

LILIANE BARATELLA ULSON

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DO ÍNDICE DE APOPTOSE  
E DA IMUNOEXPRESSÃO DA Bcl-2 COM A RESPOSTA À  
QUIMIOTERAPIA PRIMÁRIA EM MULHERES COM  
CARCINOMA DE MAMA ESTÁDIOS II E III**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Medicina

São Paulo  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

LILIANE BARATELLA ULSON

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DO ÍNDICE DE APOPTOSE  
E DA IMUNOEXPRESSÃO DA Bcl-2 COM A RESPOSTA À  
QUIMIOTERAPIA PRIMÁRIA EM MULHERES COM  
CARCINOMA DE MAMA ESTÁDIOS II E III**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Medicina

Área de concentração: **Tocoginecologia**  
Orientador: **Prof. Dr . Roberto Euzebio dos Santos**  
Co-orientadora: **Profa. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão Silva**

São Paulo  
2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca Central da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Ulson, Liliâne Baratella

Avaliação da relação do índice de apoptose e da imunoexpressão da Bcl-2 com a resposta à quimioterapia primária em mulheres com carcinoma de mama estádios II e III./ Liliâne Baratella Ulson. São Paulo, 2009.

Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Roberto Euzebio dos Santos

Co-Orientador: Maria Antonieta Longo Galvão Silva

1. Neoplasias mamárias/quimioterapia 2. Carcinoma 3. Terapia neoadjuvante 4. Apoptose 5. Proteínas proto-oncogênicas c-bcl-2

BC-FCMSCSP/02-09

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, **Wagner e Ivani** e aos meus irmãos **Wagner Antonio e Paula Maria**, alicerces da minha existência e meu porto seguro, com eterna gratidão e todo meu amor.

Aos meus amados filhos **Filipe e Clarissa** (*intra-útero*), razões da minha vida.

Ao meu querido marido **Gustav**, pelo estímulo e trabalho incansável para concretização deste sonho, todo meu carinho e meu amor.

Por fim, dedico este trabalho às **pacientes** que participaram da elaboração deste estudo, pela grandeza de espírito, altruísmo e compaixão por doarem um pouco de si, em momento tão delicado de suas vidas para o progresso do estudo do câncer de mama.

**AGRADECIMENTOS**

Ao **Prof Dr Roberto Euzebio dos Santos**, meu orientador e, sobretudo AMIGO, pelo exemplo como Mestre, Médico e Pessoa, que norteou minha formação como estudante, residente e pós-graduanda, ajudando-me a evoluir a cada dia, sem perder de vista o verdadeiro sentido e a importância de tudo que me cerca.

Ao **Prof Dr. Antonio Pedro Flores Auge**, coordenador de programa de Pós- Graduação do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo, pelo incentivo e determinação para continuar o sonho da pós-graduação.

Ao **Prof Dr Tsutomu Aoki**, diretor do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo, exemplo de carreira acadêmica, incentivando sempre a nossa titulação.

À **Profa Dra Maria Antonieta Longo Galvão Silva**, pelo carinho, atenção e perseverança no trabalho desenvolvido para a adequada avaliação anátomo-patológica, sem a qual este estudo seria inútil.

Ao **Prof Dr José Francisco Rinaldi**, chefe do Ambulatório de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Santa Casa de São Paulo, que participou da minha formação como mastologista , por ter permitido gentilmente acesso às pacientes do ambulatório de mastologia e pelas importantes considerações na aula de qualificação

Ao **Prof Dr José Carlos Pascalicchio**, pela amizade, pelo carinho e pela importante participação no exame de qualificação.

Ao **Prof Dr Victor Arias** pela paciência, pela ajuda fundamental para execução desta tese bem como pelas considerações no exame de qualificação.

Aos amigos: **Dra Camila Briani, Dra Keila Bressan (in memorian), Dra Mayka Volpato dos Santos Vello , Dra Paula Tambellini, Dr André Lima de Oliveira e Dr Fabio Francisco de Oliveira Rodrigues** pelo carinho, cuidado e empenho incansáveis na ajuda da seleção e acompanhamento das pacientes, possibilitando a concretização deste trabalho.

À **Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, berço de minha formação acadêmica, que me transformou em médica.

À **Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo**, responsável pela minha especialização e por forjar em minha alma o verdadeiro sentido da misericórdia e respeito pela vida, bem maior de todos nós.

**ABREVIATURAS**

EUA: Estados Unidos da América

IA: índice de apoptose

IHQ: imunistoquímica

NSABP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

## **SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Tratamento do Câncer de Mama	2
1.2 Apoptose	4
1.3 Detecção da apoptose	9
1.4 Apoptose e Quimioterapia Primária	11
2. OBJETIVO	17
3. CASUÍSTICA E MÉTODO	19
3.1 Padronização do material anatomico-patológico e reação imunoistoquímica	23
3.2 Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	42
7. ANEXOS	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
FONTES CONSULTADAS	60
RESUMO	62
ABSTRACT	64

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Tratamento do Câncer de Mama

O primeiro grande passo no tratamento do câncer de mama foi dado por William S. Halsted que desenvolveu em 1889 no Johns Hopkins Hospital, a mastectomia ultra - radical trazendo grande auxílio no tratamento local da doença (Halsted, 1894; Liu, 2000).

Somente no final da década de 60 e início da década de 70 com os estudos de Fisher, De Lena e Brambilla, o tratamento do câncer de mama voltou a dar novo salto com o advento da quimioterapia (Fisher et al, 1968; De Lena et al, 1975; Brambilla et al, 1976; Liu, 2000).

A quimioterapia começou a ser utilizada associada ao tratamento cirúrgico no intuito de diminuir a recorrência e aumentar a sobrevivência dos pacientes (Fisher et al, 1968; Bonadonna et al, 1976; Brambilla et al, 1976). Foram relatados os resultados do seguimento de um grupo de pacientes que iniciaram quimioterapia adjuvante há 30 anos confirmando os benefícios e redução do risco relativo de recorrência e de metástases (Bonadonna et al, 2005).

A quimioterapia primária, também conhecida como de indução ou neoadjuvante, realizada antes do procedimento cirúrgico ou do tratamento radioterápico, foi introduzida por De Lena no final da década de 70. Foi muito importante nos casos de carcinoma de mama localmente avançado – estágio III. O tratamento inicial nesses tipos de tumores inoperáveis era realizado até então com radioterapia, porém os seus efeitos loco-regionais impediam que fosse realizada em larga escala, havendo necessidade de um tratamento alternativo e com menos efeitos colaterais. (De Lena et al, 1978; Wolff et al, 2002).

Estudos demonstraram ainda a natureza sistêmica do tumor de mama, além do fato de que clones celulares à distância do tumor primário podem sofrer ação de fatores de crescimento produzidos pelo próprio tumor. Assim a quimioterapia primária atuaria nestes focos à distância (Gunduz et al, 1979; Fisher et al, 1983; Mano et al, 2004; Cleator et al, 2005).

A quimioterapia primária possibilita também, avaliar *in vivo* a resposta do tumor aos agentes quimioterápicos (Forrest et al, 1986; Giordano, 2003;), além de reduzir o volume tumoral viabilizando a realização de cirurgias conservadoras (Swain et al, 1987), sem com isso afetar as taxas de recorrência local (Bonadonna et al, 1990; Veronesi et al, 1995; Mano et al, 2004).

Importante estudo sobre quimioterapia primária foi o NSABP B-18, que objetivou associar a quimioterapia primária e a adjuvante ao tempo livre de doença e à sobrevivência global. Porém não houve diferença significativa. Já quando se correlacionou o grupo que apresentou resposta anátomo-patológica completa à quimioterapia com o que apresentou resposta clínica completa, o primeiro mostrou diferença significativa quanto ao tempo livre de doença e sobrevivência global (Fisher et al, 1998).

Nove anos após o início do estudo NSABP B-18, os resultados foram novamente avaliados e a sobrevida livre de doença e sobrevida global mantiveram-se sem diferença significativa entre os grupos de pacientes que receberam quimioterapia primária e quimioterapia adjuvante, mantendo-se as associações inalteradas (Wolmark et al, 2001).

Outros estudos demonstraram que a utilização de quimioterapia primária ocasionou uma melhora significativa na sobrevida das pacientes quando associada a melhor resposta clínica e anátomo-patológica (Jacquillat et al, 1990; Scholl et al, 1994; Cameron et al, 1997).

Atualmente ainda não há como determinar quais pacientes irão responder melhor a um tratamento quimioterápico ou qual a melhor droga a ser utilizada para um paciente em

particular, como ocorre com o tratamento hormonal verificando a presença de receptores para estrógeno e progesterona.

Sabe-se que tamanho tumoral e *status* axilar são importantes fatores prognósticos, porém não predizem a sensibilidade ao tratamento (Arpino *et al.*, 2005).

As drogas quimioterápicas são tóxicas e a compreensão de seu mecanismo de ação pode facilitar a identificação de pacientes com maior probabilidade de resposta ao quimioterápico e que podem desta forma se beneficiar do tratamento (Esteva *et al.*, 2004).

## 1.2 Apoptose

Por muito tempo, o efeito das drogas quimioterápicas sobre os tumores foi atribuído a sua rápida interação com as células alvo, causando dano irreparável na célula e consequentemente morte celular por alteração do seu metabolismo (Ferreira *et al.*, 2002).

Porém estudos demonstraram que a morte celular determinada pela ação das drogas quimioterápicas se dá através da indução de apoptose (Hickman, 1992; Ellis *et al.*, 1997; Hannun, 1997; Shao *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2002; Parton *et al.*, 2002; Arpino *et al.*, 2005).

A morte celular pode ocorrer através de dois mecanismos distintos: necrose e apoptose. No processo de necrose ocorre dano da membrana celular que se rompe liberando conteúdo citoplasmático no tecido ao redor, causando processo inflamatório, destruição e alteração arquitetural permanente com cicatriz (Collins *et al.*, 1997; Willingham, 1999).

Já a apoptose é um processo fisiológico de morte celular que envolve estímulos programados e genéticos no qual a célula perde sua viabilidade antes de perder sua integridade (Hengartner, 2000).

O termo apoptose deriva do grego *apoptosis* e significa cair fora (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie, 1974).

A morfologia das células em apoptose é diversa quando comparada à necrose. As alterações morfológicas clássicas são melhor observadas através da microscopia eletrônica e os primeiros sinais são: condensação nuclear, diminuição do tamanho celular, aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, perda da adesão a células vizinhas e cromatina condensada e disposta em “meia lua” (Van de Schepop et al, 1996; Hall, 1999).

Os fragmentos nucleares dão origem aos corpos apoptóticos que representam o achado morfológico mais frequente do processo, caracterizado por sua forma oval com grande quantidade de cromatina condensada no seu interior (Van den Schepop et al., 1996; Reed, 2000; Ferreira et al., 2002).

A apoptose está presente desde a vida embrionária e está envolvida nos processos fisiológicos de homeostase, diferenciação e regulação dos diversos sistemas dos organismos vivos. Porém qualquer alteração na sua função está relacionada ao aparecimento de múltiplas doenças como doença de Alzheimer, doenças auto-imunes, doenças virais e câncer (Reed, 2000; D`Amélio et al, 2008).

Múltiplos fatores regulam este mecanismo que pode ser desencadeado por estímulos intra e extracelulares que ocasionam danos nos processos de reparação do DNA ou se ligam a receptores na superfície celular (Gewies, 2003).

Para que o mecanismo apoptótico ocorra, há uma família de endonucleases intracelulares denominadas caspases que são proteases de cisteína descobertas a partir de estudos genéticos em um nematódio chamado *Caenorhabditis elegans* (Hengartner, 1999; Hengartner, 2001; Gewies, 2003).

As caspases estão presentes no citoplasma celular como zimógenos inativos (pró-caspases), ativadas através de seus domínios ded (*death effector domain*) e card (*caspase recruitment domain*), sendo consideradas as executoras centrais do processo de apoptose (Hengartner et al., 2000; Ferreira et al., 2002; Gewies, 2003).

Didaticamente, há 2 vias pelas quais a célula entra em apoptose: intrínseca e extrínseca, que são estudadas separadamente mas que em algumas ocasiões se intercomunicam (Reed, 2000).

A via intrínseca é mediada por genes da família *Bcl-2* (linfoma de células B) que incluem genes pró-apoptóticos como *Bax* e *Bad* (proteína X associada a Bcl-2 e antagonista de morte celular Bcl-2) e genes anti-apoptóticos como *Bcl-2* propriamente dito. (Wu et al, 2000; Parton et al, 2001).

As proteínas Bax e Bcl-2 expressas pelos seus respectivos genes são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2) e o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros define o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico (Petros et al,2004).

