

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

“Predição da Resposta à Quimioterapia Neo-adjuvante com Ciclina D1 e Proteína p21 no Tratamento Câncer de Mama Localmente Avançado”

***Aluno:* Renato Antonio Abrão**

***Orientador:* Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade**

**Dissertação Apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
Obtenção de Título de Mestre em Medicina,
Área de Ginecologia**

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Resumo

Avaliamos neste estudo as expressões da ciclina D1 e da proteína p21, pela técnica de Imuno-histoquímica, para detectar a presença destas proteínas nos núcleos das células do câncer de mama localmente avançado, com o objetivo de correlacionar a concentração destas proteínas com a resposta preditiva ao tratamento quimioterápico neo-adjuvante, utilizando o esquema docetaxel associado à epirrubicina.

A avaliação foi feita previamente e após a realização da quimioterapia neo-adjuvante. A avaliação pré-quimioterápica teve a finalidade de estabelecer um papel preditivo quanto à resposta ao tratamento primário. A avaliação pós-quimioterápica teve a finalidade de explorar a relação entre a persistência da proteína com intervalo livre de doença e sobrevida global.

Foram selecionados 72 casos de 162 tumores localmente avançados de mama atendidos no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2005, tratados por quimioterapia primária no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Conclusão: a ciclina D1 está relacionada com tumores menores, bem diferenciados e hormônio-sensíveis. Já a proteína p21 está relacionada a tumores pequenos, com estádios iniciais menores, de baixo grau histológico e hormônio-sensíveis. A expressão da ciclina D1 no tumor pré-tratamento quimioterápico não foi capaz de prever resposta à quimioterapia neo-adjuvante. No entanto, a presença da ciclina D1 e no tumor residual e da p21 tanto no tumor pré-tratamento quanto no tumor residual, sugerem melhora no intervalo livre de doença e na sobrevida global.

Abstract

We evaluate in this study the expressions of the cyclin D1 and the protein p21, with the technique of Immunohistochemistry, to detect the presence of these proteins in the cells of the local advanced breast cancer. The objective was correlate the concentration of these proteins with predictive response to the neo-adjuvant chemotherapy, using docetaxel associated with epirubicina.

The evaluation was performed before and after the neo-adjuvant chemotherapy. The evaluation before the neo-adjuvant treatment had the purpose to establish a predictive value of these proteins with primary treatment response. The evaluations after neo-adjuvant treatment had the purpose to explore the relation between the persistence of these proteins with disease-free survival and overall survival.

We selected 72 of 162 cases of local advanced breast cancer who had treated for primary chemotherapy in Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto in the period of January of 1998 to December of 2005.

Conclusion: Our study concluded that the cyclin D1 is related with small tumors and well differentiated and hormone-sensitive tumors. The protein p21 is relates with small tumors, initial stage tumors, low grade tumors and hormone-sensitive tumors. The expression of cyclin D1 in the tumor before the treatment failed to predict response to the neo-adjuvant chemotherapy. However, the presence of the cyclin D1 in the residual tumor and the protein p21 before the treatment and in the residual tumors suggest improvement in the disease- free survival and overall survival.

INTRODUÇÃO

1. Introdução.

Os tumores localmente avançados representam um grupo heterogêneo, que necessitam de avaliação clínica e tratamento especiais. Representam 5% dos casos diagnosticados de câncer de mama em países com centros de rastreamento mamográfico adequado, mas podem chegar a 30% dos casos iniciais onde a infra-estrutura é deficiente (Hortobagyi et al, 2000). Dentro desta classificação se encontram os tumores com mais de 5 cm de diâmetro, os que acometem pele e/ou musculatura torácica, os carcinomas inflamatórios e os tumores que apresentam acometimento axilar ao exame clínico (Singletary et al, 2002)

Até o final da década de 70 estes casos eram tratados, quando considerado operáveis, por mastectomia radical e em seguida eram submetidos à quimioterapia e radioterapia adjuvantes. Quando considerados inoperáveis empregava-se a radioterapia prévia à cirurgia que era, em alguns centros, seguida da quimioterapia adjuvante. Em meados da década de oitenta surgiram os primeiros estudos da aplicação e dos benefícios da quimioterapia neo-adjuvante no tratamento dos tumores localmente avançados. (Maur et al, 2006). Entretanto, observou-se nestes estudos iniciais que nem todas as pacientes respondiam da mesma forma ao tratamento e que a melhora em termos de sobrevida ocorria apenas no grupo que apresentava resposta patológica completa ou apenas tumor intraductal residual no material examinado. Tornou-se, então, relevante a investigação de marcadores preditivos de boa resposta clínica e patológica ao tratamento quimioterápico (Baumann, Kochli, 2000; Gajdos et al, 2002; Penault-Llorca, Vicent-Salomon, 2003; Maur et al, 2006).

O diâmetro do tumor, o acometimento da axila, a presença de receptores de estrogênio e progesterona, a expressão da proteína HER-2 e a idade da paciente são fatores preditivos e de prognósticos já reconhecidos e com o seu valor estabelecido (Munster, Norton, 2001; Tiezzi et al, 2007), embora com baixa acurácia para predição da resposta. Outros fatores ainda estão em fase de investigação. Neste grupo se encontram as proteínas e os genes ligados ao ciclo celular. Entre as proteínas destacam-se as ciclinas D1 e E, responsáveis pela transição das células da fase G1 para a fase S, e duas famílias de inibidores das quinases dependentes de ciclinas (CKI): p16 e p21 (Butt et al, 2005).

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quimioterapia Neo-adjuvante.

A quimioterapia é uma etapa praticamente obrigatória no tratamento do câncer de mama localmente avançado. Pode ser empregada antes ou após o tratamento cirúrgico. Os primeiros relatos do emprego da quimioterapia neo-adjuvante datam do final da década de setenta, no tratamento de carcinomas inflamatórios e em tumores inoperáveis. Na década de oitenta começou a ser prescrita para tumores localmente avançados, e recentemente está sendo utilizada em casos de doença inicial. (Von Minckwitz et al, 1997; Van der Hage et al, 2001; Sachelarie et al, 2006; Maur et al, 2006).

O objetivo primário da quimioterapia neo-adjuvante é possibilitar um procedimento cirúrgico conservador nos tumores localmente avançados. Entretanto, possibilita, também, o tratamento precoce de micrometástases e o conhecimento da resposta *in vivo* do tumor ao agente quimioterápico, sem piorar a sobrevida e o risco de recorrência da doença (Fisher et al, 1998; Pohl et al, 2003; Schwartz et al, 2005; Waljee et al, 2007), tornando esta modalidade de tratamento atraente tanto para a doença localmente avançada como para os casos iniciais da doença.

Os estudos iniciais não randomizados e com amostragens pequenas mostravam taxas de resposta clínica de redução do volume do tumor variando de 50 a 100%, com resposta patológica completa de 3 a 30%. As taxas de indicação de cirurgia conservadora variavam de 5 a 36% (Van der Hage et al, 2001; Sachelarie et al, 2006; Maur et al, 2006).

A estes estudos iniciais seguiram-se grandes estudos randomizados que consolidaram o papel da quimioterapia neo-adjuvante no tratamento dos tumores localmente avançados, mostrando, pelo menos, similaridade de resultados em termos de sobrevida global e de intervalo livre de doença em comparação com o esquema tradicional adjuvante (Popat et al, 2005). Entre os principais estudos estão o NSABP B18 (Fisher et al, 1997) que demonstrou taxas de resposta clínica (RC), resposta clínica completa (RCC) e resposta patológica completa (RPC) em torno de 80%, 36% e 9%, respectivamente, sem diferenças significantes em termos de sobrevida global (SG) e intervalo livre de doença (ILD) entre as duas modalidades de quimioterapia (SG: 79,6% x 80%, ILD: 66% x 67%).

Outro estudo importante foi o EORTC 10902 (Van der Hage et al, 2001) que mostrou taxas mais reduzidas de RC, RCC e RPC (49%, 7% e 4%), mas sem diferenças significativas em termos de SG e ILD entre os grupos que foram submetidos à quimioterapia primária versus tratamento adjuvante (SG em 5 anos: 82% x 84%).

Estes dois estudos mostraram, no entanto, que as pacientes que obtiveram resposta patológica completa após tratamento neo-adjuvante tiveram melhores resultados em termos de SG e ILD, o que categorizou a resposta patológica completa como fator prognóstico fundamental.

As drogas mais efetivas no tratamento neo-adjuvante, de forma geral, são as antraciclinas e os taxanos, que podem ser usadas em combinação ou em esquema seqüencial. Porém, à medida que se integram à seleção do tratamento fatores preditivos e de prognóstico tão diferentes como acometimento linfonodal, tamanho do tumor, infiltração angiolinfática, receptores hormonais, HER-2, Ki-67, bcl-2, TP53, entre outros, novas combinações e regimes vão surgindo na busca de uma resposta mais efetiva (Makris et al, 1997; Munster, Norton, 2001). Prevê-se que, no futuro, a escolha de um esquema específico será baseada nas características dos fatores preditivos presentes no tumor em avaliação (Vyzula et al, 2004; Prisack et al, 2005; Alassas et al, 2005; Denkert et al, 2006, Colozza et al, 2007).

A situação atual mais evidente é a das pacientes HER-2 positivas que apresentam em estudos iniciais taxas de respostas patológicas completas próximas a 65%, quando se associa o trastuzumab a uma antraciclina (Buzdar et al, 2005).

Os conhecimentos atuais indicam que poucas situações podem ser consideradas limitantes ao uso da quimioterapia. Entre elas estão: idade avançada (nestes casos, a hormonioterapia seria o tratamento mais adequado) e comorbidades que impossibilitem o uso de agentes quimioterápicos (Baumann, Kochli, 2000, Enger et al, 2006).

2.2 Fatores Preditivos no Tratamento do Câncer de Mama

Existem na gênese do tumor várias proteínas associadas à proliferação celular (Ki 67, PCNA), à ativação do ciclo celular (ciclina), à manutenção do ciclo celular (quinases dependentes de ciclina), à apoptose (Bcl 02, c-myc, p53), à degradação da matriz extracelular (metaloproteínas) e com a manutenção da adesividade celular (E-caderina). A amplificação dos genes produtores destas proteínas ou a superexpressão dos mesmos têm papel fundamental no crescimento tumoral, no poder de invasão do tumor, na sua capacidade de se desenvolver em outros órgãos, na resistência aos quimioterápicos e na resposta à radioterapia (Munster, Norton et al, 2001; Duffy et al, 2005; Henry, Hayes, 2006; Kröger et al, 2006, Dowsett et al, 2006). Sendo assim, estas proteínas têm sido empregadas como fatores prognósticos e para prever a resposta esperada para determinado tipo de tratamento.

Entre os estudos mais importantes na busca por fatores preditivos e prognósticos, alinha-se o EORTC 10994 (ensaio clínico randomizado) que avaliou vários possíveis marcadores preditivos e de prognóstico. O resultado mais importante foi observado nas pacientes que cujos tumores apresentavam a proteína p53 superexpressa evoluíram desfavoravelmente em comparação aos outros grupos (ILD e SG reduzidos) (Bonnetoi et al, 2003).

O NSABP-B27, em execução ainda, tem como proposta avaliar as mudanças na expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, do indicador de proliferação Ki-67, da forma mutada da proteína p53, da expressão dos genes pró-apoptóticos bcl-2 e do HER-2 antes e após tratamento quimioterápico primário, e como estas variações estarão relacionadas com boa resposta do tumor ao tratamento (Maur et al, 2006).

2.3 Ciclo Celular e Ciclinas da Fase G1

O ciclo celular das células malignas do câncer de mama abrange as mesmas fases consecutivas das células normais. Estas fases são G1, em que as células preparam sua maquinaria para a replicação; Fase S, em que a duplicação da informação genômica ocorre; G2, último ponto de intervenção e interrupção do ciclo celular; e fase M, em que a divisão real (e conseqüentemente a proliferação) ocorre. As células geradas assim podem começar um ciclo novo ou permanecer em estado de latência, conhecido como fase G0. Cada fase deve ser terminada antes de iniciar-se a seguinte. A grande diferença entre o ciclo das células normais e das neoplásicas é o grande potencial proliferativo das últimas, resultado muito provável do controle danificado dos elementos de controle (“check-points”) do ciclo celular. Estes “check-points” estão sujeitos ao controle interno nas células normais e suas atividades se modificam de acordo com estímulos externos (Fernandez et al, 1998; Jong et al, 1999, Caldon et al, 2006).

Duas famílias de proteínas e seus genes regulam o ciclo celular: as ciclinas e as quinases ciclina-dependentes (CDK), cuja síntese, interação e ativação seqüencial resultam na ativação de diferentes fatores de transcrição e na progressão do ciclo celular. As ciclinas são proteínas transcritas e traduzidas em um determinado momento do ciclo celular, especializadas na ativação de CDKs (Fernandez et al, 1998). As quinases ciclina-dependentes (CDK) são proteínas que, ao se ligarem a ciclinas específicas, são ativadas, tornando-se capazes de adicionar grupo fosfato a certos resíduos de aminoácidos de proteínas-alvo específicas, cuja fosforilação pode levar à alteração da atividade dessas proteínas-alvo (Fernandez et al, 1998, Caldon et al, 2006).

Diferentes ciclinas estão presentes em diferentes fases do ciclo celular, ativando quinases específicas que, através da fosforilação são então capazes de induzir a continuidade do ciclo celular. As ciclinas D1, D2 E D3 ativam CDK4 e CDK6 e conduzem as células em G0 para G1 e através de G1. A ciclina E ativa CDK2 e conduz essas células no final de G1 e no início da fase S. A ciclina A ativa CDK2 e conduz através da fase S intermediária e ativa CDK1 conduzindo as células pelo final da fase S e início de G2. Por fim, a ciclina B ativa CDK1 que é responsável pela transição de G2 para M (Fernandez et al, 1998; Barnes, Gillett, 1998, Caldon et al, 2006).

