

**ALEXANDRE SANTOS MELITTO**

**ESTUDO DO BIOMARCADOR P16 NO CARCINOMA DE MAMA DE  
MULHERES SUBMETIDAS À ENDOCRINOTERAPIA PRIMÁRIA  
DE CURTA DURAÇÃO COM TAMOXIFENO E ANASTROZOL**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ALEXANDRE SANTOS MELITTO**

**ESTUDO DO BIOMARCADOR P16 NO CARCINOMA DE MAMA DE  
MULHERES SUBMETIDAS À ENDOCRINOTERAPIA PRIMÁRIA  
DE CURTA DURAÇÃO COM TAMOXIFENO E ANASTROZOL**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Ângela Flávia Logullo Waitzberg

**São Paulo**

**2009**

Melitto, Alexandre Santos

**Estudo do biomarcador p16 no carcinoma de mama de mulheres submetidas à endocrinoterapia primária de curta duração com tamoxifeno e anastrozol.** / Alexandre Santos Melitto. -- São Paulo, 2009. xiii, 78f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ginecologia.

**Título em inglês:** Expression of p16 in short term exposition with tamoxifen and anastrozole in postmenopausal women with breast invasive cancer.

1. Biomarcador p16. 2. Tamoxifeno. 3. Anastrozol.  
4. Hormonioterapia. 5. Câncer de mama.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**Departamento de Ginecologia**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

**Coordenador do Curso de pós-graduação:**

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**Departamento de Ginecologia**

**BANCA EXAMINADORA**

**Presidente da banca:** Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim

Prof. Dr. Jorge Yoshinori Shida

Prof. Dr. Vicente Tarricone Jr.

Prof. Dr. Gilberto Uemura

**Suplente:**

Prof. Dr. Marcelo Madeira

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## **Dedicatória**

*A Juliana, minha esposa,  
pelo carinho, amor e paciência,  
com os quais sempre estive ao meu lado.*

*Aos meus pais, Cláudio e Marly,  
pelo amor, carinho e educação que sempre me proporcionaram.*

*Ao meu irmão, Fernando,  
pelo companheirismo e amizade de toda a vida.*

*A Deus,  
por tudo que ele representa em minha vida.*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim, orientador e amigo, exemplo de competência, dedicação e honestidade, que sempre me mostrou o valor do trabalho incentivando e colaborando decididamente para o sucesso deste trabalho.

À Profa. Dra. Ângela Flávia Logullo Waitzberg, professora adjunta do Departamento de Patologia da Unifesp-EPM, co-orientadora, que, pelo exemplo de dedicação conduziu-me neste estudo com objetividade, incansável disposição e ensinamentos valiosos e fundamentais para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmundo C. Baracat, professor titular do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (Unifesp-EPM), pela oportunidade, apoio e importantes sugestões para a composição deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manoel J. B. C. Girão, professor titular do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (Unifesp-EPM), pelos ensinamentos e apoio para a composição deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Kemp (*in memoriam*), amigo e professor que, através de sua simplicidade e competência, transmitiu seus conhecimentos mantendo-os sempre vivos em minha memória e que, certamente, continuará iluminando minha carreira.

Ao Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário, chefe do Departamento de Ginecologia da Unifesp-EPM, pelo incentivo e apoio nestes anos de graduação, residência e durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Simone Elias Martinelli, pela atenção, disponibilidade, estímulo e amizade dispensados desde o início da residência, e pelo exemplo de dedicação e competência.

Ao Prof. Dr. Gil Facina, e Prof. Dr. Jorge Y. Shida, pelos ensinamentos transmitidos, incentivo e amizade.

Ao Dr. Marcelo Madeira, pela amizade, estímulo e apoio na elaboração deste trabalho.



Aos amigos Dr. André Mattar e Dr. Yong K. Joo, companheiros de trabalho no Setor de Mastologia da Universidade Federal de São Paulo e no Hospital Pérola Byington, pela ajuda e apoio durante todo este estudo e por cederem parte do material coletado para sua tese de doutorado para elaboração deste estudo, além de todo apoio e participação em todas as fases deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Ginecologia da Unifesp-EPM, que contribuíram para formação dos meus conhecimentos em medicina.

A todos os médicos do Setor de Mastologia do Hospital São Paulo e do CRSM – Hospital Pérola Byington, por terem contribuído com todo apoio, atenção e incentivo para a elaboração deste trabalho.

Aos pós-graduandos do Departamento de Ginecologia e Mastologia da Unifesp-EPM, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares, por disponibilizar o laboratório de anatomia patológica do Hospital AC CAMARGO, em que foram realizados os estudos imunoistoquímicos, histológicos e micro-arranjo tecidual (TMA) utilizados.

Ao Sr. José Ivanildo Neves, biólogo do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer A.C. CAMARGO, pelo preparo das lâminas e pelo apoio logístico na construção dos TMA, e às Dra. Suely Nonogaki e Dra. Cynthia Osório, pela supervisão técnica.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia da Unifesp-EPM, em especial do Setor de Mastologia e funcionários do Hospital Pérola Byington, pela colaboração e compreensão durante a realização deste trabalho.

Aos residentes do Departamento de Ginecologia da Unifesp-EPM e da Disciplina de Mastologia da UNIFESP-EPM e do Hospital Pérola Byington, pela compreensão de minha ausência enquanto realizei este trabalho.

A Sra. Karim Martin dos Santos, secretária de Pós-graduação do Departamento de Ginecologia, por toda ajuda e auxílio prestados ao longo desses anos e pela paciência nos momentos necessários.

E, finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram na construção deste estudo.

*Ainda que eu falasse a língua dos homens, ainda que eu falasse a  
língua dos anjos, sem amor eu nada seria.*

*Coríntios 13 / Luis Vaz de Camões*

## Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Listas.....	x
Resumo.....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos.....	7
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
2.1 O ciclo celular.....	9
2.2 Endócrino-dependência e tamoxifeno.....	11
2.3 Inibidores da aromatase.....	17
2.4 A proteína do gene p16.....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Pacientes.....	31
3.2 Métodos.....	33
3.2.1 Método histopatológico.....	33
3.2.2 Método Imunoistoquímico.....	33
3.2.3 Método semiquantitativo para avaliação da imunorreação do p16.....	39
3.2.4 Método estatístico.....	40
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>53</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
Abstract	
Bibliografia Consultada	

## Lista de Figuras

<b>Figura 1 –</b>	Representação esquemática do ciclo celular. Reguladores positivos e negativos.....	11
<b>Figura 2 –</b>	Estrutura dos receptores estrogênicos alfa e beta, com respectivos domínios funcionais dos receptores de estrogênio $\alpha$ e $\beta$ .....	12
<b>Figura 3 –</b>	Vias de sinalização do receptor de estrogênio.....	13
<b>Figura 4 –</b>	Estrutura molecular do tamoxifeno.....	14
<b>Figura 5 –</b>	Estudos randomizados comparativos entre tamoxifeno e inibidores da aromatase.....	19
<b>Figura 6 –</b>	Resumo dos cinco maiores estudos comparativos entre tamoxifeno e inibidores da aromatase no tratamento adjuvante.....	22
<b>Figura 7 –</b>	Regulação da transição da fase G1 para fase S e ação da proteína p16.....	27
<b>Figura 8 –</b>	Desenho esquemático do estudo.....	32
<b>Figura 9 –</b>	Blocos receptores construídos com cilindros de calibres diferentes....	34
<b>Figura 10 –</b>	Detalhe da lâmina corada por hematoxilina e eosina (HE) obtido a partir do bloco receptor.....	34
<b>Figura 11 –</b>	Controle negativo para as imunorreações – p16 (20x).....	37
<b>Figura 12 –</b>	Controle negativo para as imunorreações – p16 (40x).....	37
<b>Figura 13 –</b>	Imunorreação positiva para p16 (40x).....	38
<b>Figura 14 –</b>	Imunorreação para receptores de estrógeno em TMA (20x).....	38
<b>Figura 15 –</b>	Método de Allred para avaliação imunoistoquímica de cortes histológicos.....	39
<b>Figura 16 –</b>	Expressão gráfica da comparação entre os grupos (anastrozol, tamoxifeno e placebo) e tempos (pré e pós tratamento).....	45

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1 –</b>	Positividade do p16 nos três grupos pré e pós tratamento. (anastrozol, placebo e tamoxifeno).....	43
<b>Tabela 2 –</b>	Expressão de p16 nos grupos (anastrozol, tamoxifeno e placebo).....	44
<b>Tabela 3 –</b>	Comparação da variação de expressão do p16 entre grupos e tempos, agrupando-se os grupos anastrozol e tamoxifeno frente ao grupo placebo.....	44
<b>Tabela 4 –</b>	Análise da variação da expressão do p16 e comparação entre os grupos anastrozol e tamoxifeno em relação ao grupo placebo.....	45

## Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Análise de Variância
CAK	Cdk Ativador de Quinase
CDK	Ciclina Dependente de Quinase
EGF	Fator de Crescimento Epidermóide
EGF-R	Receptor do Fator de Crescimento Epidermóide
GEE	General Estimation Equations
HER-2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
IA	Inibidor da aromatase
ILD	Intervalo livre de doença
INCA	Instituto Nacional do Câncer
PKC $\alpha$	Proteína Quinase C $\alpha$
pRb	Proteína Do Retinoblastoma
RE	Receptor De Estrogênio
RP	Receptor Progesterona
SERMS	Moduladores Seletivos Do Receptor De Estrogênio
SG	Sobrevida Global
TMA	Microarranjo Tecidual
TNF- $\alpha$	Fator $\alpha$ de Necrose Tumoral
WHO	World Health Organization

## Resumo

**Introdução:** A endocrinoterapia é uma das principais responsáveis pela redução de mortalidade do câncer de mama. Biomarcadores preditivos de resposta celular precoce vêm sendo estudados com intuito de prever precocemente a hormônio-resistência. Freqüentes deleções e mutações têm sido descritas no gene p16 em diversos tipos de tumores, mas pouco se sabe sobre seu papel no câncer de mama e seu comportamento após endocrinoterapia neoadjuvante com tamoxifeno e anastrozol. **Objetivos:** Estudar a expressão do p16 e dos receptores de estrogênio e progesterona (RE e RP) em pacientes na pós-menopausa com carcinoma de mama RE e/ ou RP (+) após curto período (26 dias) de tratamento com tamoxifeno, anastrozol e placebo. **Métodos:** Estudo prospectivo randomizado duplo-cego realizado com 58 pacientes dos Hospitais Pérola Byington e São Paulo da UNIFESP (São Paulo - Brasil) com carcinoma ductal infiltrativo de mama, nos estádios II e III, que no período pré-operatório foram subdivididas em três grupos: P (placebo, N=25), T (tamoxifeno 20mg/dia, N=15) e A (anastrozol 1mg/dia, N=18). A biópsia foi realizada no momento do diagnóstico e após a cirurgia definitiva (26º dia) e os tumores foram isolados por micro-arranjos teciduais. O estudo imunoistoquímico foi realizado com anticorpos para p16 (Dako- OA315), RE (Neomarkers-M7047), RP (Dako-M3569). Realizou-se o estudo semiquantitativo utilizando-se os critérios de Allred e o estudo estatístico pelo teste paramétrico de Anova. **Resultados:** A positividade do p16 variou de 22 para 17%, respectivamente pré e pós tratamento com anastrozol; de 8 para 4% no grupo placebo e não houve variação, com 7% de positividade, no grupo que recebeu tamoxifeno. A comparação entre grupos e tempos não apresentou relação significativa para o p16 ( $p=0,17$ ). Não foi encontrada correlação entre a positividade do p16 e o status hormonal (RE e RP). **Conclusão:** Não houve diferença estatística significativa entre os três grupos estudados. Futuros estudos com métodos moleculares poderão esclarecer dúvidas suscitadas a respeito do tempo de exposição à droga necessária para interferir nos biomarcadores e proteínas.