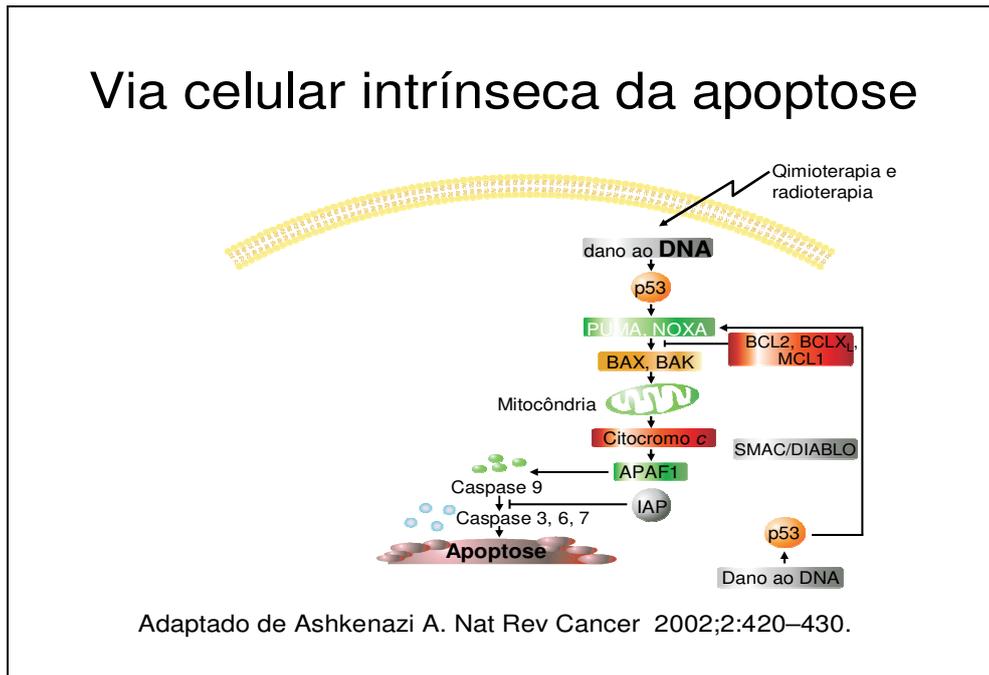
Sinais intrínsecos como dano no DNA celular, *stress* oxidativo ou indução por quimioterápicos serão desencadeantes para que os genes pró-apoptóticos através de suas proteínas (puma, noxa, bax, bad) atuem na membrana mitocondrial alterando sua permeabilidade e gerando a liberação da proteína citocromo-c que juntamente com a proteína citoplasmática apaf-1 (fator de ativação da protease), ativam a pro-caspase 9 ligando-se ao seu domínio card, originando um complexo chamado de apoptosoma. A caspase 9 ativada é a responsável por deflagrar a ativação das pro-caspases 3, 6 e 7, a cascata das caspases, que resulta na clivagem do DNA e apoptose celular (Parton et al, 2002; Ferreira et al,2002; Gewis, 2003; Hengartner, 2000).

O gene *Bcl-2* (anti-apoptótico) foi descrito em linfomas de células B como resultado de uma translocação t(14;18), codifica uma proteína mitocondrial com 24 kilodalton que se localiza no retículo endoplasmático, no envelope nuclear e na membrana mitocondrial de vários tecidos normais e neoplásicos, exceto tecidos muscular e hepático (Gasparini et al, 1995; Derossi et al, 2003). Este gene atua através de suas proteínas seqüestrando os membros

pró-apoptóticos da família *Bcl-2*, ligando-se a seus domínios BH3 (Bcl-2 homólogos) prevenindo sua oligomerização e conseqüentemente, inibindo os eventos para aumento da permeabilidade mitocondrial, liberação do citocromo-c com deflagração da cascata das caspases, inibindo assim a apoptose (Gewies, 2003).

O gene *P53* (supressão tumoral), se localiza no braço curto do cromossomo 17 e codifica uma proteína de 53 kilodáton com 393 aminoácidos, também participa do processo de apoptose. Sua principal função está relacionada à estabilidade genômica, reparo de DNA e indução de apoptose. A lesão do DNA é caracterizada pela célula através de seus mecanismos de checagem em leve, moderada ou grave. A partir daí, a célula é encaminhada para correção do dano ou apoptose. Este processo é mediado pelo *P53* que ativa as proteínas pró-apoptóticas bem como pelo aumento dos níveis de bax e diminuição de bcl-2 (Miyashita et al, 1994; Harris, 1996).

A cascata das caspases e o mecanismo apoptótico sofrem regulação de algumas proteínas denominadas IAPs (proteínas inibidoras da apoptose), que foram originalmente identificadas no proteoma do baculovirus e que no ser humano inibem diretamente as caspases 3, 7 e 9. Acredita-se que a função das IAPs é a prevenção da ativação espontânea das caspases. Este fato é corroborado pela presença de proteínas pró-apoptóticas na mitocôndria denominadas Smac (segundo ativador das caspases derivados da mitocôndria) ou Diablo (proteínas diretamente ligadas a IAP), que antagonizam a função das IAPs permitindo a continuidade da apoptose (Hengartner, 2000; Ferreira et al, 2002; Gewis, 2003). Este mecanismo, onde proteínas como Smac e Diablo inibem as IAPS tem sido chamado, por alguns autores, como terceira via de apoptose, mas que pode ser incluída na via intrínseca (Fig. 1) (Ashkenazi , 2002).



**FIGURA 1:** Via celular intrínseca da apoptose

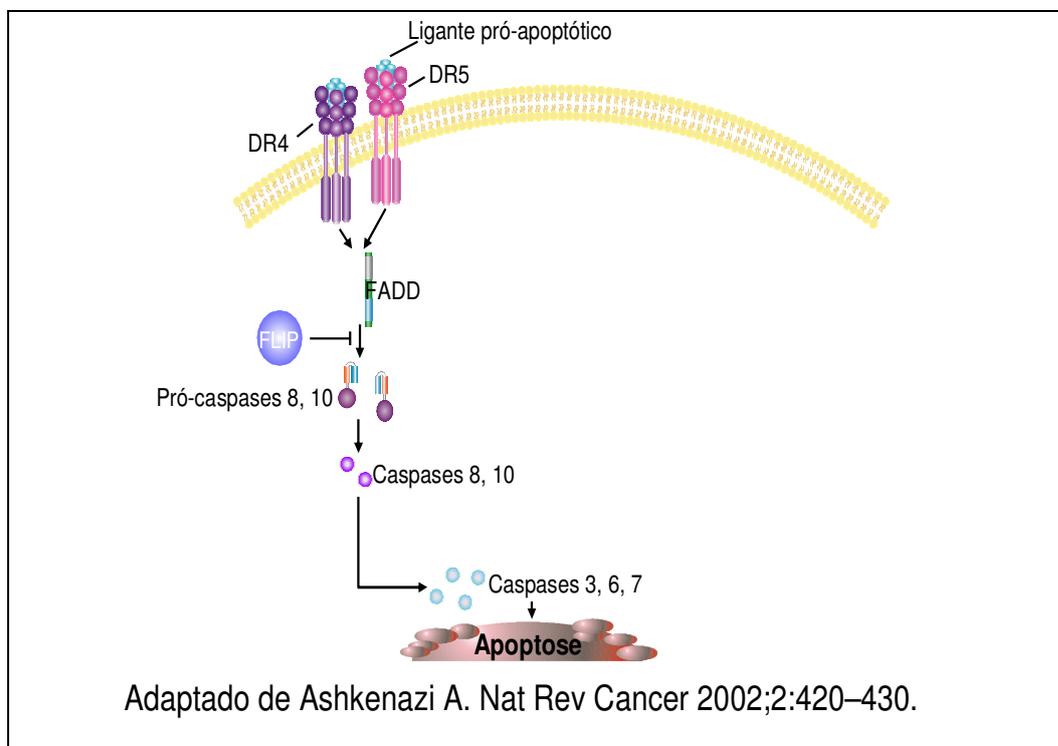
O modo pelo qual os genes pró-apoptóticos, por intermédio de suas proteínas aumentam a permeabilidade mitocondrial, ainda não foi totalmente elucidado, mas existem algumas teorias.

A possibilidade de que as proteínas codificadas pelos genes pró-apoptóticos se liguem na membrana mitocondrial e determinem a formação de canais pelos quais ocorre a passagem do citocromo-c foi aventada, porém o tamanho da molécula vai contra esta hipótese, já que o citocromo-c é uma molécula grande e não passa por esses canais. Outra hipótese é a de que as proteínas formem canais de passagem unindo-se a outras proteínas mitocondriais chamadas VDAC (canal de ânion voltagem dependente), porém ainda assim são canais estreitos. A teoria mais provável é a de que os genes pró-apoptóticos interfiram com a homeostase da membrana mitocondrial alterando a função dos canais de íons, aumentando assim a permeabilidade da membrana (Hengartner et al, 2000).

A rota extrínseca é mediada pela ativação de receptores de morte celular presentes na membrana celular que ao estímulo externo transmitem o sinal ligando-se a proteínas

específicas (FADD). Esses receptores de morte celular pertencem à super família do TNFR (receptor do fator de necrose tumoral) e inclui TNFR-1, Fas (*Fatty acid synthesis*), DR3, DR4, DR5 e DR6 (receptores de morte celular 3,4,5 e 6), (Ashkenazi, 2002).

Esta interação vai ativar a pró-caspase 8 que deflagrará a cascata das caspases, citada anteriormente, culminando com a morte celular (Fig.2) (Ashkenazi, 2002; Parton et al, 2002).



**FIGURA 2:** Via extrínseca da apoptose

### 1.3 Detecção de Apoptose

A apoptose é um evento dinâmico apresentando diversas características de acordo com o estágio em que a célula se encontra. Isto permite que ela possa ser detectada e até quantificada por muitos métodos, porém quando se avalia esse evento *in vivo*, ocorre uma falta de sincronia já que em um determinado tecido existem células em diferentes estágios do processo de apoptose, além do que no processo final a célula é eliminada por fagocitose para

evitar a ocorrência de necrose secundária, o que pode dificultar sua determinação (Bursch et al, 1985; Grasl-Kraup et al, 1997; Willingham, 1999; Alfaro Moreno et al, 2000).

Dentre os métodos disponíveis para detecção de apoptose estão os morfológicos, realizados através da microscopia óptica onde se detectam alterações na organização celular como condensação da cromatina, disposta em "meia lua", dentro do núcleo e o aparecimento dos corpos apoptóticos, que são fragmentos nucleares e saliências que se formam na superfície celular e separam-se da mesma, podendo ser fagocitados por células vizinhas ou degradados dentro dos lisossomos (Navarrete, 2003).

O método morfológico é considerado por muitos o método de excelência, por ser na prática o que permite mais facilmente a sua identificação, através de critérios bem estabelecidos (Bursch et al, 1985; Grasl-Kraup et al, 1997; Melo, 2001; D`Amelio et al, 2008).

Outro método para avaliação de apoptose é através da detecção da degradação do DNA, método conhecido como TUNEL (*Transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) que foi desenvolvido por Gavrielli em 1992 e baseia-se na clivagem de DNA na célula apoptótica, que gera grupos hidroxila-3' e são detectados *in situ* através da incubação de secções histológicas com TdT e d UTP biotinilada (Gavrielli et al, 1992). A partir daí, estes núcleos marcados podem ser avaliados em tecidos parafinados, pela citometria de fluxo, ou por métodos de imunistoquímica. Porém, trata-se de um método altamente dependente de padronização além do que durante o processo de necrose pode ocorrer também a degradação de DNA não sendo possível diferenciá-la da apoptose (Alfaro Moreno et al, 2000; Melo, 2001).

Outra forma de avaliação de apoptose é pela detecção da ativação da caspase 3 que apresenta a vantagem de ser um evento com alta correlação com apoptose e representa um marcador inicial do evento (Alfaro Moreno et al, 2000).

Por fim existe a detecção da exposição da fosfatidil serina que é uma molécula que em condições normais encontra-se no interior da membrana celular e na célula em apoptose. Devido à perda de simetria da membrana esta proteína se expõe ao meio extra-celular, para detectá-la utiliza-se uma substância chamada anexina V que não passa ao interior da membrana e possui grande afinidade pela fosfatidil serina, marcando-a (Alfaro Moreno et al, 2000).

Quanto à detecção da expressão da proteína bcl-2 (anti-apoptótica), o método mais utilizado e o de mais fácil execução é o imunistoquímico, já consagrado na literatura (Chang et al, 2000; Wu et al, 2000; Buchholz et al, 2003;).

#### **1.4 Apoptose e Quimioterapia Primária**

Os mecanismos de apoptose têm sido estudados exaustivamente nos últimos dez anos devido a sua associação com as neoplasias malignas e com seu tratamento, na tentativa de encontrar novos agentes terapêuticos, marcadores prognósticos e preditivos (Makin et al, 2001; Esteva et al, 2004).

Sendo a apoptose a via final de ação das drogas quimioterápicas, muitos estudos têm relacionado-na à resposta dos tumores ao tratamento quimioterápico (Popovska et al, 2000; Ferreira et al, 2002).

Ellis et al, em 1997, estudaram a apoptose através do índice apoptótico pelo método de TUNEL e bcl-2 por imunistoquímica antes e após quimioterapia primária. Encontraram um aumento significativo do índice apoptótico após a quimioterapia associado a melhor resposta clínica, porém não foi observada diferença significativa no estudo da bcl-2 provavelmente devido à casuística pequena (n = 27). Concluíram que o aumento do índice apoptótico permite prever a resposta clínica favorável ao tratamento quimioterápico.

Collecchi et al, em 1998, avaliando 70 pacientes com câncer de mama estudaram o índice de proliferação (Ki67) e a expressão de bcl-2 por imunistoquímica pré e pós quimioterapia primária com esquema FEC e observaram que em 70% dos casos a expressão de bcl-2 foi inalterada, 27% aumentada e 3 % reduzida, e que nos casos em que houve aumento, as células apresentavam baixa taxa de proliferação sugerindo que a quimioterapia destrói clones celulares mais agressivos poupando clones com características biológicas mais favoráveis.

Outro grupo de autores, avaliou 57 pacientes com câncer de mama das quais 33 receberam dois ciclos de quimioterapia primária utilizando esquema com ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil (CMF) seguidos de cirurgia e quatro ciclos de quimioterapia adjuvante e 24 pacientes receberam dois ciclos de placebo seguidos de cirurgia e seis ciclos de quimioterapia adjuvante com CMF. Foram avaliados índices de apoptose pelo método TUNEL nos tumores antes da quimioterapia e no material proveniente da cirurgia, e correlacionados com resposta clínica e sobrevida. O índice de apoptose (IA) médio no grupo submetido à quimioterapia foi 4,3% contra 2,2% no grupo que recebeu placebo. Quando comparados IA com resposta à quimioterapia, os casos com melhor resposta clínica apresentavam IA significativamente maiores do que nos casos sem resposta ou com progressão da doença. O mesmo ocorreu com sobrevida global e tempo livre de doença, que foram melhores nos casos em que os IA eram maiores (Shao et al, 1999).