Outro grupo importante de moduladores do ciclo celular são as CKIs (proteínas inibidoras de quinases ciclina-dependentes). A descoberta destas CKIs forneceu um paradigma novo para o controle do crescimento celular, que liga os eventos bioquímicos que cercam a interrupção do ciclo celular com os vários processos fisiológicos, incluindo a resposta celular aos danos do DNA, resposta aos sinais inibitórios do crescimento, supressão da tumorigênese, envelhecimento celular e diferenciação (Barnes, Gillett, 1998; Jong et al, 1999).

As CKIs são divididas em duas famílias, os p16INK4-p15INK4B e os p21WAF1-p27KIP1. Devido à sua atividade inibitória da progressão do ciclo celular, as CKIs são consideradas supressores tumorais. A primeira CKI implicada na carcinogênese foi a p16, que é conhecida também como INK4 e atua bloqueando a ligação das ciclinas D com o CDK 4/6. Já a família p21 atua bloqueando todos os complexos ciclinas/CDKs. O p21cip1/waf1 é conhecido por inibir a atividade do complexo ciclina D1-CDK4. É regulado pela proteína p53, através da ligação direta destas proteínas, e tem como função interromper o ciclo celular na fase G1 e promover a diferenciação celular (Barnes, Gillett, 1998; Jong et al, 1999).

O ciclo celular tem diversos pontos de verificação que são controlados por um sistema complexo cada vez mais compreendido de moduladores. Um dos mais bem estudados caminhos de regulação do ciclo celular é o que envolve o produto do gene do retinoblastoma (proteína RB), regulador negativo da transição de G1 para S, o qual é inativado por diferentes mecanismos, incluindo a sua fosforilação através da ação do complexo ciclina D/CDK 4/6 (mecanismo mais importante). (Fernandez et al, 1998; Barnes , Gillett, 1998; Jong et al, 1999)

A família D das ciclinas (D1, D2, D3) se liga aos CDKs 4/6, levando a fosforilação parcial de vários substratos, incluindo a proteína RB. A fosforilação parcial da RB (pRB) resulta na liberação de fatores de transcrição, principalmente os que pertencem a família de E2F, que por sua vez ativam vários genes responsáveis pela síntese de DNA e pela progressão do ciclo para a fase S (Barnes, Gillett, 1998; Roy, Thompson, 2006). O gene da ciclina E é ativado pela E2F, levando ao aumento na produção da ciclina E na fase final de G1. A ciclina E então se liga a CDK2, e este complexo termina a fosforilação da pRB, criando ainda um “feedback” positivo e contribuindo para a irreversibilidade da transição da fase G1 para S (Barnes, Gillett, 1998; Roy, Thompson, 2006).

O complexo Ciclina D/CDK 4/6 além de atuar na fosforilação da pRB, tem um segundo papel no ciclo celular que é de seqüestrar e degradar a p27 e p21. Essas CKIs livres bloqueiam a ligação da Ciclina E com o CDK2. Com isso o complexo ciclina E-CDK2 tem sua ação facilitada no final da fase G1. Apenas a p16 atua inibindo a ligação da ciclina D com o CDK4. Ela é estimulada pela presença da proteína RB fosforilada e pela presença do E2F (Figura 1) (Barnes, Gillett, 1998; Roy, Thompson, 2006).

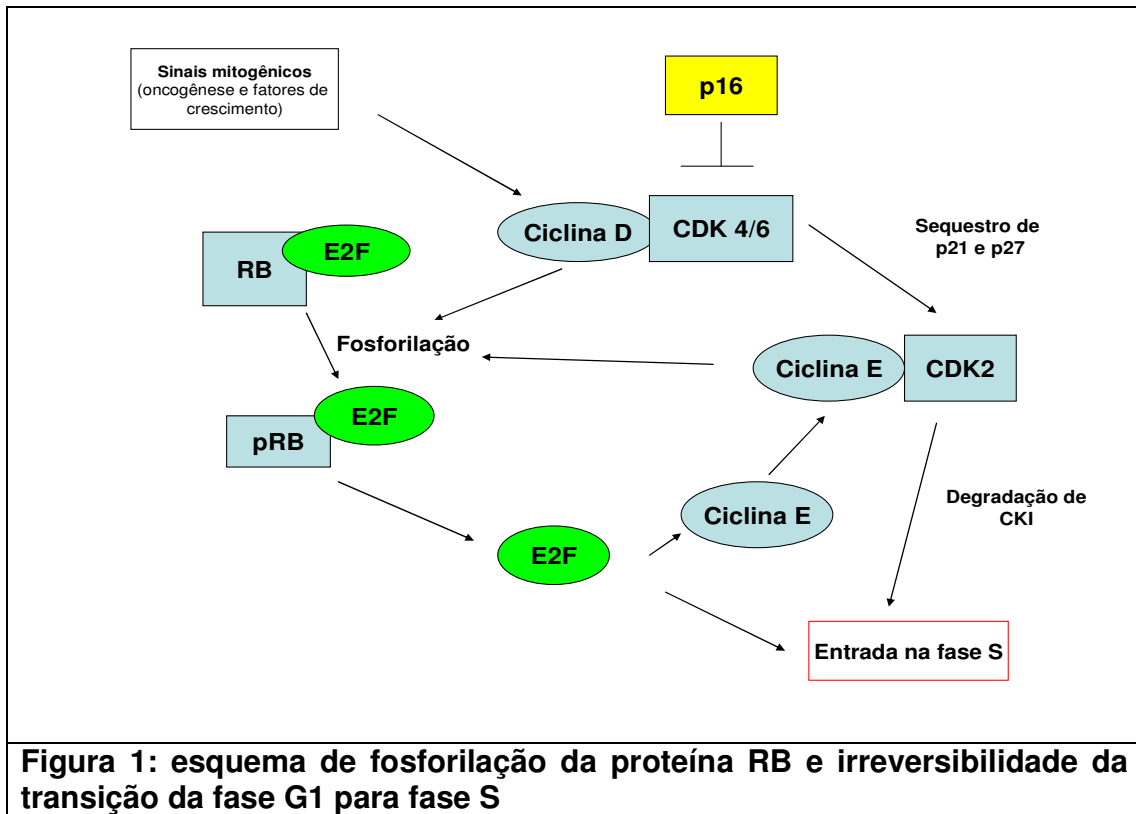


Figura 1: esquema de fosforilação da proteína RB e irreversibilidade da transição da fase G1 para fase S

2.4 Ciclina D1

O gene codificador da Ciclina D1 (CCND1) se localiza no cromossomo 11 (11q13), mesma região em que se encontram outros oncogenes que quando amplificados estão associados a aproximadamente 15% dos cânceres de mama (Umekita, Yoshida, 2000; Sutherland, Musgrove, 2004). Ele é considerado um protooncogene com capacidade de desenvolver hiperplasias e adenocarcinomas em ratas. Sabe-se que 15 a 20% dos casos de carcinoma de mama apresentam o CCND1 amplificado. Entretanto, sua proteína encontra-se superexpressa em aproximadamente metade dos casos de câncer de mama (Barnes, Gillett, 1998; Naidu et al, 2002; Balasenthil et al, 2004; Sutherland, Musgrove, 2004). Isto demonstra que nem sempre a amplificação gênica está correlacionada com a superexpressão da proteína.

A superexpressão de ciclina D1 é explicada pela ação externa de fatores do crescimento incluindo o IGF-I e o IGF-II, de aminoácidos, de hormônios (androgênios, estrogênios, gastrina), oncogenes (Ras, Src, ErbB2, STATs), e alguns antígenos virais (vírus 40t), que levariam a um aumento da transcrição desta proteína sem a necessidade de ocorrer amplificação gênica (Lebeau et al, 2003; Maofu et al, 2004).

Por muito tempo acreditou-se que a ciclina D1 tinha como função apenas a aceleração da transição do ciclo celular de G1 para S, através de mecanismos bem conhecidos, já citados anteriormente e denominados agora como função CDK-dependente. Porém, nos últimos anos, alguns estudos mostraram um papel novo da ciclina D1, independente da sua ligação as CDK 4/6, que é a de promover a ativação de outros oncogenes, estimulando a proliferação celular de forma indireta (função CDK-independente) (Fernandez et al, 1998; Sutherland, Musgrove, 2004; Roy, Thompson, 2006).

A função CDK-dependente está diretamente relacionada à presença de estrogênio. O mecanismo pelo qual o estrogênio induz o câncer de mama é através da ativação da transcrição da ciclina D1 (Barnes, Gillett, 1998). Mas o mecanismo pelo qual o estrogênio atua no gene da ciclina D1 promovendo a atividade transcricional não está muito claro. Acredita-se que seja via ativação de receptores de estrogênio (RE), porém não há confirmação que o gene CCND1 tenha RE. Após a indução da produção da ciclina D1 pelo estrogênio, esta proteína irá se ligar a CDK 4/6 e desencadear todos os processos para facilitação da transição da fase G1 para S, como a fosforilação parcial da proteína RB e o seqüestro e depleção da p21 e p27 facilitando a ação do complexo ciclina E/CDK2 (Lamb et al, 2000; Roy, Thompson, 2006).

A função CDK-independente ocorre em tecidos responsivos ao estrogênio, mesmo na ausência de estrogênio. A ciclina D1, sem estar ligada a uma CDK, atua ativando os receptores de estrogênio (RE) e assim proporcionando a proliferação celular. Ao se ligar ao RE, ela promove uma ponte entre o receptor de estrogênio e co-ativadores de fatores transcricionais, resultando numa regulação positiva dos mesmos. A ligação entre o RE e co-ativadores da família SRC-1 mediada pela ciclina D1 é um dos caminhos mais conhecidos do mecanismo CDK-independente (Sutherland, Musgrove, 1998; Barnes, Gillett, 1998; Bernards, 1999; Roy, Thompson, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado que este mecanismo ocorre com vários fatores transcricionais: receptores de androgênio, DMP1, STAT3, BETA2/NeuroD, C/EBP β , que podem ser os responsáveis pelos casos de falha de resposta aos anti-estrogênios. Entretanto, novos estudos são necessários para melhor entendimento destes mecanismos (Sutherland, Musgrove, 1998; Barnes, Gillett, 1998; Bernards, 1999; Maofu et al, 2004; Roy, Thompson, 2006).

O primeiro tumor no qual se relatou a participação da ciclina D1 na sua gênese foi o adenoma de paratireóide, ocorrendo neste caso uma translocação cromossômica entre o locus 11q13 (da ciclina D1) e o locus 11p15 (hormônio da paratireóide) (Maofu et al, 2004). Em seguida, foram observados translocações envolvendo o locus 11q13 com determinados tipos de linfomas (Fernandez et al, 1998; Maofu et al, 2004). Nos tumores sólidos, a forma mais freqüente de ativação da ciclina D1 é pela amplificação de seu gene, levando ao aumento de sua transcrição. Entretanto, no câncer de mama, conforme citado anteriormente, a amplificação está presente em apenas 15 a 20% dos casos, enquanto a superexpressão da proteína está presente em aproximadamente 50% dos casos (Fernandez et al, 1998; Park et al, 2001; Maofu et al, 2004).

Em relação ao câncer de mama, os estudos clínicos recentes mostraram uma associação positiva entre a presença da ciclina D1 superexpressa nas células tumorais e a presença de receptores de estrogênio, diferenciação tumoral, baixo grau tumoral, diâmetro tumoral pequeno, ILD e SG longos. (Barnes, Gillett, 1998; Umekita, Yoshida, 2000; Sutherland, Musgrove, 2004).

Em um estudo no qual foram avaliados 175 casos de cânceres de mama primários, o objetivo foi investigar o valor prognóstico do tumor baseado na presença ou na de ciclina D1 e receptores de estrogênio. Foi encontrada relação positiva, com significância, na superexpressão conjunta da ciclina D1 e do receptor de estrogênio. Os casos que apresentavam estes dois marcadores positivos mostraram grau histológico baixo, segundo o índice de Bloom e Richardson's, diâmetro tumoral inicial menor e maior sobrevida global (Hwang et al, 2003).

No estudo de Utsumi et al em 2000, foram avaliados 97 casos de câncer de mama para correlacionar a presença de ciclina D1 com melhora de sobrevida e tempo livre de doença. Seus resultados mostraram uma correlação positiva entre ciclina D1 e sobrevida global ($p= 0,015$) e tempo livre de doença ($p= 0,002$), concluindo que a expressão aumentada da ciclina D1 poderia ser um fator isolado preditivo para ILD e SG.

Um achado comum na literatura e que gera muitas controvérsias é a diferença de valor prognóstico dado a superexpressão da ciclina D1 e a amplificação de seu gene. Os estudos sugerem que superexpressão da ciclina D1 é um fator de bom prognóstico para o câncer invasivo de mama, associado à melhora no ILD e SG em pacientes com tumores RE positivos. Já a amplificação do CCND1 é tida com fator de mau prognóstico (Naidu et al, 2002; Hwang et al, 2003; Roy, Thompson, 2006). Esta controvérsia sobre o valor prognóstico diferente da proteína superexpressa e da amplificação do gene ocorre pela falta dos estudos que avaliam as duas variáveis simultaneamente e pelas diferenças de

técnicas para detecção destas moléculas (Barnes, Gillett, 1998; Lebeau et al, 2003; Balasenthil et al, 2004; Sutherland, Musgrove, 2004).

Devido à forte correlação da ciclina D1 com tumores hormônio dependentes, a maioria dos estudos busca sempre uma correlação preditiva entre a presença da ciclina D1 e a resposta ao tratamento com antiestrogênios, havendo apenas um grande estudo na literatura no qual se avalia a presença de ciclina D1 e resposta preditiva ao tratamento quimioterápico. Neste estudo (EORTC 10994) tentou-se identificar possíveis marcadores preditivos de resposta a quimioterapia neo-adjuvante com antraciclinas. Foi composto por 448 pacientes com cânceres de mama localmente avançados ou metastáticos tratadas inicialmente com quimioterapia. Foram avaliadas as presenças da proteína p53, o HER-2, a ciclina D1, o p21, um indicador de proliferação (MIB) e os receptores hormonais, todos pela técnica de imuno-histoquímica. Os resultados fase II mostraram que a ausência de expressão da ciclina D1 está correlacionada a baixas taxas de resposta clínica completa do tumor à quimioterapia neo-adjuvante, mas não se encontrou correlação com ILD e SG (Bonnefoi et al, 2003).