## **1. INTRODUÇÃO**

---



O carcinoma de mama representa um dos principais problemas de saúde do mundo ocidental. As estatísticas indicam o aumento de sua frequência tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 1960 e 1970, registrou-se aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes (WHO, 2008).

O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Dados do Ministério da Saúde vêm observando não somente aumento na incidência como também na mortalidade do câncer de mama, sendo, portanto indiscutível a importância do estudo desta patologia (Instituto Nacional do Câncer - INCA 2008).

O câncer de mama é considerado doença de bom prognóstico desde que diagnosticado e tratado precocemente. Embora existam várias modalidades de tratamento específico, abrangendo técnicas cirúrgicas, drogas quimioterápicas, radioterapia, terapia endócrina e genética, que objetivam a cura quando possível e o aumento da sobrevida, muitas mulheres sucumbem à doença em decorrência principalmente do diagnóstico tardio e falta de preditividade para escolha da terapia mais adequada.

A presença de expressão de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) nas células neoplásicas tem valor preditivo de resposta na endocrinoterapia e prognóstico do câncer de mama. Considera-se que a positividade dos receptores de estrogênio e progesterona (RE/RP) em análise imunoistoquímica seja fundamental para predição de resposta ao tratamento endócrino, embora existam subgrupos de pacientes com tumores RE/RP positivos que não respondam ao tratamento. A identificação de biomarcadores, de resposta ou resistência precoce, à endocrinoterapia pode auxiliar a decisão terapêutica na escolha do antiestrogênio, uma vez que os fatores preditivos e prognósticos atualmente disponíveis não têm sido suficientes para adequada seleção do tratamento (Lee et al., 2007; Rudas et al., 2008).

A superexpressão do RE é considerada fator preditivo de resposta à terapia endócrina, enquanto que quando ocorre o mesmo fenômeno com o RP

---

relaciona-se classicamente com o prognóstico. Tem crescido o interesse no RP na predição da resposta à endocrinoterapia. Demonstrou-se que a forte expressão do RP associa-se à melhor sobrevida em pacientes tratadas com tamoxifeno, e que sua perda, correlaciona-se à resistência a este, e melhor resposta aos inibidores da aromatase (Arpino et al., 2005; Dowsett et al., 2005; Stendahl et al., 2006; Hayes, 2008).

O tamoxifeno é um modulador seletivo dos receptores de estrogênio (SERM) mais utilizado no tratamento do câncer de mama receptor estrogênico positivo (RE+). Reduz significativamente as taxas de recidiva local e sistêmica acarretando uma redução na mortalidade de 30% pela neoplasia. A droga propicia uma redução na incidência de câncer na mama contralateral de até 50% (Fisher 2000; Fisher et al., 2000).

O tamoxifeno atua no controle do ciclo celular com efeito antiproliferativo, diminuindo o contingente de células que entrariam em divisão celular, possivelmente pela indução à apoptose. Apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico, portanto natural, de eliminação de células senescentes ou danificadas. Todo mecanismo é iniciado ou interrompido sob ação de proteínas específicas para a homeostase dos órgãos e tecidos, sendo regulado positivamente ou negativamente através dos produtos de genes específicos (Kumar et al., 2000; Kim et al., 2005).

Entretanto, a importância destes dois mecanismos na eficácia clínica deste medicamento permanece apenas parcialmente conhecida (Cameron et al., 2001). Assim como a extensão das conseqüências do bloqueio da ação estrogênica em células tumorais não foi ainda totalmente elucidado.

Apesar de o tamoxifeno ser a droga mais comumente indicada na endocrinoterapia do câncer de mama, diversos trabalhos vem demonstrando que os inibidores de aromatase (IA), apresentam resultados muito favoráveis em mulheres na pós-menopausa e alguns autores já sugerem seu uso como primeira linha no tratamento hormonal adjuvante do carcinoma (Piccart et al., 2002).

Na menopausa as adrenais sintetizam os androgênios (androstenediona e testosterona) e a enzima aromatase é capaz de converter a testosterona em

---

estradiol e a androstenediona em estrona, que são potentes hormônios femininos e interagem com os receptores esteróidicos presentes no carcinoma de mama, estimulando seu próprio crescimento. Os inibidores de aromatase (IA) são compostos que inibem a enzima aromatase e, por conseguinte, bloqueiam a conversão tecidual destes hormônios impedindo o estímulo estrogênico que poderia levar à maior crescimento do câncer. Os mais recentes são chamados de terceira geração, e podemos destacar o anastrozol e letrozol, que causam inibição de 97 a 99% da aromatização (Geisler et al., 2002).

A exposição ao estrogênio é um fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer de mama. Os mecanismos carcinogênicos envolvidos são complexos e interligados, tais como o estímulo à proliferação do tecido mamário e a produção de metabólitos mutagênicos, que interferem diretamente no ciclo celular. Quando associados esses fatores podem levar à iniciação, à promoção e progressão do tumor de mama (Yager et al., 2006).

A resposta clínica e prognóstica dos tumores mamários vem sendo estudada com inúmeros biomarcadores de expressão gênica demonstrados pelas técnicas de “microarray” do DNA. A partir de semelhanças e expressão de determinados genes, associando-os a achados patológicos específicos, vários trabalhos têm agrupado os tumores mamários conforme sua “assinatura genética”, visando a individualizar as terapias existentes conforme o subtipo tumoral e também o desenvolvimento de novas terapias mais específicas.

Perou et al. (2000) dividiram os tecidos mamários em quatro grupos de características moleculares e conseqüentemente prognósticas diversas. São elas: basal, luminal, erb-b2 e o de tecido normal. Demonstrou-se que os tipos basal e erb-b2 não expressam receptores hormonais, ao contrário do tipo luminal, configurando assim a necessidade da especificidade terapêutica.

O carcinoma mamário RE+ e RP+ é um subgrupo responsivo à terapia endócrina (Fisher et al., 1989; Fisher, 2000; Fisher et al., 2000; Yoshida et al., 2004). Entretanto, nem todas as pacientes com tumores receptores positivos respondem ao tamoxifeno, e estas, poderiam ser responsivas aos inibidores de aromatase se fosse possível prever resistência precoce a determinado fármaco.

---

Diversos estudos vêm sendo conduzidos na comparação entre o tamoxifeno e os inibidores da aromatase, no tratamento adjuvante do câncer de mama, buscando estabelecer qual destes promovem a melhor sobrevida livre de doença e geral. Estudos como o ATAC, MA-17, BIG 1-98, IES, ARNO e ITA vêm demonstrando a superioridade dos inibidores da aromatase em relação ao tamoxifeno em pacientes menopausadas com câncer de mama (Baum et al., 2002; Goss et al., 2003; Howell et al., 2005; Jonat et al., 2006; Coates et al., 2007; Coombes et al., 2007).

Em contrapartida ainda há controvérsias em relação ao tratamento hormonal neoadjuvante. Estudos como o IMPACT e o PROACT não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes entre o tamoxifeno e o anastrozol nesta modalidade terapêutica, apesar das expectativas geradas pelos estudos de adjuvância (Smith et al., 2005; Cataliotti et al., 2006).

Existem poucos estudos em relação ao comportamento biológico do câncer de mama e seus biomarcadores quando submetidos à endocrinoterapia neoadjuvante. Dixon, em estudo com 24 pacientes comparou a expressão de Ki67 e receptores de progesterona, antes e após tratamento endócrino neoadjuvante com anastrozol, onde não foi encontradas mudanças entre o grupo pré endocrinoterapia e pós. Estes são os primeiros dados a demonstrar a efetividade clínica e biológica do anastrozol em câncer de mama erbB2-positivo e receptores de estrogênio positivo (Dixon, 2002).

O estudo IMPACT encontrou supressão altamente significativa do Ki67 (marcador de proliferação) no grupo tratado com anastrozol em relação ao grupo que recebeu tamoxifeno ou a combinação dos dois. Observou-se também relação positiva entre o nível de receptores de estrogênio e a supressão de Ki67 em todas as pacientes. Estes dados mostram um paralelo, se levarmos em consideração somente os biomarcadores, com os resultados do estudo ATAC. Não foi analisada a expressão do p16 neste estudo (Dowsett et al., 2005).

O gene p16/INK4a é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 9p21 e seu produto é a proteína de mesmo nome, cuja função é inibir a proliferação celular, mantendo a célula em G1, inibindo que esta progrida

---

para a fase S da mitose (Canepa et al., 2007). Sua atividade está inibida em diversos tumores, incluindo o câncer de mama (McDermott et al., 2006).

Diversos trabalhos vêm procurando demonstrar a relação entre o p16 e o câncer de mama em seus diversos estágios, com o objetivo de estabelecer associações causais, preditivas e prognósticas (Wong et al., 2001; Liu et al., 2008).

Ichikawa et al. (2008) estudaram células de carcinoma de mama após exposição ao tamoxifeno confirmando aumento na população de células na fase G1 e G2 e decréscimo no número de células na fase S. Observaram também aumento da expressão do p53 e p21, enquanto a expressão do p16 não apresentou variação, alterações estas, dose e tempo dependentes.

Não há dados na literatura em relação à expressão de p16 e terapia endócrina neoadjuvante com anastrozol.

O objetivo deste estudo é verificar a expressão de p16 em pacientes acometidas por carcinoma de mama antes e após 26 dias de tratamento com tamoxifeno ou anastrozol buscando compreender melhor os mecanismos de ação e resistência destas drogas e assim determinar possíveis fatores prognósticos ou preditivos, bem como identificar possíveis correlações com a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona.

---

## **1.1 Objetivos**

1. Avaliar a incidência e variações da expressão do gene p16 em carcinomas mamários invasivos por meio de ensaio imunistoquímico em amostras pré e pós-tratamento por 26 dias com tamoxifeno, anastrozol e placebo.
  2. Comparar estes resultados entre si e estabelecer se há efeito do tamoxifeno e do anastrozol na expressão desta proteína.
  3. Avaliar a existência de correlação entre o p16 e os receptores de estrógeno e progesterona em amostras pré e pós tratamento.
-

## ***2. REVISÃO DA LITERATURA***

---

---

## 2.1 O ciclo celular

As células pertencentes a um organismo têm crescimento, divisões e até mesmo morte (apoptose) altamente reguladas. Exceção notável é representada pelas células cancerosas que surgem como células que perderam o controle usual de multiplicação, reproduzindo-se mais aceleradamente que as normais.

Howard e Pelc (1951), estudando a incorporação do fósforo radioativo ( $P^{32}$ ) em núcleos, introduziram o conceito de ciclo celular, modificado posteriormente. O ciclo celular é composto pelas seguintes fases: (Lajtha 1963)

**Fase G0:** fase das células em repouso, fora de proliferação. As células nesta fase podem ingressar no ciclo proliferativo ou destinar-se ao evento da morte celular (apoptose);

**Fase G1** (first gap): fase de primeiro repouso, que precede a fase de síntese do DNA;

**Fase S:** síntese do DNA. Ocorre a duplicação do genoma;

**Fase G2:** segunda fase de repouso que precede a mitose;

**Fase M:** mitose.

A proliferação celular é processo complexo que envolve a divisão nuclear (mitose) seguida de divisão citoplasmática (citocinese). Com o final da mitose, a célula entra em G0 e pode ficar quiescente por longo período. É metabolicamente ativa, embora interrompa o crescimento e reduza a síntese protéica. Quando receber estímulo apropriado iniciará nova fase de síntese e novo processo de replicação. A interfase, período entre as mitoses, corresponde a 95% do ciclo celular (Cooper, 1997).

