

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Expressão da topoisomerase II alpha e do HER-2/neu  
como fatores preditivos de resposta clínica e patológica em  
pacientes com câncer de mama submetidas à  
quimioterapia neoadjuvante**

Fábio Eduardo Zola

Ribeirão Preto  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**FÁBIO EDUARDO ZOLA**

**Expressão da topoisomerase II alpha e do HER-2/neu  
como fatores preditivos de resposta clínica e patológica em  
pacientes com câncer de mama submetidas à  
quimioterapia neoadjuvante**

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  
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, 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

Zola, Fábio Eduardo

Expressão da topoisomerase II alpha e do HER-2/neu como fatores preditivos de resposta clínica e patológica em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante / Fábio Eduardo Zola; orientador Jurandyr Moreira de Andrade – Ribeirão Preto, 2009.

71f.:il. 30cm

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.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Fábio Eduardo Zola

Expressão da topoisomerase II alpha e do HER-2/neu como fatores preditivos de resposta clínica e patológica em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante

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 \_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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

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

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

## **DEDICATÓRIA**

A Dora Alice Torelli Zola e João Emílio Zola, meus pais, com amor, admiração e gratidão por serem os responsáveis por todas as vitórias alcançadas em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos amigos e grandes incentivadores professores Dr. Daniel G. Tiezzi, Dra Fernanda Maris Peria, Dr Jurandyr M. Andrade e Dr Heitor Ricardo C. Marana que tornaram possível esse trabalho.

Ao co-orientador Prof. Alfredo Ribeiro Silva e a Deisy Longo pela competência e eficiência na execução dos experimentos.

Ao casal Célia e Nivaldo F. Vieira que participaram intensamente e acrescentaram muito a essa dissertação e vida.

Aos amigos do departamento de ginecologia e obstetrícia Ilza R. Mazzocato, Suelen Soares Bezerra, Reinaldo V. Tavares , Rosane A. C. Casula e Ricardo P. Silva sempre prestativos na resolução de todos os trâmites da tese.

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.

Aos amigos Dr. Sérgio Bigueti, Dr Luis Gustavo Brito, Dr Joaquim Sarmiento, Dr Willian Clagnan, Dr Franklin Pimentel, Dra Tatiane Motta e Dra Viviane Schiavon que colaboraram no árduo trabalho de seguimento ambulatorial das pacientes.

À minha família e à minha companheira e amiga Patrícia A. Barros que sempre me incentivaram e souberam compreender minha ausência para desenvolver esse projeto.

## RESUMO

ZOLA, F. E. **Expressão da topoisomerase II alfa e do HER-2/neu como fatores preditivos de resposta clínica e patológica em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante.** 2009 71f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O objetivo do estudo foi avaliar a importância da expressão das proteínas topoisomerase II alfa (topo II) e HER-2 como fatores preditivos da resposta à quimioterapia neoadjuvante e prognóstico em pacientes com câncer de mama nos estádios clínicos II e III. Pacientes e métodos: 99 pacientes receberam quimioterapia neoadjuvante com docetaxel (75mg /m<sup>2</sup>) e epirrubicina (50 mg/m<sup>2</sup>) em infusão endovenosa no dia 1 a cada 3 semanas após terem sido submetidas a biópsia incisional. Foi complementado tratamento sistêmico com quimioterapia adjuvante com CMF ou FEC de acordo com o estado axilar avaliada após a cirurgia definitiva e/ou hormonioterapia de acordo com a avaliação dos receptores hormonais. Avaliamos a taxa de resposta ao tratamento neoadjuvante e a influência da topo II alfa e do HER-2 na taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante bem como na sobrevida livre de doença e sobrevida global. Também foram avaliadas a expressão dos receptores hormonais. Resultados: a taxa de resposta clínica objetiva foi de 80,8 % com 9,1 % de resposta patológica completa. A expressão da topo II alfa não apresentou significância nas taxas de resposta ou na sobrevida das pacientes e não houve correlação entre a expressão desta proteína e de HER-2. A superexpressão da proteína HER-2 foi associada com uma redução significativa nas taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global (p= 0,04 e p= 0,004, respectivamente). Conclusão: a expressão da topo II alfa não demonstrou, em nosso estudo, ser fator preditivo ou prognóstico nas pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, quimioterapia neoadjuvante, topoisomerase II alfa, HER-2/neu.



## ABSTRACT

ZOLA, F. E. **Expression of topoisomerase II alpha and HER-2/neu as predictive factors to clinical and pathologic response of breast cancer patients submitted to neoadjuvant treatment.** 2009 71f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The objective of this study is to evaluate the importance of the expression of the proteins topoisomerase II alpha (topo II) and HER-2 as predictive factors to response to neoadjuvant chemotherapy and the prognosis of patients diagnosed with clinical stage II and stage III breast cancer. Patients and methods: 99 patients have received neoadjuvant chemotherapy with docetaxel (75mg /m<sup>2</sup>) and epirubicine (50 mg/m<sup>2</sup>) through intravenous infusion on D1 q3 weeks, after submitted to pathologic specimen harvest. Systemic treatment was then complemented with CMF or FEC according to the status of axilla involvement after surgical staging and/or hormone therapy according to hormone receptor status. We evaluated the response rate to neoadjuvant treatment and the influence of topo II alpha and HER-2 expression on the response rate and disease free survival and overall survival. The expression of hormone receptors was also evaluated. Results: Objective clinical response was 78,8%, with 8,2% of complete pathological response. Topo II alpha expression did not correlate to response to chemotherapy or survival and there was no correlation between topo II alpha expression and HER-2 expression. Superexpression of HER-2 protein was associated to a significant reduction in disease free survival and overall survival (p=0,04 and p=0,004, respectively). Conclusion: topo II alpha expression did not demonstrate, in our study, to be a predictive nor prognostic factor to the patients submitted to neoadjuvant with docetaxel and epirubicin.

Key-words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, topoisomerase II alpha, HER-2/neu.

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 - Características clínicas e histopatológicas de 99 pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina ..... p.27
- Tabela 2 - Resposta clínica observada em relação ao produto do maior diâmetro tumoral com seu maior diâmetro perpendicular após a quimioterapia de indução..... p.29
- Tabela 3 - Característica imunohistoquímica de 99 tumores de pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina ..... p.39
- Tabela 4 - Características clínicas e histopatológicas e suas relações com a resposta clínica a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina em 99 pacientes com câncer de mama localmente avançado..... p.42
- Tabela 5 - Expressão da proteína topo II $\alpha$  e sua relação com os receptores hormonais e a proteína HER-2..... p.43
- Tabela 6 - Análise multivariada (regressão logística) para risco de recorrência a distância em relação com o estadiamento clínico, resposta patológica, expressão de RE, tipo de cirurgia realizada (mastectomia x cirurgia conservadora) e estado axilar (mais de 2 linfonodos positivos.) ..... p.47
- Tabela 7 - Análise multivariada (regressão logística) para risco de morte pela doença em relação com o estadiamento clínico, expressão de RE, tipo de cirurgia realizada (mastectomia x cirurgia conservadora), o estado axilar (mais de 2 linfonodos positivos), a expressão do HER2 e o subtipo histológico..... p.47

**LISTA DE GRÁFICOS**

- Gráfico 1 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão da oncoproteína HER-2 ..... p.45
- Gráfico 2 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com o estado axilar ..... p.46
- Gráfico 3 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão de receptores de estrogênio. (SG= Sobrevida global; RE= receptor de estrogênio) ..... p.47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Expressão dos receptores hormonais. A) Expressão positiva para receptor de estrógeno (RE) em carcinoma ductal invasivo da mama com coloração nuclear de tom marrom (microscopia de luz; 400x). B) Expressão positiva para receptor de progesterona (RP) em carcinoma ductal invasivo da mama com coloração marrom na célula (microscopia de luz, 400x)..... p.34
- Figura 2 - Expressão da topoisomerase  $\alpha$ ..... p.35
- Figura 3 - Expressão da proteína HER-2 avaliada pela imunohistoquímica em carcinoma ductal invasivo da mama com marcação de membrana celular (microscopia de luz; 400x)..... p.36

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Seleção de Pacientes .....	25
3.2 Exames Iniciais e Complementares .....	28
3.3 Tratamento Neoadjuvante .....	28
3.4 Tratamento Cirúrgico .....	29
3.5 Tratamento adjuvante .....	30
3.5.1 Radioterapia .....	30
3.5.2 Quimioterapia adjuvante .....	30
3.5.3 Hormonioterapia .....	31
3.6 Seguimento clínico .....	31
3.7 Estudo histopatológico .....	32
3.7.1 Processamento do material .....	32
3.7.2 Imunohistoquímica para RE, RP e proteínas topoisomerase e HER-2 .....	32
3.7.3 Análise da expressão de RE e RP .....	33
3.7.4 Análise da expressão da topoisomerase $II\alpha$ : .....	34
3.7.5 Análise da expressão da proteína HER-2 .....	35
3.8 Análise Estatística .....	36
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Expressão das proteínas topo $II\alpha$ , HER-2 e receptores hormonais .....	38
4.2 Resposta clínica e patológica ao tratamento neoadjuvante e tratamento cirúrgico .....	39
4.3 Características clínicas e histopatológicas e suas relações com a resposta patológica ...	40
4.4 Expressão da proteína topo $II\alpha$ antes e após a quimioterapia neoadjuvante .....	41
4.5 Expressão da proteína topo $II\alpha$ e sua relação com os receptores hormonais e a proteína HER-2 .....	43
4.6 Sobrevida livre de doença e sobrevida global .....	44
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>57</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>
<b>9. APÊNDICE .....</b>	<b>72</b>

## ***1. INTRODUÇÃO***

---

O câncer de mama é a neoplasia de maior prevalência mundial entre as mulheres atualmente. O número de casos novos previstos no Brasil para 2008 é de 49.400, com risco estimado de 51 casos a cada 100.000 mulheres e a mortalidade é de 10,40 óbitos por 100.000 mulheres. Excluindo os tumores de pele, o câncer de mama é o mais incidente na região sudeste com risco estimado de 68 casos por 100.000 mulheres e corresponde a cerca de 20% dos casos novos femininos de câncer (INCA, 2008).

Os fatores de risco relacionados à exposição hormonal feminina e sua influência no desenvolvimento dos tumores mamários estão bem estabelecidos. A menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal aumentam os riscos da ocorrência da doença. Adicionados a esses dados, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. A incidência aumenta rapidamente até a idade de 45 a 50 anos, e a partir deste ponto a elevação é menos intensa. Entre os 75 a 80 anos a curva mantém um platô e depois passa a diminuir (Jemal, Siegel *et al.*, 2008).

A história familiar também é um fator de risco importante no câncer de mama. Embora essa associação só esteja presente em 15 a 20 por cento dos casos, o risco associado às mulheres que tem um parente materno ou paterno de primeiro ou de segundo grau é elevado. A amplitude dessa influencia está relacionada a idade do aparecimento da doença no diagnóstico e o número de parentes afetados, sendo que o risco de uma mulher que tem parente de primeiro grau acometido antes de 40 anos é de 5 a 7 vezes maior que a população geral (*Familial breast cancer: 2001*).

A prevenção primária dessa neoplasia ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e as características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Sendo assim, o diagnóstico precoce é determinante no sucesso do tratamento. As estratégias de rastreamento, principalmente com o rastreamento mamográfico, e o tratamento

adjuvante tem determinado a redução da mortalidade nos últimos anos (Cheson, Phillips et al., 1995; Berry, Cronin et al., 2005).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (INCA, 2008).

A escolha do tratamento torna-se mais complexa a partir do momento em que drogas descobertas recentemente apresentam comprovada eficiência aumentando as possibilidades terapêuticas, assim como associada ao maior entendimento dos tumores de mama e seus subgrupos. A forma mais adequada de selecionar o melhor esquema terapêutico é a identificação das pacientes com prognóstico ruim e de fatores preditivos de resposta a cada droga ou associação, criando um perfil de cada tumor que guie essa decisão.

Os fatores prognósticos fornecem informações sobre a evolução do tumor no momento do diagnóstico, independente da terapia a ser empregada. Esta análise permite distinguir pacientes com mau prognóstico, que devem ser tratadas de forma mais agressiva com objetivo de cura do câncer.

A avaliação histopatológica de rotina permanece como elemento crítico na determinação do prognóstico de pacientes com neoplasia maligna de mama. O estadiamento desenvolvido pela *American Joint Committee on Cancer e a Union Internationale Contre le Cancer* (Hutter, 1987) que classifica os tumores de acordo com o tamanho (T), envolvimento de linfonodos (N) e presença de metástases a distância (M) tem implicações prognósticas importantes no câncer de mama. Entre as variáveis isoladas de prognóstico, o acometimento de linfonodos axilares detectados histologicamente é o melhor indicador de doença sistêmica onde as pacientes com invasão dos gânglios axilares correm risco de 60 a 70% de



apresentarem metástases em 5 anos contra 20 a 30% das pacientes sem invasão. O tamanho tumoral, embora relacionado com o acometimento axilar, é o mais importante fator secundário de prognóstico. O tipo histológico não é uma variável principal de prognóstico, mas alguns subtipos específicos com o carcinoma tubular puro, formas papilares puras e o carcinoma mucinoso apresentam risco baixo de doença sistêmica. O grau histológico é um sistema de avaliação baseada na combinação do grau de diferenciação nuclear, arranjo arquitetura celular e a proporção de mitose e tem valor comprovado na avaliação de prognóstico (Gonzalez-Angulo, Morales-Vasquez *et al.*, 2007).

A presença de receptores de estrogênio tem valor prognóstico e apresenta sobrevida livre de doença estatisticamente maior, entre 8 e 9%, e sua vantagem principal está associada a uma maior sobrevida na doença recorrente. O c-ErbB-2 é um gene que produz uma proteína de membrana (HER-2) receptora de peptídeos responsáveis pela estimulação do crescimento celular e está associado com uma sobrevida baixa quando presente sua superexpressão. Outros fatores, como o gene supressor de tumor p53 e sua proteína p53 ou citometria de fluxo para avaliação da fase S, não tem resultados que baseiem seu uso como fator prognóstico (Gonzalez-Angulo, Morales-Vasquez *et al.*, 2007).

A análise da expressão dos genes do tumor permitiu a subdivisão desses tumores em cinco grupos: luminal A, luminal B, superexpressão do HER2, basal e normal breast-like. Os dois subtipos de melhor prognóstico são o luminal A e B. O luminal A, cujo fenótipo é receptor de estrógeno (RE) positivo e HER2 negativo, foi caracterizado pela elevada expressão de genes representados pelas células epiteliais luminiais, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. Este fenótipo está associado à assinatura de melhor prognóstico e responde à terapêutica com antiestrogênicos. O subtipo luminal B, cujo fenótipo é RE positivo e HER2 positivo, foi caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminiais, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19.