Chang et al em 2000 avaliaram um grupo de 28 mulheres com carcinoma de mama que foram submetidas à quimioterapia primária com quatro ciclos de mitoxantrona e methotrexate e posterior tratamento cirúrgico e complementação de dois ciclos de quimioterapia com as mesmas medicações. Foram realizadas biópsias seriadas antes da quimioterapia, 24 horas, 7 e 21 dias após o primeiro ciclo. Avaliaram o índice apoptótico pelo método de TUNEL e a expressão da proteína bcl-2 entre outros marcadores por método

imunoistoquímico. Foi observado um aumento significativo do índice apoptótico 24 horas após o primeiro ciclo de quimioterapia nos casos em que houve boa resposta clínica quando comparado aos não respondedores. Quanto à avaliação de bcl-2 observou-se um aumento associado aos casos de boa resposta clínica .

A avaliação do índice apoptótico pré e pós-quimioterapia primária foi realizada num grupo de 29 mulheres com carcinoma de mama. As pacientes foram submetidas à biópsia, quimioterapia primária com FEC e tratamento cirúrgico posterior. O índice apoptótico foi determinado pelo método TUNEL no material pré e pós quimioterapia. A média observada para índice apoptótico antes da quimioterapia foi 1,7% (variando de 0,21% a 9,62%) e após a quimioterapia a média foi de 2,79% (variando de 0,82% a 8,62%) representando um aumento significativo deste índice no tumor residual ( $p=0,012$ ) (Popovska et al, 2000).

Symmans et al em 2000, também avaliaram o índice de apoptose pré e pós-quimioterapia primária comparando-o ao volume tumoral residual num grupo de 11 pacientes que receberam quimioterapia com paclitaxel. As biópsias foram realizadas antes do início do primeiro ciclo de quimioterapia e 24, 48, 72 e 96 horas após o início do primeiro ciclo. A apoptose foi avaliada pela contagem dos corpos apoptóticos e o volume do tumor residual foi obtido através de métodos radiológicos. Observaram que os índices apoptóticos sofreram aumentos que variaram de três a seis vezes nos quatro dias subsequentes ao início da quimioterapia e, as mudanças no índice apoptótico correlacionaram-se inversamente ao volume residual do tumor (-0,97); concluíram que o índice apoptótico durante os quatro primeiros dias após o início da quimioterapia tende a ser um marcador preditivo da resposta, necessitando um número maior de casos para melhor análise estatística.

Em 2000 Wu et al, avaliaram as expressões de bcl-2 e bax através do método imunoistoquímico e índice apoptótico pelo TUNEL em 91 casos de pacientes com carcinoma de mama em uma análise retrospectiva e correlacionaram estes achados entre si e com grau

tumoral, comprometimento axilar e tempo livre de doença. Todas as pacientes foram submetidas à cirurgia, quimioterapia com esquema CMF e radioterapia adjuvantes: 65,9% expressavam bcl-2 e correlacionava-se com baixo índice apoptótico, alto grau tumoral e envolvimento axilar; 38,5% dos casos expressavam altos índices apoptóticos correlacionando-se com baixo grau tumoral, ausência de comprometimento axilar e baixa expressão de bcl-2. Quando realizada análise multivariada, somente o bcl-2, status axilar e o grau histológico mostraram-se fatores prognósticos independentes quanto ao tempo livre de doença e à sobrevivência global.

Em 2003, Davis et al procuraram correlacionar índice apoptótico após quimioterapia primária e resposta patológica. Trinta pacientes com carcinoma de mama foram submetidas à quimioterapia primária utilizando esquemas com 5-fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida (FEC), Taxanos e CMF (ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil). O índice apoptótico foi avaliado pelo método TUNEL nos tumores antes, 24 e 48 horas após início da quimioterapia primária e observaram um aumento significativo ( $p=0,0023$ ) do índice de apoptose 48 horas após quimioterapia nos casos onde a resposta anátomo-patológica foi maior, já os índices de apoptose 24 horas após o início da quimioterapia foram semelhantes aos níveis basais. Contrariamente, os casos com baixa resposta apresentaram índices de apoptose pós-quimioterapia baixos.

Em 2003, Archer et al estudaram 66 pacientes com carcinoma invasivo de mama. As pacientes foram submetidas à biópsia antes e 24 horas após o início da quimioterapia com antracíclicos, avaliados apoptose através do método TUNEL entre outros marcadores e correlacionados com resposta clínica e sobrevida global. Houve um aumento significativo na média dos índices de apoptose 24 horas após a quimioterapia de 0,9 para 1,60 ( $p < 0,001$ ) porém não foi observada correlação com resposta clínica ou sobrevida global.

Buchholz et al em 2003 estudaram um grupo de 25 pacientes com câncer de mama, submetidas à quimioterapia primária com adriamicina e taxano (AT), taxano isolado ou CMF e avaliaram índices de apoptose utilizando o método TUNEL e bcl-2 por imunohistoquímica em amostras de tumor pré, 24 e 48 horas após o primeiro ciclo de quimioterapia, encontrando índices de apoptose maiores nos casos em que houve resposta anátomo-patológica completa (média de 22%) do que nos casos com tumor residual (média de 7%) e bcl-2 diminuído nos casos de boa resposta anátomo-patológica à quimioterapia.

Índice de apoptose (IA) pelo método TUNEL e índice de proliferação (Ki 67) por imunohistoquímica foram estudados por Burcombe et al em um grupo de 27 pacientes com diagnóstico de carcinoma invasivo de mama as quais foram submetidas à biópsia antes e 21 dias após o primeiro ciclo de quimioterapia primária com FEC e correlacionados com resposta clínica e anátomo- patológica. Foi observado aumento do IA em 45% dos casos, diminuição em 50%, e 5 % de estabilidade 21 dias após o início do tratamento e todos os casos apresentaram IA aumentado no tumor residual à cirurgia. 68% dos casos apresentaram queda do Ki67 21 dias após o início do tratamento e 72% apresentaram queda do Ki67 no tumor residual à cirurgia. As maiores quedas do Ki67 ocorreram nos tumores que responderam ao tratamento quimioterápico (p 0,04). O aumento de IA 21 dias após o primeiro ciclo de quimioterapia foi fator preditivo de resposta anátomo- patológica (p< 0,049) (Burcombe et al, 2006).

Assim, defeitos e falhas na indução de apoptose podem ser interpretados como mecanismos de resistência às drogas quimioterápicas (Chang et al, 2000; Johnstone et al, 2002) e avanços no estudo sobre apoptose e sua relação com o tratamento quimioterápico podem modificar o tratamento empírico auxiliando na escolha das drogas e esquemas de quimioterapia bem como predizer a resposta ao tratamento (Frankel, 2003).

Face à escassez de avaliação de apoptose pelo método morfológico e a sua importância na correlação com a resposta ao tratamento quimioterápico, interessou-nos avaliar a associação da bcl-2 e índice apoptótico pelo método morfológico com a contagem dos corpos apoptóticos.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a relação do índice de apoptose e da imunoeexpressão da bcl-2 antes e após quimioterapia primária com a resposta clínica em mulheres com carcinoma de mama estádios II e III.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Trata-se de estudo longitudinal, prospectivo, onde foram selecionadas 52 mulheres encaminhadas do ambulatório do Setor de Mastologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, ao ambulatório de Quimioterapia do mesmo Departamento, com diagnóstico clínico de câncer de mama no período de julho de 2004 a julho de 2006.

As pacientes selecionadas foram comunicadas da intenção e finalidade do trabalho através de termo de consentimento livre e esclarecido, (Anexo 2) onde foi ressaltado que não haveria interferência alguma com o fluxograma normal de atendimento, sendo necessário apenas uma amostra de tecido neoplásico para realização da pesquisa. O trabalho foi aprovado pela Comissão Científica do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (Anexo 1).

Critérios de inclusão:

- Mulheres portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama estádios II e III.
- Intervalo etário entre 30 e 75 anos.
- Tumor único, unilateral e primário de mama.
- Ausência de cardiopatia.

Das 52 pacientes inicialmente selecionadas, excluimos 11 pacientes devido às seguintes situações: uma paciente com diagnóstico de mastite granulomatosa , outra portadora de obesidade mórbida que não permitia a realização de ressonância nuclear magnética , duas com tumores metastáticos e sete com diagnóstico de carcinoma lobular invasivo. O grupo que

obedeceu todos os critérios de elegibilidade foi composto por 41 pacientes cujas características gerais estão listadas nos anexos 3 e 4.

As mamografias foram realizadas no aparelho da marca Phillips modelo M 3000 (USA) com microfocos de 0,1 e 0,3 milímetros (mm), anodo de molibdênio, filtro de Ródio e exposímetro automático, empregando chassis, écran e filmes da marca Kodak, modelo Eastman Kodak Company (Rochester, New York, USA). O processamento dos filmes foi realizado por meio de equipamento da marca Kodak modelo M 38M (Rochester, New York, USA) com ciclo estendido, de uso exclusivo, suprido por fixadores e reveladores da mesma empresa nas incidências crânio-caudal e médio-oblíqua-lateral com angulação de 25 graus e, quando necessário, foram realizadas incidências adicionais com compressão e/ou magnificação de imagens .

Os exames de ultra-som mamário foram realizados com aparelho digital da marca HDI modelo 1500 (Japan) , transdutor linear de frequência variável de 7,5 a 10,0 megahertz (Mhz) com técnica de exploração radial, anti-radial e transversal em ambas as mamas e documentação das imagens em formato digital.

Os exames de ressonância nuclear magnética foram obtidos através de aparelho da marca Phillips de 1,0 Tesla, modelo T10 NT, com bobina adaptada para estudo das mamas, inicialmente com seqüências iniciais sagitais ponderadas em T2 e, posteriormente, seqüências axiais e sagitais ponderadas em T1, antes e após injeção de 10 mililitros de contraste paramagnético por via endovenosa, com aquisições em intervalos de 5 mm. O contraste utilizado foi o ácido penta-acético triamino dietileno-gadolíneo (Gd-DTPA), da marca Schering do Brasil; todas as imagens também foram digitalizadas e arquivadas.

Os exames de imagem foram realizados no Serviço de Diagnóstico por Imagem da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e foram avaliados por dois médicos-assistentes, membros titulares do Colégio Brasileiro de Radiologia, utilizando o sistema de

classificação de BI-RADS (ACR, 2004) , em ambiente escuro, com auxílio de negatoscópio e lupa magnificadora quando necessário.

O estadiamento clínico foi realizado através do exame físico com mensuração das maiores dimensões do tumor mamário e avaliação linfonodal axilar associado aos seguintes exames de imagem: ultra-sonografia de abdome total, realizado no aparelho Toshiba, modelo Tosbee SSA24GA (Japan), radiografia de tórax realizado no aparelho Emic Limex, modelo MK 500 (Kawasaki, Japan) e cintilografia óssea realizada no aparelho Elscint, modelo Apex (Israel).

A distribuição por estadiamento revelou seis pacientes no estágio IIA, 22 no II B e 13 , III A.

Foram realizadas nove (21,95%) quadrantectomias com linfonodectomia axilar e análise de margens intra-operatória e 32(78,06%) mastectomias com linfadenectomia axilar e preservação dos músculos peitorais.

Todas as pacientes apresentavam-se clinicamente com índice de Performance Status Karnofsky (KPS) 100, ou seja, aptas a realizar suas atividades habituais sem auxílio de outras pessoas.

Após a confirmação do diagnóstico de carcinoma ductal invasivo, as pacientes foram submetidas a três ciclos de quimioterapia primária a cada 21 dias, com as seguintes drogas: 5-fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida nas dosagens de  $500 \text{ mg/m}^2$ ,  $75 \text{ mg/m}^2$  e  $500 \text{ mg/m}^2$  respectivamente, de acordo com protocolo de tratamento do Setor de Quimioterapia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. O acompanhamento da resposta clínica à infusão da medicação foi verificado a cada ciclo, avaliando-se a resposta tumoral pela mensuração do maior diâmetro da neoplasia com auxílio de paquímetro.

Para a classificação da resposta clínica levamos em consideração os critérios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Group*) da EORTC que determina os seguintes parâmetros (Therasse et al, 2000) :

1. Resposta Completa (RC): ocorre desaparecimento completo da lesão alvo
2. Resposta Parcial (RP): há diminuição de pelo menos 30% do maior diâmetro da lesão alvo
3. Progressão da doença: quando há aumento no mínimo de 20% do maior diâmetro da lesão alvo
4. Doença estável: não ocorre alteração no tamanho da lesão ou não se preenche os critérios de RP e progressão da doença.

Consideramos em nosso trabalho como pacientes respondedoras aquelas classificadas como resposta completa e resposta parcial e como não respondedoras as que apresentaram progressão da doença e doença estável.

Após três ciclos de quimioterapia primária, as pacientes foram submetidas à terapêutica operatória pelo mesmo cirurgião mastologista.