As fases G1, S e G2 constituem o período mais longo do ciclo celular, chamada interfase. A mitose é, em geral, rápida. Terminadas as etapas da mitose, a célula pode entrar na fase “de repouso” denominada G0, ou seja, fora do ciclo proliferativo, ou entrar novamente em novo ciclo, na fase G1 (Figura 1)

Nos tecidos normais, cada tipo de célula apresenta um tipo particular de ciclo. Existem células estáveis, como os neurônios, células de renovação

---



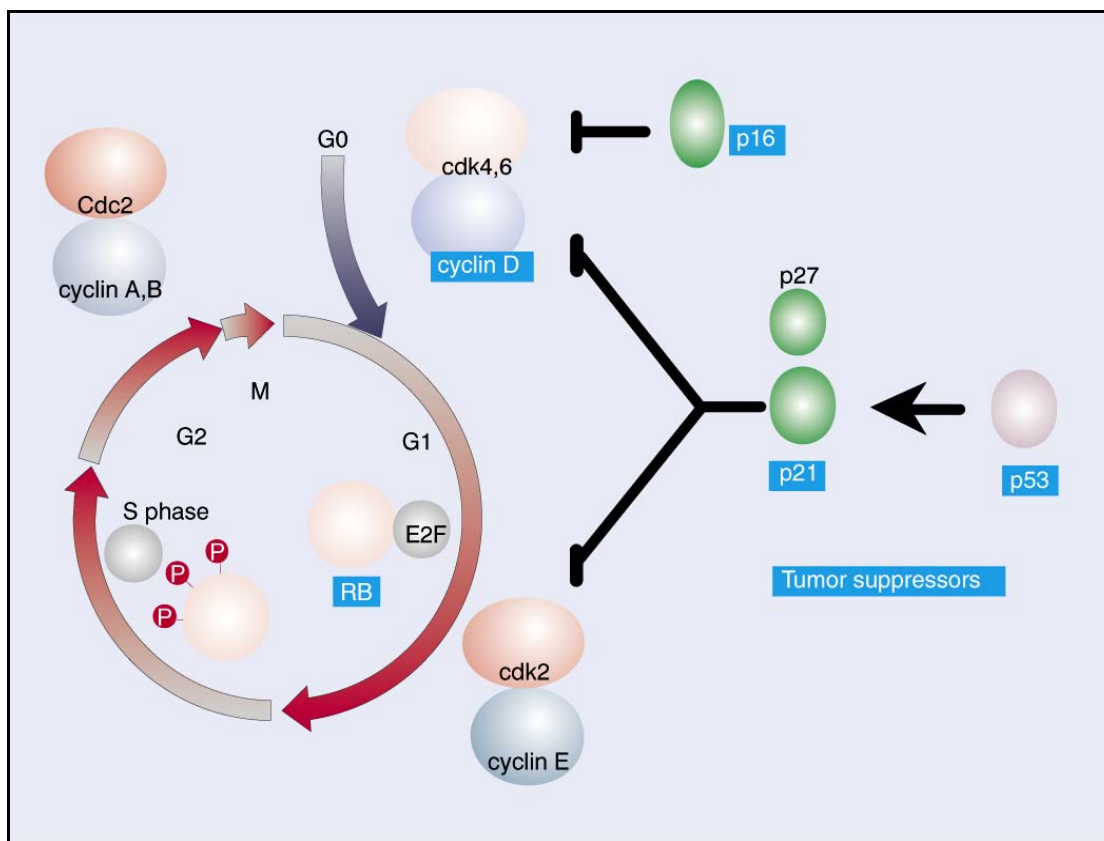
condicionada, como as fibras musculares estriadas, e células de renovação contínua, como as células epiteliais da epiderme (Leblond, 1964).

Em relação às neoplasias, a atividade proliferativa das células constitui aspecto importante para estudo, em função da relação sugerida entre o grau de proliferação e a agressividade tumoral. Alguns parâmetros histopatológicos classicamente usados como critérios de malignidade são: as atipias nucleares, o tamanho dos nucléolos, o número de mitoses e a presença de necrose, já que são expressões da proliferação celular. Em geral, a taxa de crescimento dos tumores relaciona-se com seu nível de diferenciação, de modo que tumores malignos e indiferenciados costumam crescer mais rapidamente do que os benignos.

Através de técnicas especiais como a imunistoquímica, os índices de proliferação celular têm sido pesquisados em diversos tipos de neoplasias. Além disso, células cancerosas mostram, entre outras alterações moleculares, anulação dos pontos de checagem do ciclo celular, seja pela superexpressão dos reguladores positivos (por exemplo, ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, ou Cdk), seja pela perda dos reguladores negativos (por exemplo, inibidoras de Cdk). Assim, a célula não é capaz de responder a sinais importantes, internos ou externos, que verifiquem sua proliferação, o que pode resultar na instabilidade do genoma e conseqüente proliferação exacerbada e descontrolada, como ocorre nas neoplasias (Dirks et al., 1997).

A avaliação da atividade proliferativa de uma neoplasia é de auxílio na caracterização de seu fenótipo, na determinação dos seus graus de malignidade e na estimativa do seu crescimento, sendo uma informação a respeito do seu comportamento biológico. Estudos sobre cinética celular tumoral mostram a importância da identificação do índice proliferativo tais como fatores prognósticos de diversas neoplasias. Diferentes métodos têm sido usados para estimá-lo: contagem de figuras de mitoses, citometria de fluxo, mensuração da incorporação da timidina tritiada e da bromodeoxiuridina, pesquisa dos antígenos PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e Ki-67 e marcação pela prata das regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR) (Janczukowicz, 2003).

---



**Figura 1** – Representação esquemática do ciclo celular. Reguladores positivos e negativos.

## 2.2 Endócrino-dependência e tamoxifeno

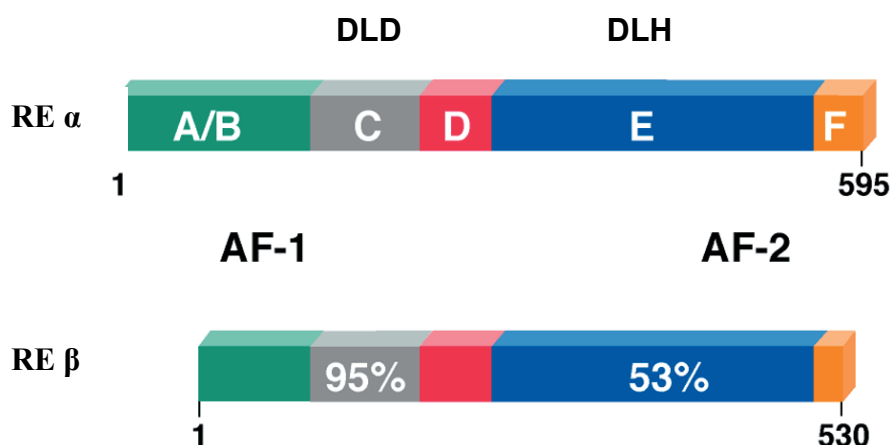
O envolvimento do estrogênio no crescimento tumoral foi sugerido no final do século XIX quando Sir George Thomas Beatson demonstrou que a ooforectomia poderia diminuir a progressão tumoral em mulheres com câncer de mama (Clemons et al., 2001). Publicado por Sir Beatson originalmente em 1896, este artigo marca o início do tratamento hormonal dos tumores de mama.

O estrogênio é um hormônio sexual esteróide e atua em vários processos fisiológicos. Influencia o crescimento, diferenciação e funcionamento dos tecidos do sistema reprodutivo, incluindo glândulas mamárias, útero, vagina e ovários no sexo feminino, bem como testículo, próstata e epidídimo no sexo masculino (Osborne et al., 2000).

Os efeitos do estrogênio, em sua grande maioria, são mediados pela ligação deste hormônio a proteínas nucleares denominadas receptores de estrogênio (RE), estes são basicamente fatores de transcrição que regulam a expressão de genes estrogênicos-estimulados (Osborne, 1998; Jordan, 1999). Entretanto, sabe-se que o RE está longe de ser o controlador direto da transcrição, pois requer uma interação com um complexo de proteínas co-reguladoras (co-ativadoras ou co-repressoras) que agem sinalizando intermediações entre o RE e a transcrição gênica (Jordan, 1999).

O estrogênio se difunde na célula e se liga ao RE nuclear, o qual é dimerizado e ativado, ligando-se a um elemento de resposta estrogênica, que por sua vez é o regulador final da ativação gênica. O receptor forma uma unidade de transcrição com RNA-polimerase através da interação com outras proteínas relacionadas aos fatores de ativação da transcrição.

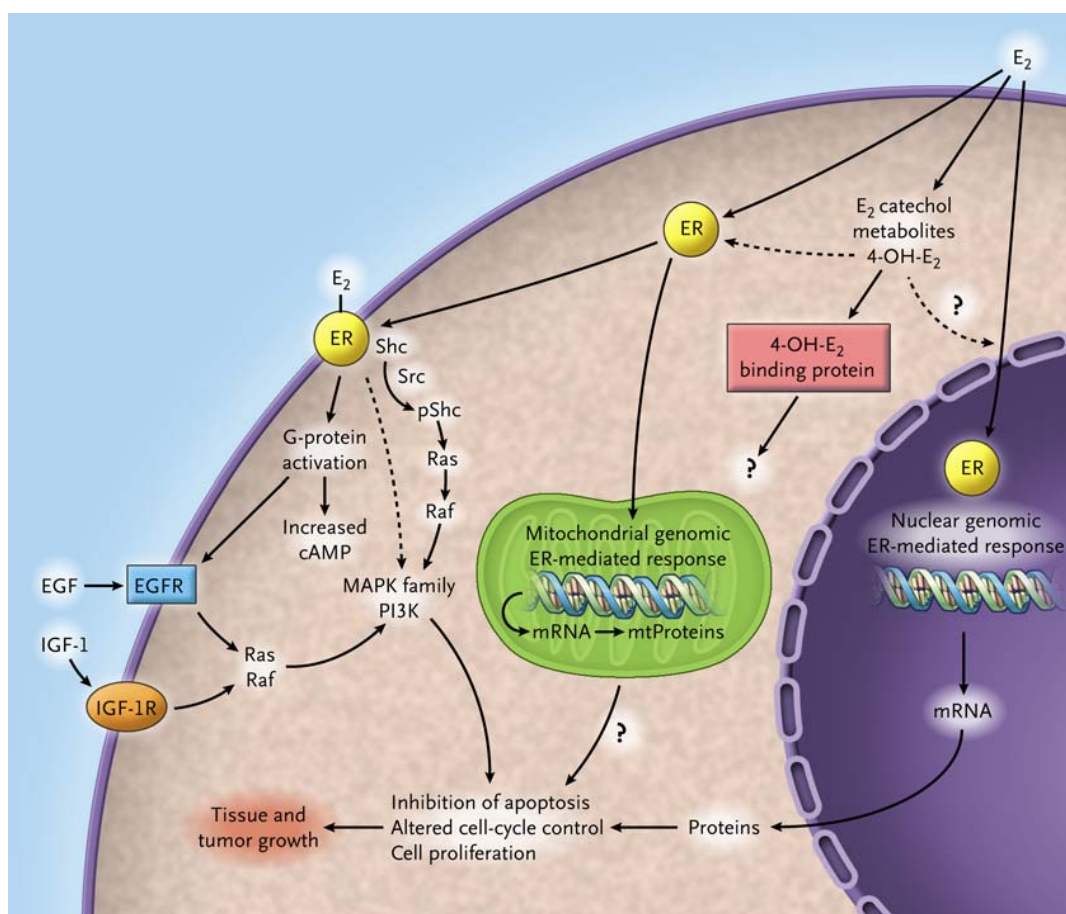
Existem duas isoformas de receptores estrogênicos: receptor estrogênico alfa (RE $\alpha$ ) e beta (RE $\beta$ ). Ambos fazem parte de uma superfamília de receptores hormonais nucleares e cada receptor estrogênico contém na sua estrutura seis diferentes domínios funcionais designados A-F (Figura 2).