Os antiestrogênios, sendo o tamoxifeno o principal representante, atuam inibindo a entrada das células na fase S. Ligam-se aos receptores de estrogênio bloqueando-os e, assim, inibindo a função CDK-dependente da ciclina D1. Não ocorrendo a fosforilação da proteína RB e a degradação da p21 e p27, passos fundamentais para a transição da fase G1 para S (Roy, Thompson, 2003).

Baseado nestes resultados seria possível supor que a expressão aumentada de ciclina D1 indicaria boa resposta aos antiestrogênios. Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que a ciclina D1 superexpressa acaba levando a uma inversão do efeito anti-proliferativo do tamoxifeno (Sthendahl et al, 2004; Roy, Thompson, 2006). Outra hipótese está relacionada à função CDK-independente da ciclina D1, que mesmo sem a sua ativação normal no ciclo celular, atuaria ativando fatores transcricionais que induziriam a proliferação celular (Barnes, Gillett, 1998; Bernards, 1999; Sutherland, Musgrove, 2004; Maofu et al, 2004). Porém mais estudos, com casuísticas maiores e com tempo maior de seguimento, são necessários para confirmar estas hipóteses.

2.5 Proteína p21

O ciclo de dimerização, ativação e dissociação do complexo ciclina-CDK são eventos importantes que controlam a progressão do ciclo celular. A progressão depende de “check-points” que asseguram que o ciclo celular não progrida caso haja defeitos genéticos graves, impedindo a multiplicação de células instáveis e formação de linhagens com potencial cancerígeno. Alguns desses pontos críticos do ciclo celular estão na fase G1, antes da entrada na fase S (síntese do DNA), e em G2, antes da M (mitose), quando ocorre a passagem de G2 para M (Fernandez et al. 1998; Jong et al, 1999). Os complexos CDK/Ciclina atuam como engrenagens que acionam a progressão celular de uma fase do ciclo para outra.

Esses pontos são monitorados por certos mecanismos de controle, os “check-points”: definidos como vias genéticas e bioquímicas capazes de levar a um bloqueio na progressão do ciclo celular, em resposta a erros internos ou agentes externos, de maneira a tentar manter a integridade do genoma e permitir a conclusão bem sucedida dessas fases da mitose. Tais mecanismos são, portanto, capazes de interromper o ciclo até que a fase esteja concluída, ou o reparo tenha sido feito, ou tenha ocorrido a morte celular. A ausência desses mecanismos de controle pode levar à morte celular, a erros na distribuição dos cromossomos ou organelas e a uma maior susceptibilidade a influências ambientais, como de agentes causadores de danos ao DNA (Jong et al, 1999; Russell et al, 1999).

Uma série de CKIs estão envolvidos na regulação desses “check-points”. Certos produtos gênicos como p16, p15 e p18, inibem certas quinases ciclina D-dependentes específicas podendo levar à parada em G₁. Outros, como p21, inibem todas as quinases e podem parar o ciclo em vários pontos (Jong et al, 1999; Russell et al, 1999).

A p21 é uma CKI implicada nos mecanismos de controle do ciclo celular que permitem a reparação do DNA. É responsiva ao tipo selvagem da proteína p53, mas não ao tipo mutante. Ela bloqueia a transição do G₁ à fase de S e suprime a proliferação celular. Em tumores esporádicos de mama a expressão de p21 tem correlação inversa com a expressão p53 e o grau do tumor. Parece estar relacionada à diferenciação celular em diversos modelos de tumores. Embora as mutações do gene p21 sejam raras, a superexpressão da p21 é vista freqüentemente nos carcinomas de mama. (Jong et al, 1999; Heikkila et al 2000; Balasenthil et al, 2004)

A superexpressão da p21 geralmente vem associada à superexpressão da ciclina D1, o que sugere controle negativo de uma proteína em relação à outra, sendo a ciclina D1 regulador positivo do ciclo celular e a p21 regulador negativo. Por este mecanismo, os efeitos da superexpressão da ciclina D1 podem ser neutralizados, bloqueando a proliferação celular e permitindo que as células se diferenciem (Jong et al, 1999; Heikkila et al, 2000; Balasenthil et al, 2004; Roy, Thompson et al, 2004).

A p21 está expressa em torno de 60% dos tumores de mama e associa-se a tumores com receptores de estrogênio positivo, de baixo grau histológico, bem diferenciados e que geralmente respondem bem aos antiestrogênios (Reed et al, 1999). Porém o valor preditivo e prognóstico da expressão p21 não está totalmente claro, existindo discordâncias em diferentes estudos, e em relação a diferentes graus de expressões da proteína no tumor avaliado, necessitando ainda de novos dados para melhor compreensão desta proteína (Lebeau et al, 2003).

Avaliaremos neste estudo as expressões da ciclina D1 e da CKI p21, aplicando a técnica de imuno-histoquímica, para detectar os núcleos tumorais marcados por estas proteínas, e tentar correlacionar a suas concentrações com a resposta preditiva ao tratamento quimioterápico neo-adjuvante (utilizando o esquema docetaxel associado a epirrubicina). Verificaremos, também, a existência de correlação da presença destas proteínas com outros marcadores já estabelecidos.

OBJETIVO

3. Objetivo do trabalho

Os objetivos deste estudo são:

- Avaliar a porcentagem de tumores avançados com expressão de Ciclina D1 e P21 antes e após o tratamento quimioterápico neoadjuvante.
- Correlacionar a presença de Ciclina D1 e P21 com a taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante em tumores de mama localmente avançados
- Verificar a relação entre a presença destas proteínas e a sobrevida livre de doença e a sobrevida global em pacientes com tumores localmente avançados.

PACIENTES E MÉTODOS

4. Pacientes e Métodos

Foram selecionados 72 casos de tumores localmente avançados de mama atendidos no ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2005 e tratados por quimioterapia primária.

4.1 Critérios de Inclusão

As pacientes selecionadas preenchem os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 75 anos, diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma invasor de mama, estadios clínicos IIA (tumores com menos de 5 cm de diâmetro mas que justifiquem o tratamento neo-adjuvante na tentativa de cirurgia conservadora), IIB, IIIA e IIIB pelos critérios da UICC e não terem recebido qualquer tipo de tratamento antitumoral prévio à inclusão. Os casos selecionados deviam ter material do tumor fixado em bloco de parafina (biópsia pré-tratamento e material obtido após o tratamento quimioterápico primário).

As pacientes deveriam apresentar Karnofsky status maior que 80, não apresentar alteração nos exames para avaliação de comprometimento feitos de rotina (manutenção de creatinina < 1,5 mg/dl, número de granulócitos superior a 1500/mm³, enzimas hepáticas normais, eletrólitos normais, urina tipo I não infecciosa) e terem recebido pelo menos dois ciclos de quimioterapia.

Foram incluídos os casos com tumores considerados localmente avançados (não operáveis com cirurgia radical primária) ou que eram inicialmente operáveis, mas por recusa da paciente ou por tentativa de preservação da mama (relação tumor x mama desfavorável) foi administrada a quimioterapia neo-adjuvante.

4.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo as pacientes que abandonaram o seguimento (motivos particulares ou óbito antes do período pré-determinado para avaliação pós-quimioterapia), estágio IV (metástase) comprovado na fase de estadiamento, os casos tratados com outros esquemas de quimioterapia ou hormonioterapia e as pacientes que não foram submetidas a tratamento cirúrgico ou biópsia incisional ao término do tratamento neo-adjuvante.

As informações sobre os casos selecionados foram obtidas de prontuários, de laudos de exames anátomo-patológicos e de fichas para registro da evolução dos tumores durante o tratamento. Esta coleta reuniu dados necessários para estadiamento e para avaliação da evolução e das intercorrências durante o tratamento inicial com quimioterapia, e para avaliação dos exames de rastreamento de metástase (raios-x de tórax, cintilografia óssea e ultra-sonografia abdominal).

4.3 Caracterização da Amostra

O número de casos novos de câncer de mama localmente avançado tratados com quimioterapia neo-adjuvante (esquema docetaxel associado à epirrubicina) no período citado foi de 162. Entretanto, parte foi excluída por ter sido tratada recentemente, não permitindo avaliação de recorrência; em outra parte (cerca de 60 casos) não havia material disponível na época do protocolo. Incluímos no estudo 72 pacientes, sendo a média de idade destas pacientes de 49 anos no momento da realização da consulta inicial (24 a 79 anos) e 43% eram menopausadas.

Em relação ao estadiamento, 39 pacientes (54,16%) foram classificados em estágio II no momento do diagnóstico, sendo que 13 casos estágio IIA e 26 casos estágio IIB. Dos 33 casos (45,8%) no estágio III, 12 eram IIIA e 23 IIIB, não havendo nenhum caso classificado como IIIC. O diâmetro médio dos tumores foi de 5,5 cm (1,9 a 15 cm).

Em relação ao tipo histológico dos tumores, o exame anátomo-patológico mostrou que o adenocarcinoma ductal invasivo sem outras especificações foi o predominante na maioria dos casos (63 casos, totalizando 87,5% do total). Em cinco pacientes (6,9%) foi diagnosticado o subtipo adenocarcinoma lobular invasivo. Os subtipos histológicos especiais compuseram 5,5% dos casos (seis pacientes), com um caso de adenocarcinoma papilífero, dois casos de carcinoma medular e um caso de adenocarcinoma colóide. Em relação ao grau de diferenciação tumoral segundo os critérios de Bloom & Richardson, 15 casos (21,4%) eram bem diferenciados, 36 casos eram pouco diferenciados (51,4%), e 19 casos (27,2%) eram indiferenciados. Em dois casos não foi possível a

especificação do grau histológico. A expressão de receptores de estrógeno foi considerada positiva em 47 casos (65,3% das pacientes), e a de progesterona foi positiva em 39 casos (55,7%).

4.4 Tratamento Quimioterápico

O esquema quimioterápico realizado foi a associação de docetaxel (taxotere) 75 mg/m² e epirrubicina 60 mg/ m², ambas infundidas em 1h, por via intravenosa, em dose única, a cada 21 dias, com total de 3 ciclos em média, na Central de Quimioterapia Ambulatorial. Previamente à quimioterapia foi administrado esquema de dessensibilização, para evitar alguns efeitos adversos ao taxotere (administração via oral de dexametasona por dois dias antes da quimioterapia, 4 mg de 8/8h). Nos trinta minutos que precediam à quimioterapia, administravam-se 10 mg de dexametasona via endovenosa, 5 mg intramuscular de dextroclorfeniramina e 8 mg de ondansetrona via endovenosa.

4.5 Tratamento Cirúrgico

As pacientes foram submetidas a tratamento conservador ou radical baseado na resposta clínica do tumor ou baseado na correlação do volume tumoral e do volume mamário remanescente. Em todos os casos foram obtidas margens cirúrgicas livres de neoplasia, mesmo que houvesse a necessidade de um segundo ou terceiro tempo de cirurgia. Os casos tratados com cirurgia conservadora foram submetidos à radioterapia como tratamento adjuvante local e nos casos de mastectomia a radioterapia foi indicada baseado em critérios já estabelecidos, tais como tumores com mais de 5 cm de diâmetro, axila com mais de 4 linfonodos positivos, neoplasias que acometiam pele ou parede torácica e tumores indiferenciados.

4.6 Avaliação da resposta tumoral.

A avaliação da resposta tumoral ao tratamento foi essencialmente clínica, tendo sido utilizado um paquímetro como instrumento de medição. Foram aferidos os dois maiores diâmetros perpendiculares do tumor e em seguida feito o cálculo do produto destas medidas. Imediatamente antes de cada ciclo de quimioterapia, uma nova avaliação das medidas tumorais era realizada para acompanhamento da resposta ao tratamento.

Quando houve associação de outros sinais, como hiperemia, edema (“peau d’orange”) ou ulceração da pele, também foram aferidas as medidas dos dois maiores eixos perpendiculares e calculados seus produtos, para inclusão como dado de análise de resposta ao tratamento.

A mudança de diâmetros dos linfonodos axilares não foi considerada como resposta clínica objetiva isoladamente (foram consideradas apenas as medidas diretas do tumor). A resposta clínica ao tratamento neoadjuvante foi categorizada em resposta completa, parcial, estável ou progressiva (Quadro 1).

| | |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Completa | Ausência de tumor clinicamente detectável após a quimioterapia; |
| Parcial | Diminuição maior ou igual a 50% do produto dos eixos perpendiculares; |
| Estável | Diminuição menor que 50% do produto dos eixos ou aumento de até 25% dos mesmos |
| Progressiva | Aumento de mais de 25% no produto dos eixos perpendiculares. |

Quadro 1: Avaliação clínica de resposta tumoral (Fisher et al, 1997)

4.7 Seguimento Clínico

Após o término do tratamento as pacientes foram avaliadas periodicamente no Ambulatório de Mastologia da FMRP-USP. No primeiro ano os retornos foram trimestrais, no segundo e terceiro anos foram semestrais e a partir daí passaram a ser anuais.

A história clínica e o exame físico dirigido eram realizados em todos os retornos. Uma nova reavaliação mamográfica era feita rotineiramente 6 meses após o término da radioterapia (ou 6 meses após a cirurgia no caso de pacientes sem indicação para a radioterapia adjuvante) e a partir de então anualmente, ou em intervalos menores se houvesse indicação. Exames de imagem complementares somente foram realizados com indicação clínica específica (suspeita de recidiva local ou quaisquer outras dúvidas que não se esclareceram somente com a mamografia).

4.8 Técnica de Imuno-Histoquímica

De cada paciente foi obtida uma amostra de tecido pré-tratamento e pós-tratamento quimioterápico (até 4 semanas após). Este tecido foi fixado em bloco de parafina e devidamente armazenado no Setor de Patologia da FMRP-USP. Do tecido fixado em parafina foram avaliadas a presença de ciclina D1, p21 e receptores hormonais pela técnica de imuno-histoquímica descrita a seguir.

