponto de vista, duas seriam as indicações atuais de sua utilização: proporcionar operabilidade para tumores considerados inoperáveis e propiciar cirurgia conservadora em pacientes com tumores operáveis para as quais, em virtude do volume tumoral, a mastectomia estaria indicada (Beriwal, Schwartz *et al.*, 2006). Dentro deste contexto, a avaliação clínica e patológica da resposta ao tratamento neoadjuvante torna-se um modelo *in vivo* ideal para testar a sensibilidade do tumor ao esquema quimioterápico empregado.

As taxas de resposta objetiva com quimioterapia neoadjuvante variam de 60% a 80% e cerca de 3% a 30% das pacientes apresentam resposta patológica completa, definida pela ausência de neoplasia invasora residual (Rajan, Poniecka *et al.*, 2004). Embora nenhum grande estudo clínico com câncer de mama operável tenha demonstrado benefício de sobrevida para pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante (Sachelarie, Grossbard *et al.*, 2006), é sabido que pacientes que apresentam resposta objetiva, em especial resposta patológica completa, apresentam substancial ganho de sobrevida quando comparadas com pacientes sem resposta ao tratamento neoadjuvante (Fisher, Bryant *et al.*, 1998; Amat, Abrial *et al.*, 2005; Sachelarie, Grossbard *et al.*, 2006). Assim, esse grupo de pacientes fornece recursos para a investigação de fatores que possam ser usados como indicadores de sobrevida (fatores prognósticos) ou indicadores de resposta à quimioterapia (fatores preditivos).

Os tumores da mama são anatomicamente acessíveis e os métodos de amostragem tecidual seriada são minimamente invasivos. Este é um aspecto favorável ao estudo do efeito *in vivo* da quimioterapia nos processos biológicos, e assim, podemos avaliar a relação entre as alterações biológicas e a resposta à quimioterapia. Como as alterações na proliferação e morte

celular são necessárias para a dinâmica do crescimento tumoral (Compagni e Christofori, 2000), o estudo dos mecanismos de controle bem como a influência de agentes citotóxicos nesses processos biológicos é de grande interesse.

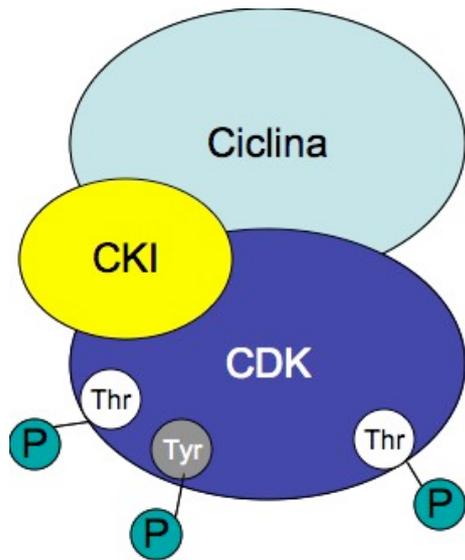
A maioria das pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante permanece com tumor residual no momento da cirurgia definitiva. Esta observação sugere que a resistência inata ou adquirida aos agentes citotóxicos é bastante comum entre as neoplasias epiteliais malignas da mama (Sachelarie, Grossbard *et al.*, 2006). A multiplicação celular em tecidos normais é controlada por um processo especializado modulado pela expressão de diversos genes de controle de ciclo celular, incluindo genes supressores de tumor, como o gene p53 (Kastan, 2007), genes de receptores de membrana da família dos EGF-R, como o HER-2 (Toschi e Cappuzzo, 2007), os genes das ciclinas (Fischer e Gianella-Borradori, 2005), bem como os que regulam a apoptose (Pommier, Sordet *et al.*, 2004). Na maioria dos tumores humanos, incluindo o carcinoma de mama, alterações da expressão desses genes estão altamente relacionadas tanto com o descontrole da proliferação celular bem como com a resistência ao tratamento sistêmico (Rickardson, Fryknas *et al.*, 2005).

O gene p53 expressa uma fosfoproteína nuclear que desempenha um papel importante no controle da transcrição, do ciclo e da apoptose celular. Seu gene foi clonado e identificado no cromossomo 17p-13 e classificado como gene supressor de tumor. Foi descoberto em 1979 por causa de sua ligação a uma proteína transformadora do vírus SV40, o antígeno T longo. A ligação a esse antígeno levava a uma estabilização desta proteína e, em contraste, a sua forma mutante não interagiu com o antígeno T (Lane e Crawford, 1979).

Estudos demonstram que estímulos hostis, tal como a hipóxia tecidual, levam ao acúmulo da proteína p53. O acúmulo desta proteína no núcleo está relacionada com a inibição do ciclo celular por inativação do mecanismo das ciclinas CDK, indução da apoptose celular, e com a senescência celular (Maccallum, Hupp *et al.*, 1996; Serrano, Lin *et al.*, 1997; Meek, 1998).

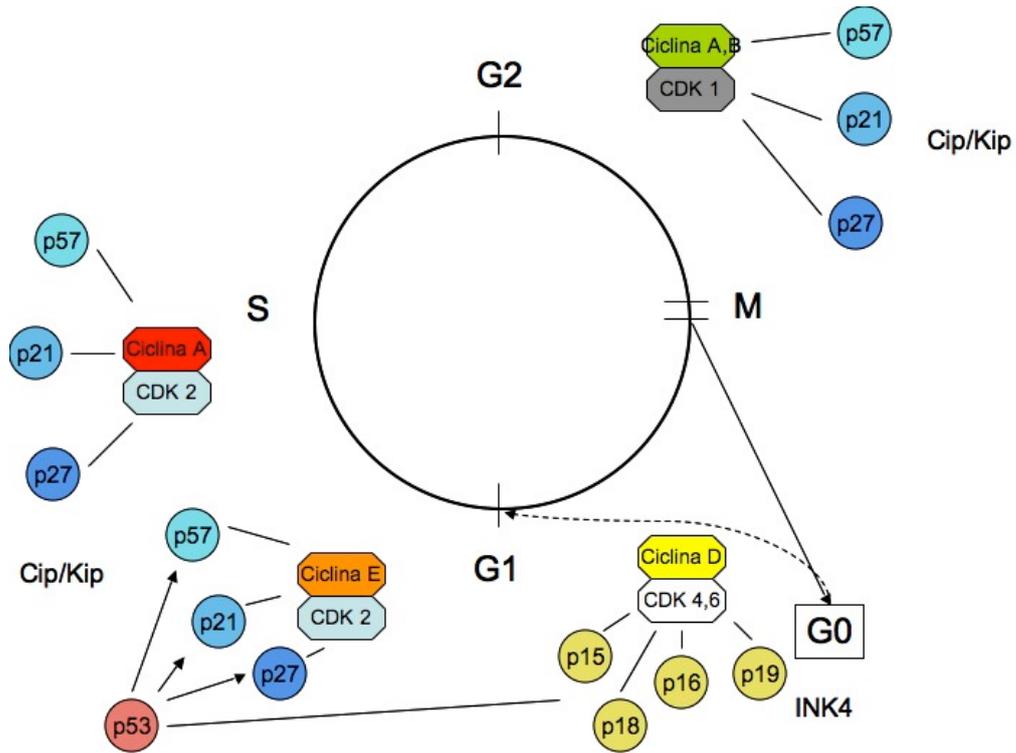
Um estado de expressão deficiente da proteína p53 está relacionado à proliferação celular independente dos fatores de crescimento séricos. Este estado deficiente está relacionado com uma forma mutante desta proteína a qual neutraliza a ação de sua forma não mutada (wild type). A perda do alelo 17p é comum para uma série de tumores malignos humanos, incluindo o câncer de mama, câncer de cólon, astrocitomas e carcinoma de pulmão. Foi demonstrado, posteriormente, que a mutação do gene p53 ocorria em mais da metade das neoplasias malignas primárias e, esta forma mutante altamente instável, acarreta um aumento de sua expressão (Nigro, Baker *et al.*, 1989).

Alterações na expressão de proteínas após a quimioterapia tem sido descritas. Em estudo prévio, observamos redução da expressão da proteína p53 em carcinomas de mama de pacientes submetidas a dois diferentes esquemas de quimioterapia neoadjuvante (Tiezzi, De Andrade *et al.*, 2006). Embora a redução da proteína p53 tenha sido relacionada com o aumento do índice apoptótico sugerindo que este mecanismo estivesse relacionado com a sensibilidade do tumor à droga, a correlação entre o padrão de expressão da proteína p53 e a resposta clínica à quimioterapia de indução não foi observada. Tal fato sugere que outros mecanismos de controle celular possam estar relacionados com os mecanismos de resistência a drogas citotóxicas. A ativação via p53 do mecanismo de controle do ciclo celular mediado pelas ciclinas-CDKs não se faz de forma direta. Além dos mecanismos de fosforilação e desfosforilação, a atividade CDKs é controlada pela sua ligação com proteínas inibidoras das ciclinas-CDKs conhecidas por CKIs (Figura 1.1).



**Figura 1.1 – Mecanismo de regulação do complexo CDK-ciclina: associação com inibidores CKIs, fosforilação inibidora da treonina 14 e tirosina 15 e fosforilação ativadora da treonina 160/161.**

Duas grandes classes de CKIs são conhecidas e representadas pela família CIP/KIP que incluem as proteínas com domínio N terminal inibidor (p21, p27 e p57) e pela família INK4 (p15, p16, p18 e p19) formadas por proteínas que interferem na ligação das ciclinas D com as CDKs (Jones e Kazlauskas, 2000; Kapranos, Stathopoulos *et al.*, 2001; Ortega, Malumbres *et al.*, 2002; Dai e Grant, 2003). A Figura 1.2 mostra as proteínas intermediárias no controle do ciclo celular mediado pelo gene p53.

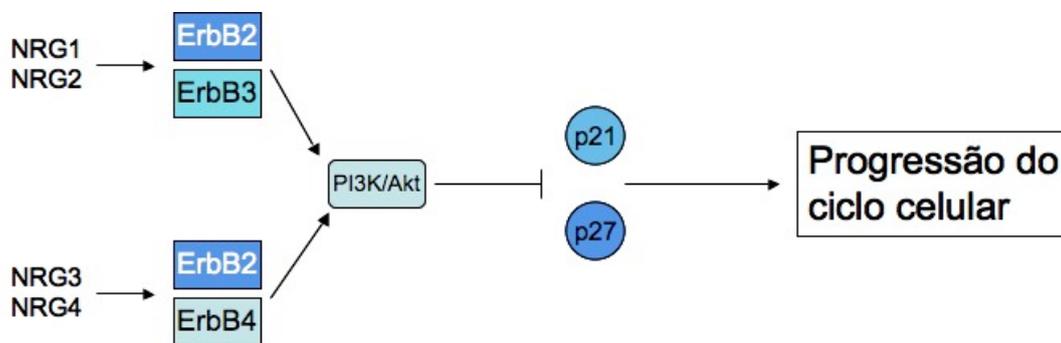


**Figura 1.2 – Proteínas CKIs (inibidores que controlam a atividade de complexos CDK-ciclina). A família INK4 (p15, p16, p18 e p19) inibe a ciclina CDK4/6-ciclina D e a família CIP/KIP (p21, p27 e p57) inibe vários complexos de CDKs-ciclinas.**

A proteína p21 (também denominada p21waf/cip1 ou SDI1) é uma proteína nuclear com importante papel na regulação do ciclo celular (El-Deiry, Tokino *et al.*, 1993). Sua ação é descrita como um inibidor de ciclinas CDKs (Xiong, Hannon *et al.*, 1993). Em resposta aos agentes citotóxicos, a proteína p53 *wild type* induz a transcrição e tradução de proteína p21 a qual é capaz de bloquear a progressão do ciclo celular na transição G1/S. Este processo é crucial para o reparo do DNA ou, alternativamente, para a indução da apoptose (El-Deiry, Harper *et al.*, 1994; El-Deiry, Tokino *et al.*, 1995). Além disto, a proteína p21waf está envolvida na parada do ciclo celular na fase G2 através da inibição do oncogene c-myc (Mitchell e El-Deiry, 1999). Sua expressão pode ser regulada através da via PI-3K/Akt e, a superexpressão da proteína HER-2 em células do câncer de mama estimula a transcrição de RNA para p21WAF1/CIP1 (Yu, Jing *et al.*, 1998; Mitsuuchi, Johnson *et al.*, 2000; Dupont, Karas *et al.*, 2003). Deste modo, a proteína p21 está envolvida em numerosas funções regulatórias de funções celulares vitais e, em sua forma nativa, possui propriedades supressoras de tumor. No entanto, o papel da expressão da proteína p21 como fator preditivo de resposta e sua relação com a expressão da proteína p53 em vigência de quimioterapia neoadjuvante ainda é desconhecido.