Este fenótipo está associado a pior prognóstico em relação ao luminal A, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (subtipos superexpressão do HER2 e basal) (Hanahan e Weinberg, 2000).

O dois subtipos de pior prognóstico são o basal e o superexpressão do HER2, neste último o fenótipo é RE negativo e HER2 positivo. Estes tumores apresentam boas respostas a drogas que bloqueiam a atividade do HER2, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumabe. O subtipo basal, cujo fenótipo é RE negativo e HER2 negativo, foi caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais assim como suas proteínas (CK5, CK6, CK14, CK17, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina e p63). Este perfil está ligado a mutações genéticas no BRCA1, e é um dos mais intrigantes subtipos tumorais, pois tem associação com pior prognóstico e não possui alvo terapêutico definido, como os outros subtipos. Portanto, não responde ao tratamento com drogas antiestrogênicas nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2 (Sorlie, 2004).

O subtipo normal breast-like foi o último grupo identificado por meio do aumento da expressão de muitos genes conhecidos por serem expressos pelo tecido adiposo e por outros tipos de células não epiteliais. Estes tumores também mostraram forte expressão para genes epiteliais basais e baixa expressão para genes do epitélio luminal. Apesar disso, atualmente ainda não está clara sua distinção nem seu valor clínico (Perou, Sorlie *et al.*, 2000).

Com os dados conhecidos para avaliação prognóstica, as pacientes com tumores de mama localmente avançados compreendem um grupo com elevado risco de desenvolvimento de doença sistêmica e tem alta taxa de inoperabilidade pela avaliação clínica. Desta forma, o tratamento atual está baseado na terapêutica sistêmica primária com drogas antineoplásicas com o objetivo de tratar eventuais micrometástases e tornar viável a ressecção cirúrgica. Estas

pacientes constituem uma população heterogênea em relação ao prognóstico sendo a resposta clínica a quimioterapia um fator prognóstico independente (Mano e Awada, 2004).

Em relação ao tratamento local da doença, a quimioterapia primária ou neoadjuvante faz 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), no grupo que apresenta 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).

O esquema de tratamento neoadjuvante mais conhecido até a década de 90 foi a poliquimioterapia baseada em antraciclinos. Nos últimos anos estudos puderam comprovar a eficácia da utilização dos taxanes contra o câncer de mama. O paclitaxel e docetaxel, drogas

que inibem a divisão celular por prevenir a despolimerização dos microtúbulos, são atualmente reconhecidas como um dos mais ativos agentes contra o câncer de mama metastático. Estudos preliminares demonstram que a utilização de taxane com antraciclina parece oferecer melhor resposta clínica que o esquema FAC no contexto da terapia neoadjuvante (Mano e Awada, 2004).

No enfoque dos fatores preditivos de resposta a terapêutica, a dosagem dos receptores hormonais foi o avanço inicial e de fundamental importância na predição de resposta a terapia hormonal. A presença de receptores de estrogênio e progesterona nos tumores de mama prediz uma resposta positiva ao uso do tamoxifeno, assim como a utilização de quimioterápicos tem resultados melhores em pacientes com negatividade para tais receptores (Paik, Bryant *et al.*, 1998). Este fato está relacionado a estes receptores não serem apenas marcadores, mas participarem de mecanismos de transcrição de genes relacionados ao estrogênio no núcleo celular (Gonzalez-Angulo, Morales-Vasquez *et al.*, 2007).

O gene c-ErbB-2 é também um fator preditivo de resposta. Localizado no cromossomo 17 e traduz a glicoproteína de membrana já citada HER2, de 185 kDa, que pertence a família dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Bargmann, Hung *et al.*, 1986; Yamamoto, Ikawa *et al.*, 1986). Semelhante ao EGFR, o receptor de fator de crescimento c-ErbB-2 possui intrínseca atividade tirosinaquinase, porém, o seu ligante não está claramente definido (Akiyama, Sudo *et al.*, 1986). Atualmente reconhecemos que o receptor c-ErbB-2 é a parte principal de todos os receptores erb (EGFR ou c-ErbB-1, c-ErbB-3 e c-ErbB-4) e que a sua ligação ao seu respectivo ligante medeia uma transdução lateral de sinal para todos os membros da família dos receptores erB e está envolvido na regulação de uma variedade de funções vitais incluindo crescimento celular, diferenciação e apoptose (Plowman, Green *et al.*, 1993; Carraway, Sliwkowski *et al.*, 1994).

Podemos encontrar amplificação e/ou superexpressão do gene c-ErbB-2 em aproximadamente 30% dos carcinomas de mama. Indivíduos com tais carcinomas apresentam uma taxa de sobrevida global menor e menor sobrevida livre de doença que pacientes cujos tumores não superexpresssem o c-ErbB-2 (Slamon, Godolphin *et al.*, 1989). O HER 2 é o alvo de um anticorpo monoclonal conhecido como trastuzumab e, portanto, a superexpressão celular do HER 2 é preditivo de resposta a este anticorpo.

A utilização do HER2 como preditor de resposta a quimioterapia não é bem estabelecida. Estudos iniciais levaram a hipótese que o uso do esquema com ciclofosfamida, metotrexate e fluorouracil (CMF) em tumores que superexpressam HER2 seria menos efetivo não foi confirmado em outros estudos. Fortalecendo a dúvida sobre essa associação, um estudo com a utilização de 4 linhagens de células de tumor mamário transfectadas com gene HER2 não encontrou diferença na resposta a antracíclicos em estudos *in vitro* em células tumorais (Pegram, Finn *et al.*, 1997).

Complementando a análise para definir o papel do HER2 como fator preditivo de resposta a quimioterapia e em recente revisão foram identificados 10 trabalhos abrangendo esse tema (Pritchard, Messersmith *et al.*, 2008). Sete destas avaliações reportaram uma associação não significativa entre HER2 e o tratamento. Mas os estudos *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) B11 (Paik, Bryant *et al.*, 1998), GUN-3 (De Placido, Perrone *et al.*, 1995) e *National Cancer Institute of Canada (NCIC) Clinical Trials Group* (CTG) MA.5 (Pritchard, Shepherd *et al.*, 2006) identificaram melhora da sobrevida global e da sobrevida livre de doença nas pacientes com HER2 superexpresso que receberam esquemas com antracíclicos.

Uma vez que não está clara a relação direta entre a hiperexpressão do HER-2, sua exata participação no mecanismo de ação das drogas e sua utilização como preditor de resposta, o uso desta molécula como marcador vem sendo questionado e estudado em associação com outras, como a topoisomerase II  $\alpha$ . A proximidade entre os genes da enzima

topoisomerase II  $\alpha$  e o c-ErbB-2 no cromossomo 17 sugerem que a enzima possa ser o verdadeiro fator preditivo de resposta, confundido pela freqüente associação entre os dois (Jarvinen e Liu, 2003). Essa associação de amplificação conjunta ocorre em cerca de 1/3 dos casos e a deleção da topoisomerase ocorre em 30% dos casos sendo que a amplificação do gene da topoisomerase sem superexpressão do c-ErbB-2 é um evento raro (Cardoso, Durbecq *et al.*, 2004; Durbecq, Paesmans *et al.*, 2004).

A avaliação topoisomerase II  $\alpha$  (topo II $\alpha$ ) como preditor de resposta a quimioterapia com antracíclicos demonstra que existe a associação positiva entre eles (Durbecq, Paesmans *et al.*, 2004). Nesse estudo, além do benefício em favor do uso de antracíclicos nos tumores com expressão aumentada da proteína, a análise contínua variada confirmou ganho de resposta de 9% a cada incremento de 10% do nível de topoisomerase. Resultados semelhantes foram escritos no estudo alemão usando o mesmo esquema como quimioterapia primária. A questão levantada por esses autores é que a topoisomerase seria a verdadeira responsável pela sensibilidade ao quimioterápico sendo que ela é o alvo dos antracíclicos. (Macgrogan, Rudolph *et al.*, 2003).

A topoisomerase é uma proteína chave na multiplicação celular. A estrutura extensa e complicada do DNA das células eucarióticas requer uma organização complexa de voltas e torções para se acomodar dentro do núcleo celular, tornando um desafio para a célula acessar regiões específicas do DNA para suas funções vitais. As topoisomerases são enzimas nucleares que reduzem a torção e compactação das voltas das hélices do DNA permitindo a transcrição e replicação. Esta enzima recebeu esse nome por ser capaz de alterar a topologia ou geometria tridimensional das moléculas do DNA sem causar danos na estrutura química, e age catalizando as reações de isomerização entre formas topológicas diferentes do DNA. A atividade enzimática permite que ocorra os cortes e religações das hélices do DNA através de uma separação transitória onde a topoisomerase fica ligada de forma covalente por um sítio

ativo de tirosina. Esta forma temporária de DNA clivado com nova conformação ocorre em curtos períodos em situações normais (Holden, 2001).

Inicialmente as topoisomerases eram classificadas com tipo I ou tipo II dependendo de onde atuavam. As reações que produziam uma quebra temporária de uma fita no DNA eram classificadas como tipo I e as que causavam uma quebra transitória dupla como tipo II. Esta descrição é correta mas foi aprimorada, com a descoberta de novos membros na família. A topoisomerase III foi posteriormente descrita e causa a quebra da fita única sendo, portanto, uma enzima do tipo I e a topoisomerase IV leva a quebra da dupla hélice é também uma enzima de tipo II (Holden, 2001).

Há uma diferença importante entre os dois tipos da proteína que é a localização cromossômica. A primeira fica localizada no cromossomo 20 e é uma proteína independente da atividade adenosina trifosfato (ATP). A topoisomerase II existe em duas isoformas: a principal alfa de 170-kDa localizada no cromossomo 17 e a beta de 180-kDa que fica no cromossomo 3. Embora as duas isoformas apresentem uma grande homologia (72%) suas funções e expressões são distintas, enquanto a expressão da topo II $\alpha$  é ciclo celular dependente (pico máximo na fase G2/M e declínio ao mínimo no fim da mitose) a isoforma beta é independente do ciclo celular. A função da alfa é vital para a segregação e condensação do cromossomo replicado e a função da exata da beta ainda não é bem definida (Jarvinen e Liu, 2003).

A falta de estudos direcionados a avaliação da topoisomerase II  $\alpha$  no esquema de quimioterapia combinada de taxane e antracíclico nos levou a elaborar as seguintes hipóteses para serem testadas neste estudo: se a expressão da topo II $\alpha$  no carcinoma invasivo de mama tem importância biológica na determinação da resposta clínica (resistência à droga) ao tratamento neoadjuvante com a combinação de taxane e antracíclico, e, caso se confirme esse dado, houve concordância com a avaliação histológica e com a determinação do HER-2.

## ***2. OBJETIVOS***

---



- Avaliar a importância da expressão do HER2/neu e da topoisomerase II  $\alpha$  na resposta clínica e patológica do tumor de mama induzida pela quimioterapia neoadjuvante *in vivo*.
- Verificar a taxa de resposta clínica e patológica no tratamento do câncer de mama localmente avançado com quimioterapia neoadjuvante.
- Verificar a taxa de tratamento cirúrgico conservador em pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas a tratamento neoadjuvante.

### ***3. MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### 3.1 Seleção de Pacientes

No período de fevereiro de 2000 a dezembro de 2007 foram incluídas consecutivamente 99 pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama nos estadios clínicos II b e III, classificados como tumores localmente avançados, com idade inferior a 80 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. Também foram incluídas as pacientes com tumores de maior diâmetro entre três e cinco centímetros 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. Os casos selecionados tinham indicação de quimioterapia neoadjuvante com o intuito de proporcionar cirurgia conservadora em casos operáveis na apresentação ou permitir a ressecção cirúrgica nos casos inoperáveis inicialmente. Nenhuma paciente era elegível para cirurgia conservadora primária e 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 (2-7). A mediana de idade das pacientes foi de 49 anos (24-79). Cinquenta e sete pacientes (57,5%) estavam na pré-menopausa antes do início do tratamento e 43 pacientes (43%) tinham idade inferior a 46 anos. Segundo o estadiamento clínico (EC), as pacientes foram classificadas como EC IIa: 19 pacientes (19,2%); EC IIb: 31 pacientes (31,3%); EC IIIa: 17 pacientes (17,2%); EC IIIb: 32 pacientes (33,3%). 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 considerada fator de exclusão.

Segundo a classificação histológica, a grande maioria dos tumores (90%), foi classificada como carcinoma ductal invasivo. O carcinoma lobular invasivo foi encontrado em sete pacientes e as outras três pacientes apresentaram tumores de origem epitelial com outras classificações histológicas. O grau de diferenciação histológica foi reportado em 97 neoplasias. O grau histológico I (bem diferenciado) foi encontrado em 18 tumores (18,5%), o grau II (moderadamente diferenciado) foi encontrado em 55 tumores (56,7%) e as neoplasias indiferenciadas (grau III) foram classificadas em 24 pacientes (24,8%). A Tabela 1 resume as características das pacientes.

**Tabela 1** - Características clínicas e histopatológicas de 99 pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.

<b>Características das Pacientes</b>	<b>N= 99 (variação)</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>		
Mediana	49 (24 – 79)	
≤45 anos	43	43
>45 anos	56	57
<b>Menopausa</b>		
Pré	57	57,5
Pós	42	42,5
<b>Ciclos de quimioterapia (mediana)</b>	3 (2 - 7)	
<b>Estadio Clínico</b>		
IIA	19	19,2
IIB	31	31,3
IIIA	17	17,2
IIIB	32	33,3
<b>Tipo histológico</b>		
Ductal	89	90
Lobular	7	7
Outros	3	3
<b>Grau histológico</b>		
I	18	18,5
II	55	56,7
III	24	24,8

### 3.2 Exames Iniciais e Complementares

Todas as pacientes tiveram a confirmação histopatológica da doença, sendo submetidas a biópsia incisional 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 conforme o protocolo do ambulatório com radiografia de tórax, ultra-sonografia hepática e cintilografia óssea. Antes do início do tratamento foram feitos exames bioquímicos das enzimas hepáticas (TGO, TGP, bilirrubinas), função 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 cardíaco 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 limitante durante a quimioterapia neoadjuvante (*National Comprehensive Cancer*

*Network (U.S.), 2000*). Não houve morte relacionada com efeito tóxico da quimioterapia neoadjuvante .

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 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.