AF-1: Função de Ativação de Transcrição 1; AF-2: Função de Ativação de Transcrição 2  
DLD: Domínio de Ligação do DNA; DLH: Domínio de Ligação Hormonal.

**Figura 2** – Estrutura dos receptores estrogênicos alfa e beta, com respectivos domínios funcionais dos receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$ . Adaptado de Osborne et al., (2000).

A ação do estrogênio se dá através destes dois receptores. Entretanto, o RE $\beta$  se expressa fracamente em tumores de mama, enquanto que em tumores iniciais o RE $\alpha$  apresenta uma alta positividade (Licznar et al., 2003). Na sua cadeia protéica estrutural, o RE $\alpha$  contém 595 aminoácidos, ao passo que o RE $\beta$  possui uma cadeia de aminoácidos mais curta, com 530 (Osborne et al., 2000). (Figura 3)



**Figura 3** – Vias de sinalização do receptor de estrogênio (Yager et al., 2006).

O receptor de progesterona (RP) também apresenta duas isoformas (RP-A) e (RP-B) (Arpino et al., 2005). A expressão do gene do RP é regulada pelo RE, mas pode ser modificada por mecanismos não-genômicos, através da interação com receptores de fatores de crescimento epidérmicos (EGF-R) e amplificação do HER-2 (Rastelli et al., 2008).

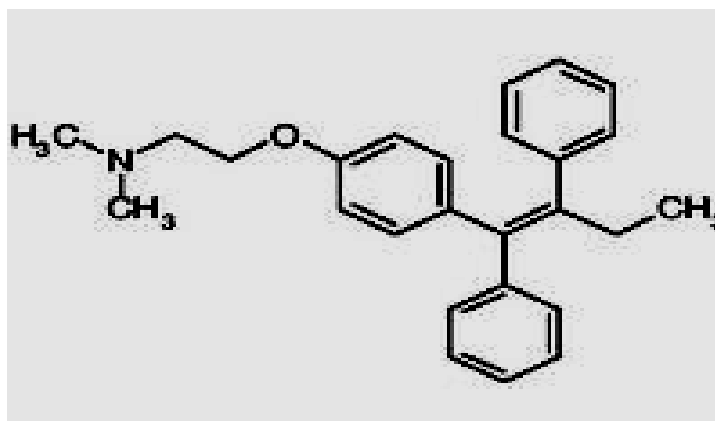
A positividade do RE é considerada fator preditivo de resposta à terapia endócrina, enquanto que a do RP relaciona-se classicamente com o prognóstico. O RP vem sendo estudado como preditivo de resposta à endocrinoterapia em pacientes RE negativo, visto que a atividade deste é considerada pré-requisito para a positividade do RP (Rastelli et al., 2008).

Foi demonstrado em pacientes tratadas com diferentes fármacos (GnRH, tamoxifeno, anastrozol) que, apesar do RE+, a negatividade do RP correlaciona-se ao menor intervalo livre de doença e pior prognóstico (Ponzzone et al., 2006; Rastelli et al., 2008).

Os fármacos antiestrogênicos do tipo trifenililênicos, como o tamoxifeno, ligam-se ao receptor estrogênico inibindo todo o desencadeamento deste complexo processo de ativação estrogênica.

O tamoxifeno age no epitélio mamário como inibidor da ação estrogênica. Tem sido utilizado no tratamento do câncer de mama por mais de três décadas, com comprovada redução de novos tumores ipsi e contralaterais, bem como diminuindo a incidência da doença em pacientes com alto risco e diminuindo a recidiva tumoral (Fisher et al., 1989; EBCTCG, 1992; EBCTCG, 1998; Fisher et al., 1998; Fisher et al., 2000).

Sua identificação farmacológica é ICI 46.474. É uma (Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil) fenoxi]-N, N-dimetiletanamina, obtido a partir da desoxibenzoína. Sua fórmula química é  $C_{26}H_{29}NO-C_6H_8O_7$  e seu peso molecular é 563,6 (Figura 4).



**Figura 4** – Estrutura molecular do tamoxifeno.

Concentrações máximas de tamoxifeno circulante são detectadas de 4 a 7 horas após a administração oral de 20mg, atingindo uma concentração plasmática média de 300ng/ml. A meia-vida de distribuição varia de 7 a 14 horas e sua excreção é lenta, sofrendo metabolização hepática pelo citocromo p450 (Jordan, 1994).

Os efeitos colaterais mais freqüentes são: ondas de calor, ganho de peso, prurido e ressecamento vulvo-vaginal, corrimento vaginal, náuseas e vômitos, irregularidade menstrual, cefaléia e tonturas (Wogan, 1997).

O tamoxifeno apresenta ainda outros efeitos não exclusivos do tecido mamário. Não sendo um anti-estrogênico puro e sim agonista parcial, desempenha sua ação agonista no aumento da massa óssea e conseqüente redução do risco de fraturas de Colles, de quadril e da coluna vertebral (Fisher et al., 1998). Se por um lado o tamoxifeno se apresenta antagonista no tecido mamário por outro tem efeito agonista e deletério sobre o endométrio, estimulando sua proliferação e aumentando o risco de carcinoma endometrial (EBCTCG, 1998; Fisher et al., 1998; Fisher et al., 2000).

As propriedades estrogênicas e antiestrogênicas do tamoxifeno e de seus metabólitos mono-hidroxilados e di-hidroxilados foram inicialmente estudadas em ratas, e o metabólito mono-hidroxi-tamoxifeno foi o mais ativo como antiestrogênico. A descoberta, em 1976, de que o 4-hidroxitamoxifeno possuía grande afinidade pelo receptor de estrogênio, mas tinha a capacidade de atuar como um antiestrogênio e com isso possuía atividade antitumoral no tecido mamário, iniciou as pesquisas sobre este fármaco (Jordan et al., 1976).

A terapia hormonal é uma das principais modalidades terapêuticas do câncer de mama, principalmente naqueles tumores com perfil imunoistoquímico (manifestação de receptores de estrógeno RE e receptores de progesterona RP) é conhecido (Fisher et al., 1989; EBCTCG 1998; Fisher et al., 1998; Fisher et al., 2000).

A proliferação celular fica diminuída com o bloqueio do ciclo celular em G<sub>1</sub> quando expostas ao tamoxifeno, induzindo o câncer de mama à regressão mais pelo bloqueio na progressão das células estrogênio-dependentes do que por um efeito citotóxico direto. Uma vez que a proliferação

---

celular está reprimida, os tumores tendem a regredir ou pelo menos não crescer, através de um encaminhamento natural para envelhecimento e morte celulares ou por causa da interação com as defesas normais do hospedeiro.

Entretanto, poucos dados estão disponíveis a respeito das modificações histológicas e celulares causadas pela terapia antiestrogênica com tamoxifeno em curtos períodos de tempo, provavelmente pelo atual manejo do câncer de mama, sem a realização de biópsias seqüenciais perioperatórias.

Os primeiros estudos com carcinoma mamário (induzido por agentes carcinogênicos) mostram que, como nos tumores humanos, nem todos respondem ao tamoxifeno, e a resposta heterogênea destes tumores está relacionada com a capacidade de ligação do estrogênio ao tumor (Jordan et al., 1976). Nos modelos animais, o tamoxifeno demonstrou ter a capacidade de inibir o crescimento tumoral, apesar de serem desconhecidos os efeitos do fármaco sobre o ciclo celular.

Buscando identificar as bases moleculares para a atividade anti-tumoral dos SERM's, Sutherland et al. (1983) demonstraram que a inibição da proliferação celular em tumores RE+ se dá pelo aprisionamento destas células na fase G<sub>1</sub> e por conseqüência diminuição de células na fase S do ciclo celular. Osborne et al. (1983) observaram o mesmo efeito de acúmulo de células na fase G<sub>1</sub>, confirmando que após a ligação do tamoxifeno com o receptor estrogênico e subsequente translocação para o núcleo, os eventos estrogênio-regulados, tais como o crescimento tumoral, ficavam inibidos.

Ainda, Watts et al. (1994) identificaram uma ação inibitória dos antiestrogênicos sobre a ciclina D1, uma das proteínas reguladoras do ciclo celular que neste estudo foi maximamente inibida antes da célula passar para fase S. Isto explica em parte o acúmulo celular na fase G<sub>1</sub> do ciclo quando as células de câncer de mama RE+ são tratadas com tamoxifeno.

Morena et al. (2004) avaliaram os efeitos do tamoxifeno após dois dias de tratamento em pacientes com carcinoma invasivo de mama. Observaram uma diminuição do volume nuclear, redução da expressão do c-erbB-2 e aumento da expressão do TGF- $\beta$ 1. Assim, a análise destes biomarcadores poderia avaliar uma resposta inicial à droga.

---

Ichikawa et al. (2008) estudaram células de carcinoma de mama após exposição ao tamoxifeno confirmando aumento na população de células na fase G1 e G2 e decréscimo no número de células na fase S. Observaram também aumento da expressão do p53 e p21, enquanto a expressão de p16 permaneceu praticamente estável, alterações estas, dose e tempo dependentes.

O sucesso da terapêutica anti-estrogênica em tratar todos os estágios de câncer de mama e a avaliação do tamoxifeno como um agente preventivo desta doença vem chamando a atenção para os mecanismos moleculares da atividade antiestrogênica.

Embora o tamoxifeno possa inibir a habilidade dos fatores de crescimento em promover a progressão do ciclo celular do câncer de mama, alterações nos mecanismos de transdução dos sinais destes fatores poderiam superar este efeito, desenvolvendo como resultante a insensibilidade e resistência aos antiestrogênicos.

### **2.3 Inibidores da Aromatase**

Na pré-menopausa, a maior parte dos estrógenos circulantes é sintetizada no ovário sob influência do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. A partir da menopausa, a síntese de estrógenos depende da aromatase presente em sítios extragonadais e a atividade estrogênica é principalmente local e não sistêmica (Osborne et al., 2005).

Nas últimas décadas, os inibidores da aromatase têm emergido como uma alternativa ao tamoxifeno, no tratamento hormonal adjuvante e paliativo de pacientes pós-menopáusicas com câncer de mama com receptores hormonais positivos. Essas drogas agem bloqueando a atividade da aromatase, tornando os níveis circulantes de estrógenos na pós-menopausa praticamente indetectáveis.