Inicialmente foram obtidas secções de 4 μm do bloco de parafina selecionado, montado em poli-L-lisina. Os cortes foram desparafenizados em xilol e fixados em etanol absoluto. Após tratamento com peróxido de hidrogênio 0.3% em metanol para quelar a atividade das peroxidases endógenas, os cortes foram lavados com PBS (phosphate-buffered saline). A imunomarcação foi precedida de incubação com tampão citrato 10mM (200 ml/20 cortes) por sete minutos à potência mais alta do forno microondas. O anticorpo monoclonal primário é específico para cada ensaio. Após, os cortes foram novamente lavados em PBS e recobertos com anticorpo secundário “antimouse” biotinilado por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de três lavagens adicionais, os cortes foram incubados com o complexo amplificador de polímero Novolink por 60 minutos também à temperatura ambiente. A contra coloração utilizada foi a hematoxilina de Harris. Foram utilizados controles positivos e negativos específicos para cada substância testada.

Os anticorpos monoclonais utilizados na detecção de cada proteína estão especificados no Quadro abaixo:

| | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Receptor de Estrogênio | Anticorpo monoclonal de rato |
| | Clone: 6F11 |
| | Código: NCL-ER-6F11 |
| | Novocastra |
| P21 | Waf 1 Protein (p21) |
| | Clone: 4D10 |
| | Código: NCL-WAF-1 |
| | Novocastra |
| Ciclina D1 | Cyclin D1 |
| | Clone: P2D11F11 |
| | Código: NCL-CYCLIN D1-GM |
| | Novocastra |
| Receptor de Progesterona | Anticorpo monoclonal de rato |
| | Clone: 16 |
| | Código: NCL-PGR-312 |
| | Novocastra |

Quadro 2: Indicadores de prognóstico empregados para caracterização da amostra

4.9 Leitura das lâminas de imuno-histoquímica

Em cada lâmina foram contadas em média 500 células em campos de grande aumento, tendo sido realizadas com o consenso de dois leitores diferentes. Antes da leitura foi feito treinamento, estabelecimento dos critérios de contagem e do padrão de marcação de cada anticorpo.

A Ciclina D1 (CD1) foi considerada positiva nas lâminas que apresentassem pelo menos 10% dos núcleos marcados com o anticorpo (Van der Hage et al, 2001; Lebeau et al, 2003). Somente os núcleos moderadamente ou fortemente marcados foram contados. Os casos positivos foram divididos em grupos quantitativos para posterior avaliação de diferenças estatísticas baseado na intensidade de marcação desta proteína: 0+ (menos de 10% dos núcleos positivos), 1+ (10 a 25% positivos), 2+ (26 a 50%), 3+ (51 a 75%) e 4+ (76 a 100%) (Figuras 2: A,B,C,D,E) (Gillet et al, 1994; Vos et al, 1999; Yang et al, 2004; Bilalovic et al; 2005).

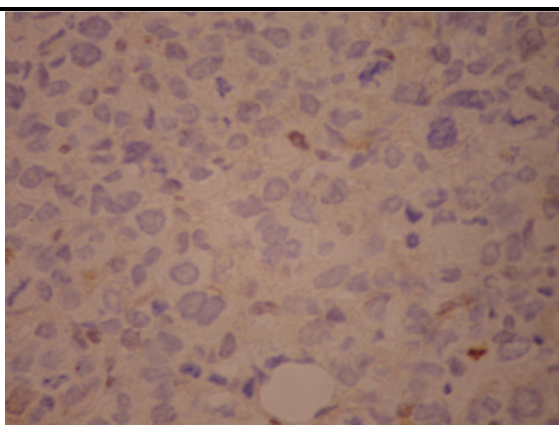


Figura 2A: Menos de 10% de Marcação

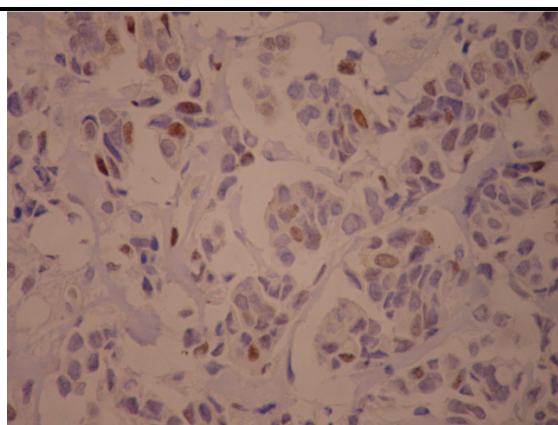


Figura 2B: 10 A 25% de Marcação

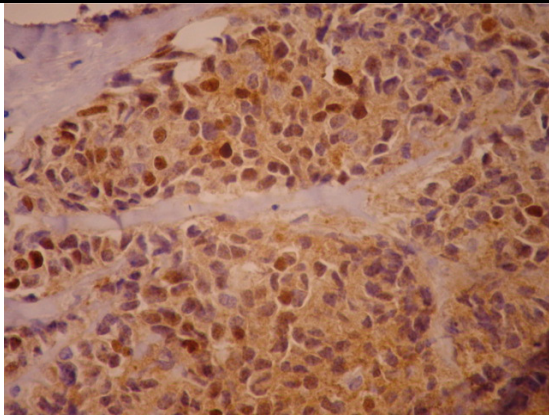


Figura 2C: 25 a 50% de marcação

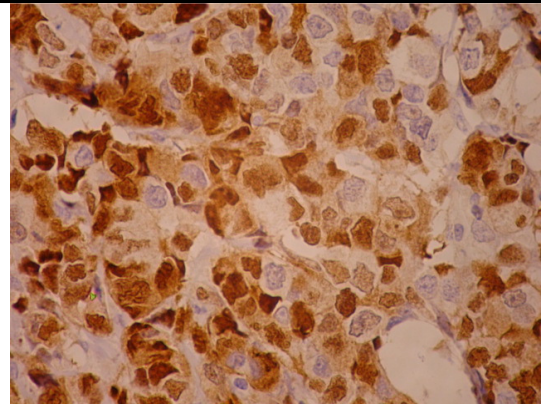


Figura 2D: 50 a 75% de marcação

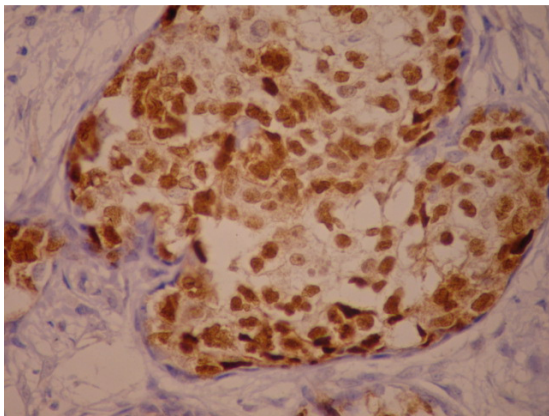


Figura 2E: Mais de 75% de marcação

Figura 2: Níveis de expressão da proteína ciclina D1 nos núcleos das células neoplásicas.

A proteína p21 foi considerada positiva nas lâminas que apresentavam mais de 10% dos núcleos das células tumorais marcados e com intensidade de marcação de moderado a forte (Figuras 3A e 3B) (Russell et al, 1999; Heikkila et al, 2000; Lebeau et al, 2003).

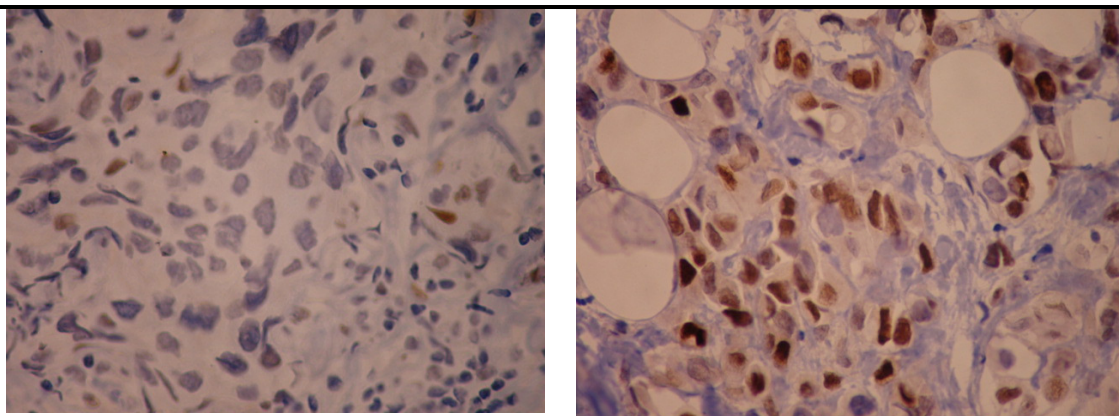


Figura 3A: menos de 10% marcadas

Figura 3B: mais de 10% marcadas

Figura 3: Níveis de expressão da proteína p21 nos núcleos das células neoplásicas.

Para receptores de estrógeno e progesterona, foram consideradas positivas as amostras com expressão dos receptores em mais de 10% das células tumorais nas amostras prévias e ao término do tratamento quimioterápico.

4.10 Análise Estatística

Na análise estatística utilizamos o software GraphPad Prisma versão 4.0. Para a análise da relação das variáveis qualitativas (status menopausal, expressão de receptores de estrógeno e progesterona, p21, ciclina D1) foi usado o teste exato de Fisher. Na análise de variáveis quantitativas como diâmetro tumoral (T), grau histológico, comprometimento clínico da axila (N) foi usado o teste de Pearson. Quando analisamos variáveis quantitativas contínuas (idade no diagnóstico, número de linfonodos comprometidos por metástase) utilizamos o teste One-Way ANOVA.

Para a construção das curvas de sobrevida livre de doença e de sobrevida global das pacientes, em relação à resposta clínica pelo tratamento neo-adjuvante, resposta patológica, status menopausal, idade no diagnóstico, grau histológico, expressão de receptores hormonais, expressão de proteína p21 pré e pós-quimioterapia e expressão de ciclina D1 pré e pós-quimioterapia, utilizamos o teste Log rank.

Utilizamos a Curva ROC para verificação da correlação da idade e do número de gânglios com intervalo livre de doenças e sobrevida global.

Consideramos como estatisticamente significativos os valores de p inferiores a 0,05.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Resultados Gerais

Este estudo avaliou 72 casos de câncer de mama localmente avançados, tratados inicialmente com quimioterapia neo-adjuvante, entre janeiro de 1998 e dezembro de 2005, no setor de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O número de ciclos de quimioterapia foi em média de três sessões por paciente (02 a 07 ciclos, com mediana de três sessões), com intervalos de 21 a 28 dias entre cada sessão, variando mais frequentemente em decorrências de alguns casos com leucopenia leve. Não houve nenhum caso de leucopenia severa, leucopenia febril ou qualquer outro fator que impedisse a continuidade do tratamento.

Após o término das sessões de quimioterapia, ou a decisão pela equipe médica de operabilidade do caso, os tumores foram novamente medidos tendo em média uma redução de 75% do produto dos maiores diâmetros (44,2 cm² para 10,9 cm²). Houve 58 casos (80,5%) de resposta clínica parcial (RCP) ou completa (RCC) (41 RCP, 17 RCC). Apenas um caso evoluiu para doença progressiva e em 13 casos não houve resposta significativa.

Em 38 casos (52,7%) foi possível a realização de cirurgia conservadora. No seguimento destas pacientes não houve diferenças na curva de intervalo livre de doença ($p= 0,47$) e sobrevida global ($p= 0,0754$) em comparação às pacientes submetidas a tratamento radical (mastectomia) (Figuras 4 e 5).

Figura 4: Intervalo Livre de Doença associado à realização de cirurgia conservadora ou mastectomia.

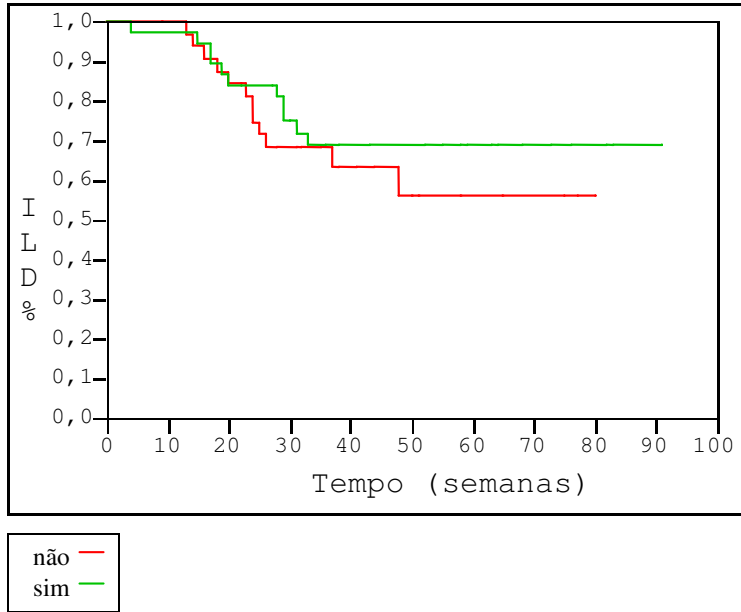
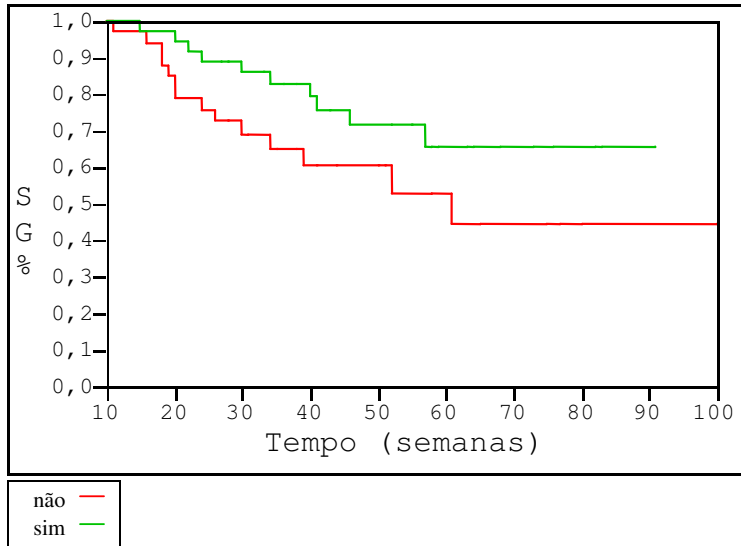
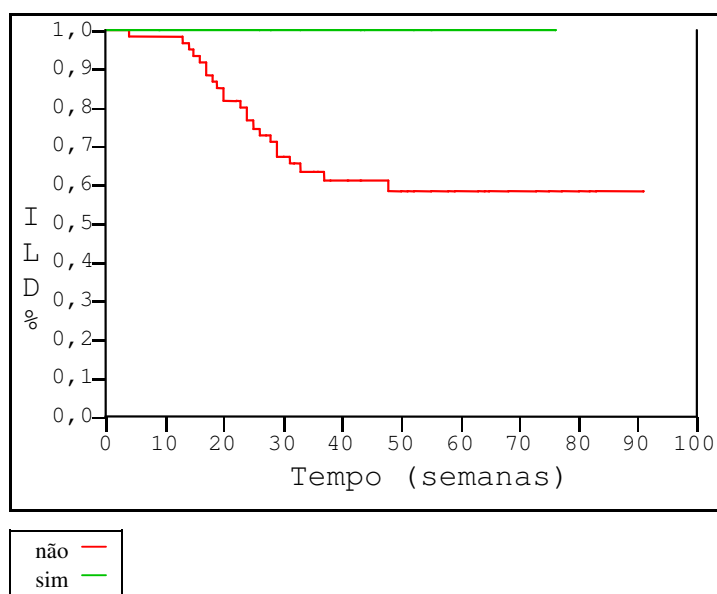


Figura 5: Tempo de Sobrevida Global associado à realização de cirurgia conservadora ou mastectomia.