**Tabela 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>
RO*	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%

\* RO: Resposta Objetiva

### 3.4 Tratamento Cirúrgico

Todas as pacientes foram submetidas à 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 foi 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 adjuvante foi indicado após o término da quimioterapia e radioterapia 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.

## 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 à 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 (radiografia de tórax, cintilografia óssea e ultra-sonografia hepática).

### **3.7 Estudo histopatológico**

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

O material da biópsia inicial e a peça cirúrgica foram fixados 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.

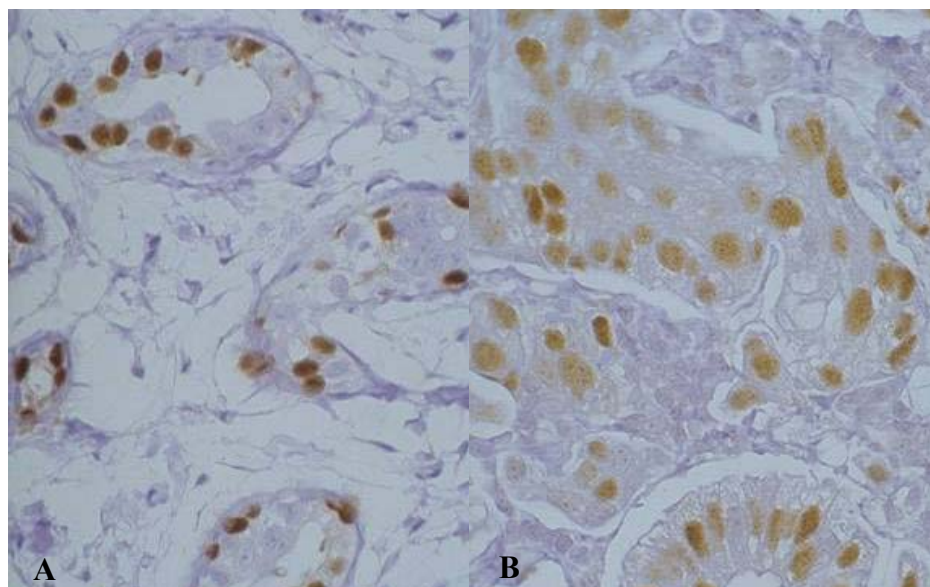
#### **3.7.2 Imunohistoquímica para RE, RP e proteínas topoisomerase e HER-2**

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), HER-2 oncoprotein (1:300, clone CB11, 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 alcoóis. 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 e RP

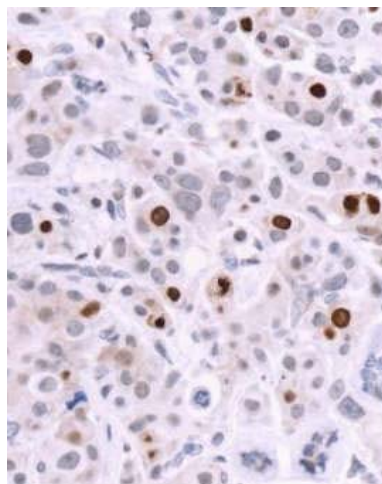
A avaliação da expressão dos receptores hormonais nos tumores foi realizada com microscopia de luz em aumento de 100 a 400 vezes. Os cortes histológicos dos espécimes obtidos antes e após a quimioterapia foram dispostos lado a lado em uma mesma lâmina para maior facilidade de comparação. As lâminas foram 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). 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 1 - Expressão dos receptores hormonais.** A) Expressão positiva para receptor de estrógeno (RE) em carcinoma ductal invasivo da mama com coloração nuclear de tom marrom (microscopia de luz; 400x). B) Expressão positiva para receptor de progesterona (RP) em carcinoma ductal invasivo da mama com coloração marrom na célula. (microscopia de luz; 400x)

#### 3.7.4 Análise da expressão da topoisomerase II $\alpha$ :

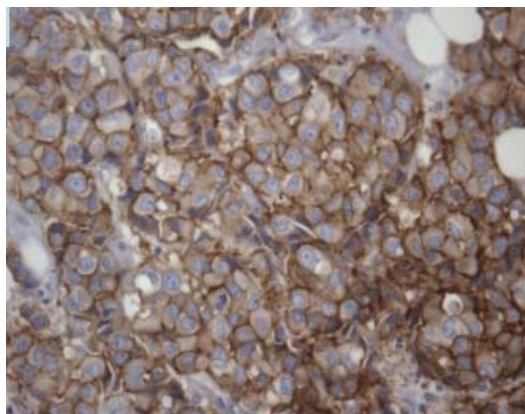
A expressão da topoisomerase foi avaliada através de reação de imunohistoquímica com a utilização de anticorpo monoclonal de camundongo anti-topoisomerase II $\alpha$ , clone 3F6 (Novocastra). O resultado foi baseado em um índice de expressão da proteína que será calculado através da relação do número de células neoplásicas com marcação nuclear positiva e o número total de células neoplásicas contadas. O índice de expressão foi calculado antes e após a quimioterapia e considerado positivo quando houve marcação de 10% ou mais dos núcleos celulares, e negativo quando houve menos de 10% de núcleos marcados (Di Leo, Larsimont *et al.*, 2001).



**Figura 2 – Expressão da topoisomerase II $\alpha$**

#### 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 3+ (Jacobs, Gown *et al.*, 1999b; a; Bilous, Dowsett *et al.*, 2003).



**Figura 3 - Expressão da proteína HER-2 avaliada pela imunohistoquímica em carcinoma ductal invasivo da mama com marcação de membrana celular (microscopia de luz; 400x).**

### 3.8 Análise Estatística

O teste de McNemar foi utilizado para avaliar a correlação pareada entre a expressão das proteínas topoisomerase 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 7.0.2 SAS (*Nominal logistic fit*). Significância estatística foi definida para  $p < 0.05$ .

## ***4. RESULTADOS***

---

#### 4.1 Expressão das proteínas topo II $\alpha$ , HER-2 e receptores hormonais

Foi realizado o estudo imunohistoquímico para analisar a expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e das proteínas topo II $\alpha$  e HER-2 no material de biópsia antes do início da quimioterapia. A expressão do receptor de estrogênio no tumor foi positiva em 67 pacientes (67,6%), a expressão do receptor de progesterona no tumor foi positiva em 53 pacientes (53,5%), a expressão da proteína topo II $\alpha$  no tumor foi considerada positiva em 23 pacientes (23,5%). A proteína HER-2 foi avaliada em 94 pacientes e foi considerada superexpressa (3+) no tumor de 28 pacientes (29,7%).

As pacientes foram classificadas de acordo com a expressão dos receptores hormonais (RH) e da proteína HER-2 em três subgrupos: o subgrupo HER2 (HER-2 negativo e RH negativos), o subgrupo triplo negativo (TN) definido pela expressão negativa das proteínas RE, RP e HER-2 e o grupo RE+ (pacientes com expressão positiva dos RH independente da expressão da proteína HER-2). Vinte e oito pacientes (28,3%) foram classificadas com HER2, 54 pacientes foram classificadas como RE+ (54,5%) e dezessete pacientes foram classificadas com TN. A Tabela 3 resume as taxas de expressão das proteínas topo II  $\alpha$ , HER-2, RE e RP.



**Tabela 3** - Característica imunohistoquímica de 99 tumores de pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.

<b>Imunohistoquímica</b>			<b>%</b>
<b>TopoIIa</b>	N= 98		
Positivo	23		23,5
Negativo	75		76,5
<b>RE</b>	N= 99		
Positivo	67		67,6
Negativo	32		32,4
<b>RP</b>	N= 99		
Positivo	53		53,5
Negativo	46		46,5
<b>HER-2</b>	N= 94		
Positivo	28		29,7
Negativo	66		70,3
<b>Subgrupos</b>	N= 99		
RE+	54		54,5
HER2	28		28,3
TN	17		17,2

#### 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 80 pacientes (80,8%) e a resposta clínica completa (cRC) em 22 pacientes (22,2%). Dezenove (19,2%) não apresentaram resposta clínica. Foram classificadas como doença estável (DE) 18 pacientes (18%) e progressão da doença (PD) em uma paciente (1,0%). Segundo a análise histológica da peça cirúrgica após a quimioterapia, pacientes com ausência de neoplasia invasiva foram classificadas como resposta patológica completa (pRC). A pRC foi observada em nove pacientes (9,1%).

Noventa e sete pacientes foram submetidas a cirurgia. A cirurgia conservadora pode ser realizada em 50 pacientes (51,5%). A mastectomia radical modificada foi realizada nas 47

pacientes quando a cirurgia conservadora não estava indicada. Os linfonodos axilares foram avaliados em todas as pacientes submetidas a dissecação cirúrgica. A mediana do número de linfonodos acometidos por doença metastática foi de 0 (0 – 10) no grupo de pacientes com resposta clínica completa e 2 (0 – 36) nas pacientes sem resposta clínica completa ( $p=0,02$ ; teste de Wilcoxon).

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

Avaliamos a relação entre a resposta patológica completa (pRC), as características clínicas das pacientes (idade, número de ciclos de quimioterapia e estadiamento clínico), grau histológico e parâmetros imunohistoquímicos de expressão das proteínas topo II  $\alpha$ , HER-2, receptores hormonais e os subtipos RE+, HER2 e TN. A média de idade das pacientes com pRC foi de 45,7 anos (38 - 57) no grupo pRC e, no grupo sem resposta patológica completa pSR, a média da idade foi de 48,7 anos (24 – 79). Não há diferença entre os grupos ( $p=0,2$ , teste t). O número médio de ciclos de quimioterapia foi três para ambos os grupos ( $p=0,6$ ; teste de Wilcoxon) e não encontramos diferença entre o estadiamento clínico entre os grupos ( $p=0,2$ , teste exato de Fisher).

Em pacientes com tumores RE+, a taxa de pRC foi 4,7% em comparação com uma taxa de resposta patológica completa de 23% em pacientes com tumores RE negativo ( $p=0,05$ ; teste exato de Fisher). O receptor de progesterona ( $p=0,2$ ; teste exato de Fisher), a superexpressão da proteína HER-2 ( $p=1,0$ ; teste exato de Fisher) e a expressão da proteína topo II $\alpha$  ( $p=0,4$ ; teste exato de Fisher) não tiveram qualquer influência na taxa de resposta patológica. No entanto, quando classificamos as pacientes conforme os subtipos RE+, HER2 e TN, observamos uma taxa de resposta maior em pacientes com tumores triplo negativos (41,6%) seguido das pacientes com tumores HER2 (8%) e uma reduzida taxa (1,8%) de

resposta em pacientes com tumores RE+ ( $p= 0.004$ ; teste do qui-quadrado). A Tabela 4 exibe a relação das características clínicas e histopatológicas entre as pacientes dos grupos pRC e pSR.

#### **4.4 Expressão da proteína topo II $\alpha$ antes e após a quimioterapia neoadjuvante.**

Expressão positiva da proteína topo II $\alpha$  pode ser avaliada antes e após a quimioterapia (análise pareada) em 94 casos. Entre 69 casos com expressão negativa antes da quimioterapia, oito casos a expressão da proteína topo II $\alpha$  foi considerada positiva após o tratamento neoadjuvante. Cinco casos foram considerados como expressão negativa após a quimioterapia entre os 21 casos considerados positivos antes da quimioterapia. Não foi observado diferença ( $p= 0,4$ ; teste de McNemar).

**Tabela 4** - Características clínicas e histopatológicas e suas relações com a resposta clínica a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina em 99 pacientes com câncer de mama localmente avançado.

	pRC (n)	pSR (n)	P
<b>Idade</b>			
Média (variação)	45,7 (38 – 57)	48,7 (24 - 79)	0,2
≤45 anos	5	38	
>45 anos	4	52	0,4
<b>Ciclos de QT (variação)</b>	3 (3 - 5)	3 (2 - 7)	0,6
<b>Estadio Clínico</b>			
IIA	1	18	
IIB	5	26	
IIIA	2	15	
IIIB	1	31	0,2
<b>Grau histológico</b>			
I	2	16	
II	5	50	
III	2	22	0,9
<b>RE</b>			
Positivo	3	64	
Negativo	6	26	0,05
<b>RP</b>			
Positivo	3	50	
Negativo	6	40	0,2
	<b>pRC (n)</b>	<b>pSR (n)</b>	<b>P</b>
<b>TopIIα</b>			
Positivo	3	20	
Negativo	6	69	0,4
<b>HER-2</b>			
Positivo	3	25	
Negativo	6	60	1,0
<b>Subtipo</b>			
RE+	1	53	
HER2	3	25	
TN	5	12	0,005

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

#### 4.5 Expressão da proteína topo II $\alpha$ e sua relação com os receptores hormonais e a proteína HER-2

A relação entre a expressão da proteína topo II  $\alpha$  e a proteína HER-2, receptores hormonais e os subtipos RE+, HER2 e TN foi analisada nas amostras de biópsia antes e após a quimioterapia neoadjuvante. Não encontramos uma correlação da expressão da topo II $\alpha$  com a proteína HER-2 ( $\chi^2= 1,0$  e  $p= 0,3$ ; teste de Bowker). No entanto, existe uma correlação entre a expressão da proteína topo II  $\alpha$  e a expressão dos receptores hormonais (RE e RP). Em 66 tumores com expressão positiva de RE, 19,7% apresentavam expressão positiva da topo II  $\alpha$ . Nos 32 tumores RE-, a expressão da topo II  $\alpha$  foi positiva em 31,2% ( $\chi^2= 29,3$  e  $p< 0,0001$ ; teste de Bowker). Em 52 tumores com expressão positiva de RP, 15,3% apresentavam expressão positiva da topo II  $\alpha$ . Nos 46 tumores RP-, a expressão da topo II  $\alpha$  foi positiva em 32,6% ( $\chi^2= 14,2$  e  $p= 0,002$ ; teste de Bowker). A Tabela 5 apresentamos o resumo dos resultados da relação entre a expressão da topo II  $\alpha$  e das outras proteínas analisadas.