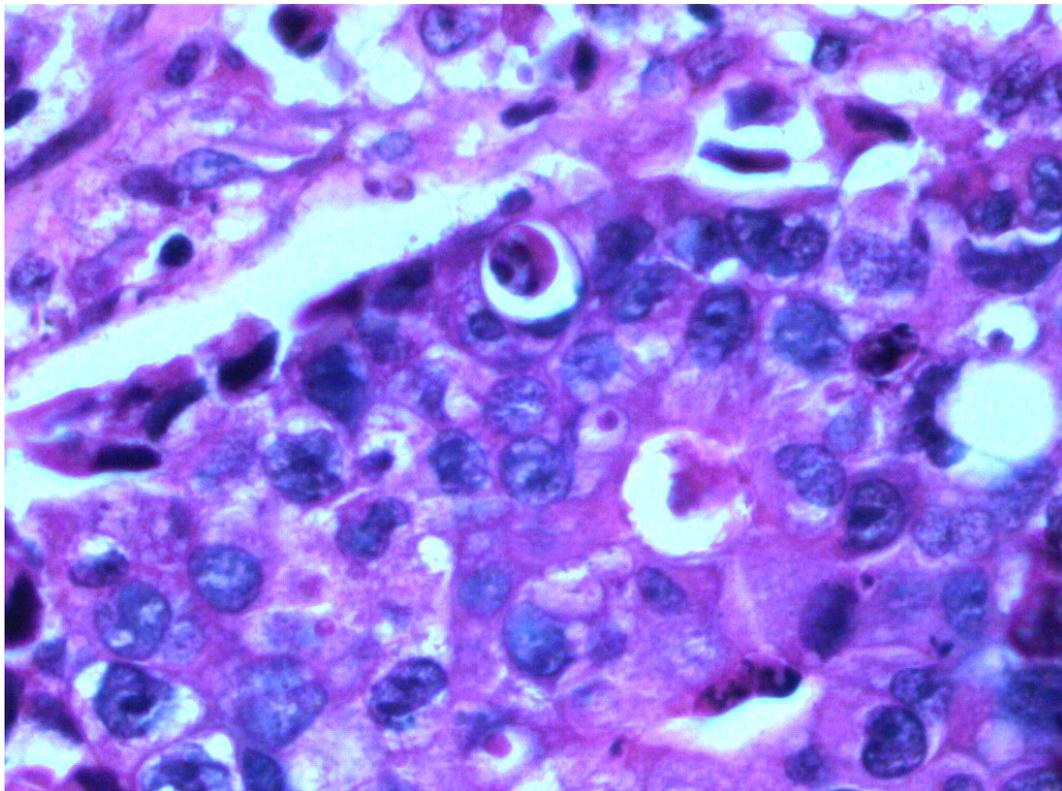
### **3.1 Padronização do material anátomo-patológico e reações imunoistoquímicas**

O material para diagnóstico anátomopatológico foi realizado por biópsia incisional a céu aberto, em ambiente de centro cirúrgico, sob sedação, onde obtivemos fragmento de cerca de um centímetro do tumor que foi fixado em formalina a 10% e posteriormente emblocado em parafina. As lâminas obtidas deste material foram coradas em hematoxilina e eosina para classificação histopatológica segundo a OMS, bem como para a determinação dos graus histológico e nuclear segundo os critérios de Scarff-Bloom e Richardson modificado por

Elston & Ellis (Elston, Ellis, 1991). Após o tratamento cirúrgico, o tamanho do tumor residual, o número de linfonodos dissecados, o acometimento linfonodal axilar neoplásico, foram avaliados por patologista, junto ao Departamento de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Foi considerada como resposta anátomo-patológica completa, a ausência de neoplasia invasiva ou *in situ*, verificada através da análise de múltiplas lâminas coradas por hematoxilina-eosina, provenientes de blocos de parafina das peças cirúrgicas conforme preconizado por Sataloff (1995).

O índice apoptótico foi avaliado através de contagem nos cortes corados ao H-E em 10 campos consecutivos de grande aumento e consideradas apenas as células claramente identificadas pelos critérios de Kerr (Kerr et al,1972) (Fig.3). O cálculo do índice apoptótico (IA) foi realizado dividindo-se o número de corpos apoptóticos pelo número total de células.



**FIGURA 3:** Fotomicrografia (400X AO; HE) de corte histológico da neoplasia de mama com corpo apoptótico no centro.

A técnica de imunohistoquímica para expressão de bcl-2 foi realizada conforme padronização adotada no Departamento de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (Boenish, 2001), (Anexo 6).

Utilizamos como anticorpos para as reações de imunohistoquímica para bcl-2 Ac. Monoclonal Anti bcl-2, clone 124, código M0887 Dako diluição 1/250.

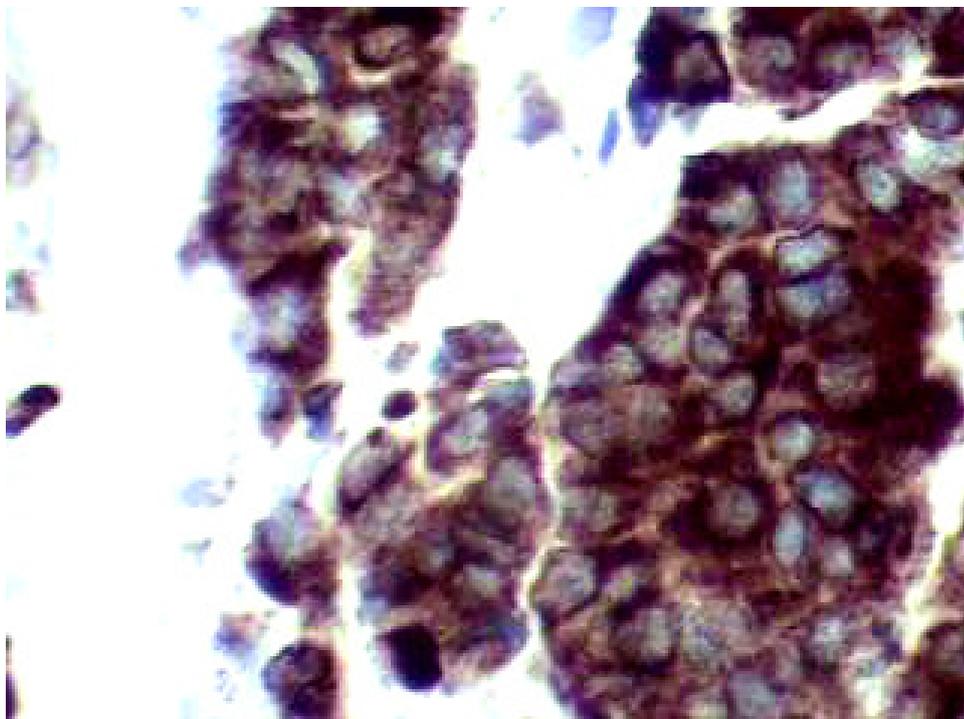
Para bcl-2, foi utilizado método semi-quantitativo com escores variando de 0 a 3. A contagem de células marcadas em coloração castanha (Fig.4.) pelo método imunohistoquímico foi realizada em 10 campos de grande aumento da seguinte forma:

**Escore 0:** ausência de células marcadas.

**Escore 1:** até 10% de células marcadas .

**Escore 2:** entre 11% e 40% de células marcadas.

**Escore 3:** mais de 41% de células marcadas.



**FIGURA 4:** Fotomicrografia (400X A0) de corte histológico de neoplasia de mama com marcação imunohistoquímica (acastanhada) para o anticorpo bcl-2 positivo 3(+).

### 3.2 Análise Estatística

A análise descritiva de natureza quantitativa como idade, tamanho do tumor, IA e tamanho do tumor residual (AP) foram calculadas e confeccionados gráficos do tipo *boxplot* (Morettin e Bussab, 2006).

As variáveis de natureza qualitativa como grau nuclear, grau histológico, linfonodos, bcl-2 e resposta clínica foram analisadas através de cálculo de frequências absolutas e relativas, além da construção de gráficos de barras (Morettin e Bussab, 2006).

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade das distribuições do Tamanho e do IA (CONOVER, 1998);
- Teste t-Student pareado na comparação dos valores médios inicial e final do Tamanho e IA (Morettin, Bussab, 2006);
- Teste de McNemar para comparar a distribuição percentual de resposta inicial de bcl-2 (AGRESTI, 1990);
- Análise de variância (ANOVA) com um fator fixo na comparação dos valores médios do IA inicial, Diferença do IA inicial e final e Tamanho AP final (NETER et al, 1996);
- Teste Exato de Fisher ou sua extensão quando necessário para estudar a associação entre Resposta clínica e bcl-2 inicial, mudança do bcl-2 inicial e final. (AGRESTI, 1990).

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância  $\alpha$  igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do *Excel 2000 for Windows* para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o programa para computador *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)* versão 11.0 *for Windows*.

## **4. RESULTADOS**

A amostra selecionada nesta pesquisa foi composta por 41 mulheres com idade média de 49,9 anos e desvio padrão (DP) de 10,2 anos variando de 32 a 70 anos.

A avaliação clínica do maior diâmetro tumoral mamário previamente à quimioterapia primária, variou de 2,5 a 15cm, com média de 5,8cm (DP 2,4cm) e mediana de 5cm. A mensuração do maior diâmetro após o término da quimioterapia primária variou de 0,0 a 8,5cm com média de 3,6cm (DP 2,1cm) e mediana de 3,0cm. A resposta clínica, classificada pelos critérios de RECIST, apresentou a seguinte distribuição: 25 (60,98%) pacientes respondedoras e 16 (39,0%) não respondedoras. A avaliação clínica linfonodal antes da quimioterapia, revelou 14 pacientes N0, 18 pacientes N1 e nove N2. Ao término da quimioterapia primária observamos 31 N0, oito N1 e dois N2; nenhuma paciente apresentava sinais clínicos, laboratoriais e de imagem sugestivos de doença metastática. A mensuração do maior diâmetro tumoral residual, realizada através da análise anátomo-patológica, demonstrou variação de 0 a 9cm com média de 3,2cm (DP 2,3cm) e mediana de 3,0cm; em cinco pacientes (12,19%) observamos resposta anátomo-patológica completa (Anexo 5).

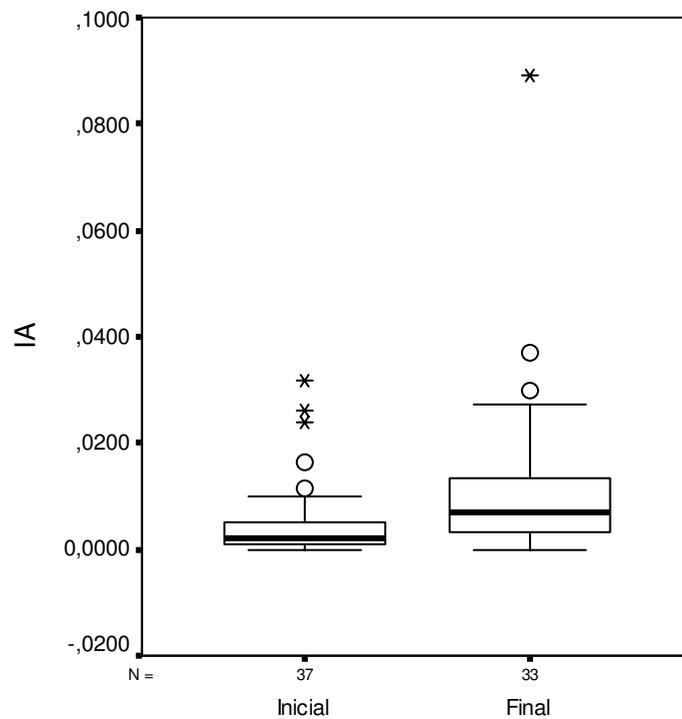
Quanto à distribuição por grau histológico verificamos que, antes do início do estudo, uma paciente apresentou grau 1, 32 pacientes grau 2 e oito pacientes grau 3; após o término, obtivemos 18 pacientes com grau 2, 18 pacientes com grau 3 e em cinco pacientes não foi possível estabelecer o grau histológico devido a ausência de tumor (Anexo 5).

Analisando o grau nuclear antes do início da quimioterapia primária, notamos que das 41 pacientes, 29 foram classificadas como grau 2 e 12 como grau 3; após seu término verificamos que uma paciente apresentava grau nuclear 1, 15 grau 2, 20 grau 3 e em cinco pacientes não foi possível sua determinação devido à ausência de tumor residual (Anexo 5).

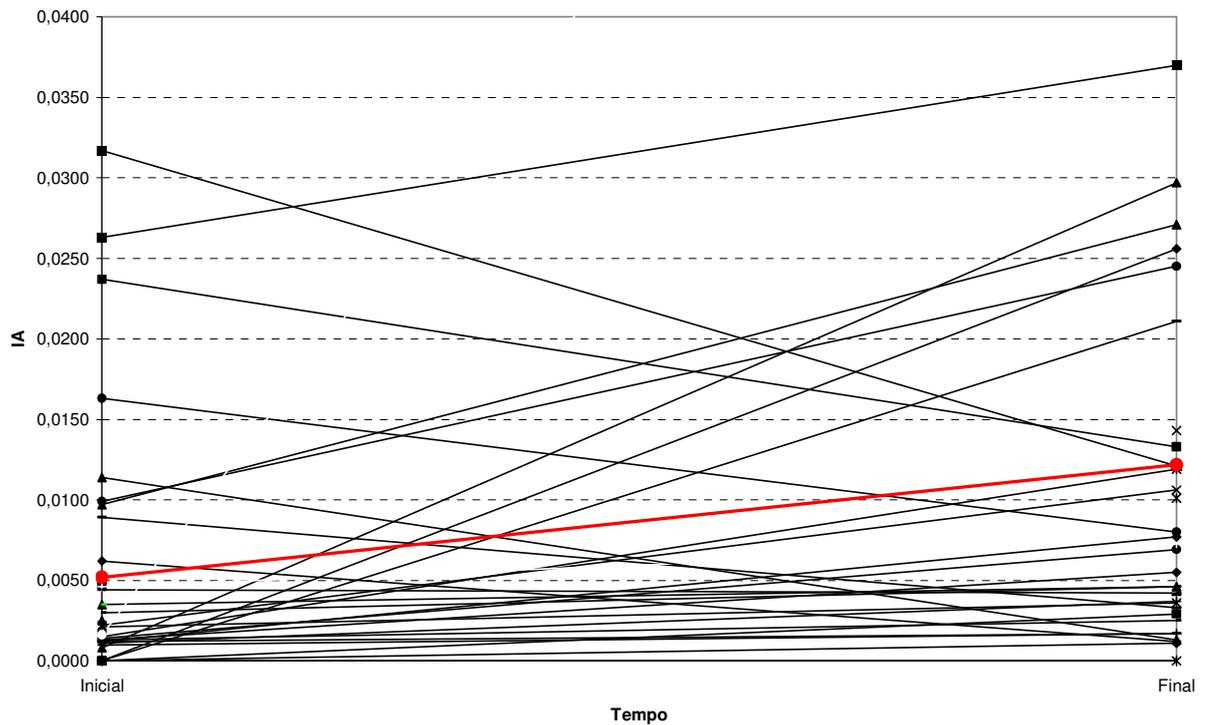
Quanto ao índice de apoptose (IA), foram analisados 37 casos antes da quimioterapia (inicial) e 33 casos pós- quimioterapia (final). Encontramos IA inicial variando de 0 a 0,0317 com média de 0,0052 e IA final variando de 0 a 0,0890 com média de 0,0122. Foi detectada uma tendência do IA médio inicial ser menor que IA médio final ( $p=0,061$ ) (Figs. 5 e 6).