Os inibidores da aromatase têm, em geral, um perfil de efeitos colaterais mais favorável do que o tamoxifeno, principalmente com relação a fenômenos dependentes da atividade agonista parcial do tamoxifeno sobre o

---



receptor de estrógeno, como câncer de endométrio, eventos tromboembólicos venosos e cérebro-vasculares isquêmicos. No entanto, a supressão da atividade estrogênica pode levar a uma taxa aumentada de perda de massa óssea e fraturas em usuárias de inibidores da aromatase (Baum et al., 2002).

Em mulheres no menacme, a maior parte do estrógeno é sintetizada nas células granulosas do ovário sob influência do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. A biossíntese dos estrógenos completa-se com a conversão da testosterona em estrógeno e da androstenediona em estrona. A conversão de andrógenos em estrógenos é catalisada pela enzima aromatase. A aromatase é encontrada não somente nos ovários, mas também em vários sítios extragonadais, incluindo células mesenquimais do tecido adiposo mamário, osso, endotélio vascular e sistema nervoso central (Osborne et al., 2005). Após a menopausa, os ovários tornam-se não funcionais e os níveis de estrógenos circulantes diminuem significativamente, pois a síntese de estrógenos passa a depender exclusivamente da aromatização de andrógenos em sítios extra-ovarianos.

Os inibidores da aromatase são subdivididos em duas categorias: esteroidais ou tipo I e não esteroidais ou tipo II. Os compostos esteroidais, formestane e exemestane, são análogos dos substratos naturais androstenediona e testosterona. Competitivamente, ligam-se ao receptor da enzima, formando ligações covalentes irreversíveis que resultam em inativação permanente da aromatase. Seus efeitos persistem mesmo sem a introdução de mais medicação. A atividade da aromatase retorna apenas quando novas moléculas são geradas (Osborne et al., 2005). Através de outro mecanismo de ação, os inibidores da aromatase não-esteroidais interagem reversivelmente com a molécula heme da aromatase, inibindo tanto a interação do ligante quanto do oxigênio com o complexo enzimático e, conseqüentemente, impedindo a aromatização esteroideal. A inibição é reversível e o efeito sustentado depende da presença contínua da droga. São exemplos de inibidores não-esteroidais aminoglutetimida, anastrozol e letrozol (Osborne et al., 2005).

Tanto para os inibidores da aromatase do tipo I quanto do tipo II, a inibição da aromatase é dose dependente. Os inibidores da aromatase de terceira geração (exemestane, anastrozol e letrozol) têm potência muitas vezes maior do que o inibidor da aromatase de primeira geração aminoglutetimida. A supressão

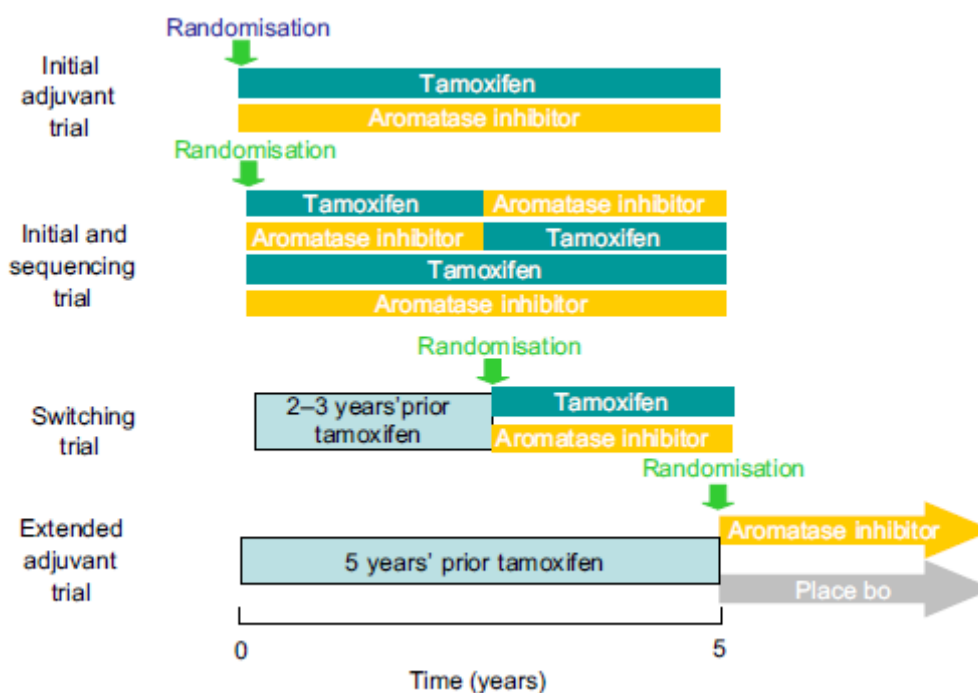
---

da aromatização corporal total chega a ser reduzida em 90,6 a 98,9%, levando a níveis indetectáveis de estrógenos circulantes (Osborne et al., 2005).

O uso de inibidores da aromatase é limitado a pacientes sem ovários funcionais. Em mulheres na pré menopausa os inibidores da aromatase têm eficácia limitada devido a supressão estrogênica inadequada e insuficiente.

Os inibidores da aromatase de terceira geração foram inicialmente comparados com o progestágeno acetato de megestrol como tratamento hormonal paliativo para pacientes com câncer de mama expressando receptores hormonais após progressão ou recidiva após o uso de tamoxifeno. Em dois estudos, os inibidores da aromatase mostraram vantagem estatisticamente significativa sobre o acetato de megestrol (Key et al., 2002). A partir disso, tornaram-se possíveis os estudos comparando o inibidor da aromatase diretamente com tamoxifeno no tratamento hormonal paliativo de primeira linha.

Diversos estudos vêm sendo conduzidos na comparação entre o tamoxifeno e os inibidores da aromatase, buscando estabelecer qual destes promovem a melhor sobrevida livre de doença e geral. Estes estudos seguiram vários desenhos e estão esquematizados abaixo (Figura 5):



**Figura 5** – Estudos randomizados comparativos entre tamoxifeno e inibidores da aromatase (Cheung, 2007).

Até recentemente, o tratamento hormonal adjuvante padrão para câncer de mama ressecado, expressando receptores hormonais, era a utilização de 5 anos de tamoxifeno. Os resultados positivos com inibidores da aromatase em doença metastática motivaram sua comparação com tamoxifeno também na adjuvância.

O primeiro desses estudos foi o ATAC, um grande estudo randomizado, duplo-cego, internacional, multicêntrico que randomizou 9.366 pacientes pós-menopáusicas com câncer de mama inicial ressecado para tratamento adjuvante com cinco anos de tamoxifeno, cinco anos de anastrozol ou cinco anos da combinação das duas drogas (Baum et al., 2002). O braço da combinação foi semelhante ao braço do tamoxifeno com relação a todos os desfechos. O tratamento com anastrozol associou-se a uma sobrevida livre de doença significativamente prolongada em relação ao tamoxifeno. Não houve vantagem com relação à sobrevida geral até o momento da última publicação dos resultados (seguimento mediano de 68 meses) (Howell et al., 2005). O anastrozol também foi mais bem tolerado do que o tamoxifeno com relação a câncer de endométrio, sangramento vaginal, eventos cérebro-vasculares, tromboembólicos venosos e fogachos. No entanto, o anastrozol foi associado com maior número de desordens musculoesqueléticas e fraturas. Artralgias ocorreram em 35,6% das pacientes tratadas com anastrozol e em 29,4% das pacientes tratadas com tamoxifeno. Fraturas ocorreram em 11% das pacientes tratadas com anastrozol e em 7,7% das pacientes tratadas com tamoxifeno.

Em outros estudos ao invés de tratamento inicial com anastrozol como testado no estudo ATAC, letrozol e exemestane foram estudados após extensões variáveis de uso prévio de tamoxifeno. Sabe-se que a utilização de tamoxifeno na adjuvância hormonal acrescenta benefícios progressivos quando usado por até cinco anos, mas nenhum benefício adicional é observado além de cinco anos de uso (Fisher et al., 2001).

O objetivo do estudo MA-17 foi comparar a evolução de 5187 pacientes pós-menopáusicas tratadas com cinco anos adicionais de letrozol ou placebo após encerrar a adjuvância hormonal com cinco anos de tamoxifeno. Esse estudo foi interrompido precocemente na primeira análise interina, por

---

recomendação do comitê independente que monitorizava os dados, por uma diferença altamente significativa em favor do letrozol. Após um seguimento mediano de 2,4 anos, 207 eventos (recidivas locais ou à distância ou câncer de mama contralateral) haviam ocorrido; 75 no grupo tratado com letrozol e 132 no grupo tratado com placebo. As sobrevidas livres de doença estimadas em 4 anos foram 93% para o letrozol e 87% para o placebo ( $p < 0,001$ ) (Goss et al., 2003). O tratamento com letrozol foi, em geral, bem tolerado. A maioria dos eventos adversos relatados foi de grau 1 ou 2. Letrozol associou-se com maior incidência de fogachos (47,2% × 40,5%), artrite (5,6% × 3,5%), artralguas (21,3% × 16,6%) e mialgias (11,8% × 9,5%). Por outro lado, sangramento vaginal foi mais comum com placebo (6% × 4,3%). A ocorrência de novos diagnósticos de osteoporose não diferiu significativamente entre os grupos nesse seguimento curto (5,8% para o grupo tratado com letrozol e 4,5% para o tratado com placebo;  $p = 0,07$ ). A incidência de fraturas também foi similar.

No BIG 1-98, estudo que comparou o uso de TMX e letrozol (2,5 mg ao dia) na adjuvância, incluindo 8.028 mulheres na pós-menopausa. Após cinco anos de uso, verificou-se redução do número de recorrências em 18%,  $p=0,007$ , no grupo que usou letrozol (Coates et al., 2007).

Um grande estudo de tratamento hormonal adjuvante em pacientes pós-menopáusicas com exemestano também já foi publicado. Nesse estudo, comparou-se, após a utilização de dois a três anos de tamoxifeno adjuvante, a troca para o inibidor da aromatase exemestano ou a manutenção do tamoxifeno até o final dos cinco anos pretendidos de adjuvância. Como nos anteriores, a troca para inibidor da aromatase resultou em uma redução de 32% no risco de recidiva ou câncer de mama contralateral em um seguimento mediano de 30 meses (Coombes et al., 2004).

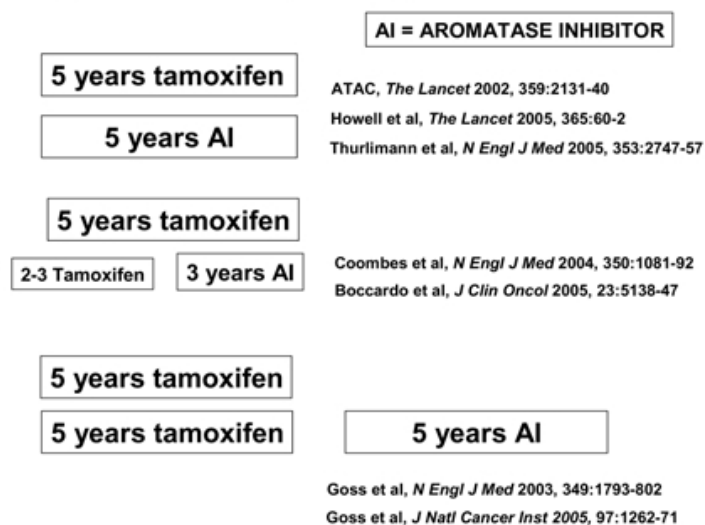
O exemestano foi associado com maior incidência de artralguas e diarreia, mas sintomas ginecológicos, eventos tromboembólicos, sangramento vaginal e câimbras foram mais comuns com o tamoxifeno. Fraturas foram relatadas mais freqüentemente no grupo do exemestano do que no grupo do tamoxifen, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (3,1% × 2,3%;  $p = 0,08$ ). A incidência de osteoporose também variou discretamente

---

entre os grupos, sendo 7,4% nas pacientes tratadas com exemestano e 5,7% naquelas tratadas com tamoxifeno ( $p = 0,05$ ) (Coombes et al., 2004).