**Tabela 5** - Expressão da proteína topo II $\alpha$  e sua relação com os receptores hormonais e a proteína HER-2.

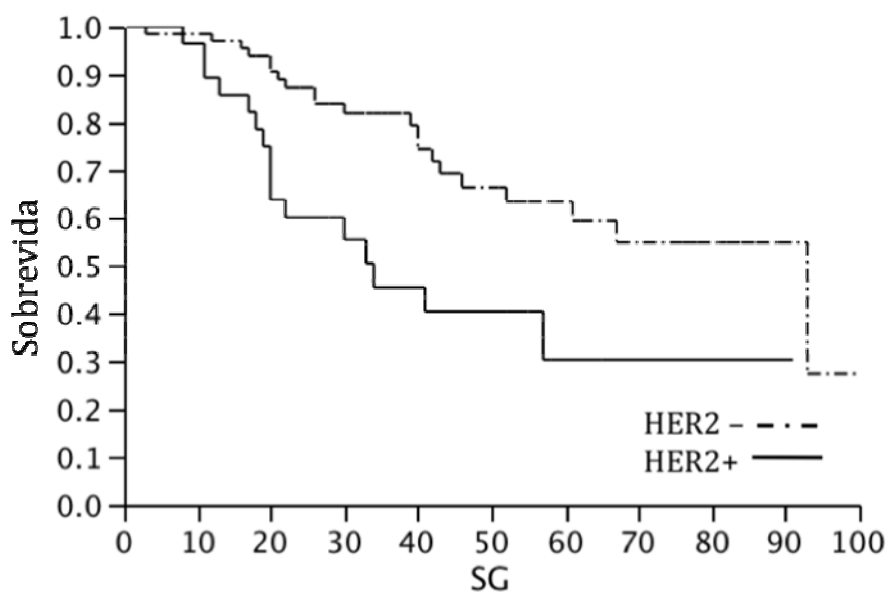
<b>Imunohistoquímica</b>	<b>topoII<math>\alpha</math>+(n)</b>	<b>topoII<math>\alpha</math>-(n)</b>	<b><math>\chi^2</math> (Bowker)</b>	<b>P</b>
<b>RE+</b>	13	53		
<b>RE-</b>	10	22	29,3	<0,0001
<b>RP+</b>	8	44		
<b>RP-</b>	15	31	14,2	0,002
<b>HER-2+</b>	7	20		
<b>HER-2-</b>	14	52	1,0	0,3
<b>Subtipos</b>				
RE+	12	42		
HER2	7	20		
TN	4	13	2,5*	0,9

\*teste do  $\chi^2$

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

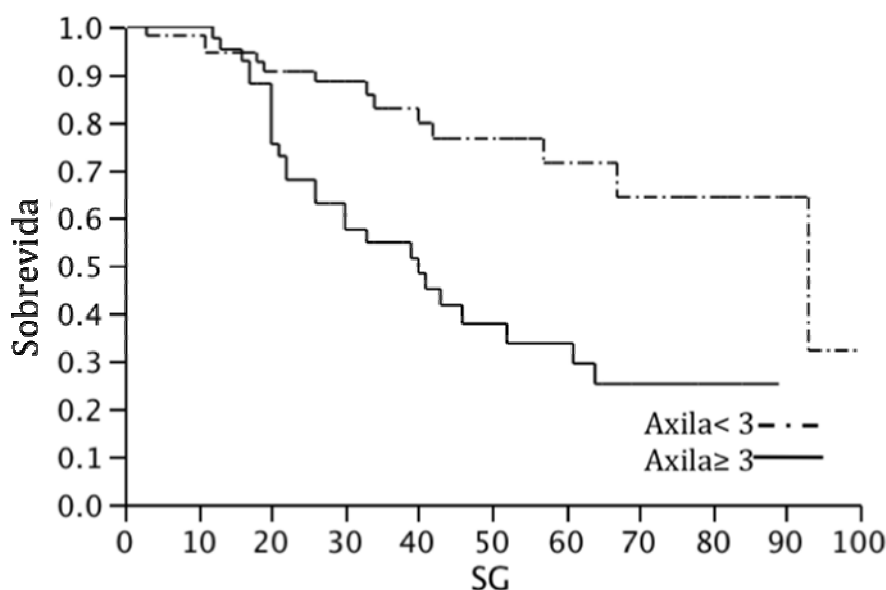
O impacto das características clínicas (idade, estágio clínico, resposta clínica, tipo de cirurgia), histológicas (grau histológico, estado axilar, resposta patológica) e imunohistoquímicas (expressão de receptores hormonais e das proteínas topo II $\alpha$  e HER-2) na sobrevida livre de doença e na sobrevida global foi analisado. Em análise univariada, o estágio clínico (II e III), o tipo de cirurgia realizada (cirurgia conservadora e mastectomia), a resposta patológica completa e a expressão do RE apresentaram significância em termos de sobrevida livre de doença. Em relação a análise da sobrevida global, o estadiamento clínico, o tipo de cirurgia realizada, o número de linfonodos axilares acometidos a expressão das proteínas HER-2 e receptor de estrogênio e o subtipo histológico (RE+, HER+ e TN) apresentaram significância como fatores de prognóstico. A expressão da proteína topoII $\alpha$  não se mostrou um fator prognósticos neste grupo de pacientes.

Pacientes com tumores com superexpressão da proteína HER-2 tiveram uma sobrevida média livre de doença de 40% em comparação com 70% nas pacientes com tumores com expressão negativa ( $p= 0,04$ ; Log-Rank). A sobrevida global também é afetada pela expressão do HER-2 no tumor ( $p= 0,004$ ). O Gráfico 1 mostra a curva de sobrevida global em relação com a expressão da proteína HER-2.



**Gráfico 1** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão da oncoproteína HER-2. (SG= sobrevida global).

A análise da relação entre o número de linfonodos axilares acometidos e a ocorrência de recidiva a distância ( $p= 0,003$ ; regressão logística) e morte pela doença ( $p< 0,0001$ ; regressão logística). Por meio da análise da curva ROC (*Receiving Operation Curve*), determinamos o melhor ponto de corte para o número de linfonodos axilares acometidos e análise de risco de morte pela doença ( $>2$ ). O gráfico 2 mostra a curva de sobrevida global em pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante e sua correlação com o estado axilar.

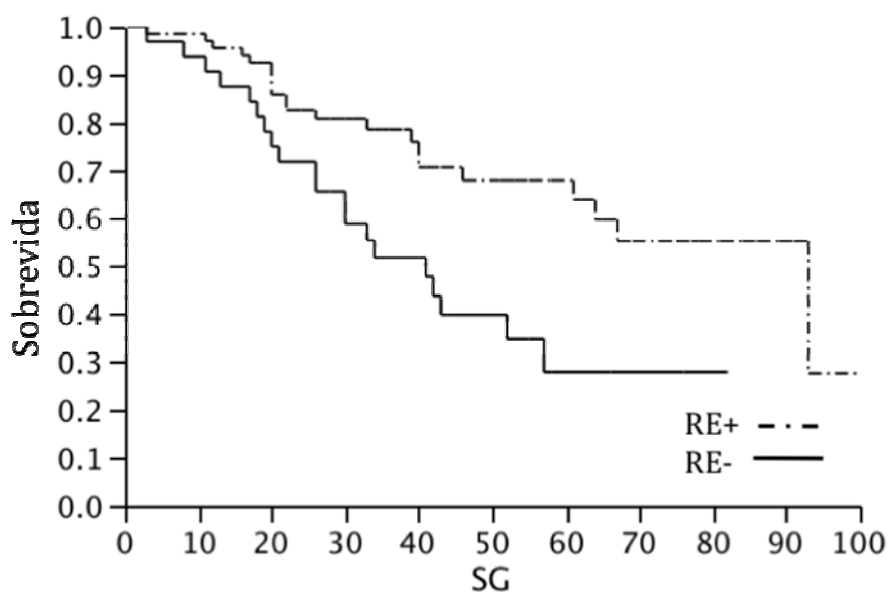


**Gráfico 2** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com o estado axilar. (SG= Sobrevida global).

Pacientes com resposta patológica completa se mostrou o grupo de melhor prognóstico. Não foi observada nenhuma recorrência a distância e nenhuma morte pela doença neste grupo de pacientes.

Em análise multivariada do risco de recorrência a distância e risco de morte pela doença foi realizada utilizando as variáveis que demonstraram significância no prognóstico em análise univariada. A Tabela 6 e 7 resumem os resultados da regressão logística para o risco de recorrência a distância e morte pela doença, respectivamente. Os resultados demonstram que o risco de recorrência da doença sofre influência da resposta patológica, da expressão do receptor de estrogênio e do status axilar. O risco de morte é influenciado pela expressão do receptor de estrogênio, status axilar e expressão da oncoproteína HER2.





**Gráfico 3** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão de receptores de estrogênio. (SG= Sobrevida global; RE= receptor de estrogênio).

**Tabela 6** - Análise multivariada (regressão logística) para risco de recorrência a distância em relação com o estadiamento clínico, resposta patológica, expressão de RE, tipo de cirurgia realizada (mastectomia x cirurgia conservadora) e estado axilar (mais de 2 linfonodos positivos).

Variáveis	OR	$\chi^2$	P
EC	1,4	0.49253328	0.4
pRP	63545	9.36734533	0.0022
RE	6,2	11.0231089	0.0009
Cirurgia	1,3	0.31665769	0.5
pAxila	1,5	8.58716763	0.003

**Tabela 7** - Análise multivariada (regressão logística) para risco de morte pela doença em relação com o estadiamento clínico, expressão de RE, tipo de cirurgia realizada (mastectomia x cirurgia conservadora), o estado axilar (mais de 2 linfonodos positivos), a expressão do HER2 e o subtipo histológico.

Variáveis	OR	$\chi^2$	P
EC	1,0	1.87967e-5	0.9
RE	14,2	7.58559565	0.005
Cirurgia	1,6	0.68974741	0.4
pAxila	9,4	16.5461242	<.0001
ERBB2	5,5	3.56255193	0.05
Subtipo	0,2	1.71409412	0.1

## ***5. DISCUSSÃO***

---

O tratamento do câncer de mama localmente avançado tem evoluído nos últimos anos com a introdução do uso da quimioterapia primária ou neoadjuvante que pode trazer benefícios importantes para esse grupo de pacientes (Kaufmann, Hortobagyi *et al.*, 2006). A utilização desta estratégia tem como objetivo a redução do volume do tumor primário possibilitando 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). A expectativa do tratamento é que cerca de 80% das pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante irão apresentar benefício local decorrente da regressão tumoral (*downstaging*). Embora não ocorra mudança da sobrevida global quando comparamos o tratamento neoadjuvante com o tratamento adjuvante clássico, as pacientes que tem resposta à quimioterapia tem impacto positivo no controle da doença (Kaufmann, Hortobagyi *et al.*, 2006).

A avaliação da resposta clínica local e patológica em 99 pacientes com câncer de mama localmente avançados que foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante com a combinação de taxane e antraciclina demonstrou resposta clínica objetiva de 80,8% e em nove (9,2%) foi observada remissão completa histopatológica da lesão invasora na mama e axila. A taxa de cirurgia conservadora foi da ordem de 51,5%. Esta taxa de resposta é similar as taxas descritas 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. Dois estudos recentes descreveram taxas de resposta patológica completa maiores que a observada em nosso estudo, com 11% e 10.5%, 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. Em nosso grupo há um predomínio de pacientes com estadios localmente mais avançados e dois terços das pacientes apresentam axila extensamente acometida (mais de 3 ganglios), caracterizando esta casuística como de mal prognóstico, mesmo frente aos grupos avaliados por outros autores (Ganem, Tubiana-Hulin *et al.*, 2003; Han, Kim *et al.*, 2006).

A quimioterapia neoadjuvante tem o intuito de testar *in vivo* a sensibilidade do tumor à 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 (Rajan, Esteva *et al.*, 2004). Na literatura existem inúmeros estudos focados em fatores preditivos ou prognósticos com uso da quimioterapia primária que variam desde a análise histológica e expressão gênica de vários produtos (Von Minckwitz, Sinn *et al.*, 2008) até correlação de resposta e estudos de imagem (Nicoletto, Nitti *et al.*, 2008). 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 focamos na análise da topoisomerase como fator relacionado a resposta e sobrevida.

A topoisomerase foi estudada por ser o local de atuação dos antracíclicos e estar relacionado a um fator já escrito de mau prognóstico que é o gene c-ErB-2. A proximidade dos ambos ocasiona a superexpressão conjunta em 1/3 dos casos, sendo que a amplificação do gene da topoisomerase raramente ocorre sem a amplificação do c-ErB-2 (Di Leo, Chan *et al.*, 2004). A proteína topo II $\alpha$  em condições normais não é detectada em células na fase G<sub>0</sub>, mas sua atividade aumenta substancialmente na fase S atingindo o máximo na fase G<sub>2</sub>-M e reduz após (Hellemans, Van Dam *et al.*, 1995).

Quanto a ocorrência nos tumores mamários, sua distribuição é heterogênea nos núcleos celulares e varia sua expressão de 2 a 62% das células tumorais. A proteína é considerada superexpressa quando acomete mais de 10% e sua frequência nos tumores mamários é de cerca 1/3 dos casos (Tuccari, Rizzo *et al.*, 1993). No grupo estudado a superexpressão da topoisomerase II  $\alpha$  ocorreu em 23,5%, demonstrando concordância com a literatura existente. Por ser um marcador de proliferação celular, alguns autores encontraram aumento da frequência da proteína em tumores mais agressivos que apresentavam alto grau, elevado tamanho tumoral e envolvimento dos gânglios axilares (Hellemans, Van Dam *et al.*, 1995; Nakopoulou, Lazaris *et al.*, 2000), mas na literatura atual há uma grande discrepância nesta relação clinico-patológica (Jarvinen, Holli *et al.*, 1998; Rudolph, Olsson *et al.*, 1999; Depowski, Rosenthal *et al.*, 2000). No presente estudo identificamos a relação entre a proteína e a negatividade dos receptores hormonais, demonstrando a presença da topoisomerase em tumores com características mais agressivas.

A taxa de pRC em pacientes com tumores RE+ foi de 4,7 % e de 23 % nas RE negativas. Este aspecto foi avaliado por um estudo com 1731 pacientes tratadas com quimioterapia primária baseada em antraciclicos para tumores avançados com taxa de pRC de 8 % nos casos de RE + e de 24 % nos casos de receptor negativo (Guarneri, Broglio *et al.*, 2006). Nota-se o fato de tumores sem expressão hormonal serem mais agressivos e sensíveis ao tratamento quimioterápico, mas a real importância da quimiorresistência nesse grupo específico não está bem definida pois não foi comprovada a evolução desfavorável. Fato que pode ser justificado pela adjuvância com o bloqueio hormonal que resgata pacientes que teriam desfecho desfavorável da doença.

Na associação entre a topoisomerase II $\alpha$  e o grupo Re +, é esperado que seja predominantemente negativa, pois a sua expressão está relacionada a alta taxa de multiplicação celular, como apontado em estudos que foram sua associação com marcadores

de multiplicação celular (Gasser, Walter *et al.*, 1992; Taagepera, Rao *et al.*, 1993). Em nossos resultados podemos constatar que este evento é verdadeiro, pois 77,7 % dos RE+ tinham topoisomerase negativa.