A média do produto dos dois maiores diâmetros dos tumores na peça operatória foi de 2,5 (variando de 86 à resposta completa), com taxa de redução de 88% em relação ao volume primário destes tumores. Houve 09 casos de resposta patológica completa (12,5% dos casos). Em nosso estudo encontramos correlação positiva entre RCP e ILD e SG, entretanto, apenas na relação com ILD ($p=0,05$) houve diferença estatística (Figura 6)

Figura 6: Intervalo Livre de Doença entre os pacientes que obtiveram ou não resposta patológica completa.



O seguimento destas pacientes variou de 24 a 100 meses (mediana de 40 meses), sendo que neste período ocorreram 27 casos de recorrência da doença (37,5% do total de casos), com 10 casos de recorrências loco – regionais, 11 casos de metástases ósseas e 21 casos de metástases viciais. O intervalo livre de doença foi de 40,3 meses, com sobrevida global média de 44,2 meses no período de seguimento. Houve 26 óbitos (36,1% dos casos).

Quatro critérios foram correlacionados com melhora de ILD e SG: idade da pacientes, recorrência loco-regional, status axilar e status menopausal. A idade abaixo de 38 anos (obtido pela curva ROC) se associou ao encurtamento do ILD e da SG ($p=0,03$ e $p= 0,03$). Em relação ao acometimento axilar, as pacientes que tiveram menos de dois linfonodos acometidos (obtido pela curva ROC) tiveram maior ILD e SG ($p=0,03$, $p=0,002$). A menopausa se correlacionou com maior ILD e SG ($p=0,02$, $p=0,05$). A Recorrência loco-regional (RLR) reduziu a sobrevida global destas pacientes ($p=0,007$). Entretanto, após análise multivariada destes 4 fatores de risco, somente a RLR e o acometimento axilar continuaram significantes como fatores prognósticos ($p=0,04$, $p=0,006$ respectivamente).

5.2 Resultados Associados à Expressão da Ciclina D1

A ciclina D1 foi investigada pela técnica de imuno-histoquímica tanto no material prévio a realização da quimioterapia quanto no material pós-tratamento, considerando expressão positiva quando pelo menos 10% dos núcleos das células neoplásicas estivessem marcados pela proteína. Dividimos as pacientes em dois grupos pré-tratamento: grupo Ciclina D1 positivo pré (CD1+/pré) e grupo Ciclina D1 negativo pré (CD1-/pré); e dois grupos pós-tratamento: grupo Ciclina positivo pós (CD1+/pós) e grupo Ciclina D1 negativo pós (CD1-/pós).

Os grupos pré-tratamento tinham o mesmo número de pacientes (36 em cada grupo), com média de idades semelhantes (48 anos) e o mesmo número de mulheres na menopausa (15 casos em cada grupo). Inicialmente observamos que o produto dos dois maiores diâmetros, em centímetros quadrados, dos tumores iniciais do grupo CD1+/pré eram menores em comparação ao outro grupo (34,04 x 52,4), porém sem significância estatística ($p=0,79$). Também não houve diferenças significativas entre os estadiamentos iniciais dos dois grupos ($p=0,62$) e entre o grau histológico dos tumores ($p=0,06$). O grupo CD1+/pré continha maior porcentagem de tumores grau I e II (Bloom & Richardson) (80,5% x 61,1%). Quanto ao tipo histológico, observamos que a expressão da ciclina estava presente em 80% dos casos de carcinomas lobulares invasores.

Em relação à resposta ao tratamento quimioterápico proposto, os dois grupos apresentaram resposta clínica semelhante, com 80,5% de resposta parcial ou completa. Entretanto, o grupo CD1-/pré apresentou uma taxa de redução dos maiores diâmetros do tumor maior (79,8 x 66,6%), número maior de cirurgias conservadoras (21 casos x 17 casos) e taxas de RPC maiores (6 casos x 3 casos).

O grupo CD1+/pré apresentou um número maior de casos com acometimento axilar (22 casos x 18 casos), porém sem significância estatística ($p=0,18$, $p=0,10$). Os tipos de recorrência da doença no grupo CD1+/pré foram: 3 casos de recorrência loco-regional (RLR), 8 casos de metástase óssea (MO) e 11 casos de metástases viscerais (MV). Já no outro grupo se dividiram em: 7 casos de RLR, 3 casos de MO e 10 casos de MV. Porém estes dados não se refletiram no ILD e SG entre os dois grupos (Tabela 1).

| Subgrupos | CD1+/ PRE | CD1-/ PRE | P |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Parâmetros | 36 pacientes | 36 pacientes | |
| RECIDIVA | 36,1% | 38,9% | |
| ILD (meses) | 41,6 | 39,02 | P=0,64 |
| ÓBITO | 13 | 13 | -- |
| | 36,1% | 36,1% | |
| SVG (meses) | 44,77 | 43,74 | p=0,73 |

Tabela 1: Avaliação das taxas de recidiva, ILD, SG no período de seguimento e número de óbitos entre casos que expressaram ou não a ciclina D1 previamente ao tratamento quimioterápico.

Em relação à associação da Ciclina D1 com outros marcadores imunohistoquímicos, encontramos uma forte correlação entre a sua presença e de receptores de estrogênio e progesterona e p21 (Tabela 2).

| Subgrupos Parâmetros | CD1+/ PRE 36 pacientes | CD1-/ PRE 36 pacientes |
|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| RE+ | 29 | 18 |
| | 80,5% | 50% |
| RP+ | 26 | 13 |
| | 72,2% | 36,1% |
| P21+ PRE | 30 | 13 |
| | 83,3% | 36,1% |
| P21+ POS | 16 | 05 |
| | 44,4% | 13,9% |

Tabela 2: Correlações positivas entre Ciclina D1, RE, RP e p21.

As lâminas de ciclina D1 pré-tratamento foram ainda subdivididas conforme sua expressão: 11 casos 1+, 12 casos 2+, 11 casos 3+ e 2 casos 4+. Não encontramos diferenças em termo de intervalo livre de doença e sobrevida em nenhuma das subdivisões.

Os grupos pós-tratamento CD1+/pós e CD1-/pós eram compostos por 26 e 37 pacientes, respectivamente, e com um maior número de pacientes menopausadas no primeiro grupo (53,8% x 35,1%, p=0,07). Estes grupos foram avaliados segundo recidiva da doença, ILD e SG.

Em relação ao número de recidivas, o grupo CD1+/pós apresentou 11 casos (42,3%) contra 14 casos do outro grupo (37,8%). Os casos de recidiva do primeiro grupo foram: 2 casos de RLR, 7 casos MO e 8 casos de MV. Já no grupo CD1-/pós foram: 7 casos de RLR, 4 casos MO e 13 casos de MV. O intervalo livre de doença apesar de ser maior no grupo positivo (44,65 meses x 37,13 meses), não foi significativo (p=0,61). A sobrevida foi em média 6 meses maior no grupo CD1+/pós (48 x 42 meses) porém sem significância estatística (p=0,65) (Tabela 3).

| Subgrupos | CD1POS+ | CD1POS | P |
|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| Parâmetros | 26pacientes | 37pacientes | |
| RECIDIVA | 11 | 14 | |
| | 42,3% | 37,8% | |
| ILD (meses) | 44,65 | 37,13 | p=0,61 |
| ÓBITO | 10 | 15 | |
| | 38,4% | 40,5% | |
| SVG (meses) | 48,07 | 42,11 | p=0,65 |

Tabela 3: Avaliação das taxas de recidiva, ILD, SG no período de seguimento e número de óbitos entre casos que expressaram ou não a ciclina D1 no tumor residual (pós-tratamento de quimioterapia).

5.3 Resultados Associados à Expressão da Proteína p21

A avaliação da proteína p21 foi semelhante à avaliação da ciclina D1, com as mesmas divisões dos grupos em pré e pós-tratamento. Expressaram a proteína p21 antes do tratamento 43 pacientes, reduzidos para 21 casos após o tratamento, mostrando uma alteração significativa da expressão da ciclina D1 pela ação da quimioterapia ($p = 0,0003$). O número de mulheres menopausadas foi maior no grupo p21-/pré (51,7% x 34,9%), valor que inverteu-se nos grupos pós tratamento (52,4% para os positivos, 38,1% para os negativos), porém sem significância ($p= 0,14$, $p= 0,17$).

O grupo p21+/pré apresentou tumores iniciais menores ($32,86 \text{ cm}^2 \times 58,7 \text{ cm}^2$, $p= 0,25$), com maior número de casos no estágio II (65,1% x 37,9%), estatisticamente significante ($p=0,049$), porém menor número de tumores grau I e II segundo os critérios de Bloom & Richardson (65,1% x 79,3%, $p= 0,46$). A avaliação do tamanho dos tumores após o tratamento quimioterápico mostrou uma resposta objetiva (RCP e RCC) ligeiramente maior no grupo p21+/pré (83,7% x 75,8%), sem significância estatística ($p=0,29$).

A realização de tratamento conservador foi possível em 24 casos (55,8%) no grupo p21+/pré, com 9,3% de RPC (04 casos). No grupo p21-/pré a taxa de cirurgia conservadora foi de 48,2% (14 casos), 05 pacientes tiveram RPC (17,2% dos casos), sem diferenças estatísticas entre esses dois critérios. O acometimento axilar foi semelhante entre os dois grupos (53,5% x 58,6%, $p= 0,77$).

Em relação à recidiva tumoral, ILD, porcentagem de óbito e SG, não houve diferenças estatísticas entre os dois grupos (Tabela 4). No grupo p21+/pré, sete pacientes apresentaram RLR, 10 MO e 13 MV, no grupo p21-/pré foram 3, 1 e 8 pacientes respectivamente.

| Subgrupos | P21+/PRE | P21-/PRE | P |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Parâmetros | 43 pacientes | 29 pacientes | |
| RECIDIVA | 17 | 10 | |
| | 39,5% | 34,5% | |
| ILD (meses) | 41,34 | 38,78 | p=0,88 |
| ÓBITO | 15 | 11 | |
| | 34,9% | 37,9% | |
| SVG (meses) | 47,2 | 39,8 | p=0,25 |

Tabela 4: Avaliação das taxas de recidiva, ILD, SG no período de seguimento e número de óbitos entre casos que expressaram ou não a proteína p21 previamente ao tratamento quimioterápico.

A proteína p21 superexpressa mostrou também correlação positiva com a presença de receptores de estrogênio e de progesterona e com a ciclina D1 superexpressa (Tabela 5).

| Subgrupos Parâmetros | P21 PRE+ 43p | P21 PRE- 29p |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| RE+ | 31 72,1% | 16 55,1% |
| RP+ | 27 62,8% | 12 41,3% |
| CD1 PRE + | 30 69,7% | 06 20,7% |
| CD1 POS+ | 20 46,5% | 6 20,7% |

Tabela5: Correlações positivas entre p21+ e RE, RP e Ciclina D1.

Os grupos pós-tratamento p21+/pós e p21-/pós foram avaliados segundo recidiva da doença, ILD e SG. Em relação ao número de recidivas, o grupo p21+/pós apresentou 4 casos (19%) de RLR, 5 casos (23,8%) de MO e 6 casos (28,5%) de MV. O grupo p21-/pós apresentou 5 casos (11,9%) de RLR, 6 casos (14,3) de MO e 14 casos (33,3%) de MV, o que refletiu nas curvas de ILD e SG desfavoráveis neste grupo, porém sem significância estatística (Tabela 6).

| Subgrupos | P21+/POS | P21-/ POS | P |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Parâmetros | 21 pacientes | 42 pacientes | |
| RECIDIVA | 09 | 17 | |
| | 42,8% | 40,4% | |
| ILD (meses) | 46,04 | 37,34 | p=0,95 |
| ÓBITO | 09 | 16 | |
| | 42,8% | 38,1% | |
| SVG (meses) | 50,2 | 41,75 | p=0,71 |

Tabela 6 Avaliação das taxas de recidiva, ILD, SG no período de seguimento e número de óbitos entre casos que expressaram ou não a proteína p21 no tumor residual (pós-tratamento de quimioterapia)

DISCUSSÃO

6. Discussão

Em nosso estudo investigamos a expressão da ciclina D1 e da proteína p21 nos núcleos das células tumorais do câncer de mama localmente avançado antes e após o tratamento quimioterápico neo-adjuvante com esquema que associava um taxane a um antracíclico. Faltam dados consistentes na literatura sobre o verdadeiro papel preditivo destas proteínas no câncer de mama e o papel fundamental que cada uma delas exerce no ciclo celular. A avaliação da ciclina D1 antes e após a neoadjuvância não foi tema de publicações e existe apenas um estudo em andamento no qual se faz estas mesmas avaliações (Van der Hage et al, 2001). A avaliação da proteína p21 antes e após a realização da quimioterapia foi tema da publicação de Pohl et al, 2003.