O IES, Intergroup Exemestane Study, informou redução de 24% no número de recorrências ( $p=0,0001$ ) e no grupo de pacientes que usaram exemestano (25mg ao dia) por dois a três anos após TMX (cinco anos no total) comparado com aquelas que usaram somente tamoxifeno por todo o período (Coombes et al., 2007). Em relação ao uso de anastrozol (1 mg ao dia) de forma sequencial após o tamoxifeno por cinco anos no total, esse também se mostrou superior ao uso exclusivo de tamoxifeno, com redução de 41%,  $p<0,0001$ , no número de recorrências, em metanálise que incluiu os estudos Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group – ABCSG 8, Arimidex-Nolvadex – ARNO 95 e o Italian Tamoxifen Anastrozole – ITA (Jonat et al., 2006).

### Long Term Estrogen Deprivation Treatment



**Figura 6** – Resumo dos cinco maiores estudos comparativos entre tamoxifeno e inibidores da aromatase no tratamento adjuvante. (Patel et al., 2007)

Estes grandes estudos controlados e randomizados (Figura 6) sugerem a superioridade dos inibidores de aromatase em relação ao tamoxifeno, refletida no aumento do tempo de sobrevida livre de doença (Carpenter, 2008) e motivaram a American Society of Clinical Oncology (ASCO), o National Comprehensive Cancer Network (NCCN) e o Consenso Internacional de St.

Gallen (St. Gallen) a recomendarem o uso dos inibidores de aromatase no tratamento de mulheres pós-menopausadas com câncer de mama inicial responsivo a terapia endócrina (Winer et al., 2005; Carlson et al., 2006; Thuerlimann et al., 2007).

Segundo a ASCO, o tratamento adjuvante de pacientes pós-menopáusicas com câncer de mama expressando receptores hormonais deve incluir um inibidor da aromatase para reduzir o risco de recidiva tumoral. Porém, nem o momento, nem a duração de uso do inibidor da aromatase estão atualmente claramente definidos. Os inibidores da aromatase são considerados um tratamento inicial apropriado para todas as pacientes com contra-indicações ao uso de tamoxifeno. Para as demais, opções incluem cinco anos de inibidor da aromatase ou tratamento seqüencial, consistindo de tamoxifeno (por 2 a 3 anos ou por 5 anos) seguido de inibidor da aromatase por 2 a 3 anos ou por 5 anos. Pacientes que não toleram inibidores da aromatase devem receber tamoxifeno. A ASCO destaca que o perfil de efeitos colateral dos inibidores da aromatase e do tamoxifeno são diferentes e que os efeitos colaterais, em longo prazo dos inibidores da aromatase, principalmente sobre massa óssea, ainda não estão completamente caracterizados (Winer et al., 2005).

Entretanto, o sucesso da endocrinoterapia neoadjuvante, tanto com tamoxifeno como com inibidores da aromatase, é muito mais recente e menos reportado na literatura. De acordo com estudos realizados é modalidade terapêutica efetiva e bem tolerada. Os inibidores de aromatase de última geração (letrozol, anastrozol e exemestano) parecem obter melhor taxa de resposta total (resposta patológica completa), portanto, maior taxa de cirurgias conservadoras do que o tamoxifeno. Pacientes com escore de Allred maior ou igual a 6 tem maior chance de responder e obter benefício clínico. A duração da terapia endócrina neoadjuvante ainda não está bem definida e necessita de mais estudos (Abrial et al., 2006).

Em estudo com 24 pacientes foi comparada a expressão de Ki67 e receptores de progesterona, antes e após tratamento endócrino neoadjuvante com anastrozol, onde não foram encontradas mudanças entre o grupo pré endócrinoterapia e pós. Estes são os primeiros dados a demonstrar a

---

efetividade clínica e biológica do anastrozol em câncer de mama erbB2-positivo e receptores de estrógeno positivo (Dixon 2002).

Em um estudo multicêntrico randomizado e duplo-cego: the Immediate Preoperative Arimidex Alone or in Combination with Tamoxifen (IMPACT) foi comparado o uso de anastrozol (1 mg por dia) versus tamoxifeno (20 mg por dia) versus anastrozol mais tamoxifeno em 330 pacientes na pós-menopausa com câncer de mama receptor de estrógeno ou progesterona positivos, localmente avançados, mas operáveis. Neste estudo as pacientes receberam tratamento neoadjuvante por três meses. O objetivo principal foi investigar a resposta tumoral e o objetivo secundário investigar a taxa de cirurgias conservadoras e a resposta dos marcadores biológicos incluindo proliferação, receptores hormonais e taxa de apoptose. Smith and Dowsett reportaram uma resposta clínica similar no braço do anastrozol (37%) em relação ao braço do tamoxifeno (36%) ou o braço da combinação (39%). Um número significativamente maior de pacientes que receberam anastrozol foram submetidas a cirurgia conservadora em relação as pacientes que receberam tamoxifeno (46 versus 22%,  $P = 0,03$ ). Em pacientes erbB2-positivas a resposta clínica foi significativamente maior no uso do anastrozol em relação ao tamoxifeno (22%,  $P = 0:09$ ) (Smith et al., 2005).

Em relação aos biomarcadores, o estudo IMPACT encontrou supressão altamente significativa do Ki67 (marcador de proliferação) no grupo tratado com anastrozol em relação ao grupo que recebeu tamoxifeno ou a combinação dos dois. Observou-se também relação positiva entre o nível de receptores de estrogênio e a supressão de Ki67 em todas as pacientes. Estes dados mostram um paralelo, se levarmos em consideração somente os biomarcadores, com os resultados do estudo ATAC. Não foi analisada a expressão do p16 neste estudo (Dowsett et al., 2005).

Similarmente um segundo estudo neoadjuvante comparou anastrozol e tamoxifeno e não mostrou taxas de resposta superior para o anastrozol. O PROACT incluiu 451 pacientes na pós-menopausa com câncer de mama receptor de estrógeno positivo. Destas pacientes 228 receberam anastrozol e 223 receberam tamoxifeno por 12 semanas antes de serem operadas. O

---

objetivo principal foi a diminuição do diâmetro do tumor aferido ao ultrassom de pelo menos 30% em relação ao tamanho no momento do diagnóstico. Como 137 pacientes neste estudo receberam quimioterapia concomitante foi analisado o subgrupo que recebeu apenas endocrinoterapia que mostrou resultados de 36,2% e 26,5% a favor do anastrozol ( $P=0,07$ ) (Cataliotti et al., 2006).

Ao contrário das expectativas os estudos IMPACT e PROACT não refletiram os resultados gerados pelo correspondente ATAC no qual o anastrozol provou ser clinicamente superior ao tamoxifeno. Isto pode ser talvez justificado pela duração limitada da terapia neoadjuvante nos estudos (Abrial et al., 2006).

#### **2.4 A proteína do gene p16**

Estudos recentes comprovam que a biologia de muitos tumores sólidos humanos resulta tanto de alterações epigenéticas quanto genéticas, definidas como conseqüentes à mudança de expressão de um gene sem modificações na seqüência de bases do DNA. Dos muitos mecanismos epigenéticos relacionados com a gênese tumoral, incluindo heterocromatização genômica, diacetilação de histonas e perda da impressão genômica, a metilação do DNA dos sítios promotores de genes supressores tumorais tem recebido particular atenção. A inativação do gene supressor de tumor por hipermetilação do promotor é comum em muitos tumores malignos. Em uma variedade de tumores tem-se observado a perda de transcrição destes genes de supressão tumorais relacionada a hipermetilação de regiões promotoras de p16/INK4a. (Baylin et al., 1998; Liu et al., 2008)

A progressão do ciclo celular está relacionada à formação de complexos contendo ciclinas, sintetizadas durante algumas fases específicas do ciclo (G0, G1, S, G2 e M) e cinases ciclina-dependentes (CDKs), estas últimas expressas em forma inativa durante todas as fases do ciclo e ativadas pelas ciclinas. Combinações diferentes de ciclina-CDKs estão associadas às diferentes fases e transições do ciclo celular. As cinases fosforilam proteínas

---

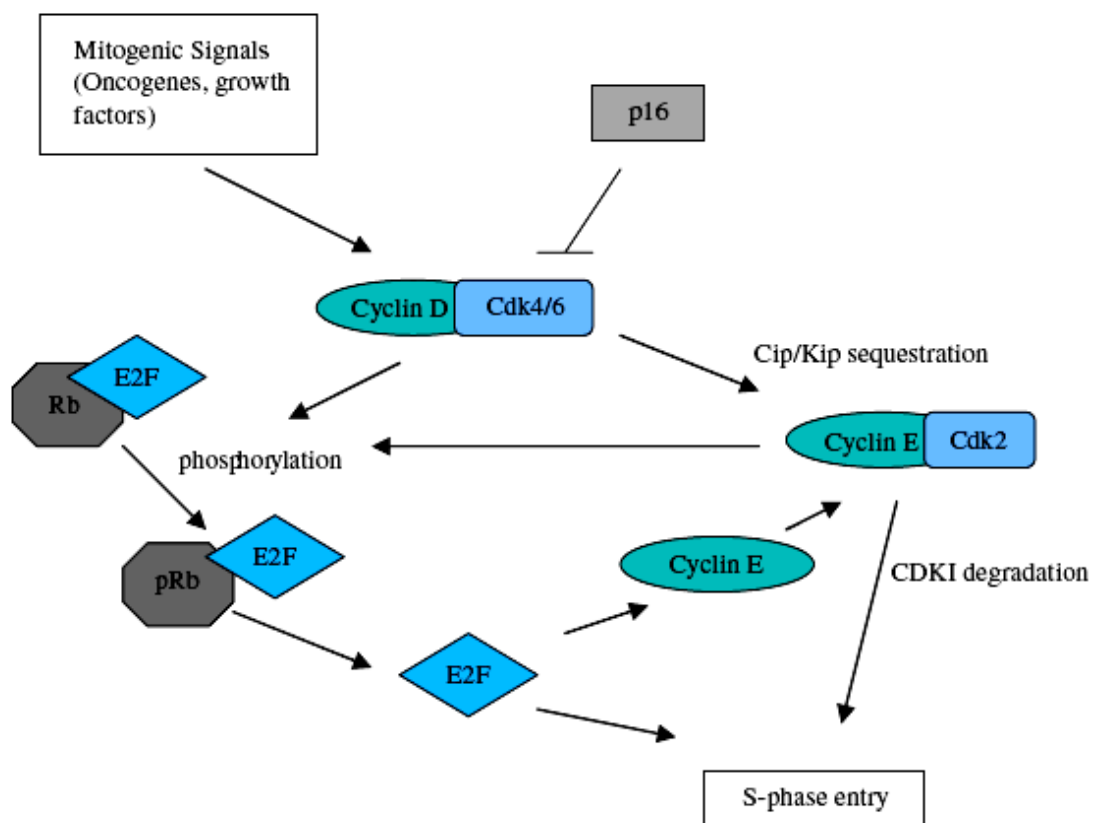


envolvidas no processo de mitose. A atividade das CDKs é regulada pelos inibidores das CDKs, que exercem controle negativo e funcionam como importantes fatores limitantes da progressão em todas as fases e nas respectivas transições entre as fases do ciclo celular. Os inibidores das CDKs são subdivididos em dois grupos: os que inibem CDKs de maneira ampla (p21, p27 e p57) e os que seletivamente inibem os complexos ciclina D-CDK 4 e ciclina D-CDK 6 (p16, p15, p18, p19) (Cotran, 2003).