O erro  $\beta$  neste caso foi de 0,530 com um poder de 0,470.

Em cinco casos não foi possível o cálculo do IA final já que houve resposta patológica completa havendo portanto ausência de tumor.



**FIGURA 5:** Boxplot do índice de apoptose (IA) inicial e final das mulheres submetidas a quimioterapia primária.



\*cerca de 30 indivíduos que apresentavam conjuntamente as medidas inicial e final

**FIGURA 6:** Perfis individuais\* do índice de apoptose (IA) inicial (pré quimioterapia primária) e final (pós quimioterapia primária) das mulheres submetidas à quimioterapia primária.

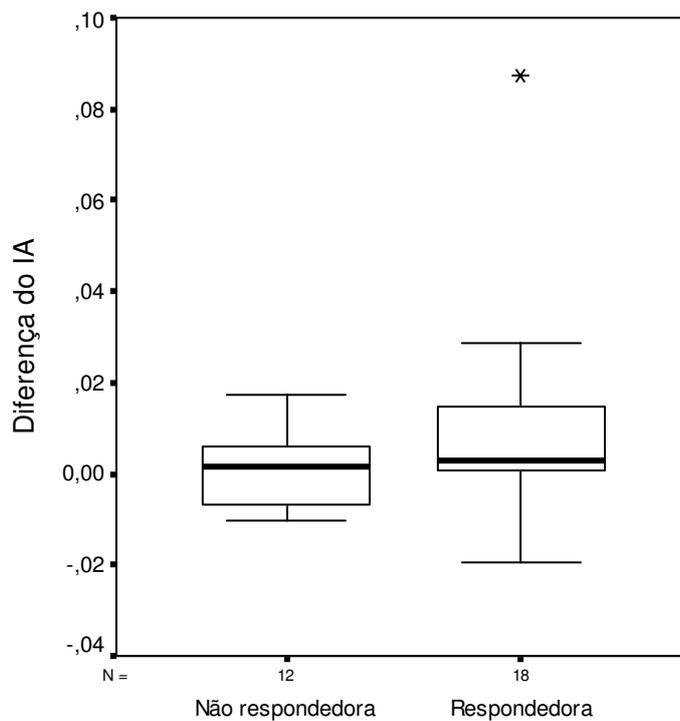
Quando correlacionamos a diferença entre IA inicial e IA final com a resposta clínica os resultados inferenciais não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tipos de resposta ( $p=0,181$ ) como mostram a Tab.1 e Fig. 7.

O teste apresentou poder de 0,264 com erro  $\beta$  de 0,736.

**TABELA 1:** Medidas-resumo da Diferença do IA\*, segundo a resposta clínica do tumor de 30 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária.

Medidas-resumo da diferença do IA	Não respondedoras N=12	Respondedoras N=18
Média	0,0010	0,0103
Mediana	0,0014	0,0028
Mínimo	-0,0104	-0,0196
Máximo	0,0174	0,0874
Desvio padrão	0,0085	0,0224

\*IA final menos IA inicial



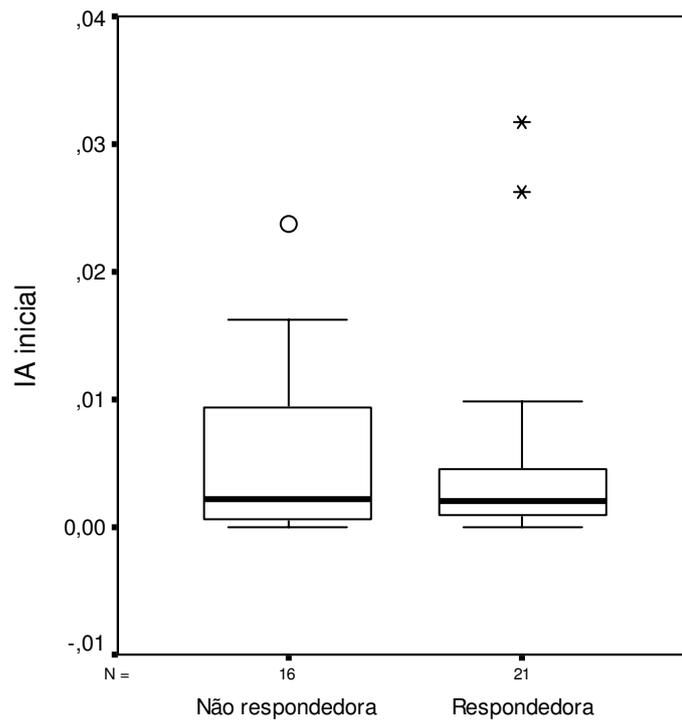
\*IA final menos IA inicial

**FIGURA 7:** Boxplot da Diferença do IA\* das 30 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária segundo a resposta clínica

Os resultados dos testes estatísticos mostraram a inexistência de associação entre resposta clínica e IA inicial ( $p=0,873$ ), com poder estatístico de 0,053 e erro  $\beta$  de 0,947 conforme tabela 2 e figura 8.

**TABELA 2:** Medidas-resumo do IA inicial de 37 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária segundo a resposta clínica

<b>Medidas-resumo da diferença do IA associadas a resposta clínica</b>	<b>Não respondedoras N=16</b>	<b>Respondedoras N=21</b>
Média	0,0054	0,0050
Mediana	0,0023	0,0021
Mínimo	0,0000	0,0000
Máximo	0,0237	0,0317
Desvio padrão	0,0069	0,0084



**FIGURA 8:** Boxplot do IA inicial das 37 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária segundo a resposta clínica

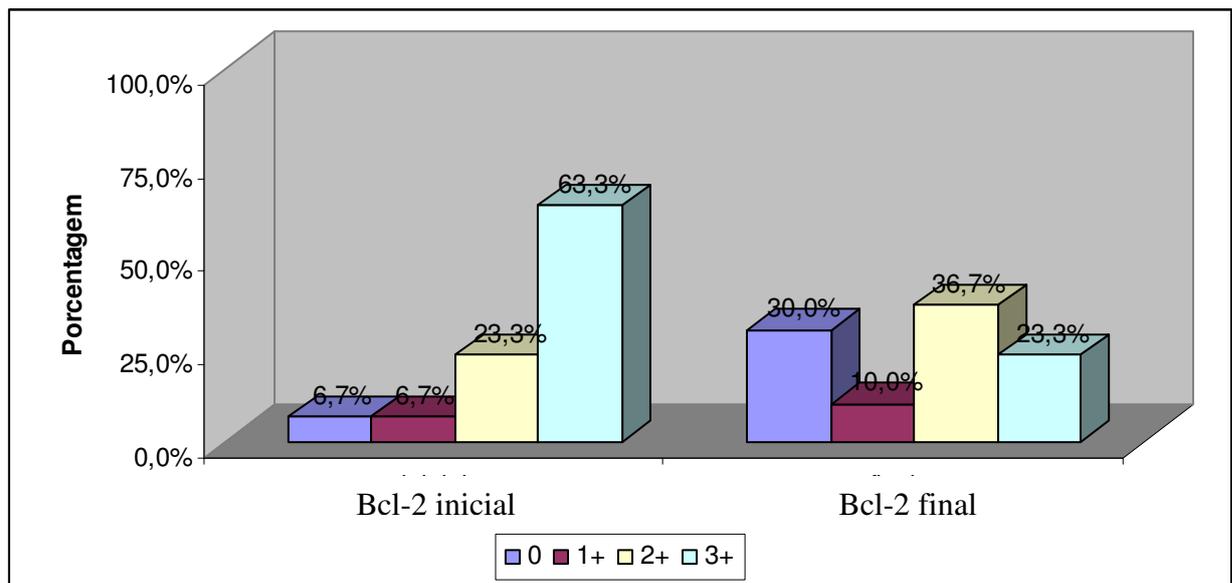
Quanto à distribuição e expressão do Bcl-2 e sua intensidade antes da quimioterapia (inicial) observamos: dois casos Bcl-2 negativo (0+), dois casos Bcl-2 positivo (1+), sete casos Bcl-2 positivo (2+) e 19 casos Bcl-2 positivo (3+).

Já a distribuição após a quimioterapia (final) resultou em: nove casos Bcl-2 negativo (0+), três casos Bcl-2 positivo (1+), 11 casos Bcl-2 positivo (2+) e sete casos Bcl-2 positivo (3+).

As porcentagens das categorias de resposta do Bcl-2 no início são estatisticamente diferentes das porcentagens das categorias de resposta do Bcl-2 no final ( $p < 0,001$ ) com uma queda de 93,3% para 70% de Bcl-2 positivo (Tab. 3 e Fig. 9).

**TABELA 3:** Distribuição das 30 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária, segundo Bcl-2 inicial (pré quimioterapia primária) e final (pós quimioterapia primária).

Bcl-2 inicial	Bcl-2 final				Total
	0	1+	2+	3+	
0	1 (3,3%)	-	-	1 (3,3%)	2 (6,7%)
1+	1 (3,3%)	-	1(3,3%)	-	2 (6,7%)
2+	4 (13,3%)	-	3 (10%)	-	7(23,3%)
3+	3 (10%)	3 (10%)	7 (23,3%)	6 (20%)	19(63,3%)
Total	9 (30%)	3 (10%)	11 (36,7%)	7 (23,3%)	30 (100%)



**FIGURA 9:** Distribuição em porcentagem das 30 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária, segundo a expressão de Bcl-2 inicial (pré-quimioterapia) e final (pós quimioterapia).

Quando correlacionadas as diferenças entre Bcl-2 inicial e final com a resposta clínica não houve associação significativa ( $p=0,417$ ) com poder estatístico de 0,274 e erro  $\beta$  de 0,726 como mostram a tabela 4 e a figura 10.

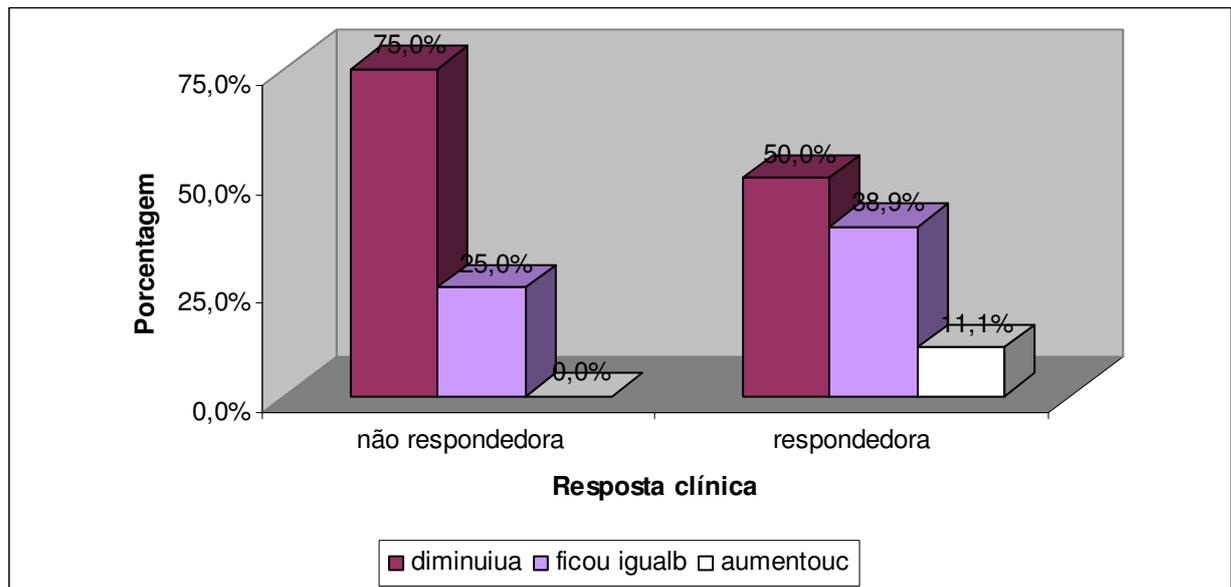
**TABELA 4:** Distribuição das 30 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária, segundo mudança da expressão de Bcl-2 após quimioterapia primária e a resposta clínica.

Bcl-2	Resposta Clínica		Total
	Não respondedoras	Respondedoras	
Diminuiu (a)	9 (75%)	9 (50%)	18 (60%)
Ficou igual (b)	3 (25%)	7 (38,9%)	10 (33,3%)
Aumentou (c)	-	2 (11,1%)	2 (6,7%)
Total	12 (100%)	18 (100%)	30 (100%)

<sup>a</sup>quando o Bcl-2 inicial foi maior que o Bcl-2 final

<sup>b</sup>quando o Bcl-2 inicial foi a igual ao Bcl-2 final

<sup>c</sup>quando o Bcl-2 inicial foi menor que o Bcl-2 final



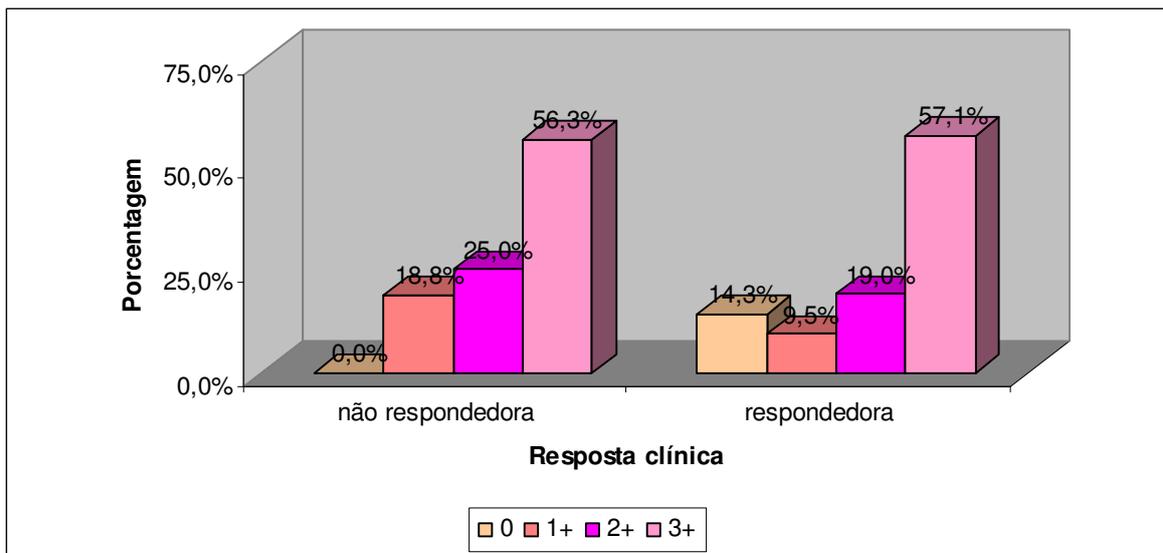
**FIGURA 10:** Distribuição em porcentagem das 30 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária, segundo a mudança da expressão de Bcl-2 após quimioterapia primária e a resposta clínica.