A presença destas proteínas vêm sendo notada em vários tumores humanos: esôfago, bexiga, fígado, estômago, carcinomas espino-celulares de cabeça e pescoço, adenomas de paratireóide e linfomas. O que mostra o papel central destes oncogenes na origem de praticamente todas as neoplasias (Jong et al, 1999)

A ciclina D1, entre todas as ciclinas, é a que exerce o papel fundamental na ativação do ciclo celular, atuando na fase precoce e induzindo as células a saírem de G0 e iniciarem seu processo de divisão. Ela é um dos oncogenes mais freqüentes no câncer de mama (metade dos casos em média). Os principais fatores de crescimento e hormônios associados com a estimulação do crescimento celular utilizam a ciclina D1 como via de ativação do ciclo celular (Fernandez et al, 1998; Barnes, Gillett, 1998; Sutherland, Musgrove, 2004; Bilalovic et al, 2005; Roy, Thompson, 2006).

A ciclina D1 não tem função única no ciclo celular, pois sabemos, hoje, que ela exerce varias atividades de forma dependente ou independente de sua ligação com as CDKs 4/6. Em alguns tipos de tumores exerce atividades fora de G1 no ciclo celular, o que dificulta muito a compreensão do seu verdadeiro papel preditivo no câncer de mama (Roy, Thompson, 2006). Entretanto os principais trabalhos realizados até o momento associam a sua presença a tumores bem diferenciados, de baixo grau histológico, hormônio-sensíveis e de bom prognóstico (Barnes, Gillett, 1998; Jong et al, 1999; Bilalovic et al, 2005).

A p21 tem um papel fundamental no bloqueio do ciclo celular, interrompendo o processo de divisão celular e proporcionando condições de atuação dos mecanismos de reparação do DNA e diferenciação celular (Lebeau et al, 2003). Ela é ativada principalmente pela forma selvagem da proteína p53 e atua controlando a atividade da ciclina D1 (Lebeau et al, 2003). Essa correlação é notada freqüentemente em tumores que quando expressam uma destas proteínas, expressa a outra também. Assim como no caso da ciclina D1, a p21 está presente em maior quantidade em tumores bem diferenciados, hormônio-sensíveis e de volumes menores (Lebeau et al, 2003; Stendahl et al, 2004; Roy, Thompson, 2006).

A técnica de imuno-histoquímica é considerada adequada para a detecção destas proteínas (Vos et al, 1999; Russell et al, 1999; Yang et al, 2004). Com a evolução da técnica e o surgimento de novos anticorpos monoclonais para detecção de cada proteína, aumentou muito a acurácia deste método de diagnóstico. Entretanto, até o momento não existe um valor estabelecido para classificação dos tumores como positivos ou negativos para a expressão da ciclina D1, variando desde os que consideram positiva a sua presença deste que um núcleo esteja corado, até trabalhos que só consideram positivo quando mais da metade dos núcleos fiquem marcados (Vos et al, 1999; Russell et al, 1999; Van der Hage et al, 2001; Popat, Smith, 2005).

Alguns trabalhos ainda dividem sua expressão de forma semiquantitativa: fraca, moderada, forte e muito forte (Gillet et al, 1999; Russell et al, 1999; Yang et al, 2004). Nós baseamos a nossa classificação segundo os estudos que consideram positivo quando mais de 10% dos núcleos estão moderadamente ou fortemente corados. Aos valores de corte para a p21 estão bem estabelecidos, sendo considerada positiva a presença desta proteína em 10% ou mais das células tumorais (Russell et al, 1999; Heikkila et al, 2000; Lebeau et al, 2003).

Os resultados gerais mostraram taxas de resposta clínica, avaliada pela redução do tumor ao tratamento quimioterápico neo-adjuvante, semelhante aos dados da literatura (Van der Hage et al, 2001 ; Sachelarie et al, 2006 ; Maur et al, 2006). O número de cirurgias conservadoras foi de 38 casos (52,7%), o que é semelhante aos números citados pelos trabalhos anteriores (Fisher et al, 1997; Van der Hage et al, 2001), mostrando a importância do tratamento neo-adjuvante na avaliação “*in vivo*” da sensibilidade do tumor à droga administrada e a possibilidade de realização de cirurgias menos mutilantes.

Como os tumores avaliados eram considerados localmente avançados, o acometimento axilar em 56,9% dos casos supera o esperado, assim como o número de recidivas elevado e o ILD e SG abaixo da média para câncer de mama (Hilsenbeck et al, 1998).

Nosso estudo demonstrou que a idade da paciente, o status menopausal, o acometimento axilar e a recorrência loco-regional são fatores prognósticos, no entanto só os últimos dois fatores podem ser considerados marcadores isolados, concordando com estudos prévios que já afirmavam estes dados (Albains, Clark et al, 1994; Hilsenbeck et al, 1998; Diab et al, 2000; Gennari et al, 2004). Entretanto nas pacientes que tiveram RPC só verificamos significância quanto ao ILD ($p=0,05$), tendo ocorrido apenas um caso de recorrência de doença nestas pacientes.

A maioria dos trabalhos publicados avaliaram a ciclina D1 e a p21 com carcinomas "*in situ*", com tumores invasores de mama sem outras especificações ou carcinomas metastáticos (Van Diest et al, 1997; Barnes, Gillett, 1999; Jong et al, 1999; Umekita et al, 2000; Lebeau et al, 2003; Stendahl et al, 2004). Apenas em um trabalho se avaliou a relação da proteína p21 com carcinomas localmente avançados de mama (Sjostrom et al, 2000). Sendo assim, para os resultados que obtivemos não foi possível a correlação com resultados prévios. A avaliação pré-quimioterápica teve a finalidade de estabelecer um papel preditivo quanto à resposta ao tratamento primário. A avaliação pós-quimioterápica teve a finalidade de explorar a relação entre a persistência da proteína com intervalo livre de doença e sobrevida global.

A superexpressão da ciclina D1 foi demonstrada em exatamente metade dos casos em nosso estudo, coincidindo exatamente com os valores encontrados na maioria dos estudos anteriores (Van Diest et al, 1997; Barnes, Gillett et al, 1998; Roy, Thompson et al, 2006). Notamos uma relação fortemente positiva entre a superexpressão da ciclina D1 e tumores do tipo lobular invasor, já relatado em trabalhos anteriores (Oyama et al, 1998; Sutherland, Musgrove, 2004). Os tumores que expressaram a ciclina D1 tinham o produto dos dois maiores diâmetros menores que os do grupo negativo, eram bem diferenciados, de baixo grau histológico e, na grande maioria, hormônio sensíveis. Resultados semelhantes aos descritos por Naidu et al, 2002; Hwang et al, 2003 e Roy, Thompson, 2006.

Entretanto não encontramos melhora na sobrevida global e nem nos riscos de recorrência da doença no grupo CD1+/pré (Apêndice 1), contrariando os resultados descritos na literatura (Naidu et al, 2002 ; Hwang et al, 2003; Roy, Thompson, 2006). E alguns critérios foram piores no grupo positivo, como as taxas de redução do volume tumoral ao tratamento quimioterápico, o número de RPC, o número de cirurgias conservadoras e a porcentagem de acometimento axilar (Apêndice 2).

Quanto à presença da ciclina D1 após o tratamento, não houve diferenças entre os grupos positivo e negativo em relação à ILD e SG. Entretanto, verificamos um ganho de 7 meses em média no intervalo livre de doença e 8 meses em média na sobrevida global no grupo positivo em período de seguimento médio de 40 meses. Isto sugere que se acompanharmos estas pacientes por um período maior, as curvas de ILD e SG possam ficar mais divergentes entre os dois grupos. Tornando a presença de ciclina D1 no tumor residual um possível fator preditivo (Apêndice 1).

A presença da proteína p21 nos tumores pré-tratamento (60% dos casos) e pós-tratamento (29% dos casos) associou-se ao aumento do ILD e da SG quando comparados aos casos negativos para esta proteína, porém sem diferença significativa. No grupo pré-tratamento este aumento foi de 3 e 7 meses, respectivamente, e no grupo pós-tratamento foi próximo a 9 meses para cada um dos parâmetros, sugerindo que estas diferenças podem se tornar significativas após seguimento maior destas pacientes (Apêndice 1)

A supressão da p21, conforme verificado previamente (Russell et al, 1999; Lebeau et al, 2003), associou-se a tumores de menor volume, com estadiamento inicial menor ($p=0,049$) e hormônio-sensíveis. Entretanto, apesar de ser a promoção da diferenciação celular um dos principais papéis da p21, não encontramos correlação positiva entre este parâmetro e a superexpressão da p21.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

Nosso estudo concluiu que a ciclina D1 está relacionada com tumores menores, bem diferenciados, e hormônio-sensíveis. Já a proteína p21 relacionou-se a tumores pequenos, com estádios iniciais menores, de baixo grau histológico e hormônio-sensíveis. A expressão da ciclina D1 no tumor pré-tratamento quimioterápico não foi capaz de prever resposta à quimioterapia neo-adjuvante, nem se associou a diferenças quanto ao ILD e SG. No entanto, a presença da ciclina D1 no tumor residual e da p21 tanto no tumor pré-tratamento quanto no tumor residual, sugerem melhora no ILD e SG, o que em estudos com casuísticas maiores e com seguimento por períodos longos poderá ser confirmado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

Alassas M, Chu Q et al. Neoadjuvant chemotherapy in stage III breast cancer. *Am Surg.* 2005; 71(6):487-92.

Albains K, Clark G. Breast Cancer Outcome and Predictors of Outcome: are there age differentials. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994; 16:35-42.

Balasantil S, Sahin AA et al. p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(2):1422-8.

Barnes DM, Gillett CE. Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 52(1-3):1-15.

Baumann S, Köchli OR. Neoadjuvant therapy in breast carcinoma. *Swiss Surg.* 2000; 6(3):137-41.

Bernards R. CDK-independent activities of D type cyclins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1424:17-22.

Bilalovic N, Vranic S et al. Immunohistochemical Evaluation of Cyclin D1 in Breast Cancer. *Croat Med J* 2005; 46(3):382-88.

Bonnefoi H, Diebold-Berger S et al. Locally advanced/inflammatory breast cancer treated with intensive epirubicin-based neoadjuvant chemotherapy: are there molecular markers in the primary tumor that predict for 5-year clinical outcome? *Ann Oncol* 2003; 14: 406–13.

Butt AJ, McNeil CM et al. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12 (1): 47-59.

Buzdar AU, Ibrahim NK et al. Significantly Higher Pathologic Complete Remission Rate After Neoadjuvant Therapy with Trastuzumab, Paclitaxel, and Epirubicin Chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3676-85.

Caldon CE, Daly RJ et al. Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2006; 97(2):261-74.

Colozza M, Azambuja E et al. Achievements in systemic therapies in the pregenomic era in metastatic breast cancer. *Oncologist*. 2007 Mar;12(3):253-70.

Denkert C, Schickling O et al. Preoperative chemotherapy in breast cancer and the development of new predictive markers. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2006; 90:114-23.

Diab S, Elledge R et al. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with Breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 550-6

Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(3):1024-1030.

Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem*. 2005; 51(3):494-503.

Enger SM, Thwin SS et al. Breast cancer treatment of older women in integrated health care settings. *J Clin Oncol*. 2006; 24(27):4377-83.

Fernandez PL, Jares P et al. Cell cycle regulators and their abnormalities in breast cancer. *Mol Pathol*. 1998; 51(6):305-9.

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

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

Gajdos C, Tartter PI et al. Relationship of clinical and pathologic response to neoadjuvant chemotherapy and outcome of locally advanced breast cancer. *J Surg Oncol.* 2002; 80(1):4-11.

Gennari R, Curigliano G et al. Breast carcinoma in elderly women. *Cancer* 2004; 10: 1302-10.

Gillet C, Fanti V et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Research* 1994; 54: 1812-17.

Heikkila P, Boguslawski K et al. Predictive value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3103–3110.

Henry NL, Hayes DF. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. *Oncologist.* 2006;11(6):541-52.

Hilsenbeck S, Ravdin P et al. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 227-37.

Hortobagyi G, Singletary S et al. *Treatment of Locally Advanced and inflammatory Breast Cancer.* Lippincott: Philadelphia, 2000.

Hwang TS, Han HS et al. Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Pathol Int.* 2003; 53(2):74-80.

Jong JS, van Diest PJ et al. Concerted overexpression of the genes encoding p21 and cyclin D1 is associated with growth inhibition and differentiation in various carcinomas. *Mol Pathol.* 1999; 52(2):78-83.

Kröger N, Milde-Langosch K et al. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(1):159-68.

Lamb J, Ladha MH et al. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(23):8667-75.

Lebeau A, Unholzer A et al. EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 79(2):187-98.

Makris A, Powles TJ et al. Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1997; 3(4):593-600.

Maofu F, Chenguang W et al. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology* 2004; 145(12):5439–47.

Maur M, Guarneri V et al. Primary systemic therapy in operable breast cancer: clinical data and biological fall-out. *Ann Oncol.* 2006; 17(5):158-64.

Munster P and Norton† L. Predictive factor for the response to adjuvant therapy with emphasis in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3:361-64

Naidu R, Wahab N et al. Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: relationship with histopathological types and clinicopathological parameters. *Oncol Rep* 2002; 9(2): 409-16.