A transição entre as fases G1 e S é o ponto essencial do ciclo celular, após o qual a célula está pronta para ingressar na fase S e progredir no processo de mitose. Participam desta transição a ciclina D1, a cinase ciclina-dependente CDK4, o inibidor de CDK p16 (p16INK4 – inibidor da CDK4) e a proteína supressora tumoral pRb. (Sano et al., 1998; Sano et al., 1998) A pRb, na sua forma ativa, não fosforilada, se liga a membros da família do fator de transcrição E2F, em complexo inativo durante as fases G0 e G1, interrompendo assim a progressão da fase G1 para a fase S. Na fase G1, ocorre acúmulo de ciclinas da classe D e E e ativação de CDKs específicas, que fosforilam a pRb, rompendo a ligação com E2F, ativando-o e levando à transcrição dos genes necessários para a entrada na fase S (Cotran, 2003).

Em 1993, enquanto estudava os controles do ciclo celular, Serrano et al encontraram uma proteína associada às ciclinas, a qual chamou de p16, com a função de bloqueio do ciclo celular sempre que este estivesse alterado. Além disso, descobriu que essa nova proteína bloqueava especificamente a atividade da ciclina CDK4 e, portanto, regulava a atividade da proteína do gene Rb para liberar os fatores de transcrição que são necessários para passagem através do ponto de restrição no ciclo celular (Serrano et al., 1993) (Figura 7).

---



**Figura 7** – Regulação da transição da fase G1 para fase S e ação da proteína p16. (Roy et al., 2006)

Apenas quatro meses após a publicação desta descoberta, um outro grupo de pesquisadores encontrou uma versão mutada de p16 enquanto procurava por um gene que causasse o melanoma (Kamb et al., 1994). Posteriormente foi demonstrado que muitos tipos de câncer humano apresentavam mutações ou mesmo falta total do gene p16 (Kamb et al., 1994). Também foram encontrados resultados similares em gliomas, linfomas e câncer ginecológico (Wong et al., 1997).

O gene p16 atua como um supressor tumoral. Experimentalmente, ratos com inativação de p16 apresentam diversos tipos de tumores. É essencial para o equilíbrio do ciclo celular quando da divisão da célula. Sua função é contraposta à da proteína Rb, produto do gene RB considerado o primeiro gene supressor descrito. Rb deve ser inativado antes que a célula avance do ponto R para a fase S. O mecanismo normal de ação do Rb fosforilado é a via da ciclina CDK4 (ciclina dependente de quinase 4), que age como proto-oncogene. Porém,

se não existir a proteína p16 – por mutação ou deleção do gene, qualquer que seja – o equilíbrio é desfeito, como se houvesse uma superexpressão de ciclina D ou CDK4 que compromete a função de Rb (Ito et al., 1997; Honoki et al., 2004).

Deste modo, o gene p16, localizado no cromossomo 9p21, atua como importante fator de supressão tumoral regulando negativamente o ciclo celular através da inibição da atividade das cinases dependentes de ciclina 4 e 6 ou CDK 4 e 6, as quais promovem a fosforilação e, por consequência, a inativação de um importante produto de supressão tumoral, a proteína do gene do retinoblastoma (Zhao et al., 1999). A inativação do p16 tem sido observada em uma variedade de tumores (Esteller et al., 2001; Esteller et al., 2002), seja por deleções homozigóticas, ou por mutações pontuais (Kamb et al., 1994; Okamoto et al., 1994), assim como por metilação (Merlo et al., 2005). A presença de metilação de diversos genes de supressão tumoral (p16, RAR-beta, TIMP3, caderina-E, DAPK-1, hMLH1, ciclina G e ppENK) já foi observada envolvendo tumores do pâncreas, mama e estômago (Ueki et al., 2004).

Em termos gerais, a inativação de p16 está associada com fenótipo mais agressivo e pior prognóstico em uma gama de neoplasias, incluindo o câncer pancreático, o melanoma maligno, glioma, leucemia, linfoma não Hodgkin e carcinoma de pulmão (Hui et al., 2000).

Na mama o papel do gene p16 ainda é controverso, apesar da inativação deste ser observada em algumas linhagens de células neoplásicas mamárias a mutação ou deleção do gene p16 é um evento relativamente raro no câncer invasivo de mama, sendo encontrada em aproximadamente 17 a 31% dos tumores (Herman et al., 1995; Brenner et al., 1996). Em contraste, diversos estudos têm encontrado superexpressão do gene p16 e associação com pior prognóstico, indiferenciação e consequente alta taxa de proliferação celular, bem como envolvimento linfonodal e expressão negativa de receptores hormonais (Milde-Langosch et al., 2001; Di Vinci et al., 2005).

Apesar do aparente conflito com pesquisas anteriores e evidências clínicas de que o p16 atue como gene de supressão tumoral, pode-se interpretar que a superexpressão do p16 é uma reação, na tentativa de limitar a proliferação celular e uma resposta da célula ao dano em seu DNA (Emig et al., 1998; Liu et al., 2008).

---

Em contrapartida, Liu et al. (2008), em estudo com 140 casos de lesões proliferativas intraductais, encontrou associação entre metilação do gene p16 e ocorrência de lesões pré-malignas e malignas *in situ* na mama, indicando que a inativação do p16 acompanhada de superexpressão da ciclina D1 é criticamente relevante para iniciação e progressão de malignidade no tecido mamário.

Ao estudar a ocorrência de metilação do p16, e consequente supressão em sua expressão, e possíveis correlações com a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, um estudo com 90 pacientes não demonstrou correlação positiva ou negativa entre a expressão do p16 e o status hormonal (Feng et al., 2007).

Em contrapartida, um estudo com 200 pacientes demonstrou haver diminuição na expressão do p16 significativamente menor em pacientes com tumor receptor de estrogênio negativo. Ou seja, entre as pacientes com tumores receptores de estrógeno positivas houve maior ocorrência de supressão na expressão do p16 (Munot et al., 2006).

---

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

### **3.1 Pacientes**

Foram incluídas 58 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama nos estádios IIb e III atendidas nos Hospitais São Paulo e Pérola Byington de São Paulo. O estudo foi prospectivo, duplo-cego envolvendo pacientes que foram randomizadas em três grupos: 1) Placebo (N=25); 2) Tamoxifeno (N=15) = 20 mg/dia e 3) Anastrozol (N=18) = 1 mg/dia. Foram excluídas as pacientes com hipersensibilidade conhecida aos medicamentos, submetidas à quimioterapia prévia, tumores inoperáveis.

As pacientes após terem conhecimento do estudo e concordado em participar do mesmo assinando o Termo de Consentimento previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo e do Hospital Pérola Byington, foram submetidas à biópsia incisional do nódulo mamário suspeito, sob anestesia local, e randomizadas em um dos grupos.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo avaliou e aprovou este projeto sob os números 1880/07 e 0904/04 (Anexos 1 e 2, respectivamente) assim como o comitê de ética em pesquisa do CRSM – Hospital Pérola Byington em 29 de março de 2006 (Anexo 3).

Após a randomização, realizada por auxiliar externa ao estudo, cada paciente recebeu um frasco lacrado e identificado com nome fantasia, contendo comprimidos idênticos, para serem ingeridos na posologia de um comprimido por dia durante 26 dias. Ao término da medicação cada paciente foi internada para realização de tratamento cirúrgico definitivo (quadrantectomia ou mastectomia).

Em ambos os serviços, o tempo médio entre o diagnóstico histológico do câncer de mama (biópsia ambulatorial) e a resolução cirúrgica definitiva, levou em média três a quatro semanas. Este intervalo deveu-se ao tempo necessário para execução de exames pré-operatórios e de rastreamento, além do tempo mínimo para agendamento de pacientes tratadas pelos setores de mastologia de ambos os hospitais.

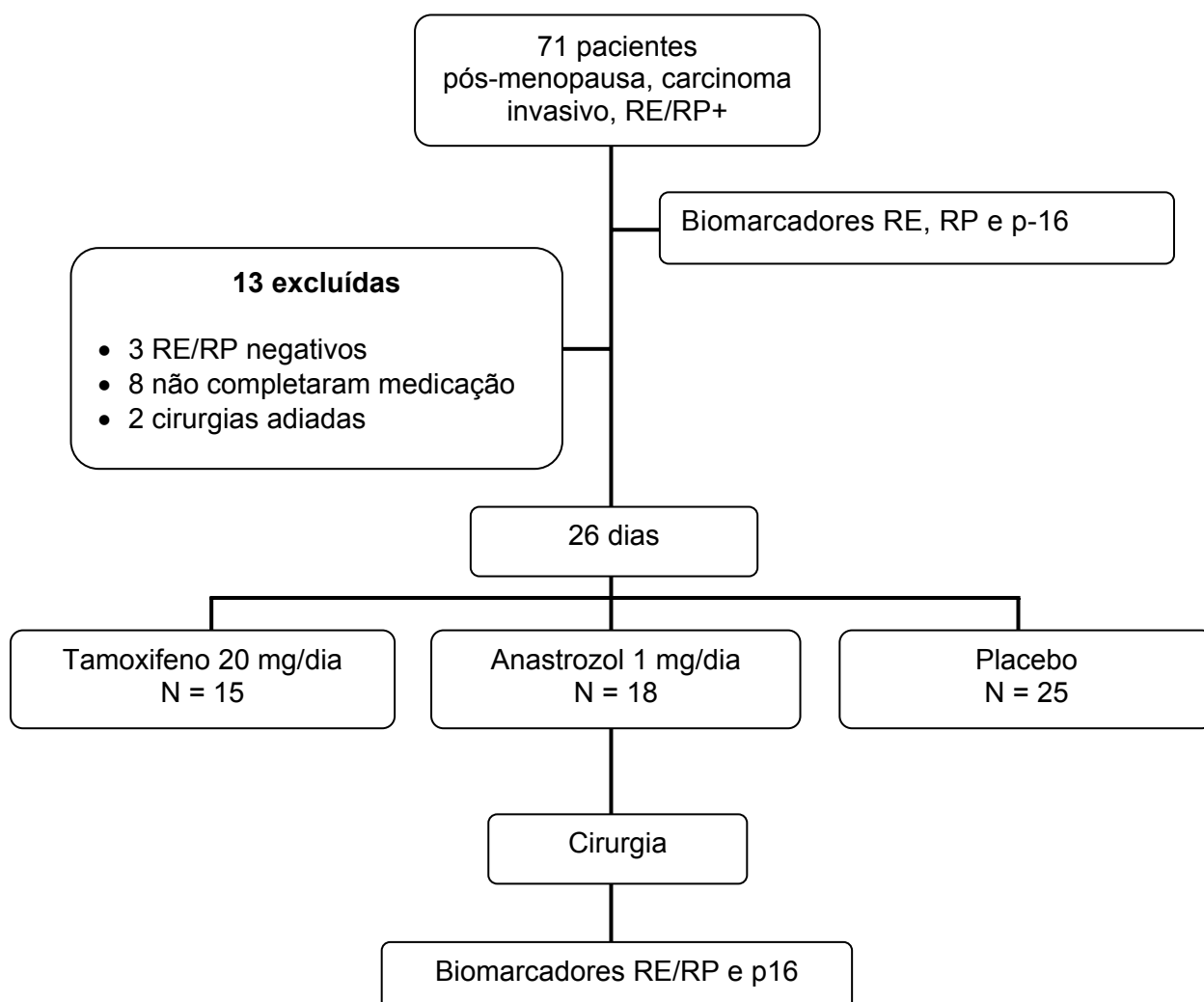
Parte do material obtido no diagnóstico e após o tratamento definitivo foi fixado em solução de formol líquido saturado a 10%, impregnado pela parafina líquida em estufa e, posteriormente foram confeccionadas lâminas coradas pela

---

hematoxilina e eosina (HE) para confirmar o diagnóstico de carcinoma de mama segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981).