A análise da superexpressão da proteína HER-2 não apresentou, de forma isolada, influencia na taxa de resposta a quimioterapia. Esse aspecto está em concordância com estudo prévio utilizando docetaxel e doxorrubicina onde não houve relação entre a resposta clínica e a presença da superexpressão do HER-2 (Von Minckwitz, Sinn *et al.*, 2008). Na avaliação da correlação entre a topoisomerase e o HER-2 não observamos diferença estatística. Este fato já foi descrito em estudo anterior que investigou a amplificação do gene da topoisomerase e da sua expressão protéica relacionado ao HER-2. Ao contrário do que ocorre com o HER-2, onde a hiperexpressão da proteína é fortemente associada à amplificação do gene com 98,8% de associação, a hiperexpressão da proteína ocorre de forma independente da amplificação do gene (Mueller, Parkes *et al.*, 2004).

Nas pacientes com tumores RE-, encontramos um numero significativamente maior de pacientes com superexpressão da topoisomerase. Este dado é compatível com a literatura onde vários autores identificaram esta associação e sua justificativa está na presença de tumores mais agressivos nesse grupo (Jarvinen, Kononen *et al.*, 1996; Jarvinen, Holli *et al.*, 1998; Depowski, Rosenthal *et al.*, 2000).

Na avaliação dos casos triplo negativos, foram identificados treze com topoisomerase negativa e quatro com superexpressão da proteína. Nos casos negativos, encontramos resposta patológica completa em seis dos dezessete casos. Este dado é consistente com a literatura que demonstra altas taxas de resposta nos tumores TN, embora este perfil de neoplasia tenha alta ocorrência de recidivas a distância. A expressão do topo II $\alpha$  nestes casos está em desacordo com a literatura pela sua baixa correlação e, fica evidente que existem vários outros genes e proteínas envolvidos na regulação da proliferação celular e do comportamento biológico do

tumor e que este processo não pode ser resumido em uma única e exclusiva proteína (Liedtke, Mazouni *et al.*, 2008).

A avaliação do risco de recorrência da neoplasia está associada a resposta patológica, expressão dos receptores hormonais e status axilar. Em relação à sobrevida das pacientes estudadas, a resposta patológica completa, a expressão da proteína HER2, o número de linfonodos axilares acometidos e a presença de receptores hormonais apresentaram significância como fatores prognósticos. A pRC é um dos fatores mais importantes na quimioterapia neoadjuvante modificando de forma substancial a evolução da doença.(Guarneri, Broglio *et al.*, 2006; Kaufmann, Hortobagyi *et al.*, 2006). O comprometimento axilar é um importante fator de prognóstico, definido tanto em nosso trabalho quanto na literatura vigente e é uma das bases do estadiamento da câncer de mama (Hutter, 1987; Gonzalez-Angulo, Morales-Vasquez *et al.*, 2007). O Her-2 tem impacto como fator prognóstico e esse seu papel já foi bem identificado na literatura (Sjogren, Inganas *et al.*, 1998). A expressão hormonal positiva está associada com tumores histologicamente bem diferenciados, com fração de células em divisão mais baixa e com diploidia, e todos estes fatores levam a um prognóstico melhor para estas pacientes como observado em nossa análise (Knoop, Bentzen *et al.*, 2001).

A expressão da topoisomerase não se mostrou fator preditivo ou prognóstico nas pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante com esquema combinado de antracíclicos e taxanes. A análise desses de dados questiona a topoisomerase com um fator que está associado a taxa de replicação celular, como já descrito (Sandri, Hochhauser *et al.*, 1996; Lynch, Guinee *et al.*, 1997) e não ao comportamento clínico da doença.

A identificação do comportamento clínico da neoplasia maligna de mama é complexo pois ocorre uma progressiva acumulação da mutação de múltiplos genes combinadas com a desregulação epigenética de genes críticos e vias protéicas (Olopade, Grushko *et al.*, 2008).

Esse fenótipo heterogêneo torna seu tratamento mais difícil e a tendência atual é a análise combinada de múltiplos genes e proteínas, determinando a assinatura gênica de cada tumor. A topoisomerase II isoladamente não foi considerada um fator preditivo ou prognóstico de fundamental importância, porém ela tem seu espaço preservado no conjunto de genes a serem avaliados, e fica claro que sua associação com outras proteínas já estudadas a torna de valor para futuras investigações. Desta forma teremos mais informações do tumor para definir adequadamente seu tratamento.



## ***6. CONCLUSÕES***

---

No nosso estudo não houve significância na avaliação da topoisomerase II  $\alpha$  como fator preditor de resposta e sobrevida ao uso de quimioterapia neoadjuvante com esquema combinado de antracíclico e taxane. A superexpressão do HER-2 teve impacto na sobrevida, confirmando ser fator prognóstico, mas não foi capaz de prever resposta a quimioterapia neoadjuvante.

Os tumores RH- tiveram uma expressiva melhor resposta a quimioterapia primária nesta avaliação.

## ***7. ANEXOS***

---

## 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 a 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  $> 1$  mm e  $\leq 5$  mm

T1b – tumor  $> 5$  mm e  $\leq 10$  mm

T1c – tumor  $> 10$  mm e  $\leq 2,0$  cm

T2 – tumor  $> 2,0$  cm e  $\leq 5,0$  cm

T3 – tumor  $> 5,0$  cm

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 mamária 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 mamária 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 linfo-cintilografia) 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, freqüentemente 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+) (ls).

<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 linfocintilografia) ou por exame físico

\*\* *Não clinicamente aparente* é definido pela não detecção por exames de imagem (excluindo linfocintilografia) 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***

---

Akiyama, T., C. Sudo, *et al.* The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science, v.232, n.4758, Jun 27, p.1644-6. 1986.

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.

Bargmann, C. I., M. C. Hung, *et al.* The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. Nature, v.319, n.6050, Jan 16-22, p.226-30. 1986.

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.

Berry, D. A., K. A. Cronin, *et al.* Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. N Engl J Med, v.353, n.17, Oct 27, p.1784-92. 2005.

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.

Cardoso, F., V. Durbecq, *et al.* Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. Int J Oncol, v.24, n.1, Jan, p.201-9. 2004.

Carraway, K. L., 3rd, M. X. Sliwkowski, *et al.* The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. J Biol Chem, v.269, n.19, May 13, p.14303-6. 1994.

Cheson, B. D., P. H. Phillips, *et al.* Clinical trials referral resource. Clinical trials of suramin. Oncology (Williston Park), v.9, n.2, Feb, p.161, 163. 1995.

De Placido, S., F. Perrone, *et al.* CMF vs alternating CMF/EV in the adjuvant treatment of operable breast cancer. A single centre randomised clinical trial (Naples GUN-3 study). Br J Cancer, v.71, n.6, Jun, p.1283-7. 1995.

Depowski, P. L., S. I. Rosenthal, *et al.* Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. Mod Pathol, v.13, n.5, May, p.542-7. 2000.

Di Leo, A., S. Chan, *et al.* HER-2/neu as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. Breast Cancer Res Treat, v.86, n.3, Aug, p.197-206. 2004.

Di Leo, A., D. Larsimont, *et al.* HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. Ann Oncol, v.12, n.8, Aug, p.1081-9. 2001.

Durbecq, V., M. Paesmans, *et al.* Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. Mol Cancer Ther, v.3, n.10, Oct, p.1207-14. 2004.

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

Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet, v.358, n.9291, Oct 27, p.1389-99. 2001.

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.

Gasser, S. M., R. Walter, *et al.* Topoisomerase II: its functions and phosphorylation. Antonie Van Leeuwenhoek, v.62, n.1-2, Aug, p.15-24. 1992.

Gonzalez-Angulo, A. M., F. Morales-Vasquez, *et al.* Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. Adv Exp Med Biol, v.608, p.1-22. 2007.

Guarneri, V., K. Broglio, *et al.* Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. J Clin Oncol, v.24, n.7, Mar 1, p.1037-44. 2006.

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.

Hanahan, D. e R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.

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.

Hellemans, P., P. A. Van Dam, *et al.* Immunohistochemical study of topoisomerase II-alpha expression in primary ductal carcinoma of the breast. J Clin Pathol, v.48, n.2, Feb, p.147-50. 1995.

Holden, J. A. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. Curr Med Chem Anticancer Agents, v.1, n.1, May, p.1-25. 2001.

Hutter, R. V. At last--worldwide agreement on the staging of cancer. Arch Surg, v.122, n.11, Nov, p.1235-9. 1987.

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.

Jarvinen, T. A., K. Holli, *et al.* Predictive value of topoisomerase IIalpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. Br J Cancer, v.77, n.12, Jun, p.2267-73. 1998.

Jarvinen, T. A., J. Kononen, *et al.* Expression of topoisomerase IIalpha is associated with rapid cell proliferation, aneuploidy, and c-erbB2 overexpression in breast cancer. Am J Pathol, v.148, n.6, Jun, p.2073-82. 1996.

Jarvinen, T. A. e E. T. Liu. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.78, n.3, Apr, p.299-311. 2003.

Jemal, A., R. Siegel, *et al.* Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin, v.58, n.2, Mar-Apr, p.71-96. 2008.

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.

Knoop, A. S., S. M. Bentzen, *et al.* Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. J Clin Oncol, v.19, n.14, Jul 15, p.3376-84. 2001.

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.

Liedtke, C., C. Mazouni, *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. J Clin Oncol, v.26, n.8, Mar 10, p.1275-81. 2008.

Lynch, B. J., D. G. Guinee, Jr., *et al.* Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. Hum Pathol, v.28, n.10, Oct, p.1180-8. 1997.

Macgrogan, G., P. Rudolph, *et al.* DNA topoisomerase IIalpha expression and the response to primary chemotherapy in breast cancer. Br J Cancer, v.89, n.4, Aug 18, p.666-71. 2003.

Mano, M. S. e A. Awada. Primary chemotherapy for breast cancer: the evidence and the future. Ann Oncol, v.15, n.8, Aug, p.1161-71. 2004.

Mueller, R. E., R. K. Parkes, *et al.* Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. Genes Chromosomes Cancer, v.39, n.4, Apr, p.288-97. 2004.

Nakopoulou, L., A. C. Lazaris, *et al.* DNA topoisomerase II-alpha immunoreactivity as a marker of tumor aggressiveness in invasive breast cancer. Pathobiology, v.68, n.3, May-Jun, p.137-43. 2000.

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

Nicoletto, M. O., D. Nitti, *et al.* Correlation between magnetic resonance imaging and histopathological tumor response after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Tumori, v.94, n.4, Jul-Aug, p.481-8. 2008.

Olopade, O. I., T. A. Grushko, *et al.* Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. Clin Cancer Res, v.14, n.24, Dec 15, p.7988-99. 2008.

Paik, S., J. Bryant, *et al.* erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst, v.90, n.18, Sep 16, p.1361-70. 1998.

Pegram, M. D., R. S. Finn, *et al.* The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. Oncogene, v.15, n.5, Jul 31, p.537-47. 1997.

Perou, C. M., T. Sorlie, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. Nature, v.406, n.6797, Aug 17, p.747-52. 2000.

Plowman, G. D., J. M. Green, *et al.* Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. Nature, v.366, n.6454, Dec 2, p.473-5. 1993.

Pritchard, K. I., H. Messersmith, *et al.* HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. J Clin Oncol, v.26, n.5, Feb 10, p.736-44. 2008.

Pritchard, K. I., L. E. Shepherd, *et al.* HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. N Engl J Med, v.354, n.20, May 18, p.2103-11. 2006.

Rajan, R., F. J. Esteva, *et al.* Pathologic changes in breast cancer following neoadjuvant chemotherapy: implications for the assessment of response. Clin Breast Cancer, v.5, n.3, Aug, p.235-8. 2004.

Rajan, R., A. Poniecka, *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.

Rudolph, P., H. Olsson, *et al.* Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. J Pathol, v.187, n.2, Jan, p.207-16. 1999.

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

Sandri, M. I., D. Hochhauser, *et al.* Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta genes in human breast cancers. Br J Cancer, v.73, n.12, Jun, p.1518-24. 1996.

Sjogren, S., M. Inganas, *et al.* Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. J Clin Oncol, v.16, n.2, Feb, p.462-9. 1998.

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.

Sorlie, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. Eur J Cancer, v.40, n.18, Dec, p.2667-75. 2004.

Taagepera, S., P. N. Rao, *et al.* DNA topoisomerase II alpha is the major chromosome protein recognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.18, Sep 15, p.8407-11. 1993.



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.

Tuccari, G., A. Rizzo, *et al.* Immunocytochemical detection of DNA topoisomerase type II in primary breast carcinomas: correlation with clinico-pathological features. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, v.423, n.1, p.51-5. 1993.

Von Minckwitz, G., H. P. Sinn, *et al.* Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. Breast Cancer Res, v.10, n.2, p.R30. 2008.

Yamamoto, T., S. Ikawa, *et al.* Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature, v.319, n.6050, Jan 16-22, p.230-4. 1986.

## ***9. APÊNDICE***

---

# **TRABALHO PARA PUBLICAÇÃO ( Paper)**

## **Expressão da topoisomerase II alpha e do HER-2/neu em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante**

**(Expression of topoisomerase II alpha and HER-2/neu in breast cancer patients  
submitted to neoadjuvant treatment)**

**Autores:**

**Instituição: Divisão de mastologia do departamento de ginecologia e obstetrícia da  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo**

**Endereço para correspondência: fabiozola@hotmail.com**

**Avenida dos Bandeirantes 3900, 8 Andar, HCRP - USP**

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a importância da expressão das proteínas topoisomerase II alfa (topo II) e HER-2 como fatores preditivos da resposta à quimioterapia neoadjuvante e prognóstico em pacientes com câncer de mama nos estádio clínico II e III. Pacientes e métodos: 99 pacientes receberam quimioterapia neoadjuvante com docetaxel (75mg /m<sup>2</sup>) e epirrubicina (50 mg/m<sup>2</sup>) em infusão endovenosa no dia 1 a cada 3 semanas após terem sido submetidas a biópsia incisional. Foi complementado tratamento sistêmico com quimioterapia adjuvante com CMF ou FEC de acordo com o estado axilar avaliada após a cirurgia definitiva e/ou hormonioterapia de acordo com a avaliação dos receptores hormonais. Avaliamos a taxa de resposta ao tratamento neoadjuvante e a influência da topo II alfa e do HER-2 na taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante bem como na sobrevida livre de doença e sobrevida global. Também foram avaliadas a expressão dos receptores hormonais. Resultados: a taxa de resposta clínica objetiva foi de 80,8% com 9,1% de resposta patológica completa. A expressão da topo II alfa não apresentou significância nas taxas de resposta ou na sobrevida das pacientes e não houve correlação entre a expressão desta proteína e de HER-2. A superexpressão da proteína HER-2 foi associada com uma redução significativa nas taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global (p= 0,04 e p= 0,004, respectivamente). Conclusão: a expressão da topo II alfa não demonstrou, em nosso estudo, ser fator preditivo ou prognóstico nas pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, quimioterapia neoadjuvante, topoisomerase II alpha, HER-2/neu.

## ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the importance of the expression of the proteins topoisomerase II alpha (topo II) and HER-2 as predictive factors to response to neoadjuvant chemotherapy and the prognosis of patients diagnosed with clinical stage II and stage III breast cancer. Patients and methods: 99 patients have received neoadjuvant chemotherapy with docetaxel (75mg /m<sup>2</sup>) and epirubicine (50 mg/m<sup>2</sup>) through intravenous infusion on D1 q3 weeks, after submitted to pathologic specimen harvest. Systemic treatment was then complemented with CMF or FEC according to the status of axilla involvement after surgical staging and/or hormone therapy according to hormone receptor status. We evaluated the response rate to neoadjuvant treatment and the influence of topo II alpha and HER-2 expression on the response rate and disease free survival and overall survival. The expression of hormone receptors was also evaluated. Results: Objective clinical response was 80.8%, with 9.1% of complete pathological response. Topo II alpha expression did not correlate to response to chemotherapy or survival and there was no correlation between topo II alpha expression and HER-2 expression. Superexpression of HER-2 protein was associated to a significant reduction in disease free survival and overall survival (p=0,04 and p=0,004, respectively). Conclusion: topo II alpha expression did not demonstrate, in our study, to be a predictive nor prognostic factor to the patients submitted to neoadjuvant with docetaxel and epirubicin.

Key-words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, topoisomerase II alpha, HER-2/neu.

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia de maior prevalência mundial entre as mulheres atualmente. O número de casos novos previstos no Brasil para 2008 é de 49.400, com risco estimado de 51 casos a cada 100.000 mulheres e a mortalidade é de 10,40 óbitos por 100.000 mulheres. Excluindo os tumores de pele, o câncer de mama é o mais incidente na região sudeste com risco estimado de 68 casos por 100.000 mulheres e corresponde a cerca de 20% dos casos novos femininos de câncer (INCA, 2008).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (INCA, 2008).

Com os dados conhecidos para avaliação prognóstica, as pacientes com tumores de mama localmente avançados compreendem um grupo com elevado risco de desenvolvimento de doença sistêmica e tem alta taxa de inoperabilidade pela avaliação clínica. Desta forma, o tratamento atual está baseado na terapêutica sistêmica primária com drogas antineoplásicas com o objetivo de tratar eventuais micrometástases e tornar viável a ressecção cirúrgica. Estas pacientes constituem uma população heterogênea em relação ao prognóstico sendo a resposta clínica a quimioterapia um fator prognóstico independente (Mano e Awada, 2004).

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), no grupo que apresenta 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).

Dentre os fatores preditivos e prognósticos conhecidos, destacam-se o estadió, o comprometimento axilar e a histologia.(Gonzalez-Angulo, Morales-Vasquez *et al.*, 2007), além do painel de imunoistoquímica que definirá do ponto de vista de comportamento biológico três grupos distintos de pacientes. Os receptores hormonais positivos (RH+), os HER2+ e os triplo negativos (TN)(Sorlie, 2004).

Para o subgrupo de pacientes carcinoma de mama localmente avançado (CMLA), estes fatores previamente citados não são suficientes para predizer o seu comportamento frente ao tratamento neoadjuvante, assim, novos marcadores preditivos de resposta e prognósticos devem ser investigados. Este trabalho tem foco na topoisomerase II  $\alpha$  (topo II $\alpha$ )

A topo II $\alpha$  como preditor de resposta a quimioterapia foi testada com antracíclicos e demonstrou que existe a associação positiva entre eles (Durbecq, Paesmans *et al.*, 2004). Nesse estudo, além do benefício em favor do uso de antracíclicos nos tumores com expressão aumentada da proteína, a análise contínua variada confirmou ganho de resposta de 9% a cada incremento de 10% do nível de topoisomerase. Resultados semelhantes foram escritos no estudo alemão usando o mesmo esquema como quimioterapia primária. A questão levantada por esses autores é que a topo II $\alpha$  seria a verdadeira responsável pela sensibilidade ao quimioterápico sendo que ela é o alvo dos antracíclicos. (Macgrogan, Rudolph *et al.*, 2003). Não há, no entanto, avaliação da topo II $\alpha$  estudos da adição de taxane.

A falta de estudos direcionados a avaliação da topoisomerase II  $\alpha$  no esquema de quimioterapia combinada de taxane e antracíclico nos levou a desenvolver este estudo afim de avaliar seu papel como fator prognóstico e preditivo, assim como sua associação com outros fatores clássicos conhecidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção de Pacientes

No período de fevereiro de 2000 a dezembro de 2007 foram incluídas consecutivamente 99 pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama nos estadios clínicos II b e III, classificados como tumores localmente avançados, com idade inferior a 80 anos e selecionadas para tratamento primário com quimioterapia (EZTNM for the AJCC cancer staging manual, 2003) no Setor de Mastologia do nosso serviço. Também foram incluídas pacientes com estágio clínico IIa e que apresentassem relação volume da mama/volume tumor imprópria para o tratamento cirúrgico conservador primário. Os casos selecionados tinham indicação de quimioterapia neoadjuvante com o intuito de proporcionar cirurgia conservadora em casos operáveis na apresentação ou permitir a ressecção cirúrgica nos casos inicialmente inoperáveis.

A mediana do número de ciclos de quimioterapia que as pacientes receberam foi três (2-7). A mediana de idade das pacientes foi de 49 anos (24-79). Cinquenta e sete pacientes (57,5%) estavam na pré-menopausa antes do início do tratamento e 43 pacientes (43%) tinham idade inferior a 46 anos. Segundo o estadiamento clínico (EC), as pacientes foram classificadas como EC IIa: 19 pacientes (19,2%); EC IIb: 31 pacientes (31,3%); EC IIIa: 17 pacientes (17,2%); EC IIIb: 32 pacientes (33,3%). 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 considerada fator de exclusão.

Segundo a classificação histológica, a grande maioria dos tumores (90%), foi classificada como carcinoma ductal invasivo. O carcinoma lobular invasivo foi encontrado em sete pacientes e as outras três pacientes apresentaram tumores de origem epitelial com outras classificações histológicas. O grau de diferenciação histológica foi reportado em 97



neoplasias. O grau histológico I (bem diferenciado) foi encontrado em 18 tumores (18,5%), o grau II (moderadamente diferenciado) foi encontrado em 55 tumores (56,7%) e as neoplasias indiferenciadas (grau III) foram classificadas em 24 pacientes (24,8%). A Tabela 1 resume as características das pacientes.

Todas as pacientes tiveram a confirmação histopatológica da doença, sendo submetidas a biópsia incisional 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 (Estadiamento UICC) na data da inclusão e a exames de rastreamento de metástases conforme o protocolo do ambulatório com radiografia de tórax, ultra-sonografia hepática e cintilografia óssea. Antes do início do tratamento foram feitos exames bioquímicos das enzimas hepáticas (TGO, TGP, bilirrubinas), função 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 cardíaco específico. Os exames de função hepática, renal e hematológica foram repetidos antes de cada ciclo de quimioterapia e antes do procedimento cirúrgico definitivo.

### **Tratamento Neoadjuvante**

A quimioterapia neoadjuvante utilizou o esquema 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. Não foi observada toxicidade grau 3 ou 4 durante a quimioterapia (*National Comprehensive Cancer Network (U.S.), 2000*). 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. 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.

### **Tratamento Cirúrgico**

A cirurgia definitiva foi indicada conforme o resultado da avaliação clínica após o tratamento neoadjuvante e, segundo desejo da paciente em se preservar ou não a mama acometida. As cirurgias conservadoras e radicais foram complementadas com dissecação de linfonodos axilares nos níveis I, II e III.

### **Tratamento adjuvante**

As pacientes submetidas a tratamento cirúrgico conservador foram submetidas à radioterapia na mama com dose total de 5000 cGy fracionadas em 200 cGy por dia, 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 foi indicada.

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.

O tratamento hormonioterápico adjuvante foi indicado após o término da quimioterapia e radioterapia 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.

### **Estudo histopatológico**

Após o material ser incluídos em parafina foram feitas coloração com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação convencional, tal como tipo histológico e grau de diferenciação tumoral. A avaliação por imunohistoquímica envolveu os receptores hormonais, e o HER-2. resumidamente: desparafinização em xilol e reidratação 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. Lavagem 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), HER-2 oncoprotein (1:300, clone CB11, 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.

### **Análise da expressão da topoisomerase II $\alpha$ .:**

A expressão da topoisomerase foi avaliada através de reação de imunohistoquímica com a utilização de anticorpo monoclonal de camundongo anti-topoisomerase II $\alpha$ , clone 3F6 (Novocastra). O resultado será baseado em um índice de expressão da proteína que será calculado através da relação do número de células neoplásicas com marcação nuclear positiva e o número total de células neoplásicas contadas. O índice de expressão será calculado antes e após a quimioterapia e considerado positivo quando houver marcação de 10% ou mais dos núcleos celulares, e negativo quando houver menos de 10% de núcleos marcados (Di Leo, Larsimont *et al.*, 2001).

### **Análise Estatística**

O teste de McNemar foi utilizado para avaliar a correlação pareada entre a expressão das proteínas 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 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 topo II, 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 7.0.2 SAS (*Nominal logistic fit*). Significância estatística foi definida para  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### **Expressão das proteínas topo II $\alpha$ , HER-2 e receptores hormonais**

Foi realizado o estudo imunohistoquímico para analisar a expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e das proteínas topo II $\alpha$  e HER-2 no material de biópsia antes do início da quimioterapia. A expressão do receptor de estrogênio no tumor foi positiva em 67 pacientes (67,6%), a expressão do receptor de progesterona no tumor foi positiva em 53 pacientes (53,5%), a expressão da proteína topo II $\alpha$  no tumor foi considerada positiva em 23 pacientes (23,5%). A proteína HER-2 foi avaliada em 94 pacientes e foi considerada superexpressa (3+) no tumor de 28 pacientes (29,7%).

As pacientes foram classificadas de acordo com a expressão dos receptores hormonais (RH) e da proteína HER-2 em três subgrupos: o subgrupo HER2 (HER-2 negativo e RH negativos), o subgrupo triplo negativo (TN) definido pela expressão negativa das proteínas RE, RP e HER-2 e o grupo RE+ (pacientes com expressão positiva dos RH independente da expressão da proteína HER-2). Vinte e oito pacientes (28,3%) foram classificadas com HER2, 54 pacientes foram classificadas como RE+ (54,5%) e dezessete pacientes foram classificadas com TN. A Tabela 2 resume as taxas de expressão das proteínas topo II  $\alpha$ , HER-2, RE e RP.

### **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 80 pacientes (80,8%) e a resposta clínica completa (cRC) em 22 pacientes (22,2%). Dezenove (19,2%) não apresentaram resposta clínica. Foram classificadas como doença estável (DE) 18 pacientes (18%) e progressão da doença (PD) em uma paciente (1,0%). Segundo a análise histológica da peça cirúrgica após a quimioterapia, pacientes com ausência de neoplasia invasiva foram

classificadas como resposta patológica completa (pRC). A pRC foi observada em nove pacientes (9,1%).

Noventa e sete pacientes foram submetidas a cirurgia. A cirurgia conservadora pode ser realizada em 50 pacientes (51,5%). A mastectomia radical modificada foi realizada nas 47 pacientes quando a cirurgia conservadora não estava indicada. Os linfonodos axilares foram avaliados em todas as pacientes submetidas a dissecação cirúrgica. A mediana do número de linfonodos acometidos por doença metastática foi de 0 (0 – 10) no grupo de pacientes com resposta clínica completa e 2 (0 – 36) nas pacientes sem resposta clínica completa ( $p= 0,02$ ; teste de Wilcoxon).

### **Características clínicas e histopatológicas e suas relações com a resposta patológica**

Avaliamos a relação entre a resposta patológica completa (pRC), as características clínicas das pacientes (idade, número de ciclos de quimioterapia e estadiamento clínico), grau histológico e parâmetros imunohistoquímicos de expressão das proteínas topo II  $\alpha$ , HER-2, receptores hormonais e os subtipos RE+, HER2 e TN. A média de idade das pacientes com pRC foi de 45,7 anos (38 - 57) no grupo pRC e, no grupo sem resposta patológica completa pSR, a média da idade foi de 48,7 anos (24 – 79). Não há diferença entre os grupos ( $p= 0,2$ , teste t). O número médio de ciclos de quimioterapia foi três para ambos os grupos ( $p= 0,6$ ; teste de Wilcoxon) e não encontramos diferença entre o estadiamento clínico entre os grupos ( $p= 0,2$ , teste exato de Fisher).

Em pacientes com tumores RE+, a taxa de pRC foi 4,7% em comparação com uma taxa de resposta patológica completa de 23% em pacientes com tumores RE negativo ( $p= 0,05$ ; teste exato de Fisher). O receptor de progesterona ( $p= 0,2$ ; teste exato de Fisher), a superexpressão da proteína HER-2 ( $p= 1,0$ ; teste exato de Fisher) e a expressão da proteína

topo II $\alpha$  ( $p= 0,4$ ; teste exato de Fisher) não tiveram qualquer influência na taxa de resposta patológica. No entanto, quando classificamos as pacientes conforme os subtipos RE+, HER2 e TN, observamos uma taxa de resposta maior em pacientes com tumores triplo negativos (41,6%) seguido das pacientes com tumores HER2 (8%) e uma reduzida taxa (1,8%) de resposta em pacientes com tumores RE+ ( $p= 0.004$ ; teste do qui-quadrado).

#### **Expressão da proteína topo II $\alpha$ antes e após a quimioterapia neoadjuvante.**

Expressão positiva da proteína topo II $\alpha$  pode ser avaliada antes e após a quimioterapia (análise pareada) em 94 casos. Entre 69 casos com expressão negativa antes da quimioterapia, oito casos a expressão da proteína topo II $\alpha$  foi considerada positiva após o tratamento neoadjuvante. Cinco casos foram considerados como expressão negativa após a quimioterapia entre os 21 casos considerados positivos antes da quimioterapia. Não foi observado diferença ( $p= 0,4$ ; teste de McNemar).