A proteína Her2/neu pertence a família de quatro receptores tirosina quinase transmembrana denominada *epidermal growth factor receptor* (EGFR) relacionados ao controle do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (Yarden e Sliwkowski, 2001; Gschwind, Fischer *et al.*, 2004). No epitélio normal, a localização basolateral dos EGFRs facilita a sinalização entre o mesênquima e o epitélio no controle do ciclo celular (Borg, Marchetto *et al.*, 2000). O mesênquima funciona como um compartimento para vários ligantes de EGFRs como as neuregulinas (NRGs) que se ligam aos receptores ErbB3, ErbB4 e ErbB2 (HER-2). Embora o HER-2 seja a oncoproteína mais potente dentro da família dos EGFRs, nenhum ligante com alta afinidade a seu homodímero (ErbB2 – ErbB2) foi

reconhecido (Yarden e Sliwkowski, 2001). A superexpressão da proteína HER-2, a amplificação do gene HER-2 ou ambos, estão presentes entre 15 a 25% dos carcinomas de mama e, estão associadas com comportamento agressivo do tumor (Slamon, Clark *et al.*, 1987; Slamon, Godolphin *et al.*, 1989). A amplificação do HER-2 leva a um aumento da formação de heterodímeros (ErbB2 – ErbB3 e ErbB2 – ErbB4) aumentando a especificidade do ligante. Talvez, o maior exemplo da capacidade do heterodímero ErbB2 de controlar a sinalização mitogênica seja decorrente da formação do heterodímero ErbB2-ErbB3. Embora nem o ErbB2 nem o ErbB3 sozinhos podem ser ativados pelo ligante, o heterodímero composto por eles é o complexo de receptor com maior potência de transformação celular (Alimandi, Romano *et al.*, 1995; Wallasch, Weiss *et al.*, 1995) e de indução de mitose (Pinkas-Kramarski, Soussan *et al.*, 1996). A Figura 1.3 resume a via de sinalização do HER-2 e seus heterodímeros.



**Figura 1.3 – Via de sinalização do ErbB2 por meio da formação de heterodímeros com o ErbB3 e ErbB4 e ativação do ciclo celular.**

Embora o papel da superexpressão da proteína HER-2 no prognóstico do câncer de mama esteja bem estabelecido (Ravdin e Chamness, 1995; Press, Bernstein *et al.*, 1997), estudos recentes têm demonstrado resultados conflitantes a respeito de seu papel como fator preditivo de resposta à quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama localmente avançado (Zhang, Yang *et al.*, 2003; Learn, Yeh *et al.*, 2005; Fernandez-Sanchez, Gamboa-Dominguez *et al.*, 2006).

A expressão de receptores hormonais, em especial o receptor alfa de estrogênio, é reconhecidamente um fator de predição de resposta ao tratamento hormonal do câncer de mama (Ciocca, Gago *et al.*, 2006). Por outro lado, não foram identificados critérios clínicos ou patológicos capazes de prever a resposta à quimioterapia neoadjuvante. Tumores de mesmo tipo histológico, mesmo grau de diferenciação e mesmo estadiamento clínico apresentam comportamentos biológicos distintos (Hennessy, Gonzalez-Angulo *et al.*, 2005). Esta observação nos permite supor que tumores morfologicamente semelhantes possuem diferentes alterações genéticas que determinam a resistência a droga. A identificação de alterações moleculares específicas que podem estar associadas com a predição de resposta à quimioterapia permite selecionar pacientes que mais se beneficiarão do tratamento neoadjuvante evitando efeitos indesejáveis da terapia citotóxica em pacientes com baixa probabilidade de resposta e otimizando o tratamento através da individualização terapêutica conforme o perfil molecular de cada neoplasia.

## **2. Objetivos**

- Verificar a expressão das proteínas p53, p21, HER-2 e receptores hormonais no carcinoma da mama estadios clínicos II e III;
  
- Estudar o papel destas proteínas como indicadores de resposta à quimioterapia neoadjuvante e avaliar sua importância como fator prognóstico em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante;
  
- Avaliar a influência da quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina sobre a expressão imunohistoquímica das proteínas p53, p21 e HER-2.

### **3. Materiais e Métodos**

### 3.1 Seleção de Pacientes

No período de Fevereiro de 2000 a Dezembro de 2002 foram incluídas consecutivamente 60 pacientes com diagnóstico histopatológico de Carcinoma de Mama nos estádios clínicos II e III com idade inferior a 70 anos e selecionadas para tratamento primário com quimioterapia (EZTNM for the AJCC cancer staging manual, 2003) no Setor de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Foram incluídas, também, pacientes com tumores de maior diâmetro entre três e 5 cm e axila clinicamente negativa (T2N0) correspondente ao estágio clínico IIa e, que apresentavam relação volume da mama/volume tumor imprópria para o tratamento cirúrgico conservador primário. Todas as pacientes incluídas no estudo tinham indicação de quimioterapia neoadjuvante: proporcionar cirurgia conservadora em casos primariamente operáveis ou proporcionar operabilidade em lesões primariamente inoperáveis. Nenhuma paciente era elegível para cirurgia conservadora primária. Ambas as indicações são previstas no protocolo de tratamento do carcinoma da mama do Setor de Mastologia e Oncologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A mediana do número de ciclos de quimioterapia que as pacientes receberam foi três (2 – 5). A média de idade das pacientes foi de 50 anos (29 – 67) sendo que 18 pacientes (30%) tinham idade inferior a 46 anos. Segundo o estadiamento clínico (EC), as pacientes foram classificadas como EC IIa: 12 pacientes (20%); EC IIb: 19 pacientes (31,7%); EC IIIa: oito pacientes (13,3%); EC IIIb: 18 pacientes (30%); e EC IIIc: três pacientes (5%). Nenhuma paciente apresentava diagnóstico clínico ou radiológico de doença metastática no dia da

inclusão no estudo. A presença de carcinoma inflamatório primário da mama foi considerado fator de exclusão.

Segundo a classificação histológica, a grande maioria dos tumores (81,7%), foi classificada como carcinoma ductal invasivo. O carcinoma lobular e medular invasivo foi encontrado em quatro pacientes (6,7) e as outras três pacientes apresentaram tumores de origem epitelial com outras classificações histológicas (5%). O grau de diferenciação histológica foi reportado em 59 neoplasias. O grau histológico I (bem diferenciado) foi encontrado em 16 tumores (26,7%), o grau II (moderadamente diferenciado) foi encontrado em 32 tumores (53,3%) e as neoplasias indiferenciadas (grau III) foram classificadas em 11 pacientes (18,4%). A Tabela 3.1.1 resume as características das pacientes.

**Tabela 3.1.1 Características clínicas e histopatológicas de 60 pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.**

<b>Características das Pacientes</b>	<b>n= 60 (variação)</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>		
Mediana	50 (29 - 67)	
≤45 anos	18	30
>45 anos	42	70
<b>Ciclos de quimioterapia (mediana)</b>		
	3 (2 - 5)	
<b>Estadio Clínico</b>		
IIA	12	20
IIB	19	31,7
IIIA	8	13,3
IIIB	18	30
IIIC	3	5
<b>Tipo histológico</b>		
Ductal	49	81,7
Lobular	4	6,7
Medular	4	6,7
Outros	3	5
<b>Grau histológico</b>		
I	16	26,7
II	32	53,3
III	11	18,4

### **3.2 Exames Iniciais e Complementares**

Todas as pacientes foram submetidas a biópsia incisional para confirmação de carcinoma de mama quando da hipótese diagnóstica de câncer de mama feito pelo exame físico, mamográfico e por punção com agulha fina (PAF). As pacientes foram submetidas a exame físico completo e submetidas a estadiamento clínico (vide Anexos – Estadiamento UICC) na data da inclusão.

Todas as pacientes foram submetidas a exames de rastreamento de metástases com radiografia de tórax, ultra-sonografia hepática e cintilografia óssea. Antes do início do tratamento foram feitos exames bioquímicos da função hepática (TGO, TGP, bilirrubinas), renal (uréia e creatinina), cardíaca (eletrocardiograma e radiografia de tórax) e hematológica (hemograma completo). As pacientes com idade superior a 60 anos ou com história ou diagnóstico de cardiopatias foram encaminhadas ao Serviço de Cardiologia do mesmo hospital para avaliação de risco cirúrgico específico. Os exames de função hepática, renal e hematológica foram repetidos antes de cada ciclo de quimioterapia e antes do procedimento cirúrgico definitivo.

### **3.3 Tratamento Neoadjuvante**

As pacientes foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante com Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> em infusão endovenosa em 1 hora e Epirrubicina 50 mg/m<sup>2</sup> em infusão endovenosa em 30 minutos no D1, e administrados de 21/21 dias se as funções hepática, renal estivessem preservadas e hemograma com leucograma dentro da normalidade. A dose média de docetaxel e epirrubicina foi de 232,4 mg/m<sup>2</sup> e 155 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Não foi observada toxicidade maior que 2 durante a quimioterapia neoadjuvante (National

Comprehensive Cancer Network (U.S.), 2000). O efeito tóxico mais freqüente foi a alopecia, observada em todas as pacientes. Náuseas e vômitos foram observados em 19,2% das pacientes e neutropenia grau 2 em 11,5%. Não houve morte relacionada com efeito tóxico da quimioterapia neoadjuvante. A Tabela 3.3.1 exhibe as taxas de efeito tóxico decorrentes do tratamento neoadjuvante.

**Tabela 3.3.1. Toxicidade à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel 75mg m<sup>2</sup> e epirrubicina 50mg m<sup>2</sup> em 60 pacientes com câncer de mama localmente avançado.**

	<b>Toxicidade</b>
	<b>(%)</b>
Alopecia	100
Náuseas e vômitos	19,2
Neutropenia	11,5
Neutropenia febril	3,8
Febre	5,7
Diarréia	5,7
Mucosite	3,8
Reação alérgica	3,8
Astenia	1,9
Cefaléia	1,9

A reavaliação clínica da resposta ao tratamento neoadjuvante foi feita antes do início de cada ciclo ou antes do tratamento cirúrgico definitivo. A resposta clínica final foi avaliada pelo produto da medida clínica do maior diâmetro do tumor e o maior diâmetro perpendicular a este, estimados com um paquímetro de precisão (Hayward, Carbone *et al.*, 1977). A Tabela 3.3.2 mostra a relação da resposta clínica com o produto dos diâmetros do tumor.

Em caso de resposta objetiva, a quimioterapia foi mantida, no mesmo esquema, até se obter operabilidade em casos de lesões inoperáveis ou até proporcionar cirurgia conservadora em casos de lesões operáveis. Uma paciente com tumor primariamente inoperável e que não apresentou resposta ao tratamento neoadjuvante foi submetida à nova biópsia incisional após ser conscientizada do procedimento e posterior tratamento radioterápico na mama acometida.

**Tabela 3.3.2 Resposta clínica observada em relação ao produto do maior diâmetro tumoral com seu maior diâmetro perpendicular após a quimioterapia de indução.**

<b>Resposta Clínica</b>		<b>Produto dos diâmetros do tumor</b>
Resposta Objetiva	Completa	Tumor não evidente clinicamente
	Parcial	Redução maior que 50%
Sem Resposta		Redução menor que 50% ou aumento menor que 25%
Progressão		Aumento maior que 25%

### **3.4 Tratamento Cirúrgico**

Todas as pacientes foram submetidas á biópsia incisional para diagnóstico histopatológico antes do início da quimioterapia de indução conforme protocolo deste serviço. A cirurgia definitiva era indicada conforme o resultado da avaliação clínica após o tratamento neoadjuvante e, segundo desejo da paciente em se preservar ou não a mama acometida, após esclarecimento a respeito dos riscos e benefícios. Quando a opção era cirurgia conservadora, o material da tumorectomia era enviado ao Serviço de Patologia deste hospital para avaliação das margens cirúrgicas no intra-operatório. Em caso de margens cirúrgicas comprometidas por neoplasia sem a possibilidade de ampliação das margens, as pacientes eram submetidas a Mastectomia radical modificada. Todas as pacientes foram orientadas a respeito desta possibilidade antes do procedimento cirúrgico. As cirurgias conservadoras e radicais foram complementadas com dissecação de linfonodos axilares nos níveis I, II e III.