A análise estatística não evidenciou associação entre a resposta clínica e a expressão do Bcl-2 inicial ( $p=0,466$ ) com poder estatístico de 0,275 e erro  $\beta$  de 0,725 (Tab. 5 e Fig. 11)

porém observou-se tendência na relação da resposta clínica completa com a menor frequência da expressão de Bcl-2 inicial positivo (3+).

**TABELA 5:** Distribuição das 37 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária, segundo a expressão de Bcl-2 inicial (pré-quimioterapia primária) e a resposta clínica.

Bcl-2 inicial	Resposta clínica		Total
	Não respondedoras	Respondedoras	
0	-	3 (14,3%)	3 (8,1%)
1+	3 (18,8%)	2 (9,5%)	5 (13,5%)
2+	4 (25,0%)	4 (19,0%)	8 (21,6%)
3+	9 (56,3%)	12 (57,1%)	21 (56,8%)
Total	16 (100,0%)	21 (100,0%)	37 (100,0%)



**FIGURA 11:** Distribuição em porcentagem das 37 mulheres portadoras de carcinoma de mama submetidas à quimioterapia primária, segundo a expressão do Bcl-2 inicial (pré quimioterapia primária) e a resposta clínica.

## **5. DISCUSSÃO**

A boa resposta clínica e anátomo-patológica dos tumores à quimioterapia, associadas ao ganho de tempo livre de doença e sobrevivência global têm sido o objetivo do tratamento com diferentes tipos de esquemas e drogas quimioterápicas.

Os estudos com a quimioterapia primária, mostram taxas de resposta clínica variando de 17% a 86% e resposta patológica completa entre 2,6 e 16%. (Bonadonna et al, 2002; Cleator et al, 2005) o que está de acordo com nossos achados, que apresentaram resposta clínica em 61% e resposta anátomo-patológica completa em 12,19% dos casos avaliados. Essa grande variação nas taxas de resposta dos tumores ao tratamento quimioterápico têm estimulado a busca constante de fatores preditivos de resposta à quimioterapia na tentativa de selecionar melhor as candidatas a este tratamento.

A despeito do tipo de droga quimioterápica utilizada, sabe-se que sua atuação ocorre ao induzir apoptose (Popovska et al, 2000; Ferreira et al, 2002). No intuito de identificarmos fatores preditivos de resposta à quimioterapia, interessou-nos avaliar o índice de apoptose (IA) e a bcl-2, proteína envolvida nesse processo.

O índice de apoptose (IA) inicial, que mostra as características próprias do tumor, é um evento dinâmico dependente da fase em que a célula se encontra; variou em nossa casuística de 0 a 3,17%, com média de 0,05%, pouco abaixo dos dados da literatura, cujas médias têm variado entre 0,75% e 2%. Já o IA final, localizado entre 0 e 8,9%, com média de 1,2% valores também encontrados por outros autores com médias entre 1,17% e 10% (Chang et al, 2000; Parton et al, 2002; Buchholz et al, 2003).

Ao correlacionarmos IA inicial e IA final, observamos uma tendência de aumento após a quimioterapia ( $p=0,061$ ), resultado equivalente ao encontrado por Arpino et al, em 2006 ( $p=0,06$ ). Outros estudos mostraram uma elevação significativa no IA após tratamento quimioterápico, confirmando o fato de o medicamento atuar aumentando a morte celular pelo mecanismo de apoptose (Ellis et al, 1997; Popovska et al, 2000; Parton et al, 2002; Archer et al, 2003; Buchholz et al, 2003), por outro lado autores como Chang et al, 2000 e Burcombe et al, 2006, não observaram tal correlação.

O momento exato da avaliação do IA ainda é discutível, Dowsett et al, em 1999, avaliaram IA pré-quimioterapia, 24 horas e 3 meses após o início da quimioterapia primária, observando aumento no índice de apoptose 24 horas após o início da quimioterapia e uma queda 3 meses após. Acredita-se que devido aos mecanismos de fagocitose sofrido pelas células após a apoptose observe-se uma falsa queda no IA quando avaliado mais tardiamente. Este fato pode explicar nosso achado de apenas uma tendência no aumento de IA, pois avaliamos a apoptose no material proveniente da cirurgia ou seja, no mínimo 21 dias após o ciclo de quimioterapia. Para minimizar este possível viés alguns autores têm realizado biópsias seriadas 24, 48, 72 horas, 7 e 21 dias após o início da quimioterapia porém acreditamos não ser indicado já que expõe a paciente a sucessivos procedimentos invasivos (Arpino et al, 2006; Burcombe et al, 2006).

Quando correlacionamos IA inicial e a diferença entre IA final e IA inicial com resposta clínica, não encontramos relação significativa, com  $p=0,181$  e  $p=0,873$  respectivamente, fato corroborado por Parton et al em 2002, Archer et al em 2003 e Burcombe et al em 2006.

Porém, outros trabalhos encontraram associação significativa da diferença entre o IA final e o IA inicial com a resposta clínica (Shao et al, 1999; Chang et al, 2000; Symmans et al, 2000; Buchholz et al, 2003; Davis et al, 2003) ou até uma tendência de correlação (Arpino et

al, 2006). Implicamos este nosso achado de não correlação entre IA inicial e a diferença entre IA final e IA inicial com a resposta clínica, novamente ao tempo no qual foi avaliado o índice de apoptose. Davis et al em 2003, realizando biópsias seriadas 24 e 48 horas após o início do tratamento com quimioterapia primária, mostrou associação do IA na maioria das amostras colhidas 48 horas e não 24 horas após início do tratamento, com exceção de uma paciente na qual o pico de apoptose ocorreu 24 horas após o início da terapêutica. Isto pode sugerir que o IA não seja um bom fator preditivo de resposta ao tratamento quimioterápico já que pode variar de paciente para paciente e entre os momentos de coleta das amostras.

Outro importante fator relacionado à apoptose é a avaliação de bcl-2, cuja super expressão está associada com a supressão da apoptose.

Observamos diferença estatisticamente significativa entre bcl-2 pré e pós-quimioterapia com 93,3% de positividade pré e 70% pós-quimioterapia ( $p < 0,001$ ), resultado esperado já que uma queda de bcl-2 está associada a altos índices de apoptose (Wu et al, 2000).

Quando relacionamos bcl-2 inicial com resposta ao tratamento quimioterápico, não foi observada associação estatisticamente significativa ( $p=0,466$ ); outros autores também não encontraram esta relação (Chang et al, 2000; Parton et al, 2002). Talvez uma casuística maior pudesse resultar numa associação estatisticamente significativa, já que observamos tendência de menor expressão de bcl-2 inicial positivo 3+ nos casos de resposta completa, fato esperado pois sendo o *Bcl-2* gene inibidor da apoptose, quanto menor a expressão de sua proteína bcl-2, maior o IA e conseqüentemente melhor resposta ao tratamento quimioterápico.

Em nosso estudo não observamos associação significativa da diferença entre bcl-2 final e inicial com a resposta clínica ( $p=0,417$ ), assim como Ellis et al em 1997 e Sjöström et al em 2002. Por outro lado, Buchholz et al em 2003 e von Minckwitz et al em 2008, encontraram diminuição de bcl-2 associada à resposta à quimioterapia. Essa discrepância de

resultados pode ser explicada pela utilização de diferentes regimes de tratamento quimioterápico, variação no tempo de coleta de amostras e até tipo de anticorpos utilizados para o estudo.

Collechi et al em 1998 e Chang et al em 2000, observaram um aumento de Bcl-2 induzido pela quimioterapia, resultado este diferente do esperado. Acreditam os autores que este fato seja decorrente de uma seleção de clones celulares bem diferenciados.

Assim, o valor preditivo dos IA e bcl-2 ainda é controverso quando correlacionados à quimioterapia primária. Apesar do IA ter apresentado uma tendência de aumento e a bcl-2 queda estatisticamente significativa após a quimioterapia primária, não se correlacionaram à resposta clínica, não apresentando poder como fator preditivo em nosso estudo. Acreditamos que outros trabalhos com diferentes esquemas quimioterápicos, maior casuística e avaliação final mais precoce sejam necessários para avaliar melhor estes dois fatores e, possivelmente, estabelecê-los como auxiliares na indicação do melhor tratamento para cada paciente.

## **6. CONCLUSÕES**

- Os IA e a imunexpressão da bcl-2 pré e pós-quimioterapia primária não se correlacionaram com resposta clínica à quimioterapia primária.
- Observamos diminuição da imunexpressão da bcl-2 após a quimioterapia primária.
- Houve uma tendência de aumento do IA após a quimioterapia primária.

## **7. ANEXOS**

## ANEXO 1

## Parecer do comitê de ética em pesquisa.

 **IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**  
 Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo –SP  
 PABX (11) 21767000 Ramais:57102/5502 – telefax- 2176.7041  
 E-mail: [eticamed@santacasasp.org.br](mailto:eticamed@santacasasp.org.br)

São Paulo, 2 de junho de 2006.

Projeto nº147/06  
 Informe este número para  
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

**Dr.(a). Liliane Baratella Ulson**  
 Departamento Obstetrícia e Ginecologia

Ilmo.(a).Sr.(a).

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia **31/05/2006** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"Estudo da apoptose no carcinoma de mama estádios II e III pré e pós quimioterapia primária "**, emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

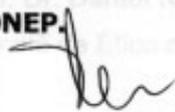
**Aprovado ( inclusive o TCLE);**

**Com pendências** (há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias, ( enviar as alterações em duas cópias);

**Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);

**Não aprovado:** e

**Aprovado** (inclusive TCLE -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**



**Prof. Dr. Daniel R. Muñoz**  
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
 ISCMSP

## ANEXO 2

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

***POR MEIO DESTES , VENHO CONVIDAR A SENHORA PARA PARTICIPAR DE UM ESTUDO CUJO NOME É “CORRELAÇÃO DO ÍNDICE DE APOPTOSE E DA EXPRESSÃO DE BCL-2 COM A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA PRIMÁRIA EM MULHERES COM CARCINOMA DE MAMA ESTÁDIOS II E III.”***

***PARA SEU TRATAMENTO, SERÁ NECESSÁRIO INICIALMENTE O USO DE UMA MEDICAÇÃO DADA POR SUA VEIA CHAMADA QUIMIOTERAPIA QUE SERVE PARA DIMINUIRMOS O TAMANHO DE SEU TUMOR PARA QUE POSSAMOS OPERÁ-LO.***

***NESTE ESTUDO, GOSTARÍAMOS DE OBTER UM PEDAÇO DE SEU TUMOR PARA CONGELARMOS E PESQUISARMOS QUAL É O TIPO ESPECÍFICO DE SEU TUMOR.***

***PARA QUE ISTO OCORRA, NÓS FAREMOS UMA BIÓPSIA NO CENTRO CIRÚRGICO ONDE A SENHORA ESTARÁ SOB SEDAÇÃO E , NESTE MOMENTO, NÃO SENTIRÁ NENHUMA DOR; TAMBÉM , FAREMOS A APLICAÇÃO DE UMA TINTA EM ALGUNS PONTOS PARA MARCAMOS TAMANHO DO TUMOR PARA ACOMPANHARMOS O SEU COMPORTAMENTO DURANTE A QUIMIOTERAPIA.***

***ALÉM DISSO, PARA VERMOS O TAMANHO DO TUMOR, FAREMOS ALGUNS EXAMES QUE SÃO: MAMOGRAFIA, ULTRASSONOGRRAFIA E RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA ANTES E APÓS O USO DE QUIMIOTERAPIA..***

***DEPOIS DE 3 TOMADAS DA QUIMIOTERAPIA REPETIREMOS OS EXAMES PARA AVALIARMOS A RESPOSTA DE SEU TUMOR À MEDICAÇÃO E APÓS A FINALIZAÇÃO DESTA ETAPA, REALIZAREMOS O TRATAMENTO CIRÚRGICO.***

***NESTE TRABALHO NÃO ESTAMOS UTILIZANDO NENHUMA DROGA EXPERIMENTAL NEM ATRASAREMOS O SEU TRATAMENTO.***

**SUA PARTICIPAÇÃO É TOTALMENTE VOLUNTÁRIA E A QUALQUER MOMENTO A SENHORA PODE DESISTIR DE PARTICIPAR DESTE ESTUDO NÃO HAVENDO PREJUÍZO ALGUM DE SEU TRATAMENTO.**

**OS DADOS COLETADOS ESTARÃO SOB SIGILO ABSOLUTO EM PODER DOS PESQUISADORES E A SENHORA PODE EXAMINÁ-LOS A QUALQUER MOMENTO.**

**O PESQUISADOR RESPONSÁVEL CHAMA-SE LILIANE BARATELLA ULSON, MÉDICA DO SETOR DE MASTOLOGIA DA SANTA CASA DE SÃO PAULO E SEUS TELEFONES DE CONTATO SÃO: 32240122 RAMAL 5554, 5555, 5435, 5622 E 92542817.**