Oyama T, Kashiwabara K et al. Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer Res.* 1998; 58(13):2876-80.

Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A. Roles of the pathologist in neoadjuvant chemotherapy: evaluation of response, prognostic and predictive factors. *Ann Pathol.* 2003; 23(6):555-63.

Pohl G, Rudas M et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 78(1):97-103.

Popat S, Smith IE. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(11):858.

Prisack HB, Karreman C et al. Predictive biological markers for response of invasive breast cancer to anthracycline/cyclophosphamide - based primary (radio-) chemotherapy. *Anticancer Res.* 2005; 25(6):4615-21.

Reed W, Florens VA et al. Elevated levels of p27, p21 and cyclin D1 correlate with positive oestrogen and progesterone receptor status in node-negative breast carcinoma patients. *Virchows Arch.* 1999; 435(2):116-24.

Roy PG., Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. *The Breast* 2006; 15: 718–27

Russell A, Hendley J et al. Inhibitory effect of p21 in MCF-7 cells is overcome by its coordinated stabilization with D-type cyclins. *Oncogene.* 1999; 18(47):6454-9.

Sachelarie I, Grossbard ML et al. Primary systemic therapy of breast cancer. *Oncologist.* 2006; 11(6):574-89.

Schwartz GF, Meltzer AJ et al. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy for stage II carcinoma of the breast. *J Am Coll Surg.* 2005; 201(3):327-34.

Singletary SE, Alfred C et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for breast Cancer. *J Clin Oncol* 2002; 17:3628-36.

Sjostrom J, Blomqvist C, et al. Predictive Value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for Chemotherapy Response in Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3103–10.

Stendahl M, Kronblad A et al. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for Tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 2004; 90(10): 1942-8.

Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004; 9(1):95-104.

Tiezzi DG, Andrade JM et al. HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer*. 2007; 26:7:36.

Umekita Y, Yoshida H. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma in situ, atypical ductal hyperplasia and usual ductal hyperplasia: an immunohistochemical study. *Pathol Int*. 2000; 50(7):527-30.

Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, et al. Correlation of cyclin D1 mRNA levels with clinico-pathological parameters and clinical outcome in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 2000; 89(1): 39-43.

Van der hage, Van de Velde CJ et al. Preoperative Chemotherapy in Primary Operable Breast Cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol* 2001; 19: 4224-37.

Van Diest PJ, Michalides RJ, et al. Cyclin D1 Expression in Invasive Breast Cancer Correlations and Prognostic Value. *AmJ Pathol* 1997; 150:705-11.

Von Minckwitz G, Costa SD, Blohmer J, et al. Preoperative chemotherapy of breast carcinoma. *Zentralbl Chir.* 1998;123 Suppl 5:138-41.

Vos CB, Ter Haar N et al. Cyclin D1 gene amplification and overexpression are present in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol.* 1999; 187(3):279-84.

Vyzula R, Dusek L et al. Breast cancer and neoadjuvant therapy: any predictive marker? *Neoplasma.* 2004; 51(6):471-80.

Yang C, Ionescu-Tiba V et al. The role of the cyclin D1-dependent kinases in ErbB2-mediated breast cancer. *Am J Pathol.* 2004;164(3):1031-38

Waljee JF, Newman LA. Neoadjuvant systemic therapy and the surgical management of breast cancer. *Surg Clin North Am.* 2007; 87(2):399-415.

APÉNDICES

9.1 Apendice I

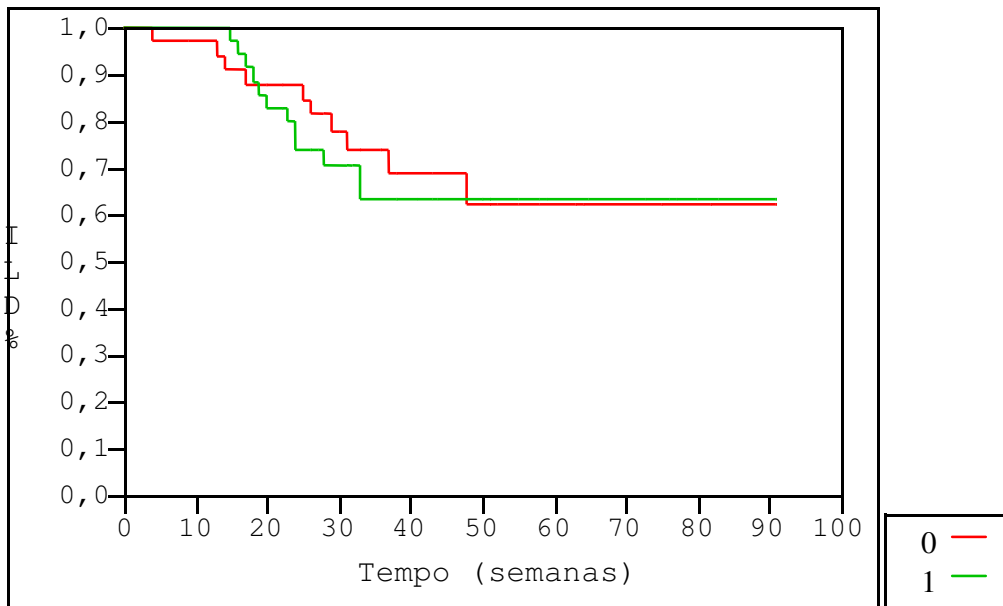


Figura 1: Comparação entre os grupos cd1+/pré (1) e cd1-/pré (0) em relação a ILD, mostrando que não há diferenças entre os dois grupos.

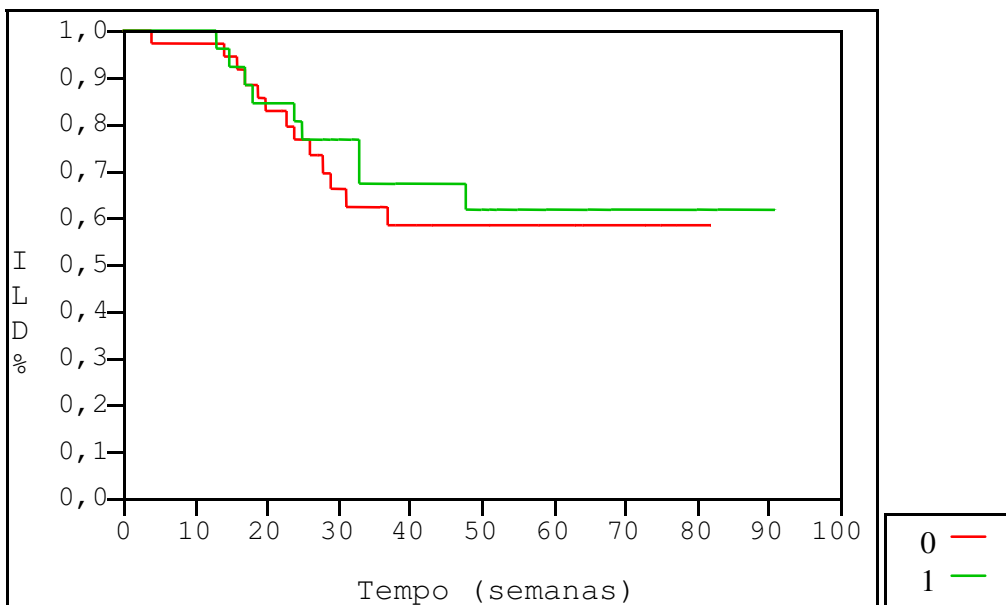


Figura 2: Comparação entre os grupos cd1+/pos (1) e cd1-/pos (0) em relação a ILD, mostrando que não há diferenças entre os dois grupos.

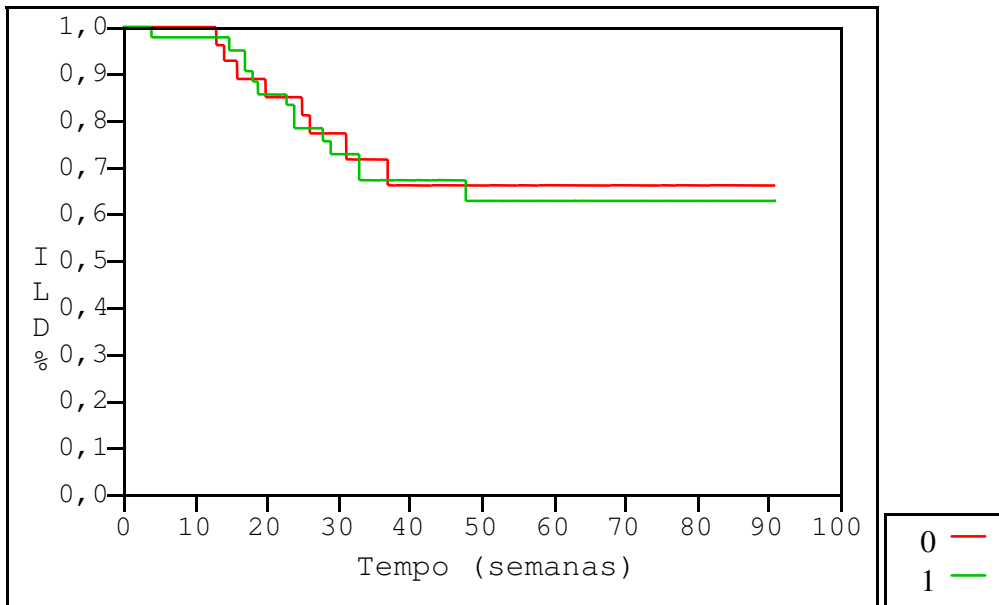


Figura 3: Comparação entre os grupos p21+/pré (1) e p21-/pré (0) em relação a ILD, mostrando que não há diferenças entre os dois grupos.

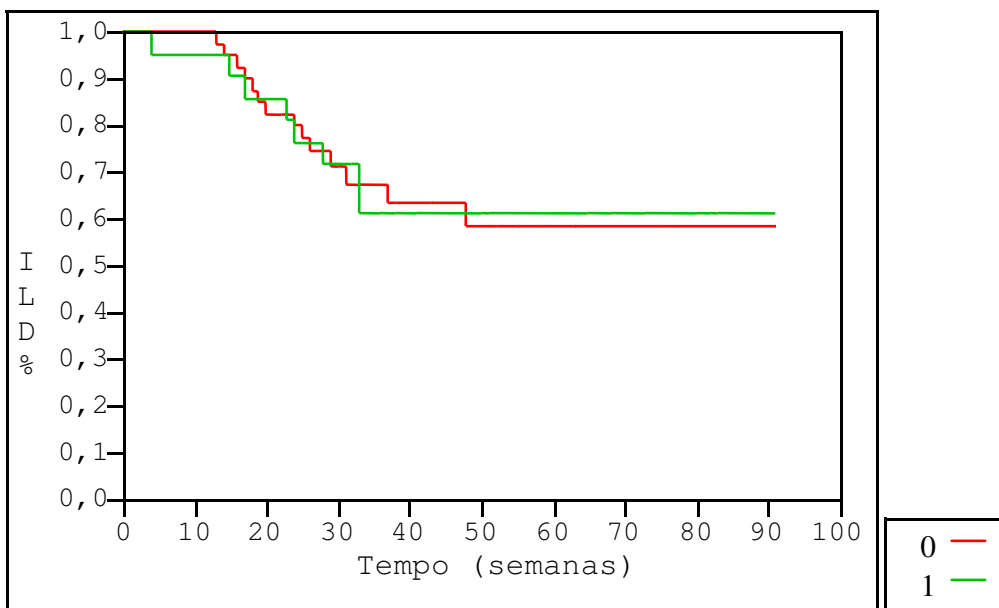


Figura 4: Comparação entre os grupos p21+/pos (1) e p21-/pos (0) em relação a ILD, mostrando que não há diferenças entre os dois grupos.

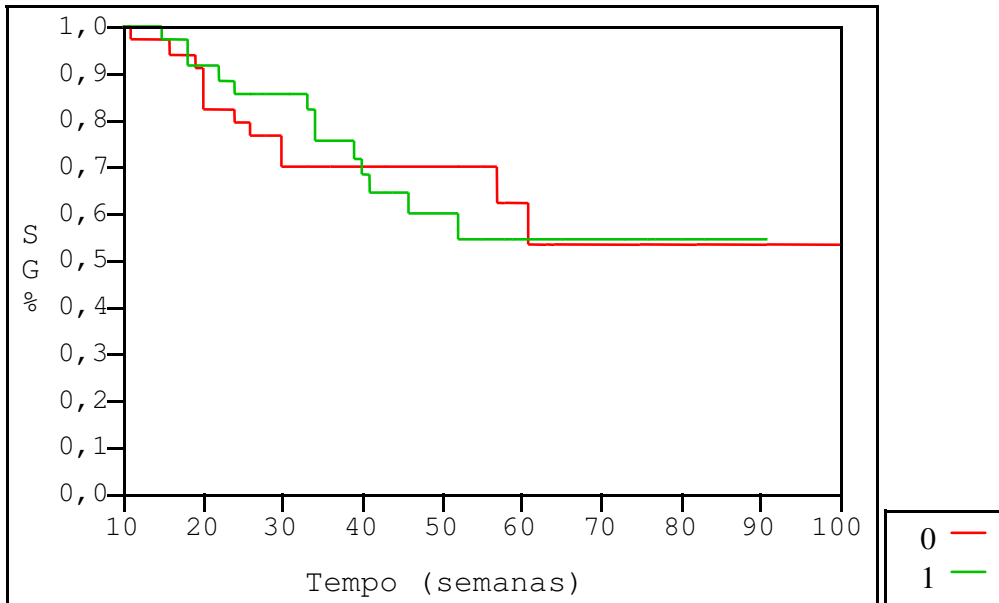


Figura 5: Comparação entre os grupos cd1+/pré (1) e cd1-/pré (0) em relação à SG, mostrando que não há diferenças entre os dois grupos.