### **3.5 Tratamento adjuvante**

#### **3.5.1 Radioterapia**

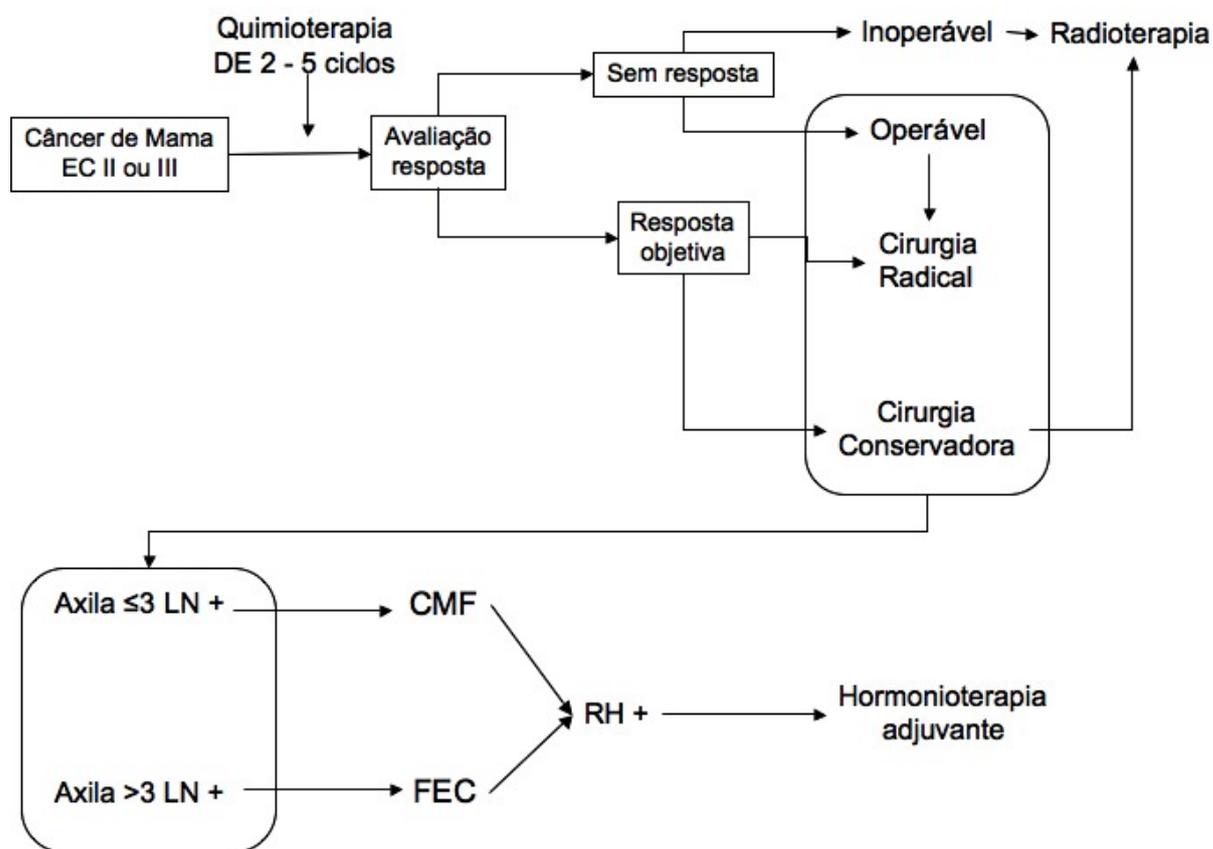
Todas as pacientes submetidas a tratamento cirúrgico conservador foram submetidas à radioterapia na mama. O esquema de radioterapia inclui uma dose total de 5000 cGy em doses diárias fracionadas (200 cGy) no parênquima mamário restante bem como um reforço (boost) de 160 cGy no leito tumoral. As pacientes submetidas à cirurgia radical, foram encaminhadas à radioterapia quando houvesse de alto risco de recorrência local (sinais inflamatórios, edema ou ulceração da pele, tumores maior que 5 cm no maior diâmetro e axila com mais de 3 linfonodos acometidos por metástase). Em pacientes com axila com mais de três linfonodos axilares histopatologicamente comprometidos, a radioterapia da fossa supraclavicular era indicada.

### **3.5.2 Quimioterapia adjuvante**

Todas as pacientes foram submetidas à quimioterapia adjuvante até que se complementasse um total de nove ciclos a contar da primeira terapia de indução. Pacientes com alto risco de doença sistêmica (axila extensamente comprometida no exame físico inicial ou com mais de três linfonodos histopatologicamente comprometidos) foram submetidas ao esquema FEC (fluoruracil 500 mg/m<sup>2</sup>, epirrubicina 50 mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida 500mg/m<sup>2</sup> em infusão endovenosa no D1) a cada 21/21 dias caso funções hepática, renal preservadas e hemograma com leucograma dentro da normalidade. Caso contrário, foram submetidas ao esquema CMF (Ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup>, Metotrexate 50 mg/m<sup>2</sup> e 5-Fluoruracil 500 mg/m<sup>2</sup> em infusão endovenosa no D1) com mesmo intervalo de tempo entre os ciclos.

### **3.5.3 Hormonioterapia**

O tratamento hormonioterápico foi indicado após o término da quimioterapia e radioterapia adjuvante com tamoxifeno 20 mg via oral ao dia por 60 meses para todas as pacientes com tumores com expressão positiva para receptores de estrógenos (RE) ou progesterona (RP) em mais de 10% das células neoplásicas avaliadas por método imunohistoquímico. A Figura 3.5.1 mostra o organograma de tratamento para as pacientes do estudo.



**Figura 3.5.1 – Organograma de tratamento de 60 pacientes com câncer de mama estágio clínico (EC) II e III. (DE= docetaxel + epirrubicina; LN= linfonodos axilares; CMF= ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluoruracil; FEC= 5-fluoruracil, epirrubicina, ciclofosfamida; RH= receptores hormonais)**

### 3.6 Seguimento clínico

Todas as pacientes foram seguidas no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. As consultas de seguimento foram realizadas a cada três meses durante os dois primeiros anos, semestralmente durante o terceiro ao quinto e ano após o tratamento e anualmente após cinco anos de tratamento. As pacientes eram submetidas a questionamento direcionado de sintomas e, os exames de rastreamento de metástase somente eram realizados caso houvesse suspeita clínica de doença metastática. A mamografia foi realizada anualmente em todas as pacientes e, em pacientes submetidas a

cirurgia conservadora, uma mamografia de controle pós-operatória era realizada para avaliar doença residual. O tempo médio de seguimento foi de 48 meses (24 – 69).

O diagnóstico de doença metastática foi baseado em critérios clínicos, radiológicos ou histológicos e todas as pacientes foram submetidas a tratamento de resgate direcionado á localização da doença. Para confirmação de recorrência loco-regional, estudo histológico com confirmação de carcinoma de mama recorrente era necessário. Pacientes com cirurgia conservadora foram submetidas a mastectomia de resgate após exames de rastreamento de doença metastática (raio-x de tórax, cintilografia óssea e ultra-sonografia hepática).

### **3.7 Estudo histopatológico**

#### **3.7.1 Processamento do material**

Todo material obtido na biópsia e na peça cirúrgica foi fixado em solução de formaldeído a 10% e incluídos em parafina após 24 horas de fixação. Foi realizada coloração com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação convencional, tal como, tipo histológico, grau de diferenciação, presença de componente intraductal extenso e invasão angio-linfática, entre outros. Todas as lâminas foram avaliadas quanto à viabilidade de estudo imunohistoquímico antes de serem incluídas no estudo.

#### **3.7.2 Imunohistoquímica para RE, RP e proteínas p53, p21 e HER-2**

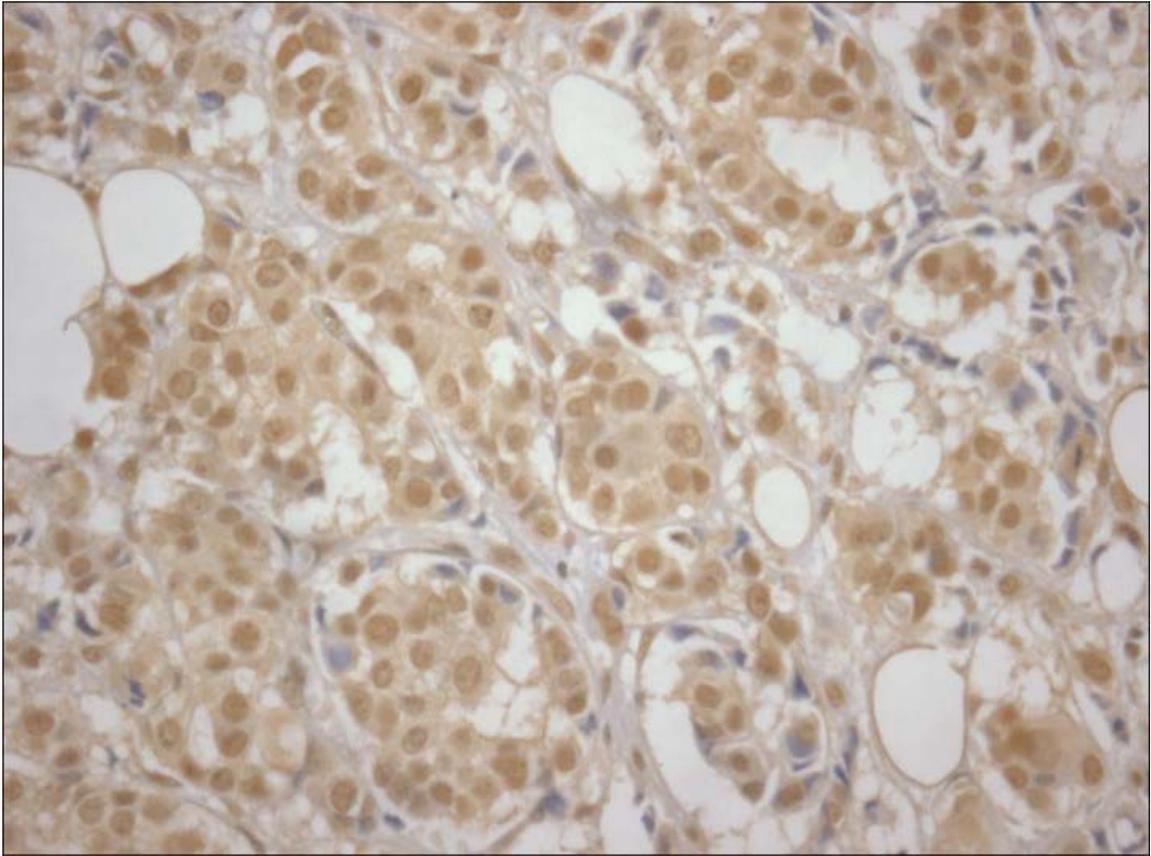
Foram preparados cortes de tecido parafinizado (4 a 5µm) em lâminas com poli-L-lisina (os cortes antes e após a quimioterapia, de cada paciente, foram preparados na mesma lâmina). Foram mantidos na estufa a 60° Celsius *overnight* e, posteriormente,

desparafinizados em xilol e reidratado em etanol e água destilada. Realizado a recuperação antigênica, depois de colocadas as lâminas em suporte com tampão citrato (200ml/20 lâminas), em forno de micro-ondas por 7 minutos em potência máxima. Depois de esfriadas, as lâminas, foram secas em suas bordas e lavadas em PBS. Os seguintes anticorpos primários foram incubados *overnight* à temperatura ambiente: RE (1:100, clone 6F11, Novocasta, UK), RP (1:100, clone 1A6, Novocasta, UK), p21 (1:50, clone 4D10, Novocasta, UK), HER-2 oncoprotein (1:300, clone CB11, Novocasta, UK), e p53 (1:100, clone DO-7, Novocasta, UK). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (Dako EnVision+ System – Anti-mouse Peroxidase) por 30 minutos e contra-corado com hematoxilina de Harris, azulado com água amoniacal e desidratado com álcoois. Todas as lâminas foram avaliadas por três observadores. Os casos discordantes foram reavaliados em conjunto para definição da expressão.