**DECLARO QUE FUI ESCLARECIDA DE TODAS AS MINHAS DÚVIDAS E CONCORDO EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO VOLUNTARIAMENTE.**

---

**NOME:**

---

**RG:**

**SÃO PAULO \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

---

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:  
DRA LILIANE BARATELLA ULSON  
CRM 101487**



## ANEXO 4

Dados gerais das 41 pacientes submetidas à quimioterapia primária segundo antecedentes de lactação, uso de terapia de reposição hormonal (TRH), uso de métodos contraceptivos (MAC), índice de massa corporal (IMC), mensuração clínica inicial do tumor (t inicial), avaliação linfonodal inicial (n inicial), pesquisa de metástases (m inicial), estadiamento clínico (EC), grau nuclear inicial (GNI), grau histológico inicial (GHI), mensuração clínica final do tumor (t final), avaliação linfonodal final (n final) e critérios de Recist.

registro	lactação	trh	mac	IMC	t inicial	n inicial	m inicial	EC	GNI	GHI	t final	n final	recist
938897	sim	não	sim	23,98	7	0	0	2b	2	2	5	0	nr
952542	sim	não	sim	25,77	5	0	0	2a	2	2	3	0	pr
778441	sim	não	sim	24,2	4,5	0	0	2a	2	2	2	0	pr
971248	sim	não	não	23,45	8	1	0	3a	2	2	7	1	nr
940807	sim	não	não	25,58	5	2	0	3a	3	3	3	0	pr
933704	não	sim	não	30,48	6	0	0	2b	2	2	2	0	pr
944267	sim	não	não	19,4	7	2	0	3a	2	2	5,5	2	nr
953478	não	não	sim	23,01	4	1	0	2b	2	2	2	0	pr
962828	sim	não	sim	23,5	5	1	0	2b	3	3	3,5	0	pr
967134	sim	não	sim	25,59	4,5	1	0	2b	2	2	2	0	pr
977002	não	não	não	39,15	6	2	0	3a	2	2	2	1	pr
959994	não	não	sim	23,86	4,5	1	0	2b	2	2	3,5	0	nr
971006	sim	não	não	24,04	4	1	0	2b	3	2	4	1	estavel
938065	sim	não	não	26,7	5,5	2	0	3a	2	2	2	0	pr
932700	sim	não	não	23,16	9	2	0	3a	3	3	4,5	0	pr
964611	sim	não	não	28,27	8	0	0	2b	2	2	6	0	nr
957012	não	não	sim	31,68	4	1	0	2b	2	2	4	1	estavel
972627	sim	não	sim	28,77	4	0	0	2a	2	3	3,5	0	nr
959487	não	não	sim	33,56	8	0	0	2b	3	2	6	0	nr
987590	sim	sim	não	31,44	10	2	0	3a	3	2	8	1	nr
953276	sim	não	não	40,16	5	1	0	2b	2	1	2,5	0	pr
975353	sim	não	não	19,8	8	0	0	2b	2	2	7	0	nr
944773	sim	não	não	25,41	4	0	0	2a	2	3	3	0	nr
964187	sim	não	sim	27,08	3	1	0	2b	3	2	1,5	0	pr
959842	não	não	não	26,26	5,5	0	0	2b	2	2	3,5	0	pr
945389	não	não	não	28,3	10	0	0	2b	3	2	4,5	0	pr
936934	sim	não	sim	23,84	8	1	0	3a	2	2	2	0	pr
973003	sim	não	sim	23,8	3,5	1	0	2b	2	2	2	0	pr
875245	sim	não	não	34,32	4	0	0	2a	2	2	3	0	nr
973184	sim	não	não	24	2,5	1	0	2b	2	3	0	0	cr
743631	não	não	sim	25,86	4	1	0	2b	2	2	2,5	0	pr
855334	sim	não	sim	27,05	5,5	1	0	3a	3	3	3	0	pr
988720	não	não	não	33,33	5	1	0	2b	2	2	6	1	progressão
995878	não	não	não	25,41	4	1	0	2b	2	2	0	0	cr
1000311	não	não	não	25,05	6	0	0	2b	3	2	0	0	cr
1007867	não	não	não	22,22	5	1	0	2b	2	2	3	0	pr
563890	sim	não	não	21,62	6	1	0	3a	2	2	7	1	progressão
978375	não	não	não	25	2,5	0	0	2a	2	2	1,5	0	pr
310708	não	não	sim	24,7	8	2	0	3a	2	2	6	1	nr
1028856	sim	não	sim	37,04	15	2	0	3a	3	2	8,5	2	pr
950377	sim	não	não	28,76	5	2	0	3a	3	3	2	0	pr

## ANEXO 5.

Distribuição das pacientes submetidas à quimioterapia primária segundo raça, mensuração clínica inicial (TI) e final (TF) em centímetros, avaliação clínica axilar inicial (NI) e final (NF), estadiamento clínico (EC), mensuração anátomo-patológica (T.AP), graus nuclear inicial (GNI) e final (GNF), graus histológico inicial (GHI) e final (GHF), resposta clínica (RC).

Registro	Nome	Raça	TI	TF	NI	NF	EC	T.AP	GNI	GHI	GNF	GHF	RC
938897	ACFS	branca	7	5	0	0	IIB	6	2	2	2	2	NR
952542	AMJP	branca	5	3	0	0	IIA	0,5	2	2	2	2	PR
778441	ALO	branca	4,5	2	0	0	IIA	1,5	2	2	3	3	PR
971248	BAC	branca	8	7	1	1	IIIA	3	2	2	2	2	NR
940807	CRN	Negra	5	3	2	0	IIIA	4	3	3	3	3	PR
933704	DAA	branca	6	2	0	0	IIB	5	2	2	2	2	PR
944267	DFM	Negra	7	5,5	2	2	IIIA	8	2	2	3	2	NR
953478	EL	branca	4	2	1	0	IIB	3	2	2	2	2	PR
962828	ERCM	Negra	5	3,5	1	0	IIB	5,5	3	3	3	3	PR
967134	EMFS	branca	4,5	2	1	0	IIB	2	2	2	3	3	PR
977002	ESN	negra	6	2	2	1	IIIA	3,5	2	2	2	2	PR
959994	FGG	branca	4,5	3,5	1	0	IIB	5	2	2	3	3	NR
971006	GMS	branca	4	4	1	1	IIB	3	3	2	3	3	NR
938065	GMS	negra	5,5	2	2	0	IIIA	4	2	2	2	2	PR
932700	IMF	negra	9	4,5	2	0	IIIA	6	3	3	3	3	PR
964611	IAS	negra	8	6	0	0	IIB	9	2	2	3	2	NR
957012	JSS	negra	4	4	1	1	IIB	5	2	2	3	3	NR
972627	JP	branca	4	3,5	0	0	IIA	2,2	2	3	3	3	NR
959487	LSB	branca	8	6	0	0	IIB	6	3	2	3	3	NR
957590	MAEN	branca	10	8	2	1	IIIA	4	3	2	3	3	NR
953276	MCRA	branca	5	2,5	1	0	IIB	2	2	1	2	2	PR
975353	MAA	branca	8	7	0	0	IIB	4,5	2	2	3	3	NR
944773	MFG	branca	4	3	0	0	IIA	2	2	3	2	2	NR
964187	MGS	negra	3	1,5	1	0	IIB	2	3	2	3	3	PR
959842	MIMG	branca	5,5	3,5	0	0	IIB	2,5	2	2	3	2	PR
945889	NMP	branca	10	4,5	0	0	IIB	2	3	2	3	3	PR
936934	NOSS	branca	8	2	1	0	IIIA	4	2	2	2	2	PR
973003	OFS	negra	3,5	2	1	0	IIB	0,8	2	2	2	2	PR
875245	RR	branca	4	3	0	0	IIA	0	2	2	0	0	NR
973184	SM	negra	2,5	0	1	0	IIB	0	2	3	0	0	CR
743631	TR	branca	4	2,5	1	0	IIB	3	2	2	3	2	PR
855334	ZLJ	branca	5,5	3	1	0	IIIA	0	3	3	0	0	PR
988720	MPA	negra	5	6	1	1	IIB	3,5	2	2	2	3	NR
995878	MNA	branca	4	0	1	0	IIB	0	2	2	0	0	CR
1000311	VOM	branca	6	0	0	0	IIB	0	3	2	0	0	CR
1007867	MJSA	branca	5	3	1	0	IIB	2,5	2	2	3	3	PR
563890	FPS	branca	6	7	1	1	IIIA	4,5	2	2	1	2	NR
978375	CMS	branca	2,5	1,5	0	0	IIA	2	2	2	2	2	PR
310708	EBSP	negra	8	6	2	1	IIIA	2	2	2	2	2	NR
1028856	DFS	negra	15	8,5	2	2	IIIA	7,5	3	2	2	3	PR
950377	NCC	branca	4	2	2	0	IIIA	0,5	3	3	3	3	PR
	Média	NA	5,79	3,59	NA	NA	NA	3,43	NA	NA	NA	NA	NA
	Mediana	NA	5	3	NA	NA	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA
	DP	NA	2,43	2,14	NA	NA	NA	2,22	NA	NA	NA	NA	NA

Nota: NR: pacientes não-respondedoras, CR: resposta completa, PR: resposta parcial, NA: não aplicável

## ANEXO 6

### Técnica de Imunoistoquímica

1. Cortes histológicos dos tecidos com 4µm de espessura seguida pela montagem destes cortes em lâminas silanizadas, com retirada da parafina em estufa a 55° C e manutenção dos mesmos em temperatura ambiente.
2. Desparafinização dos cortes com xilol a 60°C, por 30 minutos, seguida por dois banhos em xilol à temperatura ambiente, durante 15 minutos cada.
3. Reidratação dos cortes com etanol absoluto (etanol absoluto I , etanol absoluto II, etanol absoluto III, etanol 95° GL e etanol 80°GL[Gay-Lussac] ), cada banho durando dois minutos, seguida por lavagem em água corrente e finalizada em passagem por água destilada.
4. Adição de 1.600 ml do tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0) aos cortes, com exposição ao vapor no aparelho Pascal (Dako cytomation) durante 30 minutos, com a finalidade de recuperação do epítipo antigênico, com a finalidade de restituir antigenicidade à proteína afetada pela fixação dos tecidos em formalina. Manutenção das lâminas em vapor, por 30 minutos. Após a retirada das lâminas, conservação das mesmas em solução tamponada, à temperatura ambiente, durante 20 minutos.
5. Reação de inibição de peroxidase endógena, através de lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio a 3%, por quatro vezes, por 10 minutos cada e lavagem em água parada, por cinco minutos.
6. Lavagem das lâminas no tampão salino PBS (pH 7,4) , por duas vezes, por 15 minutos.
7. Incubação das lâminas com os anticorpos citados nas diluições específicas, em geladeira por 18 horas.
8. Lavagem das lâminas, por duas vezes, em tampão PBS (pH 7,4), por dez minutos.
9. Incubação dos cortes teciduais com anticorpos secundários (anticorpos de ligação), por 30 minutos em estufa a 37°C. No estudo foi utilizado anticorpo secundário biotilado universal Kit DAKO LSAB Systems, Peroxidase (DakoCorp., Carpinteria, CA, USA).
10. Lavagem das lâminas em tampão PBS, duas vezes, por dez minutos.
11. Incubação das lâminas em anticorpo terciário, no sistema de detecção ultra-estreptavidina EP-USA, Universal-HRP (Novocastra, Norwell, MA USA) em câmara úmida, por 30 minutos, em estufa a 37°C.
12. Lavagem das lâminas em solução tampão, duas vezes, por dez minutos.
13. Colocação das lâminas para reação cromógena em 3,3',5,5' tetraidrocloro de diaminobenzidina (DBA), por três a cinco minutos, ocorrendo a reação que resulta no aparecimento da cópia sépia, característica do anticorpo fixado à proteína.
14. Lavagem em água corrente, duas vezes, por dez minutos.

15. Contra-coloração rotineira com hematoxilina de *Mayer*, por três minutos, em temperatura ambiente, para obtenção de coloração azulada do citoplasma e núcleo.
16. Desidratação dos cortes com série de etanol (50-70-100° GL) e xilol
17. Montagem das lâminas através de sua fixação sobre *Entellan Merck*, afim de que a preparação passe a ter conservação permanente.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abreu e Lima, MC, Gobbi H, Gianotti Filho O, Alvarenga M. Lesões benignas não neoplásicas e neoplasias da mama. In: Bacchi CE, Cardoso de Almeida PC, Franco M. Manual de padronização de laudos histopatológicos. 3ª ed. São Paulo: Reichmann & Autores; 2005. p. 265-6.

Alfaro Moreno E, Garcia Cuellar C, Dueñas González A. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Rev Inst Nal Cancerol (Mex). 2000; 46:275-80.

Agresti A. Categorical data analysis. New York: Wiley Interscience, 1990. 558p.

American College of Radiology (ACR). Breast imaging reporting and data system (BI-RADS™). 4<sup>th</sup> ed. Reston (VA): American College of Radiology; 2003. 170 p.

Archer CD, Parton M, Smith IE, Ellis PA, Slater J, Ashley S, et al. Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer. Br J Cancer. 2003; 89:1035-41.

Arpino G, Ciocca DR, Weiss H, Allred DC, Daguerre P, Vargas-Roig L, et al. Predictive value of apoptosis, proliferation, HER-2, and topoisomerase II alpha for anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2005; 92:69-75.

Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of tumor-necrosis factor superfamily. Nat Rev Cancer. 2002; 2: 420-30.

Boenisch T. Basic immunochemistry. Basic enzymeology. In: Boenisch T, editor. Handbook Immunochemical staining methods. 3<sup>rd</sup> ed. Carpinteria (CA): Dako Corporation; 2001. p. 64-5.

Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnattelli L, Brambilla C, et al. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. N Engl J Med. 1976; 294:405-10.

Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, Ferrari L, Luini A, Greco M, et al. Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. J Natl Cancer Inst. 1990; 82:1539-45.