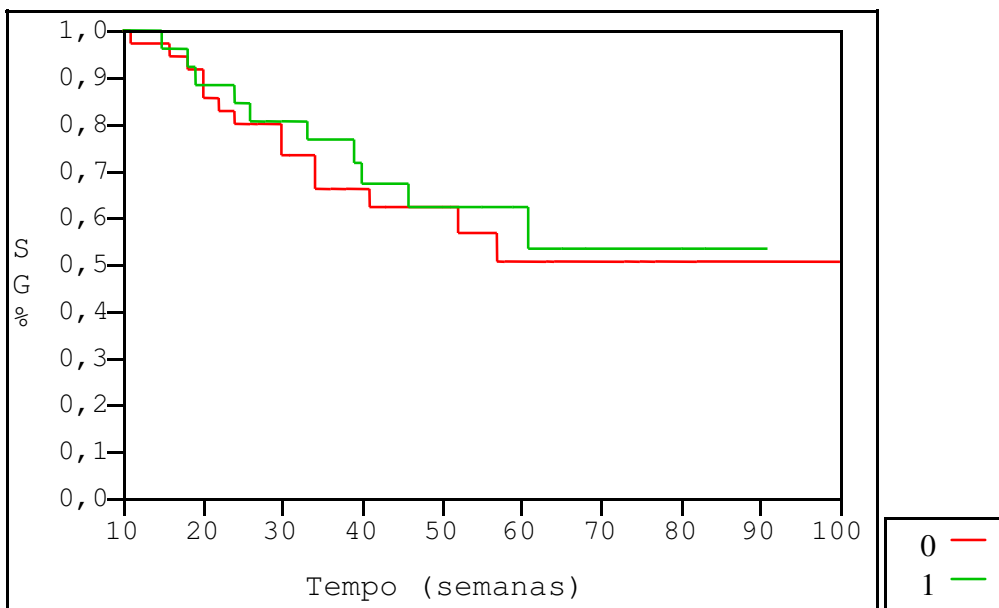


Figura 6: Comparação entre os grupos cd1+/pos (1) e cd1-/pos (0) em relação à SG, mostrando que não há diferenças entre os dois grupos.

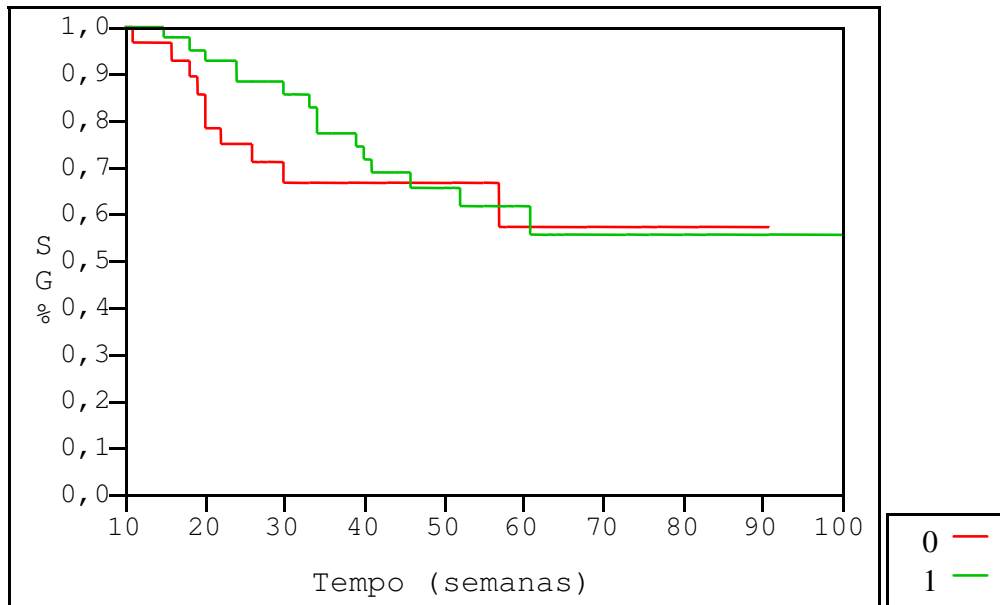


Figura 7: Comparação entre os grupos p21+/pré (1) e p21-/pré (0) em relação à SG, mostrando que não há diferenças entre os dois grupos.

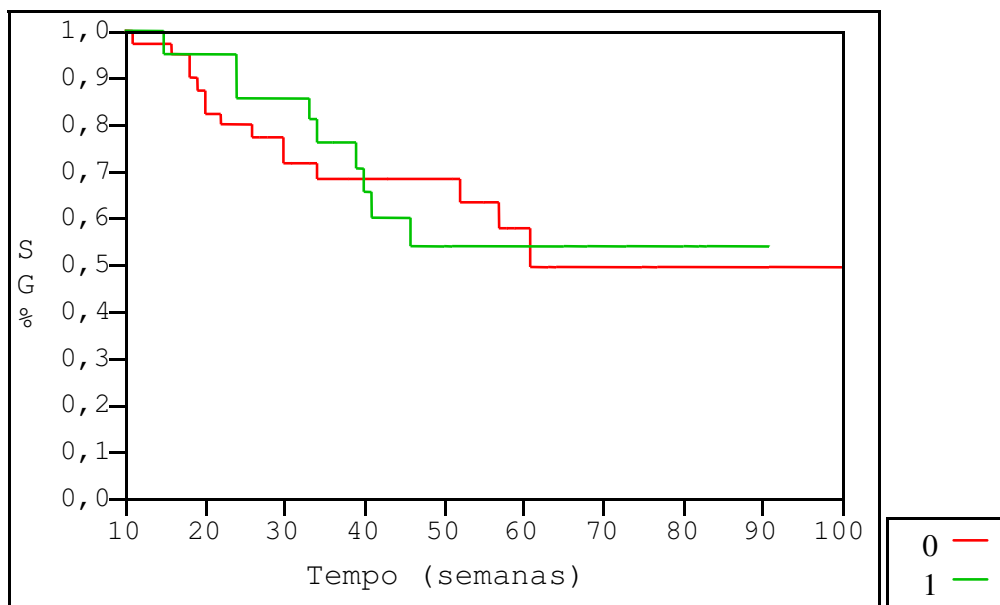


Figura 8: Comparação entre os grupos p21+/pos (1) e p21-/pos (0) em relação à SG, mostrando que não há diferenças entre os dois grupos.

9.2 Apêndice II

Análise comparando a taxa de resposta a cada parâmetro em relação à presença ou não do marcador Ciclina D1

| Subgrupos | Grupo | CD1 | CD1 | p | CD1 | CD1 | P |
|----------------------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|
| Parâmetros | Total | PRE+ | PRE- | | POS+ | POS- | |
| | 72p | 36p | 36p | | 26p | 37p | |
| RECIDIVA | 27 | 13 | 14 | -- | 11 | 14 | |
| | 37,5% | 36,1% | 38,9% | | 42,3% | 37,8% | -- |
| ILD (m) | 40,33 | 41,6 | 39,02 | P=0,64 | 44,65 | 37,13 | p=0,61 |
| ÓBITO | 26 | 13 | 13 | P=1,0 | 10 | 15 | -- |
| | 36,1% | 36,1% | 36,1% | | 38,4% | 40,5% | |
| SVG (m) | 44,26 | 44,77 | 43,74 | p=0,73 | 48,07 | 42,11 | p=0,65 |
| MENOPAUSA | 31 | 15 | 15 | | 14 | 13 | 0,07 |
| | 43% | 41,6% | 41,6% | 1,0 | 53,8% | 35,1% | -- |
| > DIAMETRO | 6,23 | 6,2 | 6,25 | 0,76 | -- | -- | -- |
| PROD PRE | 44,26 | 34,04 | 52,4 | 0,79 | -- | -- | -- |
| PROD POS | 10,93 | 11,36 | 10,58 | 0,93 | -- | -- | -- |
| % redução | 75,3% | 66,6% | 79,8% | -- | -- | -- | -- |
| MED PAT | 5,3 | 7,08 | 3,59 | -- | -- | -- | -- |
| % redução | 88% | 79,2% | 93% | -- | -- | -- | -- |
| ESTADIO | 39 EII | 18 EII | 21 EII | 0,62 | 16 EII | 17 EII | 0,27 |
| | 33 EIII | 18 EIII | 15 EIII | | 10 EIII | 20 EIII | |
| Tumor Baixo | 51 | 29 | 22 | 0,06 | -- | -- | -- |
| Grau | 70,8% | 80,5% | 61,1% | | | | |
| RO | 58 | 29 | 29 | | -- | -- | 0,67 |
| | 80,5% | 80,5% | 80,5% | P=0,75 | | | |

| | | | | | | | |
|------------------|--------------|-------|-------|------|-------|-------|------|
| RPC | 09 | 3 | 6 | 0,47 | -- | -- | -- |
| | 12,5% | 8,3% | 16,6% | | | | |
| CIR CONS | 38 | 17 | 21 | | -- | -- | -- |
| | 52,7% | 47,2% | 58,3% | | | | |
| AXILA + | 41 | 22 | 18 | 0,18 | 17 | 21 | 0,97 |
| | 56,9% | 61,1% | 50% | | 65,4% | 56,7% | |
| AXILA ++ | 16 | 9 | 6 | 0,10 | 8 | 6 | 0,97 |
| | 22,2% | 25% | 16,6% | | 30,7% | 16,2% | |
| RLR | 10 | 3 | 7 | 0,16 | 2 | 7 | 0,18 |
| | 13,8% | 8,3% | 19,4% | | 7,7% | 18,9% | |
| MET OSSEA | 11 | 8 | 3 | | 7 | 4 | |
| | 15,3% | 22,2% | 8,3% | | 7,7% | 10,8% | |
| MET DIST | 21 | 11 | 10 | | 8 | 13 | |
| | 29,1% | 30,5% | 27,8% | | 30,7% | 35,1% | |
| RE+ | 47 | 29 | 18 | | -- | -- | -- |
| | 65,2% | 80,5% | 50% | | | | |
| RP+ | 39 | 26 | 13 | | -- | -- | -- |
| | 54,1% | 72,2% | 36,1% | | | | |
| P21+ PRE | 43 | 30 | 13 | | -- | -- | -- |
| | 59,7% | 83,3% | 36,1% | | | | |
| P21+ POS | 21 | 16 | 5 | | -- | -- | -- |
| | 29,1% | 44,4% | 13,9% | | | | |

Análise comparando a taxa de resposta a cada parâmetro em relação à presença ou não do marcador P21

| Subgrupos Parâmetros | POP | P21 | P21 | P | P21 | P21 | P |
|-------------------------|---------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| | GERAL | PRE+ | PRE- | | POS+ | POS- | |
| | 72p | 43p | 29p | | 21p | 42p | |
| RECIDIVA | 27 | 17 | 10 | | 9 | 17 | |
| | 37,5% | 39,5% | 34,5% | | 42,8% | 40,4% | |
| ILD (m) | 40,33 | 41,34 | 38,78 | p=0,88 | 46,04 | 37,34 | p=0,95 |
| ÓBITO | 26 | 15 | 11 | | 9 | 16 | |
| | 36,1% | 34,9% | 37,9% | | 42,8% | 38,1% | |
| SVG (m) | 44,26 | 47,2 | 39,8 | p=0,25 | 50,2 | 41,75 | p=0,71 |
| MENOPAUSA | 31 | 15 | 15 | 0,14 | -- | -- | -- |
| | 43% | 34,9% | 51,7% | | | | |
| > DIAMETRO | 6,23 | 6 | 6,5 | 0,58 | -- | -- | -- |
| PROD PRE | 44,26 | 32,86 | 58,7 | 0,25 | -- | -- | -- |
| PROD POS | 10,93 | 10,83 | 11,08 | -- | -- | -- | -- |
| % redução | 77,3% | 67% | 81,1% | | | | |
| MED PAT | 5,3 | 6,2 | 3,94 | -- | -- | -- | -- |
| % redução | 88% | 81,1% | 93,3% | | | | |
| ESTADIO | 39 EII | 28 | 11 | 0,049 | 15 | 16 | 0,01 |
| | 33 EIII | 15 | 18 | | 6 | 10 | -- |
| Tumor Baixo | 51 | 28 | 23 | 0,46 | -- | -- | 0,54 |
| Grau | 70,8% | 65,1% | 79,3% | | -- | -- | |
| RO | 58 | 36 | 22 | | -- | -- | 0,37 |
| | 80,5% | 83,7% | 75,8% | P=0,29 | | | |
| RPC | 09 | 4 | 5 | 0,35 | -- | -- | 0,11 |
| | 12,5% | 9,3% | 17,2% | | | | |

| | | | | | | | |
|------------------|--------------|-------|-------|------|-------|-------|------|
| CIR CONS | 38 | 24 | 14 | | -- | -- | -- |
| | 52,7% | 55,8% | 48,2% | | | | |
| AXILA + | 41 | 23 | 17 | 0,77 | 14 | 24 | 0,20 |
| | 56,9% | 53,5% | 58,6% | | 66,7% | 57,1% | |
| AXILA ++ | 16 | 9 | 6 | 0,42 | 4 | 9 | 0,20 |
| | 22,2% | 20,9% | 20,7% | | 19% | 21,4% | |
| RLR | 10 | 7 | 3 | 0,44 | 4 | 5 | 0,46 |
| | 13,8% | 16,2% | 10,3% | | 19% | 11,9% | |
| MET OSSEA | 11 | 10 | 1 | | 5 | 6 | |
| | 15,3% | 23,2% | 3,4% | | 23,8% | 14,3% | |
| MET DIST | 21 | 13 | 8 | | 6 | 14 | |
| | 29,1% | 30,2% | 27,6% | | 28,5% | 33,3% | |
| RE+ | 47 | 31 | 16 | | -- | -- | -- |
| | 65,2% | 72,1% | 55,1% | | | | |
| RP+ | 39 | 27 | 12 | | -- | -- | -- |
| | 54,1% | 62,8% | 41,3% | | | | |
| CD1 PRE + | 36 | 30 | 6 | | -- | -- | -- |
| | 50% | 69,7% | 20,7% | | | | |
| CD1 POS+ | 26 | 20 | 6 | | -- | -- | -- |
| | 36,1% | 46,5% | 20,7% | | | | |

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](#)