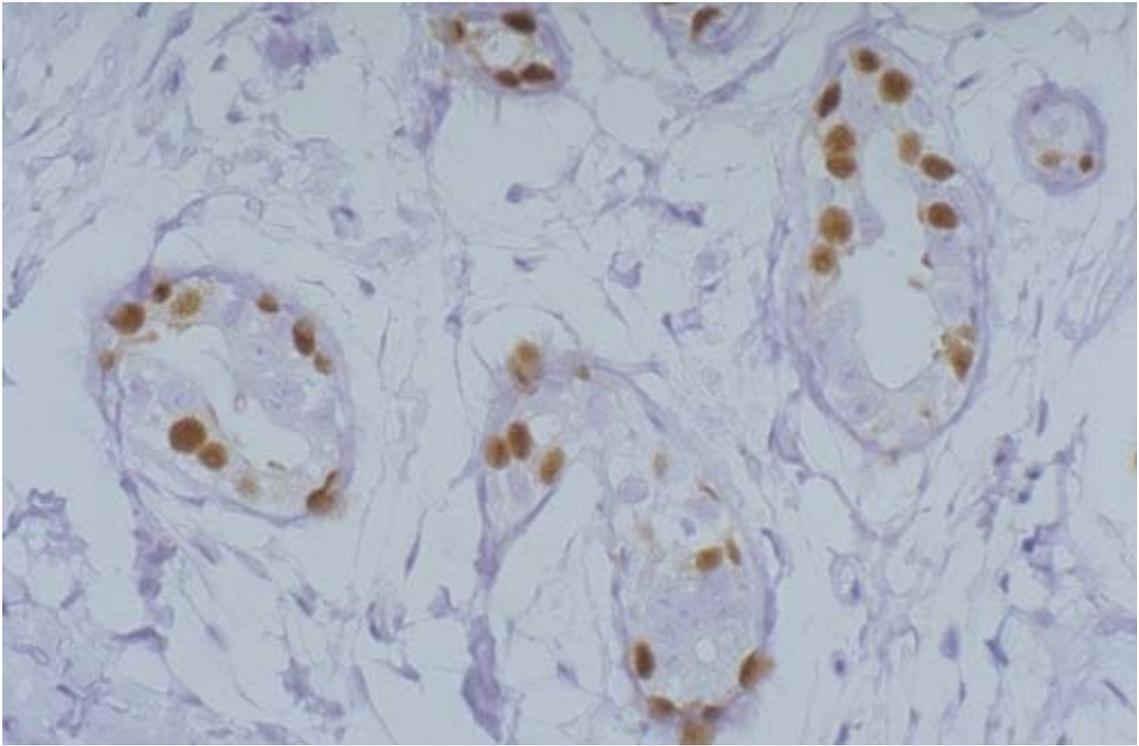
### **3.7.3 Análise da expressão de RE, RP e proteína p53**

A avaliação da expressão da proteína p53 e dos receptores hormonais nos tumores foi realizada com microscopia de luz em aumento de 100 a 400 vezes. Os cortes histológicos dos espécimes obtidos antes e após a quimioterapia foram dispostos lado a lado em uma mesma lâmina para maior facilidade de comparação. As lâminas foram avaliadas por dois observadores e os casos discordantes foram reavaliados em conjunto e chegou a um consenso final. Foram considerados casos positivos onde mais de 10% das células tumorais estavam com seus núcleos francamente corados (Harvey, Clark *et al.*, 1999; Fitzgibbons, Page *et al.*, 2000; Anelli, Brentani *et al.*, 2003; Kourea, Koutras *et al.*, 2003). As Figuras 3.7.3.1, 3.7.3.2 e 3.7.3.3 exemplificam casos de carcinoma ductal invasivo da mama com expressão positiva para as proteínas p53, receptor de estrógeno e receptor de progesterona,

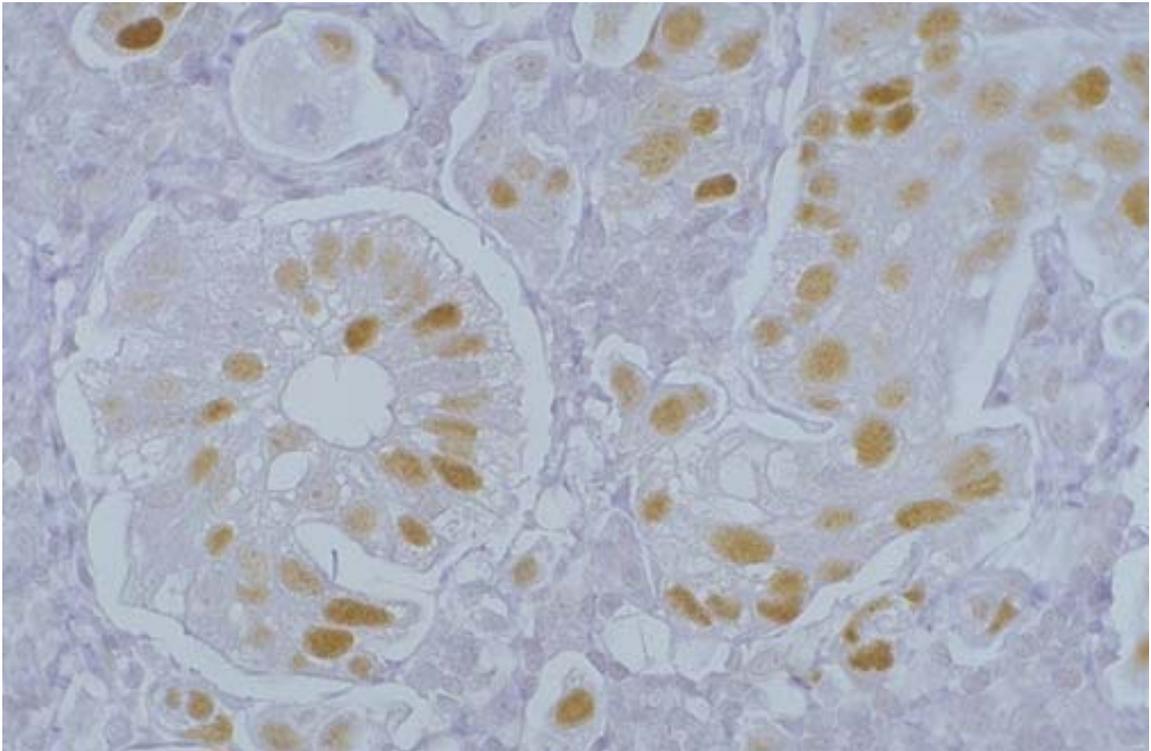
respectivamente. O controle positivo foi realizado com casos sabidamente positivos. O controle negativo foi feito sem o uso do anticorpo primário. Os casos foram categorizados em dois grupos: expressão positiva e negativa.



**Figura 3.7.3.1 – Expressão positiva para proteína p53 em carcinoma ductal invasivo da mama. A coloração nuclear de tom marrom é observada em praticamente todas as células neoplásicas (microscopia de luz; 400x).**



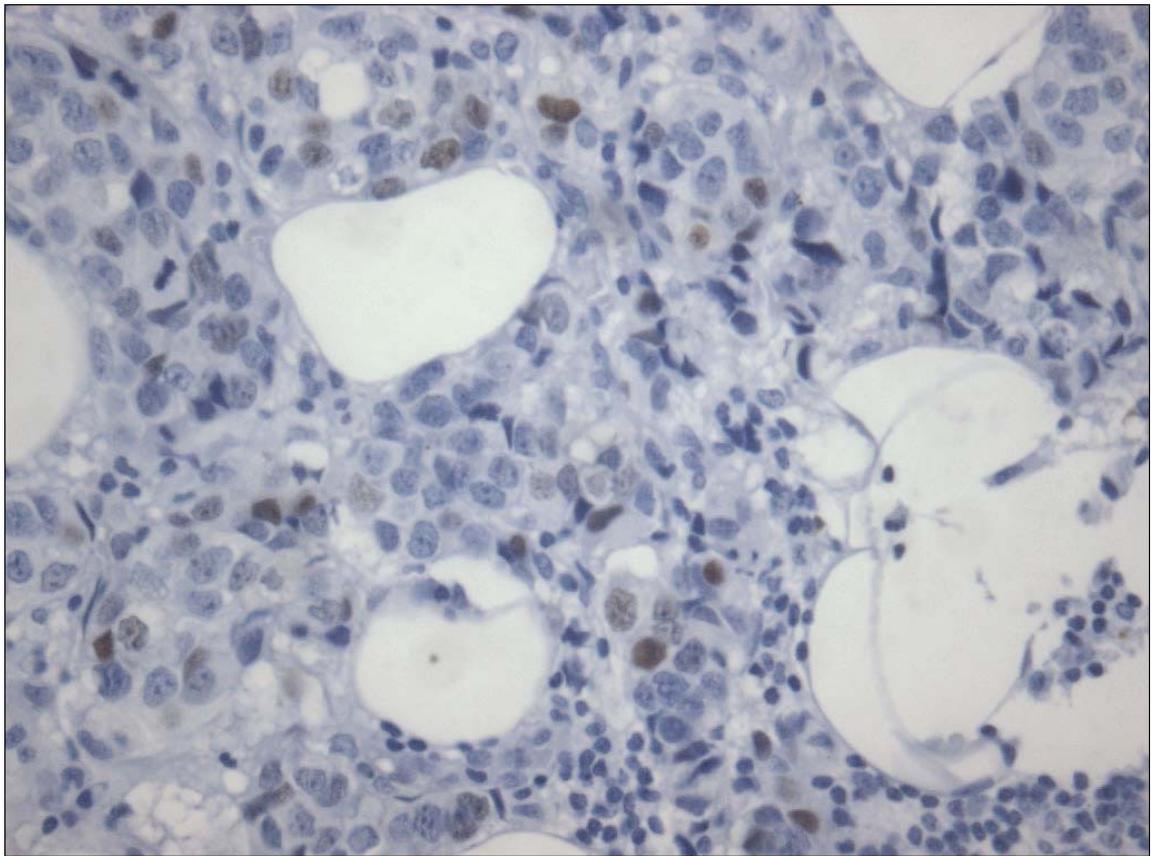
**Figura 3.7.3.2 – Expressão positiva para receptor de estrógeno (RE) em carcinoma ductal invasivo da mama. Notar a coloração nuclear de tom marrom em aproximadamente 80% de todas as células neoplásicas (microscopia de luz; 200x).**



**Figura 3.7.3.3 – Expressão positiva para receptor de progesterona (RP) em carcinoma ductal invasivo da mama. Notar a coloração nuclear de tom marrom em cerca de 90% de todas as células neoplásicas (microscopia de luz; 400x).**

### **3.7.4 Análise da expressão da proteína p21**

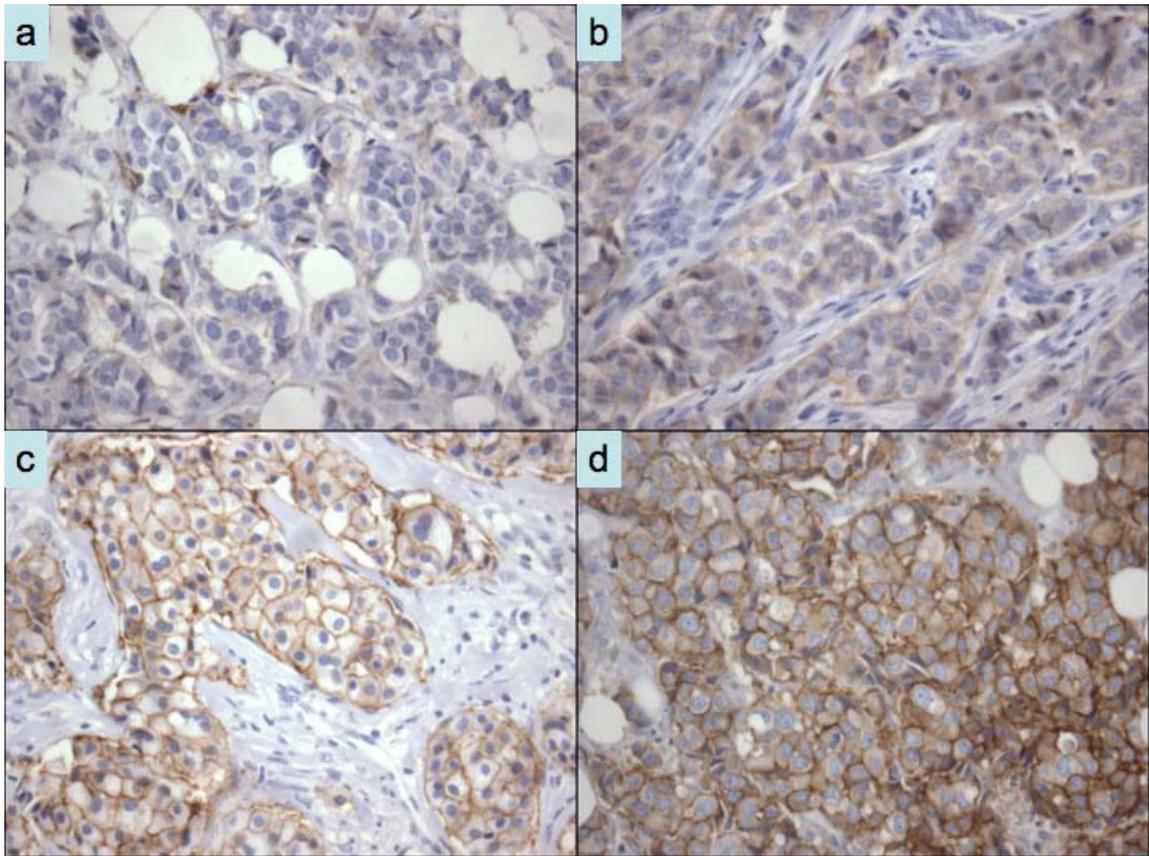
A avaliação da expressão da proteína p21 nos tumores foi feita em microscopia de luz com aumento de 100 e 400 vezes. Os cortes histológicos dos espécimes obtidos antes e após a quimioterapia foram dispostos lado a lado em uma mesma lâmina para maior facilidade de comparação. As lâminas foram avaliadas por dois observadores e os casos discordantes foram reavaliados em conjunto e chegou a um consenso final. Foram considerados positivos casos nos quais mais de 5% das células neoplásicas estavam com seus núcleos evidentemente corados (Allal, Gervaz *et al.*, 2004). A Figura 3.7.4 mostra a expressão positiva para proteína p21 em carcinoma ductal invasivo da mama. O controle positivo foi realizado com caso sabidamente positivo para expressão da proteína. O controle negativo foi feito sem o uso do anticorpo primário. Deste modo, os casos foram divididos em dois grupos: aqueles que expressaram o p21 (p21+) e os que não expressaram a proteína (p21-).