Bonadonna G, Zambetti M, Bumma C, Donadio M, Bolognesi A, Robustelli Della Cuna G, et al. Multimodal treatment with primary single-agent epirubicin in operable breast cancer: 5-year experience of the Michelangelo Cooperative Group. Ann Oncol. 2002; 13:1049-58.

Bonadonna G, Moliterni A, Zambetti M, Daidone MG, Pilotti S, Gianni L, et al. 30 years follow up of randomised studies of adjuvant CMF in operable breast cancer: cohort study. BMJ. 2005; 330:217.

Brambilla C, De Lena M, Rossi A, Valagussa P, Bonadonna G. Response and survival in advanced breast cancer after two non-cross-resistant combinations. *Br Med J.* 1976; 1:801-4.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. [on line] Estimativa de câncer no Brasil para 2006. Brasília (DF): INCA; 2006. Disponível:  
[http://www.inca.gov.br/estimativas/2004/tbregioes\\_consolidado.asp?ID=1](http://www.inca.gov.br/estimativas/2004/tbregioes_consolidado.asp?ID=1) [10/09/2006]

Buchholz TA, Davis DW, Mc Conkey DJ, Symmans WF, Valero V, Jhingran A, et al. Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy. *Cancer J.* 2003; 9: 33-41.

Burcombe R, Wilson GD, Dowsett M, Khan I, Richman PI, Daley F, et al. Evaluation of Ki67 and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2006; 8:R31.

Bursch W, Taper HS, Lauer B, Schulte-Hermann R. Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1985; 50:153-66.

Cameron DA, Anderson ED, Levack P, Hawkins RA, Anderson TJ, Leonard RC, et al. Primary systemic therapy for operable breast cancer-10-year survival data after chemotherapy and hormone therapy. *Br J Cancer.* 1997; 76:1099-105.

Chang J, Ormerod M, Powels TJ, Allred DC, Ashley SE, Dowsett M. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2000; 89:2145-52.

Cleator SJ, Makris A, Ashley SE, Lal R, Powels TJ. Good clinical response of breast cancers to neoadjuvant chemoendocrine therapy is associated with improved overall survival. *Ann Oncol.* 2005; 16:267-72.

Collecchi P, Baldini E, Giannessi P, Naccarato AG, Passoni A, Gardin G, et al. Primary Chemotherapy in Locally Advanced Breast Cancer (LABC): effects on tumour proliferative activity, Bcl-2 expression and the relationship between tumor regression and biological markers. *Eur J Cancer.* 1998; 34:1701-4.

Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45:923-34.

Conover WJ. Practical nonparametric statistics. 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons; 1998. 592p.

D'Amelio M, Tino E, Cecconi F. The apoptosome: emerging and new potential targets for drug design. *Pharm Res.* 2008; 25:740-51.

Davis DW, Buchholz TA, Hess KR, Sahin, A. A., Valero, V., McConkey, D. J.. Automated quantification of apoptosis after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: early assessment predicts clinical response. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 955-60.

De Lena M, Brambilla C, Morabito A, Bonadonna G. Adriamycin plus vincristine compared to and combined with cyclophosphamide methotrexate, and 5-fluorouracil for advanced breast cancer. *Cancer*. 1975;35:1108-15.

De Lena M, Zucali R, Viganotti G, Valagussa P, Bonadonna G. Combined chemotherapy-radiotherapy approach in locally advanced (T3b-T4) breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1978; 1:53-9.

Derossi DR, Ito K, Couto Filho JO, Bacchi CE. Avaliação da expressão da proteína Bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em punção aspirativa por agulha fina; correlação com grau histológico em espécimes cirúrgicos correspondentes. *J Bras Patol Med Lab*. 2003; 39: 229-35.

Ellis PA, Smith IE, McCarthy K, Detre S, Salter J, Dowsett M. Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet*. 1997; 349: 849.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long- term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19:403-10.

Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004; 6:109-18.

Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:2024-34.

Fisher B, Ravdin RG, Ausman RK, Slack NH, Moore GE, Noer RJ. Surgical adjuvant chemotherapy in cancer of the breast: results of a decade of cooperative investigation. *Ann Surg*. 1968; 168:337-56.

Fisher B, Gunduz N, Saffer EA. Influence of interval between primary tumor removal and chemotherapy on kinetics and growth of metastases. *Cancer Res*. 1983; 43:1488-92.

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

Forrest AP, Levack PA, Chetty U, Hawkins RA, Miller WR, Smyth JF, et al. A human tumor model. *Lancet*. 1986; 840-2.

Frankel SR. The power and perils of prediction. *Cancer J*. 2003; 9:28-30.

Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C, Palma PD, Mauri FA, Boracchi P, et al. Expression of Bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1995; 1:189-98.

Gewies A. Introduction of apoptosis. *ApoReview*. [serial online] 2003:1-26. Available from: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm> [2006 June 7]

Giordano SH. Update on locally advanced breast cancer. *Oncologist*. 2003; 8:521-30.

Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Müllauer L, Taper H, Huber W, Bursh W, et al. Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology*. 1997; 25:906-12.

Gravieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992; 119:493-501.

Gunduz N, Fisher B, Saffer EA. Effect of surgical removal on the growth and kinetics of residual tumor. *Cancer Res*. 1979; 39:3861-5.

Hall PA. Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocr Relat Cancer*. 1999; 6:3-8.

Halsted WS. The results of operation for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June 1889 to January 1894. *Ann Surg*. [serial online] 1894; 20:497-555. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1493925> [2007 Dec 12]

Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*. 1997; 89:1845-53.

Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:1442-55.

Hengartner MO. Programmed cell death in the nematode *C.elegans*. *Recent Prog Horm Res*. 1999; 54:213-22.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407:770-6.

Hengartner MO. Apoptosis: DNA destroyers. *Nature*. 2001; 412:27-9.

Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*. 1992; 11: 121-39.

Jacquillat C, Weil M, Baillet F, Borel C, Auclerc G, De Maublanc M.A, et al. Results of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the breast-conserving treatment of 250 patients with all stages of infiltrative breast cancer patients. *Cancer*. 1990; 66: 119-29.

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002; 108:153-64.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-57.

Liu ET. Breast cancer research: where we are and where we should go. *Breast Cancer Res*. 2000; 2:73-6.

Makin G, Dive C. Modulating sensitivity to drug-induced apoptosis: the future for chemotherapy? *Breast Cancer Res*. 2001; 3:150-3.

Mano MS, Awada A. Primary chemotherapy for breast cancer: the evidence and the future. *Ann Oncol*. 2004; 15:1161-71.

Melo ES. Macronódulos em fígados cirróticos. Tese [Doutorado] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994; 9:1799-805.

Morettin PA, Bussab WO, Estatística básica. 5ª ed. São Paulo: Saraiva; 2006.

Navarrete MALH. Avaliação das atividades proliferativa, apoptótica e da taxa de renovação celular do epitélio mamário humano durante as fases folicular e lútea do ciclo menstrual. Tese [Doutorado] São Paulo : Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 2003.

Neter J, Kutner M H, Nachtsheim C J, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4<sup>th</sup> ed. Boston: Irwin; 1996.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55:74-108.

Parkin DM, Fernández LM. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J*. 2006; (Suppl.1):S70-80.

Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ*. 2001;322: 1528-32.

Parton M, Krajewski S, Smith I, Krajewska M, Archer C, Naito M, et al. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:2100-8.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesif SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1644:83-94.

Popovska S, Dikov D, Deliisky T, Gortchev G. Influence of primary chemotherapy on apoptosis of breast cancer. *Ann Oncol*. 2000; 11(Suppl.4):35.

Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol*. 2000; 157:1415-30.

Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Leieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg*. 1995; 180:297-306.

Scholl SM, Fourquet A, Asselain B, Pierga JY, Vilcoq JR, Durand JC, et al. Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with tumors considered too large for breast conserving surgery: preliminary results of a randomized trial: S6. *J Eur J Cancer* 1994; 30A:645-52.

Shao ZM, Li J, Wu J, Han QX, Shen ZZ, Fontana JA, et al. Neo-adjuvant chemotherapy for operable breast cancer induces apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 1999; 53:263-9.

- Sjöström J, Blomqvist C, von Boguslawski K, Bengtsson N, Mjaaland I, Malmström P et al. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:811-6.
- Swain SM, Sorace RA, Bagley CS, Danforth DN Jr, Bader J, Wesley MN, et al. Neoadjuvant chemotherapy in the combined approach of locally advanced nonmetastatic breast cancer. *Cancer Res.* 1987; 47:3889-94.
- Symmans WF, Volm MD, Shapiro RL, Perkins AB, Kim AY, Demaria S, et al. Paclitaxel-induced apoptosis and mitotic arrest assessed by serial fine-needle aspiration: implications for early prediction of breast cancer response to neoadjuvant treatment. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:4610-7.
- Therasse T, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L et al. New guidelines evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:205-16.
- Van de Schepop H, de Jong JS, van Diest PJ, Baak J. Counting of apoptotic cells: a methodological study in invasive cancer. *J Clin Pathol.* 1996; 49: M214-M217.
- Veronesi U, Bonadonna G, Zurrada S, Galimberti V, Greco M, Brambilla C, et al. Conservation surgery after primary chemotherapy in large carcinomas of the breast. *Ann Surg.* 1995; 222:612-8.
- Von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G, Loibl S, Blohmer JU, Eidtmann H, 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.* 2008; 10:R30.
- Willingham MC. Cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 1999; 47:1101-10.
- Wolff AC, Davidson NE. Preoperative therapy in breast cancer: lessons from the treatment of locally advanced disease. *Oncologist.* 2002; 7:239-45.
- Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001; (30):96-102.
- Wu J, Shao ZM, Shen ZZ, Lu JS, Han QX, Fontana JA, et al. Significance of apoptosis and apoptotic-related proteins, bcl-2, and bax in primary breast cancer. *Breast J.* 2000; 6:44-52.
- Wyllie AH. Death in normal and neoplastic cells. *J. Clin. Pathol Suppl (R Coll Pathol).* 1974; 7:35-42.

## **9. FONTES CONSULTADAS**

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação. Normatização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação; 2004, 26p.

Houaiss A. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. 1º. Ed. Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2001.

**RESUMO**

Ulson LB. Avaliação da relação do índice de apoptose e da imunexpressão da BCL-2 com a resposta à quimioterapia primária em mulheres com carcinoma de mama estádios II e III. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Dissertação de Mestrado. 2009.

Apoptose, um tipo de morte celular programada foi descrito em 1972 por Kerr, e seus sofisticados mecanismos tem sido muito estudados nas últimas décadas devido a sua associação com doenças, principalmente no que tange o desenvolvimento e o tratamento do câncer. Sabe-se que a apoptose é o principal mecanismo pelo qual os agentes quimioterápicos atuam nas células tumorais. Assim, muitos autores têm tentado associar resposta quimioterápica com apoptose, observando que a indução da mesma pela quimioterapia está associada a uma melhor resposta clínica na tentativa de encontrar outros fatores preditivos de resposta à quimioterapia. Avaliamos o índice de apoptose (IA) e a expressão de Bcl-2 pré e pós quimioterapia primária e sua correlação com a resposta clínica utilizando os critérios de RECIST, em 41 mulheres brasileiras portadoras de carcinoma de mama estádios II e III. Encontramos uma tendência do IA médio inicial (pré-quimioterapia) ser menor que IA médio final (pós quimioterapia) ( $p=0,061$ ). Não encontramos relação estatisticamente significativa entre a diferença entre IA inicial e IA final com a resposta clínica ( $p=0,181$ ) assim como não observamos associação entre a resposta clínica e IA inicial ( $p=0,873$ ). Quando avaliamos a expressão de Bcl-2, as porcentagens das categorias de resposta do Bcl-2 pré quimioterapia são estatisticamente diferentes das porcentagens das categorias de resposta do Bcl-2 pós quimioterapia ( $p<0,001$ ) com uma queda de 93,3% para 70% de Bcl-2 positivo. Quando correlacionamos as diferenças entre Bcl-2 inicial e final com a resposta clínica não houve associação significativa ( $p=0,417$ ), bem como não encontramos associação entre a resposta clínica e a expressão do Bcl-2 inicial ( $p=0,466$ ); porém observamos uma tendência na relação da resposta clínica completa com a menor frequência da expressão de Bcl-2 inicial positivo (3+). O momento de avaliação da apoptose na nossa amostra bem como o número de casos podem explicar a não correlação estatisticamente significativa entre IA e Bcl-2 e resposta clínica à quimioterapia primária.

**ABSTRACT**

Apoptosis, a form of programmed cell death, described in 1972 by Kerr, and its intrinsic mechanisms has been the focus of many studies in the last decades due to its association with diseases, mostly concerning cancer development and treatment. It is known that apoptosis is the main mechanism in which chemotherapy agents act over tumor cells. Being that, many authors have been trying to relate the chemotherapy response to apoptosis, realizing that its induction by the chemotherapy is associated to a better clinical response attempting to find more accurate chemotherapy response predictive factors. We have assessed the apoptotic index (AI) and the Bcl-2 expression pre and post primary chemotherapy and its correlation to the clinical response using the RECIST criteria, in 41 Brazilian women with breast carcinoma stages II and III. A tendency to the initial mean AI (pre chemotherapy) be lower than the final mean AI (post chemotherapy) ( $p=0,061$ ) was found. There was no statistical significance on the difference between the initial and final AIs with the clinical response ( $p=0,181$ ), neither we have found association between the clinical response and the initial AI ( $p=0,873$ ). When the Bcl-2 expression was assessed, the percentages of the pre chemotherapy Bcl-2 response categories are statistically different from the post chemotherapy response categories ( $p<0,001$ ) with a 93,3% to 70% drop of positive Bcl-2. When we related the differences of the initial and final Bcl-2 with the clinical response, there was no significant association ( $p=0,417$ ), neither were found relation among the clinical response and the Bcl-2 initial expression ( $p=0,466$ ), however there was a tendency on the relation between the complete clinical response and a lesser frequency on the initial positive Bcl-2 expression (3+). The moment of the apoptosis evaluation on our sample so as the number of cases, could explain the non-statistically significant correlation between the AI and Bcl-2 with the clinical response to primary chemotherapy.

# 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](#)