#### **Expressão da proteína topo II $\alpha$ e sua relação com os receptores hormonais e a proteína HER-2.**

A relação entre a expressão da proteína topo II  $\alpha$  e a proteína HER-2, receptores hormonais e os subtipos RE+, HER2 e TN foi analisada nas amostras de biópsia antes e após a quimioterapia neoadjuvante. Não encontramos uma correlação da expressão da topo II $\alpha$  com a proteína HER-2 ( $\chi^2= 1,0$  e  $p= 0,3$ ; teste de Bowker). No entanto, existe uma correlação entre a expressão da proteína topo II  $\alpha$  e a expressão dos receptores hormonais (RE e RP). Em 66 tumores com expressão positiva de RE, 19,7% apresentavam expressão positiva da topo II  $\alpha$ . Nos 32 tumores RE-, a expressão da topo II  $\alpha$  foi positiva em 31,2% ( $\chi^2= 29,3$  e  $p< 0,0001$ ; teste de Bowker). Em 52 tumores com expressão positiva de RP, 15,3% apresentavam expressão positiva da topo II  $\alpha$ . Nos 46 tumores RP-, a expressão da topo II  $\alpha$  foi positiva em

32,6% ( $\chi^2= 14,2$  e  $p= 0,002$ ; teste de Bowker). A Tabela 3 apresentamos o resumo dos resultados da relação entre a expressão da topo II  $\alpha$  e das outras proteínas analisadas.

### **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, resposta patológica) e imunohistoquímicas (expressão de receptores hormonais e das proteínas topo II $\alpha$  e HER-2) na sobrevida livre de doença e na sobrevida global foi analisado. Em análise univariada, o estadiamento clínico (II e III), o tipo de cirurgia realizada (cirurgia conservadora e mastectomia), a resposta patológica completa e a expressão do RE apresentaram significância em termos de sobrevida livre de doença. Em relação a análise da sobrevida global, o estadiamento clínico, o tipo de cirurgia realizada, o número de linfonodos axilares acometidos a expressão das proteínas HER-2 e receptor de estrogênio e o subtipo histológico (RE+, HER+ e TN) apresentaram significância como fatores de prognóstico. A expressão da proteína topoII $\alpha$  não se mostrou um fator prognósticos neste grupo de pacientes.

Pacientes com tumores com superexpressão da proteína HER-2 tiveram uma sobrevida média livre de doença de 40% em comparação com 70% nas pacientes com tumores com expressão negativa ( $p= 0,04$ ; Log-Rank). A sobrevida global também é afetada pela expressão do HER-2 no tumor ( $p= 0,004$ ). O Gráfico 1 mostra a curva de sobrevida global em relação com a expressão da proteína HER-2.

A análise da relação entre o número de linfonodos axilares acometidos e a ocorrência de recidiva a distância ( $p= 0,003$ ; regressão logística) e morte pela doença ( $p < 0,0001$ ; regressão logística). Por meio da análise da curva ROC (*Receiving Operation Curve*), determinamos o melhor ponto de corte para o número de linfonodos axilares acometidos e análise de risco de morte pela doença ( $>2$ ). O gráfico 2 mostra a curva de sobrevida global em



pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante e sua correlação com o estado axilar.

Pacientes com resposta patológica completa se mostrou o grupo de melhor prognóstico. Não foi observada nenhuma recorrência a distância e nenhuma morte pela doença neste grupo de pacientes.

Em análise multivariada do risco de recorrência a distancia e risco de morte pela doença foi realizada utilizando as variáveis que demonstraram significância no prognóstico em análise univariada. A Tabela 4 e 5 resumem os resultados da regressão logística para o risco de recorrência a distância e morte pela doença, respectivamente. Os resultados demonstram que o risco de recorrência da doença sofre influência da resposta patológica, da expressão do receptor de estrogênio e do status axilar. O risco de morte é influenciado pela expressão do receptor de estrógeno, status axilar e expressão da oncoproteína HER2.

## DISCUSSÃO

O tratamento do câncer de mama localmente avançado tem evoluído nos últimos anos com a introdução do uso da quimioterapia primária ou neoadjuvante que pode trazer benefícios importantes para esse grupo de pacientes (Kaufmann, Hortobagyi *et al.*, 2006). A utilização desta estratégia tem como objetivo a redução do volume do tumor primário possibilitando 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). A expectativa do tratamento é que cerca de 80% das pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante irão apresentar benefício local decorrente da regressão tumoral (*downstaging*). Embora não ocorra mudança da sobrevida global quando comparamos o tratamento neoadjuvante com o tratamento adjuvante clássico, as pacientes que tem resposta à quimioterapia tem impacto positivo no controle da doença (Kaufmann, Hortobagyi *et al.*, 2006).

A avaliação da resposta clínica local e patológica em 99 pacientes com câncer de mama localmente avançados que foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante com a combinação de taxane e antraciclina demonstrou resposta clínica objetiva de 80,8% e em nove (9,2%) foi observada remissão completa histopatológica da lesão invasora na mama e axila. A taxa de cirurgia conservadora foi da ordem de 51,5%. Esta taxa de resposta é similar as taxas descritas 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. Dois estudos recentes descreveram taxas de resposta patológica completa maiores que a observada em nosso estudo, com 11% e 10,5%, 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. Em nosso grupo há um predomínio de pacientes com estadios localmente mais avançados e dois terços das pacientes apresentam axila extensamente acometida (mais de 3 ganglios), caracterizando esta casuística como de mal prognóstico, mesmo frente aos grupos avaliados por outros autores (Ganem, Tubiana-Hulin *et al.*, 2003; Han, Kim *et al.*, 2006).

A quimioterapia neoadjuvante tem o intuito de testar *in vivo* a sensibilidade do tumor à 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 (Rajan, Esteva *et al.*, 2004). Na literatura existem inúmeros estudos focados em fatores preditivos ou prognósticos com uso da quimioterapia primária que variam desde a análise histológica e expressão gênica de vários produtos (Von Minckwitz, Sinn *et al.*, 2008) até correlação de resposta e estudos de imagem (Nicoletto, Nitti *et al.*, 2008). 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 focamos na análise da topoisomerase como fator relacionado a resposta e sobrevida.

A topoisomerase foi estudada por ser o local de atuação dos antracíclicos e estar relacionado a um fator já escrito de mau prognóstico que é o gene c-ErB-2. A proximidade dos ambos ocasiona a superexpressão conjunta em 1/3 dos casos, sendo que a amplificação do gene da topoisomerase raramente ocorre sem a amplificação do c-ErB-2 (Di Leo, Chan *et al.*, 2004). A proteína topo II $\alpha$  em condições normais não é detectada em células na fase G0, mas sua atividade aumenta substancialmente na fase S atingindo o máximo na fase G2-M e reduz após (Hellemans, Van Dam *et al.*, 1995).

Quanto a ocorrência nos tumores mamários, sua distribuição é heterogênea nos núcleos celulares e varia sua expressão de 2 a 62% das células tumorais. A proteína é considerada superexpressa quando acomete mais de 10% e sua frequência nos tumores mamários é de cerca 1/3 dos casos (Tuccari, Rizzo *et al.*, 1993). No grupo estudado a superexpressão da topoisomerase II  $\alpha$  ocorreu em 23,5%, demonstrando concordância com a literatura existente. Por ser um marcador de proliferação celular, alguns autores encontraram aumento da frequência da proteína em tumores mais agressivos que apresentavam alto grau, elevado tamanho tumoral e envolvimento dos gânglios axilares (Hellemans, Van Dam *et al.*, 1995; Nakopoulou, Lazaris *et al.*, 2000), mas na literatura atual há uma grande discrepância nesta relação clinico-patológica (Jarvinen, Holli *et al.*, 1998; Rudolph, Olsson *et al.*, 1999; Depowski, Rosenthal *et al.*, 2000). No presente estudo identificamos a relação entre a proteína e a negatividade dos receptores hormonais, demonstrando a presença da topoisomerase em tumores com características mais agressivas.

A taxa de pRC em pacientes com tumores RE+ foi de 4,7 % e de 23 % nas RE negativas. Este aspecto foi avaliado por um estudo com 1731 pacientes tratadas com quimioterapia primária baseada em antraciclicos para tumores avançados com taxa de pRC de 8 % nos casos de RE + e de 24 % nos casos de receptor negativo (Guarneri, Broglio *et al.*, 2006). Nota-se o fato de tumores sem expressão hormonal serem mais agressivos e sensíveis ao tratamento quimioterápico, mas a real importância da quimiorresistência nesse grupo específico não está bem definida pois não foi comprovada a evolução desfavorável. Fato que pode ser justificado pela adjuvância com o bloqueio hormonal que resgata pacientes que teriam desfecho desfavorável da doença.

Na associação entre a topoisomerase II $\alpha$  e o grupo Re +, é esperado que seja predominantemente negativa, pois a sua expressão está relacionada a alta taxa de multiplicação celular, como apontado em estudos que foram sua associação com marcadores

de multiplicação celular (Gasser, Walter *et al.*, 1992; Taagepera, Rao *et al.*, 1993). Em nossos resultados podemos constatar que este evento é verdadeiro, pois 77,7 % dos RE+ tinham topoisomerase negativa.

A análise da superexpressão da proteína HER-2 não apresentou, de forma isolada, influencia na taxa de resposta a quimioterapia. Esse aspecto está em concordância com estudo prévio utilizando docetaxel e doxorrubicina onde não houve relação entre a resposta clínica e a presença da superexpressão do HER-2 (Von Minckwitz, Sinn *et al.*, 2008). Na avaliação da correlação entre a topoisomerase e o HER-2 não observamos diferença estatística. Este fato já foi descrito em estudo anterior que investigou a amplificação do gene da topoisomerase e da sua expressão protéica relacionado ao HER-2. Ao contrário do que ocorre com o HER-2, onde a hiperexpressão da proteína é fortemente associada à amplificação do gene com 98,8% de associação, a hiperexpressão da proteína ocorre de forma independente da amplificação do gene (Mueller, Parkes *et al.*, 2004).

Nas pacientes com tumores RE-, encontramos um numero significativamente maior de pacientes com superexpressão da topoisomerase. Este dado é compatível com a literatura onde vários autores identificaram esta associação e sua justificativa está na presença de tumores mais agressivos nesse grupo (Jarvinen, Kononen *et al.*, 1996; Jarvinen, Holli *et al.*, 1998; Depowski, Rosenthal *et al.*, 2000).

Na avaliação dos casos triplo negativos, foram identificados treze com topoisomerase negativa e quatro com superexpressão da proteína. Nos casos negativos, encontramos resposta patológica completa em seis dos dezessete casos. Este dado é consistente com a literatura que demonstra altas taxas de resposta nos tumores TN, embora este perfil de neoplasia tenha alta ocorrência de recidivas a distância. A expressão do topo II $\alpha$  nestes casos está em desacordo com a literatura pela sua baixa correlação e, fica evidente que existem vários outros genes e proteínas envolvidos na regulação da proliferação celular e do comportamento biológico do

tumor e que este processo não pode ser resumido em uma única e exclusiva proteína (Liedtke, Mazouni *et al.*, 2008).

A avaliação do risco de recorrência da neoplasia está associada a resposta patológica, expressão dos receptores hormonais e status axilar. Em relação à sobrevida das pacientes estudadas, a resposta patológica completa, a expressão da proteína HER2, o número de linfonodos axilares acometidos e a presença de receptores hormonais apresentaram significância como fatores prognósticos. A pRC é um dos fatores mais importantes na quimioterapia neoadjuvante modificando de forma substancial a evolução da doença.(Guarneri, Broglio *et al.*, 2006; Kaufmann, Hortobagyi *et al.*, 2006). O comprometimento axilar é um importante fator de prognóstico, definido tanto em nosso trabalho quanto na literatura vigente e é uma das bases do estadiamento da câncer de mama (Hutter, 1987; Gonzalez-Angulo, Morales-Vasquez *et al.*, 2007). O Her-2 tem impacto como fator prognóstico e esse seu papel já foi bem identificado na literatura (Sjogren, Inganas *et al.*, 1998). A expressão hormonal positiva está associada com tumores histologicamente bem diferenciados, com fração de células em divisão mais baixa e com diploidia, e todos estes fatores levam a um prognóstico melhor para estas pacientes como observado em nossa análise (Knoop, Bentzen *et al.*, 2001).

A expressão da topoisomerase não se mostrou fator preditivo ou prognóstico nas pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante com esquema combinado de antracíclicos e taxanes. A análise desses de dados questiona a topoisomerase com um fator que está associado a taxa de replicação celular, como já descrito (Sandri, Hochhauser *et al.*, 1996; Lynch, Guinee *et al.*, 1997) e não ao comportamento clínico da doença.

A identificação do comportamento clínico da neoplasia maligna de mama é complexo pois ocorre uma progressiva acumulação da mutação de múltiplos genes combinadas com a desregulação epigenética de genes críticos e vias protéicas (Olopade, Grushko *et al.*, 2008).

Esse fenótipo heterogêneo torna seu tratamento mais difícil e a tendência atual é a análise combinada de múltiplos genes e proteínas, determinando a assinatura gênica de cada tumor. A topoisomerase II isoladamente não foi considerada um fator preditivo ou prognóstico de fundamental importância, porém ela tem seu espaço preservado no conjunto de genes a serem avaliados, e fica claro que sua associação com outras proteínas já estudadas a torna de valor para futuras investigações. Desta forma teremos mais informações do tumor para definir adequadamente seu tratamento.

No nosso estudo não houve significância na avaliação da topoisomerase II  $\alpha$  como fator preditor de resposta e sobrevida ao uso de quimioterapia neoadjuvante com esquema combinado de antracíclico e taxane. A superexpressão do HER-2 teve impacto na sobrevida, confirmando ser fator prognóstico, mas não foi capaz de prever resposta a quimioterapia neoadjuvante.. Os tumores RH- tiveram uma expressiva melhor resposta a quimioterapia primária nesta avaliação.

## BIBLIOGRAFIA

Akiyama, T., C. Sudo, *et al.* The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science, v.232, n.4758, Jun 27, p.1644-6. 1986.

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.

Bargmann, C. I., M. C. Hung, *et al.* The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. Nature, v.319, n.6050, Jan 16-22, p.226-30. 1986.

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.

Berry, D. A., K. A. Cronin, *et al.* Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. N Engl J Med, v.353, n.17, Oct 27, p.1784-92. 2005.

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.

Cardoso, F., V. Durbecq, *et al.* Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. Int J Oncol, v.24, n.1, Jan, p.201-9. 2004.