**Figura 3.7.4.1 – Expressão imunohistoquímica para proteína p21. A coloração nuclear em tom de cinza pode ser observada em mais de 5% de todas as células neoplásicas. (Microscopia de luz; 400x)**

### **3.7.5 Análise da expressão da proteína HER-2**

A imunorreatividade da proteína HER-2 foi determinada pela marcação de membrana celular e categorizada entre 0 e 3+. A categoria 0 foi definida pela não detecção de marcação de membrana ou pela marcação em menos de 10% das células neoplásicas. A categoria 1+ foi definida pela tênue e mal definida marcação de membrana em mais de 10% das células neoplásicas. A categoria 2+ foi definida pela observação de fraca a moderada marcação completa de membrana em mais de 10% das células tumorais e a categoria 3+, definida pela marcação intensa da membrana em mais de 10% das células tumorais. Foram considerados positivos tumores categorizados como 2+ e 3+ (Jacobs, Gown *et al.*, 1999b; a; Bilous, Dowsett *et al.*, 2003). A Figura 3.7.5 exemplifica a classificação da expressão imunohistoquímica da proteína HER-2.



**Figura 3.7.5** Expressão da proteína HER-2 avaliada pela imunohistoquímica em carcinoma ductal invasivo da mama. Note as diferentes intensidades de marcação de membrana (microscopia de luz; 400x). Classificação baseada no protocolo HercepTest (Jacobs, Gown *et al.*, 1999b; a; Bilous, Dowsett *et al.*, 2003). (a. Escore 0 = expressão negativa; b. Escore +1 = expressão negativa; c. Escore +2 = expressão positiva; d. Escore +3 = expressão positiva).

### 3.8 Análise Estatística

O teste de McNemar foi utilizado para avaliar a correlação pareada entre a expressão das proteínas p53, p21 e HER-2 antes e após a quimioterapia neoadjuvante. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para determinar a correlação entre o *estado* axilar e a resposta clínica e para avaliar a correlação entre a resposta clínica e o risco de morte e progressão da doença. A relação entre a resposta clínica e as características das pacientes e os padrões histopatológicos foi avaliada através do teste exato de Fisher e qui-quadrado. A relação entre o número de ciclos de quimioterapia administrados e a resposta clínica foi avaliada através do teste de Mann-Whitney. A sobrevida livre de doença e a sobrevida global foram analisadas pela curva de Kaplan-Meier. Os *softwares* MedCalc versão 6.16.000 e Graphpad Prism versão 4 foram utilizados para as análises estatísticas acima mencionadas.

A análise multivariada para testar a correlação entre a expressão da proteína HER-2, a resposta clínica, o *estado* axilar, o tipo de cirurgia realizada com o risco de recorrência da doença e morte pela doença foi realizada através do *software* JMP 6.0 SAS (*Nominal logistic fit*). Significância estatística foi definida para  $p < 0.05$ .



#### **4.1. Expressão das proteínas p53, p21, HER-2 e receptores hormonais**

Foi realizado o estudo imunohistoquímico para expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e das proteínas p21, p53 e HER-2 no material de biópsia antes do início da quimioterapia nas 60 pacientes. A expressão do receptor de estrogênio no tumor foi positiva em 45 pacientes (75%), a expressão do receptor de progesterona no tumor foi positiva em 32 pacientes (53,3%), a expressão da proteína p21 no tumor foi considerada positiva em 20 pacientes (33,3%). A expressão da proteína p53 no tumor foi positiva em 17 pacientes (28,3%) e a proteína HER-2 foi considerada superexpressa no tumor de 11 pacientes (18,3%). A Tabela 4.1 resume as características das pacientes do estudo.

**Tabela 4.1 Características histopatológicas de 60 pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.**

<b>Imunohistoquímica</b>	<b>n= 60 (variação)</b>	<b>%</b>
<b>RE</b>		
Positivo	45	75
Negativo	15	25
<b>RP</b>		
Positivo	32	53,3
Negativo	28	46,7
<b>Proteína p53</b>		
Positivo	17	28,3
Negativo	43	71,7
<b>Proteína p21</b>		
Positivo	20	33,3
Negativo	40	66,7
<b>HER-2</b>		
Positivo	11	18,3
Negativo	49	81,7

## **4.2. Resposta clínica e patológica ao tratamento neoadjuvante e tratamento cirúrgico**

A resposta clínica ao tratamento neoadjuvante foi avaliada a cada ciclo de quimioterapia. A resposta clínica objetiva (RO) foi observada em 46 pacientes (76,6%) e a resposta clínica completa (RcC) em nove pacientes (15%). Quatorze pacientes (23,3%) não apresentaram resposta clínica. Foram classificadas como doença estável (DE) 12 pacientes (20%) e progressão da doença (PD) em duas pacientes (3,3%). Segundo a análise histológica da peça cirúrgica após a quimioterapia, pacientes com ausência de neoplasia invasiva foram classificadas como resposta patológica completa (RpC). A RpC foi observada em três pacientes (5%).

A cirurgia pode ser realizada em 59 pacientes (98,3%). Uma paciente com doença estável foi submetida a tratamento de segunda linha com quimio e radioterapia e evoluiu para óbito por doença metastática antes que a cirurgia pudesse ser realizada. A cirurgia conservadora pode ser realizada em 40 pacientes (66,7%). Mastectomia radical modificada foi realizada nas 19 pacientes onde a cirurgia conservadora não estava indicada. A cirurgia conservadora foi realizada mais frequentemente em pacientes com RO (73,9%). No grupo sem resposta clínica, a cirurgia conservadora pode ser realizada em 35,7% dos casos ( $p= 0,03$ ; teste  $\chi^2$ ).

Os linfonodos axilares foram avaliados em 59 pacientes submetidas a dissecação cirúrgica. A mediana do número de linfonodos acometidos por doença metastática foi de 0 (0 – 19) no grupo de pacientes com resposta objetiva e 3 (0 – 25) nas pacientes sem resposta clínica. Observamos uma correlação positiva entre a ausência de resposta clínica e a presença de metástase em linfonodos axilares nas pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante ( $p= 0,003$ , Spermán  $r$ ). A taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante, o tipo de cirurgia realizada e o estado axilar estão resumidos na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2 Resposta clínica, tipo de cirurgia e avaliação histológica dos linfonodos axilares de 60 pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.**

	<b>RO</b>	<b>SR</b>	
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>P</b>
<b>Resposta Clínica</b>	46 (76,7)	14 (23,3)	-
<b>Cirurgia</b>			
MRM	12 (26)	7 (50)	
CC	34 (74)	6 (42,8)	
NC	0	1 (7,2)	0,03
<b>Linfonodos axilares positivos</b>			
Mediana (variação)	0 (0 – 19)	3 (0 – 25)	0,03

RO= resposta objetiva; SR= sem resposta; MRM= mastectomia radical modificada; CC= cirurgia conservadora; NC= não submetida a cirurgia.

### **4.3. Características clínicas e histopatológicas e suas relações com a resposta clínica**

Avaliamos a relação entre a resposta clínica, as características clínicas das pacientes (idade, número de ciclos de quimioterapia e estadiamento clínico), grau histológico e parâmetros imunohistoquímicos de expressão das proteínas p53, p21, HER-2 e receptores hormonais. A média da idade das pacientes com RO foi de 51,5 anos (35 - 67) e, no grupo SR, a média da idade foi de 47,5 anos (29 - 68). Não há diferença entre os grupos ( $p= 0,3$ , teste t de Student). O número médio de ciclos de quimioterapia foi três para ambos os grupos ( $p= 0,4$ , Teste de Mann-Whitney) e não encontramos diferença entre o estadiamento clínico entre os grupos RO e SR ( $p= 0,78$ , teste  $\chi^2$ ).

O receptor de estrogênio foi considerado positivo em 72,7% das pacientes RO e 85,7% nas pacientes sem resposta clínica ( $p= 0,48$ , Teste exato de Fisher). O receptor de progesterona foi positivo em 44% e 50% nas pacientes dos grupos RO e SR, respectivamente ( $p= 0,76$ , teste exato de Fisher). No grupo RO, a superexpressão da proteína p53 e HER-2 foi encontrada em 16 pacientes (34,7 %) e 10 pacientes (21,7 %) respectivamente e, a proteína p21 estava positiva em 15 pacientes (32,6 %). No grupo SR, a superexpressão da proteína p53 e HER-2 foi observada em 2 pacientes (14,3 %) e em 1 paciente (7,1 %), respectivamente. A proteína p21 estava positiva em 5 pacientes (35,7 %) do grupo SR. Não encontramos diferença da expressão destas proteínas entre os grupos RO e SR. A Tabela 4.3 exhibe a relação das características clínicas e histopatológicas entre as pacientes dos grupos RO e SR.

**Tabela 4.3 Características clínicas e histopatológicas e suas relações com a resposta clínica a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina em 60 pacientes com câncer de mama localmente avançado.**

	<b>RO (n)</b>	<b>SR (n)</b>	<b>P</b>
<b>Idade</b>			
Mediana (variação)	51,5 (35 – 67)	47,5 (29 - 68)	0,3
≤45 anos	12	7	
>45 anos	35	7	0,1
<b>Ciclos de QT (variação)</b>			
	3 (2 - 5)	3 (2 - 4)	0,4
<b>Estadio Clínico</b>			
IIA	8	4	
IIB	15	4	
IIIA	5	2	
IIIB	14	4	
IIIC	3	0	0,78
<b>Grau histológico</b>			
I	10	6	
II	27	5	
III	8	3	0,2
<b>RE</b>			
Positivo	32	12	
Negativo	12	2	0,48
<b>RP</b>			
Positivo	20	7	
Negativo	25	7	0,76
<b>RE/RP</b>			
Positivo	16	7	
Negativo	22	7	0,75
<b>P53</b>			
Positivo	16	2	
Negativo	30	12	0,19
<b>P21</b>			
Positivo	15	5	
Negativo	31	9	1
<b>HER-2</b>			
Positivo	10	1	
Negativo	36	13	0,43

RO= resposta objetiva; SR= sem resposta; n= número de pacientes; QT= quimioterapia; RE= receptor de estrogênio; RP= receptor de progesterona.

#### **4.4. Expressão das proteínas p53, p21 e HER-2 antes e após a quimioterapia neoadjuvante.**

A expressão das proteínas p53, p21 e HER-2 foram avaliadas no material de biópsia incisional de 60 pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Em razão da falta de material suficiente para estudo imunohistoquímico em pacientes com considerável redução do volume tumoral após a quimioterapia, a avaliação imunohistoquímica das proteínas p53 e p21 não foi realizada em seis pacientes e, a proteína HER-2 não foi avaliada em quatro pacientes após o tratamento neoadjuvante.

Expressão positiva da proteína p53 foi identificada em 18 pacientes (30%) antes e em 8 pacientes (14,5%) após a quimioterapia neoadjuvante. Houve uma redução significativa no nível de expressão após a quimioterapia ( $p= 0,039$ ; diferença 13,2%, teste de McNemar). A expressão da proteína p21 foi positiva em 13 pacientes (21,6%) antes e em 5 pacientes (9,2%) após a quimioterapia. A quimioterapia neoadjuvante reduziu a expressão da proteína p21. A expressão positiva da proteína p21 no tumor foi observada em 21,6% das pacientes antes da quimioterapia. Após a quimioterapia, em apenas 9,3% das pacientes foi observada expressão positiva ( $p= 0,021$ ; diferença 14,8%, teste de McNemar). Superexpressão da proteína HER-2 foi encontrada em 11 pacientes (18,3%) antes da quimioterapia. Após o tratamento neoadjuvante, a superexpressão desta proteína foi observada em sete pacientes (12,5%). A quimioterapia neoadjuvante não foi capaz de alterar a expressão da proteína HER-2 ( $p= 0,12$ , teste de McNemar). A Tabela 4.4 mostra as taxas de expressão positiva das proteínas p53, p21 e HER-2 antes e após a quimioterapia neoadjuvante.

**Tabela 4.4 Expressão das proteínas p53, p21 e HER-2 antes e após a quimioterapia em 60 pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas a tratamento neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.**

	<b>Pré-quimioterapia</b>	<b>Pós-quimioterapia</b>		<b>Dif.</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b><i>p</i></b>	<b>(%)</b>
p53 +	18 (30)	8 (14,5)	0,039	13,2
p21 +	13 (21,6)	5 (9,2)	0,021	14,18
HER-2 +	11 (18,3)	7 (12,5)	0,12	NS

n= número de pacientes; Dif.= diferença entre a expressão antes e após a quimioterapia – teste de McNemar; NS= não significativa.

#### **4.5. Expressão da proteína p21 e sua relação com as proteínas p53 e HER-2.**

A relação entre a expressão da proteína p21 e as proteínas p53 e HER-2 foi analisada nas amostras de biópsia antes da quimioterapia neoadjuvante. Em 40 pacientes com tumores p53 negativos, encontramos 16 pacientes com expressão positiva da proteína p21 (40%). Em pacientes com tumores p53 positivo (n= 16), identificamos quatro pacientes com p21 positivo (25%). A diferença observada não foi significativa ( $p= 0,2$ ; teste exato de Fisher).

Entre as onze pacientes com superexpressão da proteína HER-2, quatro pacientes foram consideradas p21 positivo (36,3%) e, em 49 pacientes HER-2 negativo, a expressão positiva da proteína p21 foi observada em 16 (32,6%). Não encontramos diferença de expressão da proteína p21 entre os grupos de paciente HER-2 positivo e negativo ( $p= 1,0$ ; teste exato de Fisher).

#### 4.6. Sobrevida livre de doença e sobrevida global.

O impacto das características clínicas (idade, estágio clínico, resposta clínica, tipo de cirurgia), histológicas (grau histológico, *estado* axilar) e imunohistoquímicas (expressão de receptores hormonais e das proteínas p53, p21 e HER-2) na sobrevida livre de doença e na sobrevida global foi analisado.

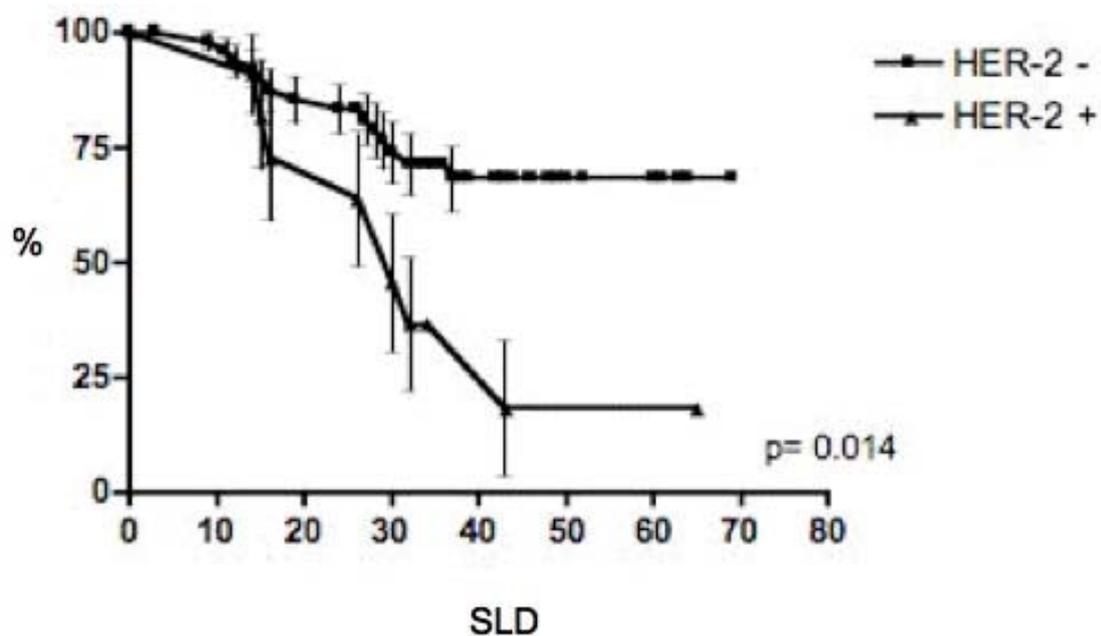
Observamos uma correlação inversa entre a resposta clínica e o risco de morte pela doença ( $p= 0,02$ ; Spearman  $r$ ). Em análise univariada, apenas a expressão da proteína HER-2 e dois outros fatores associados com a resposta clínica estavam relacionados com a sobrevida global: o tipo de cirurgia realizada (HR= 0,41; 95% IC= 0,12 to 0,96;  $p= 0,042$ ) e a presença de comprometimento axilar extenso (mais de seis linfonodos axilares positivos) (HR= 0,35; 95% IC= 0,08 to 0,78;  $p= 0,017$ ).

Em análise multivariada, apenas a superexpressão da proteína HER-2 demonstrou ser um fator de prognóstico independente. A Tabela 4.6 resume os resultados da regressão logística para o risco de morte pela doença em relação à expressão da proteína HER-2, estado axilar e tipo de cirurgia.

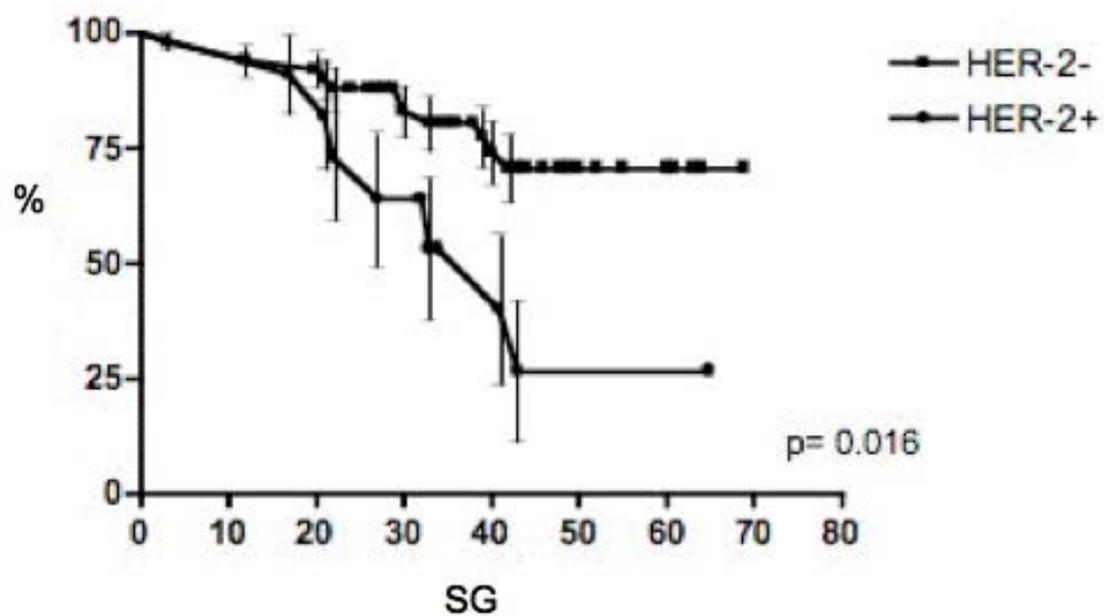
O tempo médio de sobrevida livre de doença foi 31 meses (HR= 0,35; 95% IC= 0,08 to 0,75;  $p= 0,014$ ) e o tempo médio de sobrevida global foi de 40 meses (HR= 0,33; 95% IC= 0,06 – 0,75;  $p=0,016$ ) para as pacientes com superexpressão do HER-2. As Figuras 4.6.1 e 4.6.2 mostram as curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de doença e sobrevida global de acordo com a expressão da proteína HER-2, respectivamente.

**Tabela 4.6 – Análise multivariada (regressão logística) para risco de morte pela doença em relação a expressão da proteína HER-2, estado axilar (mais de 3 linfonodos positivos) e tipo de cirurgia (mastectomia x cirurgia conservadora).**

	OR	IC 95%
HER-2	6,0	1,5 – 27,9
Axila	2,2	0,6 – 7,9
Cirurgia	1,8	0,4 – 6,9



**Figura 4.6.1. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença em sessenta pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão da oncoproteína HER-2.** (SLD= sobrevida livre de doença; HER-2 - = grupo de pacientes com expressão negativa; HER-2+ = grupo de pacientes com expressão positiva.)



**Figura 4.6.2.** Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em sessenta pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão da oncoproteína HER-2. (SG= Sobrevida global; HER-2 - = grupo de pacientes com expressão negativa; HER-2 + = grupo de pacientes com expressão positiva).

## **5. Discussão**

A quimioterapia neoadjuvante é o tratamento primário de escolha em pacientes com câncer de mama localmente avançado (Kaufmann, Hortobagyi *et al.*, 2006). O objetivo principal de seu uso é adicionar o benefício local ao benefício do tratamento sistêmico. A utilização endovenosa de drogas citotóxicas é capaz de reduzir o volume do tumor primário resultando em uma abordagem cirúrgica menos agressiva, quer proporcionando cirurgia conservadora em lesões onde primariamente requeriam mastectomia, quer propiciando condições locais de operabilidade em lesões consideradas inoperáveis (Fisher, Brown *et al.*, 1997; Beriwal, Schwartz *et al.*, 2006). Cerca de 80% das pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante irão apresentar benefício local decorrente da regressão tumoral (*downstaging*). No entanto, a sobrevida global não é modificada, quando comparamos o tratamento neoadjuvante com o tratamento adjuvante clássico (Kaufmann, Hortobagyi *et al.*, 2006).

Estudamos a resposta local clínica e patológica em 60 pacientes com câncer de mama localmente avançados que foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante com a combinação de taxane e antraciclina. Nenhum efeito tóxico grave ou letal foi observado. A resposta clínica objetiva foi de 76,6% e em três pacientes (5%) foi observada remissão completa histopatológica da lesão invasora na mama e axila. A taxa de cirurgia conservadora foi da ordem de 66,6%. Esta taxa de resposta é similar as taxas descrita por outros autores (Ramaswamy, Povoski *et al.*, 2005). Ramaswamy *et al* relataram resposta patológica completa de 8% e uma taxa de cirurgia conservadora de 16% com a utilização de docetaxel e epirrubicina sequenciais utilizando uma dose total média de 300 mg/m<sup>2</sup> para ambas as drogas. Em nosso estudo, a dose média total de docetaxel e epirrubicina foi de 232,4mg/m<sup>2</sup> e 155mg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Nossos dados sugerem que a combinação destas duas drogas é, no mínimo, tão efetiva quanto a administração sequencial. Dois estudos recentes descreveram taxas de resposta patológica completa maiores que a observada em nosso estudo, utilizando esquema em combinação de taxane e antraciclina (Ganem, Tubiana-Hulin *et al.*, 2003; Han,

Kim *et al.*, 2006). No entanto, a taxa de cirurgia conservadora, em nosso estudo, foi maior. Os resultados discordantes podem ser decorrentes da inclusão de diferente proporção de pacientes com doença inoperável.

A quimioterapia neoadjuvante, considerada como um modelo *in vivo* para testar a sensibilidade do tumor a droga, é útil para estudar as características biológicas de tumores malignos bem como avaliar os mecanismos de ação e fatores preditivos de resistência a drogas citotóxicas. Em um estudo anterior, demonstramos que a indução de apoptose é um importante preditor de resposta local à quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama e que a presença de superexpressão da proteína p53 está correlacionada com a resistência a indução de apoptose (Tiezzi, De Andrade *et al.*, 2006). No presente estudo, nós avaliamos a correlação entre as características clínicas, patológicas e imunohistoquímicas das pacientes e a resposta clínica e patológica após a quimioterapia neoadjuvante. Nenhum parâmetro estudado foi considerado um fator preditivo de resposta.

Alteração na expressão de proteínas após a quimioterapia neoadjuvante tem sido descrita (Taucher, Rudas *et al.*, 2003; Tiezzi, De Andrade *et al.*, 2006). Tal observação sugere que a quimioterapia é capaz de alterar a expressão gênica no tumor e que este mecanismo é um importante fator na sensibilidade a drogas citotóxicas. No presente estudo, pudemos observar a redução da expressão das proteínas p53 e p21, após o tratamento neoadjuvante. No entanto, a combinação de taxane e antraciclina neoadjuvante não foi capaz de alterar a expressão da proteína HER-2. Este fenótipo estável durante a quimioterapia neoadjuvante já foi descrito por outros autores (Taucher, Rudas *et al.*, 2003).