Carraway, K. L., 3rd, M. X. Sliwkowski, *et al.* The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. J Biol Chem, v.269, n.19, May 13, p.14303-6. 1994.

Cheson, B. D., P. H. Phillips, *et al.* Clinical trials referral resource. Clinical trials of suramin. Oncology (Williston Park), v.9, n.2, Feb, p.161, 163. 1995.

De Placido, S., F. Perrone, *et al.* CMF vs alternating CMF/EV in the adjuvant treatment of operable breast cancer. A single centre randomised clinical trial (Naples GUN-3 study). Br J Cancer, v.71, n.6, Jun, p.1283-7. 1995.

Depowski, P. L., S. I. Rosenthal, *et al.* Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. Mod Pathol, v.13, n.5, May, p.542-7. 2000.

Di Leo, A., S. Chan, *et al.* HER-2/neu as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. Breast Cancer Res Treat, v.86, n.3, Aug, p.197-206. 2004.

Di Leo, A., D. Larsimont, *et al.* HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. Ann Oncol, v.12, n.8, Aug, p.1081-9. 2001.

Durbecq, V., M. Paesmans, *et al.* Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. Mol Cancer Ther, v.3, n.10, Oct, p.1207-14. 2004.

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

Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet, v.358, n.9291, Oct 27, p.1389-99. 2001.



- 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.
- Gasser, S. M., R. Walter, *et al.* Topoisomerase II: its functions and phosphorylation. Antonie Van Leeuwenhoek, v.62, n.1-2, Aug, p.15-24. 1992.
- Gonzalez-Angulo, A. M., F. Morales-Vasquez, *et al.* Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. Adv Exp Med Biol, v.608, p.1-22. 2007.
- Guarneri, V., K. Broglio, *et al.* Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. J Clin Oncol, v.24, n.7, Mar 1, p.1037-44. 2006.
- 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.
- Hanahan, D. e R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.
- 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.
- Hellemans, P., P. A. Van Dam, *et al.* Immunohistochemical study of topoisomerase II-alpha expression in primary ductal carcinoma of the breast. J Clin Pathol, v.48, n.2, Feb, p.147-50. 1995.
- Holden, J. A. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. Curr Med Chem Anticancer Agents, v.1, n.1, May, p.1-25. 2001.
- Hutter, R. V. At last--worldwide agreement on the staging of cancer. Arch Surg, v.122, n.11, Nov, p.1235-9. 1987.
- 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.
- Jarvinen, T. A., K. Holli, *et al.* Predictive value of topoisomerase IIalpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. Br J Cancer, v.77, n.12, Jun, p.2267-73. 1998.
- Jarvinen, T. A., J. Kononen, *et al.* Expression of topoisomerase IIalpha is associated with rapid cell proliferation, aneuploidy, and c-erbB2 overexpression in breast cancer. Am J Pathol, v.148, n.6, Jun, p.2073-82. 1996.
- Jarvinen, T. A. e E. T. Liu. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.78, n.3, Apr, p.299-311. 2003.
- Jemal, A., R. Siegel, *et al.* Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin, v.58, n.2, Mar-Apr, p.71-96. 2008.

- 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.
- Knoop, A. S., S. M. Bentzen, *et al.* Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. J Clin Oncol, v.19, n.14, Jul 15, p.3376-84. 2001.
- 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.
- Liedtke, C., C. Mazouni, *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. J Clin Oncol, v.26, n.8, Mar 10, p.1275-81. 2008.
- Lynch, B. J., D. G. Guinee, Jr., *et al.* Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. Hum Pathol, v.28, n.10, Oct, p.1180-8. 1997.
- Macgrogan, G., P. Rudolph, *et al.* DNA topoisomerase IIalpha expression and the response to primary chemotherapy in breast cancer. Br J Cancer, v.89, n.4, Aug 18, p.666-71. 2003.
- Mano, M. S. e A. Awada. Primary chemotherapy for breast cancer: the evidence and the future. Ann Oncol, v.15, n.8, Aug, p.1161-71. 2004.
- Mueller, R. E., R. K. Parkes, *et al.* Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. Genes Chromosomes Cancer, v.39, n.4, Apr, p.288-97. 2004.
- Nakopoulou, L., A. C. Lazaris, *et al.* DNA topoisomerase II-alpha immunoreactivity as a marker of tumor aggressiveness in invasive breast cancer. Pathobiology, v.68, n.3, May-Jun, p.137-43. 2000.
- National Comprehensive Cancer Network (U.S.). The complete library of NCCN oncology practice guidelines. Rockledge, PA: NCCN: 1 CD-ROM p. 2000.
- Nicoletto, M. O., D. Nitti, *et al.* Correlation between magnetic resonance imaging and histopathological tumor response after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Tumori, v.94, n.4, Jul-Aug, p.481-8. 2008.
- Olopade, O. I., T. A. Grushko, *et al.* Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. Clin Cancer Res, v.14, n.24, Dec 15, p.7988-99. 2008.
- Paik, S., J. Bryant, *et al.* erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst, v.90, n.18, Sep 16, p.1361-70. 1998.
- Pegram, M. D., R. S. Finn, *et al.* The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. Oncogene, v.15, n.5, Jul 31, p.537-47. 1997.
- Perou, C. M., T. Sorlie, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. Nature, v.406, n.6797, Aug 17, p.747-52. 2000.
- Plowman, G. D., J. M. Green, *et al.* Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. Nature, v.366, n.6454, Dec 2, p.473-5. 1993.
- Pritchard, K. I., H. Messersmith, *et al.* HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. J Clin Oncol, v.26, n.5, Feb 10, p.736-44. 2008.
- Pritchard, K. I., L. E. Shepherd, *et al.* HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. N Engl J Med, v.354, n.20, May 18, p.2103-11. 2006.
- Rajan, R., F. J. Esteva, *et al.* Pathologic changes in breast cancer following neoadjuvant chemotherapy: implications for the assessment of response. Clin Breast Cancer, v.5, n.3, Aug, p.235-8. 2004.

- Rajan, R., A. Poniecka, *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.
- Rudolph, P., H. Olsson, *et al.* Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. J Pathol, v.187, n.2, Jan, p.207-16. 1999.
- Sachelarie, I., M. L. Grossbard, *et al.* Primary systemic therapy of breast cancer. Oncologist, v.11, n.6, Jun, p.574-89. 2006.
- Sandri, M. I., D. Hochhauser, *et al.* Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta genes in human breast cancers. Br J Cancer, v.73, n.12, Jun, p.1518-24. 1996.
- Sjogren, S., M. Inganas, *et al.* Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. J Clin Oncol, v.16, n.2, Feb, p.462-9. 1998.
- 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.
- Sorlie, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. Eur J Cancer, v.40, n.18, Dec, p.2667-75. 2004.
- Taagepera, S., P. N. Rao, *et al.* DNA topoisomerase II alpha is the major chromosome protein recognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.18, Sep 15, p.8407-11. 1993.
- 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.
- Tuccari, G., A. Rizzo, *et al.* Immunocytochemical detection of DNA topoisomerase type II in primary breast carcinomas: correlation with clinico-pathological features. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, v.423, n.1, p.51-5. 1993.
- Von Minckwitz, G., H. P. Sinn, *et al.* Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. Breast Cancer Res, v.10, n.2, p.R30. 2008.
- Yamamoto, T., S. Ikawa, *et al.* Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature, v.319, n.6050, Jan 16-22, p.230-4. 1986.

## GRÁFICOS E TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e histopatológicas de 85 pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.

<b>Características das Pacientes</b>	<b>N= 99 (variação)</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>		
Mediana	49 (24 – 79)	
≤45 anos	43	43
>45 anos	56	57
<b>Menopausa</b>		
Pré	57	57,5
Pós	42	42,5
<b>Ciclos de quimioterapia (mediana)</b>	3 (2 - 7)	
<b>Estadio Clínico</b>		
IIA	19	19,2
IIB	31	31,3
IIIA	17	17,2
IIIB	32	33,3
<b>Tipo histológico</b>		
Ductal	89	90
Lobular	7	7
Outros	3	3
<b>Grau histológico</b>		
I	18	18,5
II	55	56,7
III	24	24,8

**Tabela 2 - Característica imunohistoquímica de 82 tumores de pacientes com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina.**

<b>Imunohistoquímica</b>	<b>%</b>	
<b>TopoIIa</b>	N= 98	
Positivo	23	23,5
Negativo	75	76,5
<b>RE</b>	N= 99	
Positivo	67	67,6
Negativo	32	32,4
<b>RP</b>	N= 99	
Positivo	53	53,5
Negativo	46	46,5
<b>HER-2</b>	N= 94	
Positivo	28	29,7
Negativo	66	70,3
<b>Subgrupos</b>	N= 99	
RE+	54	54,5
HER2	28	28,3
TN	17	17,2

**Tabela 3 - Expressão da proteína topo IIa e sua relação com os receptores hormonais e a proteína HER-2.**

<b>Imunohistoquímica</b>	<b>topoIIa+ (n)</b>	<b>topoIIa-(n)</b>	<b><math>x^2</math> (Bowker)</b>	<b>P</b>
<b>RE+</b>	13	53		
<b>RE-</b>	10	22	29,3	<0,0001
<b>RP+</b>	8	44		
<b>RP-</b>	15	31	14,2	0,002
<b>RH+</b>	7	20		
<b>RH-</b>	14	52	1,0	0,3
<b>HER-2+</b>				
<b>HER-2-</b>	12	42		
<b>Subtipos</b>	7	20		
RE+	4	13	2,5*	0,9
HER2	13	53		
TN	10	22	29,3	<0,0001

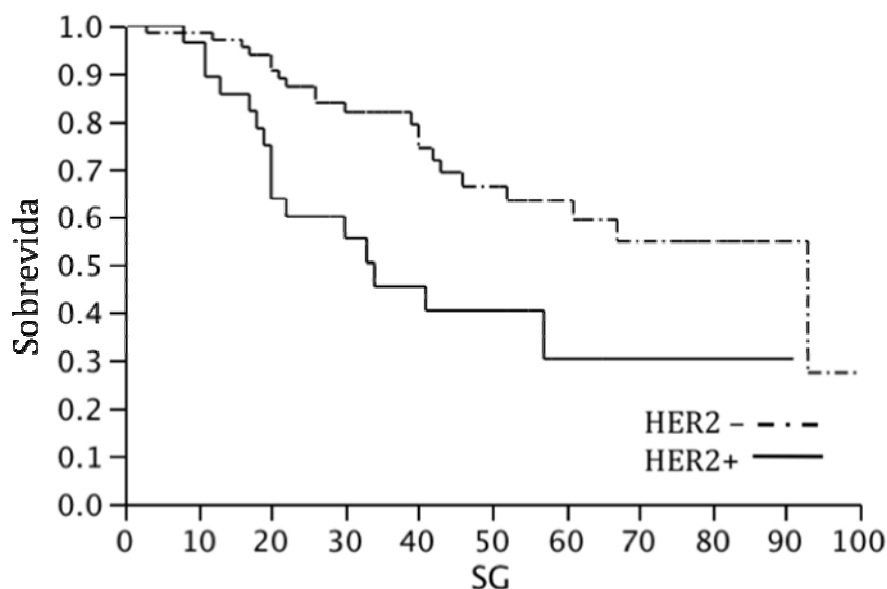
\*teste do  $x^2$

**Tabela 4 - Análise multivariada (regressão logística) para risco de recorrência a distância em relação com o estadiamento clínico, resposta patológica, expressão de RE, tipo de cirurgia realizada (mastectomia x cirurgia conservadora) e estado axilar (mais de 2 linfonodos positivos).**

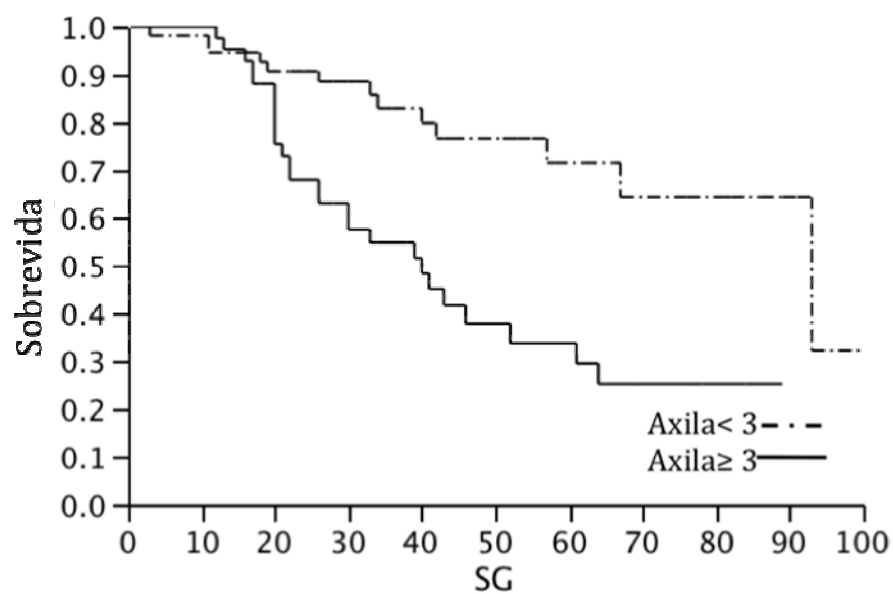
Variáveis	OR	$\chi^2$	P
EC	1,4	0.49253328	0.4
pRP	63545	9.36734533	0.0022
RE	6,2	11.0231089	0.0009
Cirurgia	1,3	0.31665769	0.5
pAxila	1,5	8.58716763	0.003

**Tabela 5 - Análise multivariada (regressão logística) para risco de morte pela doença em relação com o estadiamento clínico, expressão de RE, tipo de cirurgia realizada (mastectomia x cirurgia conservadora), o estado axilar (mais de 2 linfonodos positivos), a expressão do HER2 e o subtipo histológico.**

Variáveis	OR	$\chi^2$	P
EC	1,0	1.87967e-5	0.9
RE	14,2	7.58559565	0.005
Cirurgia	1,6	0.68974741	0.4
pAxila	9,4	16.5461242	<.0001
ERBB2	5,5	3.56255193	0.05
Subtipo	0,2	1.71409412	0.1



**Gráfico 1 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com a expressão da oncoproteína HER-2. (SG= sobrevida global; 0= grupo de pacientes com expressão negativa do HER-2; 1= grupo de pacientes com expressão positiva do HER-2).**



**Gráfico 2 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com docetaxel e epirrubicina de acordo com o estado axilar. (SG= Sobrevida global; 0 = grupo de pacientes com até 2 linfonodos axilares acometidos; 1= grupo de pacientes com mais de 2 linfonodos axilares acometidos).**

# 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](#)