Dentre todos os parâmetros clínicos e histopatológicos analisados, somente a expressão da proteína HER-2 se mostrou fator prognóstico relevante em análise multivariada. O tempo médio de sobrevida livre de doença e sobrevida global foi de 30 e 41 meses, respectivamente, em pacientes com expressão positiva da proteína HER-2. Estes pacientes tiveram uma

sobrevida global de 25% em tempo médio de seguimento de 48 meses, em contraste com sobrevida de 70% em pacientes com expressão negativa. De acordo com a estimativa do *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER), pacientes com câncer de mama estágio III (T3 N1M0), grau histológico 3 e sem tratamento sistêmico adjuvante apresentam sobrevida média de 33,5% em 10 anos (Ravdin, Siminoff *et al.*, 2001). Esta observação associada com a presença de fenótipo estável durante a quimioterapia neoadjuvante nos permite inferir que tumores com super-expressão da proteína HER-2 são resistentes à combinação de taxane e antraciclina, visto que não foi observado benefício aparente com o tratamento instituído. Esta observação permite-nos oferecer tratamento alternativo para estas pacientes sendo que recentes estudos tem demonstrado um benefício promissor com a utilização concomitante de quimioterapia e imunoterapia como tratamento neoadjuvante em pacientes com superexpressão do HER-2 (Ahluwalia e Daw, 2005; Montemurro e Aglietta, 2005).

A expressão da proteína p21 está diretamente relacionada a via de ação da proteína p53 (El-Deiry, Tokino *et al.*, 1993). Em resposta a agentes que causam dano direto no DNA, o proteína p53 induz a expressão de p21 sendo este mecanismo responsável pela parada do ciclo celular na transição G1/S através da inibição de quinases dependente de ciclinas (El-Deiry, Harper *et al.*, 1994). A expressão da proteína p21 também está presente durante a fase de diferenciação terminal e pode também mediar a parada do ciclo celular na fase G2 (Barbareschi, Caffo *et al.*, 1996; Niculescu, Chen *et al.*, 1998). No entanto, nenhuma definição a respeito da expressão desta proteína e seu valor prognóstico foi demonstrada (Barbareschi, Caffo *et al.*, 1996; Sjostrom, Blomqvist *et al.*, 2000; Pellikainen, Pekola *et al.*, 2003). Não observamos qualquer associação entre a expressão da proteína p21 com a resposta clínica ou a sobrevida livre de doença e sobrevida global nas pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante.

As pacientes com expressão positiva da proteína p21, porém com expressão negativa da proteína p53 (p21+/p53-), deveriam, teoricamente, apresentar melhores taxas de resposta à quimioterapia e melhor prognóstico. Esta hipótese é sustentada devido a funcionalidade intacta da via de sinalização do p53. Deste modo, esperávamos que estas pacientes tivessem uma maior sensibilidade ao tratamento quimioterápico. Embora a diferença não tenha sido significativa, observamos sobrevida média de 50% neste grupo de pacientes, em contraste com uma sobrevida de 75% nas outras pacientes. Este resultado contraditório foi publicado anteriormente (Pellikainen, Pekola *et al.*, 2003) e, alguns autores demonstraram que a expressão positiva da proteína p21 no carcinoma de mama estava associada com maior taxa de proliferação celular (Mathoulin-Portier, Viens *et al.*, 2000; Thor, Liu *et al.*, 2000; Gohring, Bersch *et al.*, 2001). O acúmulo de p21 nuclear pode ser o indício de uma tentativa mal sucedida de bloquear a proliferação celular em tumores com alto índice mitótico.

A persistente apresentação clínica de pacientes com câncer de mama localmente avançado associada às altas taxas de recorrência e mortalidade bem como a heterogeneidade de comportamento clínico entre elas nos permite categorizá-las como um grupo em especial e é motivo de constante investimento em pesquisa para a melhor compreensão do comportamento biológico das lesões avançadas. O valor de marcadores biológicos como fator preditivo de resposta à quimioterapia neoadjuvante ainda não está claro. Tumores de mama avançados são compostos por uma população celular policlonal e o grande número de alterações genéticas limita o uso de marcadores específicos na prática clínica. As perspectivas futuras baseiam-se na avaliação simultânea de múltiplos genes, denominada na atualidade de assinatura genética. Estudos recentes demonstraram uma correlação positiva entre a assinatura genética e a resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante (Ayers, Symmans *et al.*, 2004; Thuerigen, Schneeweiss *et al.*, 2006).

## **6. Conclusões**

A expressão das proteínas p53, p21, HER-2, RE e RP pela imunohistoquímica no carcinoma de mama foi positiva em 28,3%, 33,3%, 18,3%, 75% e 53,3%, respectivamente.

As proteínas p53, p21, RE e RP não foram se mostraram fatores indicadores de resposta à quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama e a avaliação da expressão desta proteínas não teve importância como fator prognóstico. Já a proteína HER-2, embora sua expressão não tenha se mostrado eficaz como fator de predição de resposta à quimioterapia neoadjuvante, a sua superexpressão foi o mais expressivo fator prognóstico.

A combinação de docetaxel e epirrubicina neoadjuvante no câncer de mama reduz de forma significativa a expressão das proteínas p53 e p21 e não altera a expressão da proteína HER-2.



## ESTADIAMENTO

O sistema utilizado em nosso serviço é o empregado pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que é baseado na avaliação clínica do tamanho do nódulo, *estado* dos linfonodos regionais e a presença de metástase à distância, sistema este conhecido como TNM.

O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) realizou revisão em Janeiro de 2003 no Manual de Estadiamento do Câncer (6º edição) onde algumas alterações importantes a respeito do câncer de mama foram implementadas. Segue abaixo o estadiamento atual (EZTNM for the AJCC cancer staging manual, 2003).

### ***American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System For Breast Cancer***

#### ***Tumor Primário (T)***

A definição para classificação do tumor primário (T) segue a mesma classificação clínica e patológica. Se a mensuração for feita através do exame físico, o examinador usará letras maiúsculas (T1, T2 ou T3). Se a mensuração for realizada através de outro método (mamografia, ultra-sonografia, histologia), o examinador deverá notificar (pT1, mT1).

TX – o tumor primário não pode ser avaliado

T0 – sem evidência de tumor primário

Tis – carcinoma *in situ*

Tis (CDIS) – carcinoma ductal *in situ*

Tis (CLIS) – carcinoma lobular *in situ*

Tis (Paget) – doença de Paget do mamilo sem tumor

Nota: a doença de Paget associada à tumor invasivo deve ser classificada de acordo com o tamanho da lesão

T1 – tumor  $\leq 2$ cm em seu maior diâmetro

T1mic – microinvasão ( $\leq 1$ mm em sua maior dimensão)

T1a – tumor >1mm e ≤5mm

T1b – tumor >5mm e ≤10mm

T1c – tumor >10mm e ≤2,0cm

T2 – tumor > 2,0cm e ≤5,0cm

T3 – tumor > 5,0cm

T4 – tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede torácica ou pele, como descrito a seguir:

T4a – extensão para parede torácica (não inclui o músculo peitoral)

T4b – edema (incluindo peau d’orange) ou ulceração da pele ou nódulos satélites confinados a mesma mama

T4c – T4a + T4b

T4d – carcinoma inflamatório

### ***Linfonodos Regionais (N)***

#### **Avaliação clínica**

NX – linfonodos regionais não podem ser avaliados (ex.: previamente removidos)

N0 – sem metástases em linfonodos regionais

N1 – metástase para linfonodo(s) axilar móvel ipsilateral

N2 – metástase em linfonodo(s) axilar ipsilateral fixo ou coalescentes, linfonodos da mama interna ipsilateral *cl clinicamente aparente\** na ausência de evidência clínica de metástase para linfonodos axilares ipsilaterais.

N2a - metástase em linfonodos(s) axilar ipsilateral fixo ou coalescentes

N2b – metástase *cl clinicamente aparente\** para linfonodos da mama interna ipsilateral na ausência de evidência clínica de metástase para linfonodos axilares ipsilaterais

N3 – metástase para linfonodo infraclavicular ipsilateral com ou sem envolvimento de linfonodos axilares, ou em metástase *cl clinicamente aparente\** para linfonodos da mama interna ipsilateral e presença de evidência clínica de metástase para linfonodos axilares ipsilaterais; ou metástase para linfonodo supraclavicular ipsilateral com ou sem envolvimento de linfonodos axilares ou de mama interna.

N3a – metástase para linfonodo infraclavicular ipsilateral

N3b – metástase em linfonodo da mama interna ipsilateral e linfonodo(s) axilar

N3c – metástase para linfonodo supraclavicular ipsilateral

\*Clinicamente aparente é definido por detecção em estudos de imagem (excluindo linfocintilografia) ou por exame físico ou por visualização macroscópica.

#### **Avaliação patológica (pN)<sup>a</sup>**

pNX – linfonodos regionais não podem ser avaliados (ex.: previamente removidos ou não removidos para estudo histológico)

pN0 – ausência de metástase para linfonodos regionais ao à histologia, sem exame adicional para células tumorais isoladas

Nota: células tumorais isoladas são definidas como células tumorais únicas ou um aglomerado de células tumorais não maiores que 2mm, frequentemente detectadas por imunohistoquímica (IHQ) ou métodos de biologia molecular.

pN0(i-) – ausência histológica de metástase para linfonodos regionais, IHQ negativa

pN0(i+) – ausência histológica de metástase para linfonodos regionais, IHQ positiva

pN0(mol-) – ausência histológica de metástase para linfonodos regionais, achados moleculares negativos (RT-PCR)

pN0(mol+) – ausência histológica de metástase para linfonodos regionais, achados moleculares positivos (RT-PCR)

<sup>a</sup>A classificação é baseada na dissecação axilar com ou sem dissecação do linfonodo sentinela. Classificação baseada somente no linfonodo sentinela deve ser designada como tal (ex.: pN0(i+) (Is).

<sup>b</sup>RT-PCR: transcriptase reversa/reacção em cadeia de polimerase.

pN1 – metástase em 1 a 3 linfonodos, e/ou linfonodos da mama interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não *cl clinicamente aparente*\*\*

pN1mi – micrometástase (maior que 0,2mm, não mais que 2,0mm)

pN1a – metástase para 1 a 3 linfonodos axilares

pN1b – metástase para linfonodos da mama interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não *cl clinicamente aparente*\*\*

pN1c – metástase para 1 a 3 linfonodos axilares e em linfonodos da mama interna com doença microscópica detectada pela dissecação do linfonodo sentinela mas não *cl clinicamente aparente*\*\*

pN2 – metástase em 4 a 9 linfonodos axilares, ou em linfonodos da mama interna *cl clinicamente aparente*\* na ausência de metástase para linfonodos axilares

pN2a – metástase para 4 a 9 linfonodos axilares (pelo menos um depósito tumoral maior que 2,0mm)

pN2b – metástase para linfonodos da mama interna *cl clinicamente aparente*\* na ausência de metástase para linfonodos axilares

pN3 – Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares, ou em linfonodos infra-claviculares, ou em linfonodos *cl clinicamente aparentes*\* da mama interna ipsilateral na presença de 1 ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais do que 3 linfonodos axilares com metástase microscópica clinicamente negativa para linfonodos da mama interna; ou em linfonodos supra-claviculares ipsilaterais.

pN3a – metástase em 10 ou mais linfonodos axilares (pelo menos um depósito tumoral maior que 2,0mm), ou metástase em linfonodos infra-claviculares

pN3b – metástase em linfonodos *cl clinicamente aparentes\** da mama interna ipsilateral na presença de 1 ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais do que 3 linfonodos axilares com metástase microscópica para a mama interna detectada por dissecação de linfonodo sentinela porém *não clinicamente aparente\*\**

pN3c – metástase para linfonodos supra-claviculares ipsilaterais

\**Clinicamente aparente* é definido por estudos de imagem (excluindo linfo-cintilografia) ou por exame físico

\*\* *Não clinicamente aparente* é definido pela não detecção por exames de imagem (excluindo linfo-cintilografia) ou exame físico

### **Metástase à distância (M)**

MX – metástase à distância não pode ser avaliada

M0 – sem metástase à distância

M1 – metástase à distância

### **Grupamento de Estadiamento**

**Estádio 0** Tis N0 M0

**Estádio I** T1\* N0 M0

**Estádio IIA** T0 N1 M0

T1\* N1 M0

T2 N0 M0

**Estádio IIB** T2 N1 M0

T3 N0 M0

**Estádio IIIA** T0 N2 M0

T1\* N2 M0

T2 N2 M0

T3 N1 M0

T3 N2 M0

**Estádio IIIB** T4 N0 M0

T4 N1 M0

T4 N2 M0

**Estádio IIIC** QualquerT N3 M0

**Estádio IV** QualquerT QualquerN M1

\*T1 inclui T1mic

Nota: o estágio deve ser mudado se os estudos de imagem após a cirurgia revelar a presença de metástase, desde que estes sejam executados em 4 meses após o diagnóstico na ausência de doença progressiva e em paciente que não esteja sob quimioterapia neoadjuvante.

## **8. Referências Bibliográficas**

Ahluwalia, M. S. e H. A. Daw. Neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel and epirubicin for HER-2-positive operable breast cancer. J Clin Oncol, v.23, n.30, Oct 20, p.7759-60; author reply 7760-1. 2005.

Alimandi, M., A. Romano, *et al.* Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. Oncogene, v.10, n.9, May 4, p.1813-21. 1995.

Allal, A. S., P. Gervaz, *et al.* Cyclin D1, cyclin E, and p21 have no apparent prognostic value in anal carcinomas treated by radiotherapy with or without chemotherapy. Br J Cancer, v.91, n.7, Oct 4, p.1239-44. 2004.

Amat, S., C. Abrial, *et al.* High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.94, n.3, Dec, p.255-63. 2005.

Anelli, A., R. R. Brentani, *et al.* Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using paclitaxel and doxorubicin in stage IIIB breast cancer. Ann Oncol, v.14, n.3, Mar, p.428-32. 2003.

Ayers, M., W. F. Symmans, *et al.* Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol, v.22, n.12, Jun 15, p.2284-93. 2004.

Barbareschi, M., O. Caffo, *et al.* p21WAF1 immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse-free survival. Br J Cancer, v.74, n.2, Jul, p.208-15. 1996.

Beriwal, S., G. F. Schwartz, *et al.* Breast-conserving therapy after neoadjuvant chemotherapy: long-term results. Breast J, v.12, n.2, Mar-Apr, p.159-64. 2006.

Bilous, M., M. Dowsett, *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. Mod Pathol, v.16, n.2, Feb, p.173-82. 2003.

Borg, J. P., S. Marchetto, *et al.* ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. Nat Cell Biol, v.2, n.7, Jul, p.407-14. 2000.

Ciocca, D. R., F. E. Gago, *et al.* Co-expression of steroid receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her-2/neu: Clinical implications. J Steroid Biochem Mol Biol, v.102, n.1-5, Dec, p.32-40. 2006.

Compagni, A. e G. Christofori. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. Br J Cancer, v.83, n.1, Jul, p.1-5. 2000.

Dai, Y. e S. Grant. Cyclin-dependent kinase inhibitors. Curr Opin Pharmacol, v.3, n.4, Aug, p.362-70. 2003.

Dupont, J., M. Karas, *et al.* The cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP/WAF is a positive regulator of insulin-like growth factor I-induced cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells. J Biol Chem, v.278, n.39, Sep 26, p.37256-64. 2003.

El-Deiry, W. S., J. W. Harper, *et al.* WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res, v.54, n.5, Mar 1, p.1169-74. 1994.

El-Deiry, W. S., T. Tokino, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell, v.75, n.4, Nov 19, p.817-25. 1993.

\_\_\_\_\_. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res, v.55, n.13, Jul 1, p.2910-9. 1995.

EZTNM for the AJCC cancer staging manual. New York: Springer-Verlag: 1 CD-ROM p. 2003.

Fernandez-Sanchez, M., A. Gamboa-Dominguez, *et al.* Clinical and pathological predictors of the response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer. Med Oncol, v.23, n.2, p.171-83. 2006.

Fischer, P. M. e A. Gianella-Borradori. Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors. Expert Opin Investig Drugs, v.14, n.4, Apr, p.457-77. 2005.

Fisher, B., A. Brown, *et al.* Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. J Clin Oncol, v.15, n.7, Jul, p.2483-93. 1997.

Fisher, B., J. Bryant, *et al.* Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. J Clin Oncol, v.16, n.8, Aug, p.2672-85. 1998.

Fitzgibbons, P. L., D. L. Page, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med, v.124, n.7, Jul, p.966-78. 2000.

Ganem, G., M. Tubiana-Hulin, *et al.* Phase II trial combining docetaxel and doxorubicin as neoadjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. Ann Oncol, v.14, n.11, Nov, p.1623-8. 2003.

Gohring, U. J., A. Bersch, *et al.* p21(waf) correlates with DNA replication but not with prognosis in invasive breast cancer. J Clin Pathol, v.54, n.11, Nov, p.866-70. 2001.

Gschwind, A., O. M. Fischer, *et al.* The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer, v.4, n.5, May, p.361-70. 2004.

Han, S., S. B. Kim, *et al.* A phase II study of neoadjuvant docetaxel plus doxorubicin (KBCS-01) in stage II, III breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.98, n.1, Jul, p.57-61. 2006.

Harvey, J. M., G. M. Clark, *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. J Clin Oncol, v.17, n.5, May, p.1474-81. 1999.

Hayward, J. L., P. P. Carbone, *et al.* Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. Br J Cancer, v.35, n.3, Mar, p.292-8. 1977.

Hennessy, B. T., A. M. Gonzalez-Angulo, *et al.* Individualization of neoadjuvant therapy for breast cancer according to molecular tumor characteristics. Nat Clin Pract Oncol, v.2, n.12, Dec, p.598-9. 2005.

Jacobs, T. W., A. M. Gown, *et al.* Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. J Clin Oncol, v.17, n.7, Jul, p.1974-82. 1999a.

\_\_\_\_\_. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. J Clin Oncol, v.17, n.7, Jul, p.1983-7. 1999b.

Jones, S. M. e A. Kazlauskas. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. Oncogene, v.19, n.49, Nov 20, p.5558-67. 2000.

Kapranos, N., G. P. Stathopoulos, *et al.* p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. Anticancer Res, v.21, n.1B, Jan-Feb, p.521-8. 2001.

Kastan, M. B. Wild-type p53: tumors can't stand it. Cell, v.128, n.5, Mar 9, p.837-40. 2007.

Kaufmann, M., G. N. Hortobagyi, *et al.* Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. J Clin Oncol, v.24, n.12, Apr 20, p.1940-9. 2006.

Kourea, H. P., A. K. Koutras, *et al.* Expression of the cell cycle regulatory proteins p34cdc2, p21waf1, and p53 in node negative invasive ductal breast carcinoma. Mol Pathol, v.56, n.6, Dec, p.328-35. 2003.

Lane, D. P. e L. V. Crawford. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature, v.278, n.5701, Mar 15, p.261-3. 1979.

Learn, P. A., I. T. Yeh, *et al.* HER-2/neu expression as a predictor of response to neoadjuvant docetaxel in patients with operable breast carcinoma. Cancer, v.103, n.11, Jun 1, p.2252-60. 2005.

Maccallum, D. E., T. R. Hupp, *et al.* The p53 response to ionising radiation in adult and developing murine tissues. Oncogene, v.13, n.12, Dec 19, p.2575-87. 1996.

Mathoulin-Portier, M. P., P. Viens, *et al.* Prognostic value of simultaneous expression of p21 and mdm2 in breast carcinomas treated by adjuvant chemotherapy with anthracyclin. Oncol Rep, v.7, n.3, May-Jun, p.675-80. 2000.

Meek, D. W. Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. Cell Signal, v.10, n.3, Mar, p.159-66. 1998.

Mitchell, K. O. e W. S. El-Deiry. Overexpression of c-Myc inhibits p21WAF1/CIP1 expression and induces S-phase entry in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-sensitive human cancer cells. Cell Growth Differ, v.10, n.4, Apr, p.223-30. 1999.

Mitsuuchi, Y., S. W. Johnson, *et al.* The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signal transduction pathway plays a critical role in the expression of p21WAF1/CIP1/SDI1 induced by cisplatin and paclitaxel. Cancer Res, v.60, n.19, Oct 1, p.5390-4. 2000.

Montemurro, F. e M. Aglietta. Incorporating trastuzumab into the neoadjuvant treatment of HER2-overexpressing breast cancer. Clin Breast Cancer, v.6, n.1, Apr, p.77-80. 2005.

National Comprehensive Cancer Network (U.S.). The complete library of NCCN oncology practice guidelines. Rockledge, PA: NCCN: 1 CD-ROM p. 2000.

Niculescu, A. B., 3rd, X. Chen, *et al.* Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. Mol Cell Biol, v.18, n.1, Jan, p.629-43. 1998.

Nigro, J. M., S. J. Baker, *et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature, v.342, n.6250, Dec 7, p.705-8. 1989.

Ortega, S., M. Malumbres, *et al.* Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. Biochim Biophys Acta, v.1602, n.1, Mar 14, p.73-87. 2002.

Pellikainen, M. J., T. T. Pekola, *et al.* p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. J Clin Pathol, v.56, n.3, Mar, p.214-20. 2003.

Pinkas-Kramarski, R., L. Soussan, *et al.* Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. Embo J, v.15, n.10, May 15, p.2452-67. 1996.

Pommier, Y., O. Sordet, *et al.* Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. Oncogene, v.23, n.16, Apr 12, p.2934-49. 2004.

Press, M. F., L. Bernstein, *et al.* HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. J Clin Oncol, v.15, n.8, Aug, p.2894-904. 1997.

Rajan, R., A. Poniacka, *et al.* Change in tumor cellularity of breast carcinoma after neoadjuvant chemotherapy as a variable in the pathologic assessment of response. Cancer, v.100, n.7, Apr 1, p.1365-73. 2004.

Ramaswamy, B., S. P. Povoski, *et al.* Phase II trial of neoadjuvant chemotherapy with docetaxel followed by epirubicin in stage II/III breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.93, n.1, Sep, p.67-74. 2005.

Ravdin, P. M. e G. C. Chamness. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers--a review. Gene, v.159, n.1, Jun 14, p.19-27. 1995.

Ravdin, P. M., L. A. Siminoff, *et al.* Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. J Clin Oncol, v.19, n.4, Feb 15, p.980-91. 2001.

Rickardson, L., M. Fryknas, *et al.* Identification of molecular mechanisms for cellular drug resistance by combining drug activity and gene expression profiles. Br J Cancer, v.93, n.4, Aug 22, p.483-92. 2005.

Sachelarie, I., M. L. Grossbard, *et al.* Primary systemic therapy of breast cancer. Oncologist, v.11, n.6, Jun, p.574-89. 2006.

Serrano, M., A. W. Lin, *et al.* Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell, v.88, n.5, Mar 7, p.593-602. 1997.

Sjostrom, J., C. Blomqvist, *et al.* Predictive value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for chemotherapy response in advanced breast cancer. Clin Cancer Res, v.6, n.8, Aug, p.3103-10. 2000.

Slamon, D. J., G. M. Clark, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science, v.235, n.4785, Jan 9, p.177-82. 1987.

Slamon, D. J., W. Godolphin, *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science, v.244, n.4905, May 12, p.707-12. 1989.

Taucher, S., M. Rudas, *et al.* Influence of neoadjuvant therapy with epirubicin and docetaxel on the expression of HER2/neu in patients with breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.82, n.3, Dec, p.207-13. 2003.

Thor, A. D., S. Liu, *et al.* p(21WAF1/CIP1) expression in breast cancers: associations with p53 and outcome. Breast Cancer Res Treat, v.61, n.1, May, p.33-43. 2000.

Thuerigen, O., A. Schneeweiss, *et al.* Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. J Clin Oncol, v.24, n.12, Apr 20, p.1839-45. 2006.

Tiezzi, D. G., J. M. De Andrade, *et al.* Apoptosis induced by neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Pathology, v.38, n.1, Feb, p.21-7. 2006.

Toschi, L. e F. Cappuzzo. Understanding the new genetics of responsiveness to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. Oncologist, v.12, n.2, Feb, p.211-20. 2007.

Wallasch, C., F. U. Weiss, *et al.* Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. Embo J, v.14, n.17, Sep 1, p.4267-75. 1995.

Xiong, Y., G. J. Hannon, *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature, v.366, n.6456, Dec 16, p.701-4. 1993.

Yarden, Y. e M. X. Sliwkowski. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol, v.2, n.2, Feb, p.127-37. 2001.

Yu, D., T. Jing, *et al.* Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. Mol Cell, v.2, n.5, Nov, p.581-91. 1998.

Zhang, F., Y. Yang, *et al.* Correlation between HER-2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in patients with breast carcinoma. Cancer, v.97, n.7, Apr 1, p.1758-65. 2003.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)