Outra parte do material foi enviada para análise imunoistoquímica dos marcadores tumorais através da técnica de tissue microarray, para avaliação dos biomarcadores pré e pós-tratamento.

A inclusão de pacientes e coleta de material foi realizada no período de julho de 2004 a fevereiro de 2007. Inicialmente foram incluídas 71 pacientes no total, sendo que destas 13 foram excluídas, três delas por apresentarem receptores de estrógeno e progesterona negativos, oito por não terem completado a medicação adequadamente e duas porque tiveram suas cirurgias adiadas. Segue abaixo desenho esquemático do estudo (Figura 8).



**Figura 8** – Desenho esquemático do estudo.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Método Histopatológico**

Os fragmentos de tumores obtidos durante a biópsia e na cirurgia definitiva foram fixados em solução de formol líquido saturado a 10%, por um período de 12 horas. Foram então submetidos a processamento clássico (desidratados em álcool etílico e diafanizados pelo xilol) e então incluídos em parafina líquida à temperatura de 59°C.

Foram obtidos cortes seriados de 5 µm dos blocos através de micrótomo manual. Os cortes foram montados em lâminas untadas com albumina de Mayer, as quais foram mantidas em estufa regulada à temperatura de 37°C durante 24 horas para secagem e colagem. Foram então coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para confirmar o diagnóstico de carcinoma invasivo, segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981).

### **3.2.2 Método Imunoistoquímico**

O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou tissue microarray (TMA), é uma técnica descrita com ampla aceitação pela literatura mundial. Com um conceito extremamente simples, trata-se de agrupar um grande número de amostras teciduais em um único bloco de parafina, permitindo o estudo de expressão de marcadores moleculares em larga escala com grande aproveitamento do material arquivado, do tempo e dos custos (Kononen et al., 1998).

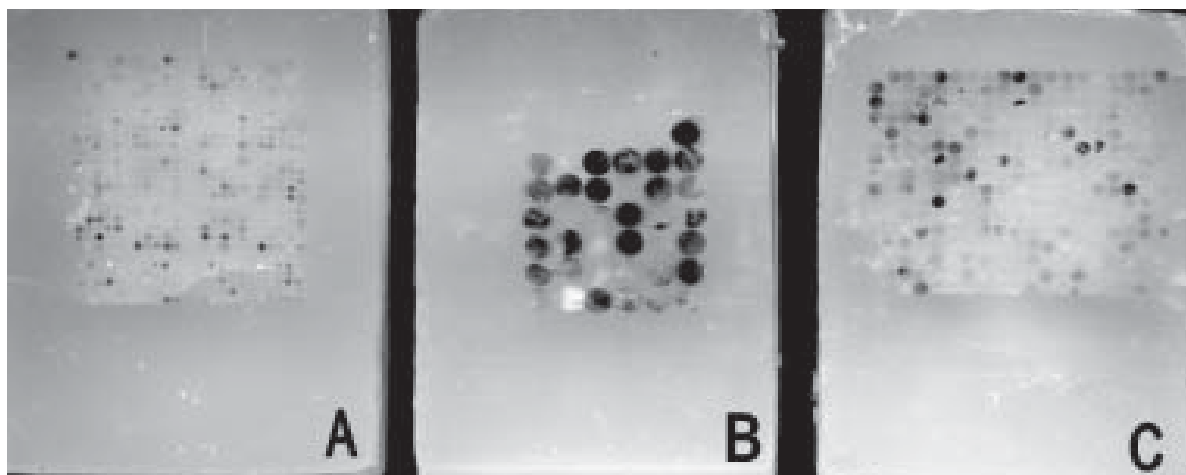
Foi demonstrado que a metodologia TMA é aplicável à rotina da pesquisa de fatores prognósticos do câncer de mama através da amostragem de quatro áreas, incluindo regiões centrais e periféricas do tumor. Esses autores obtiveram alta concordância nos resultados com os cortes convencionais, custo sete vezes menor e, portanto, recomendam o uso de TMA na rotina de imunoistoquímica dos laboratórios com alto fluxo de carcinomas da mama (Ruiz et al., 2006; Sapino et al., 2006).

Na escolha da matriz adequada foi usada agulha de 1 mm por oferecer boa amostragem facilidade da construção do bloco receptor e menor

---

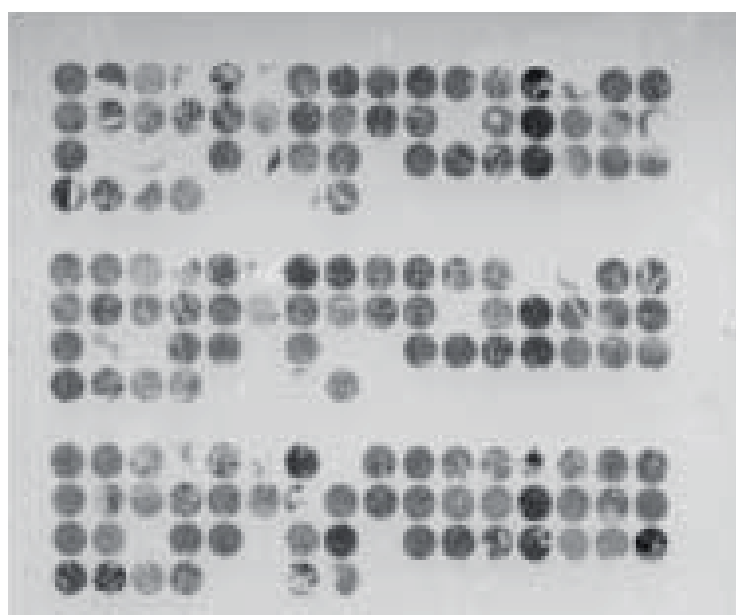


dano ao bloco doador, os cilindros foram separados entre si a cada 0,2 mm e construídos com máquina de TMA da Beecher Instruments Inc (Andrade, 2007) (Figura 9).



**Figura 9** – Blocos receptores construídos com cilindros de calibres diferentes. A: 0,6 mm; B: 2 mm e C: 1 mm.

Os cortes foram realizados com micrótomo manual e fixados com fita adesiva e aplicados nas respectivas lâminas (Figura 10).



**Figura 10** – Detalhe da lâmina corada por hematoxilina e eosina (HE) obtido a partir do bloco receptor.

O bloco de TMA foi cortado com micrótomo rotativo na espessura de 5 µm. As lâminas foram irradiadas com UV por 30 minutos, tendo sido em seguida mergulhadas em solução solvente (TPC) e secadas a temperatura ambiente. As lâminas receberam banho de parafina, estando prontas para o armazenamento em freezer.

A desparafinização das lâminas foi feita deixando-as por 24 horas em estufa a 60°C, com xilol a 60°C por 20 minutos, etanol 100% por 30 segundos, 85% por 30 segundos e 70% por 30 segundos. Posteriormente foram lavadas em água destilada.

Ferveu-se a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna<sup>®</sup>, Nigro) destampada, mergulhou-se as lâminas e lacrou-se a panela com a válvula de segurança aberta.

Após a saída do vapor saturado foi abaixada a válvula de segurança e aguardou-se a despressurização. Após quatro minutos desse sinal deixou-se a panela fechada sob água corrente até que houvesse despressurização total então as lâminas foram novamente lavadas em água destilada.

Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, (água oxigenada 10 vol) com quatro trocas de cinco minutos cada. Foram lavadas em água corrente, destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por cinco minutos.

Somente então as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme tabela abaixo (Quadro 1) em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

**Quadro 1** – Anticorpos primários usados na análise imunoistoquímica

<b>Anticorpos</b>	<b>Clones</b>	<b>Títulos</b>	<b>Fabricante</b>
Receptor de estrógeno	SP1	1:500	Neomarkers cat # M7047
Receptor de progesterona	PgR636	1:400	Dako cat # M3569
p16	E6H4	1:50	Dako cat # OA315

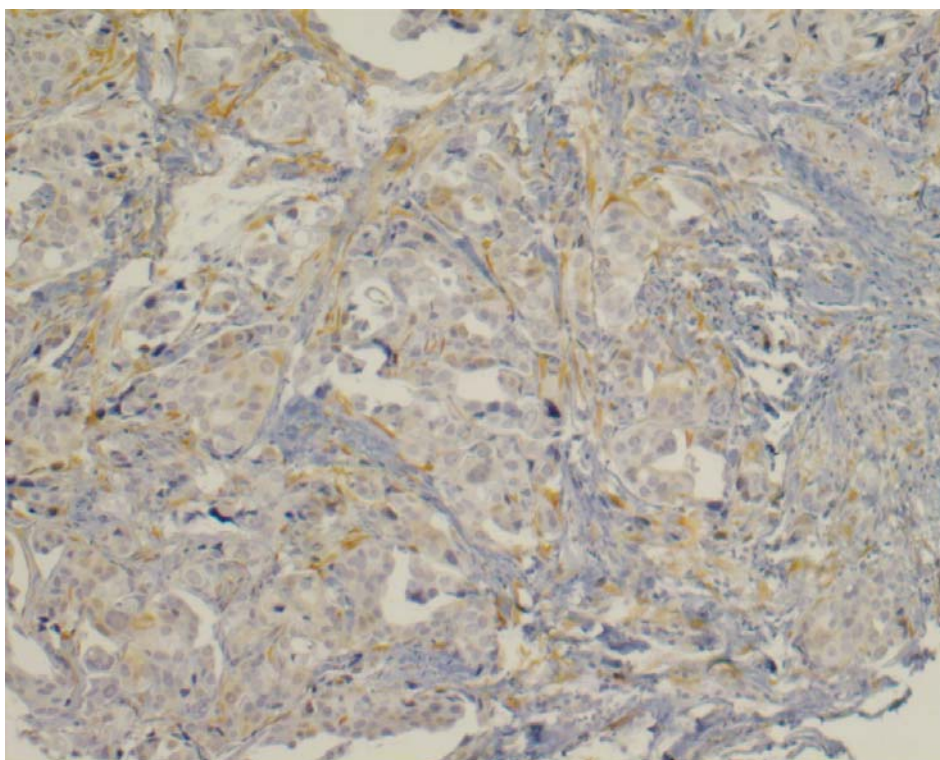
Após a incubação com anticorpos as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de três minutos cada e incubadas por 30 minutos a 37°C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer RE7260-k, Reino Unido). Em seguida, foram lavadas novamente com tampão PBS com três trocas de três minutos cada, incubadas com o NovoLink Polymer por 30 minutos a 37°C. Lavadas com tampão PBS com três trocas de três minutos cada. Posteriormente foram incubadas em solução substrato: 60 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por cinco minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observou-se ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

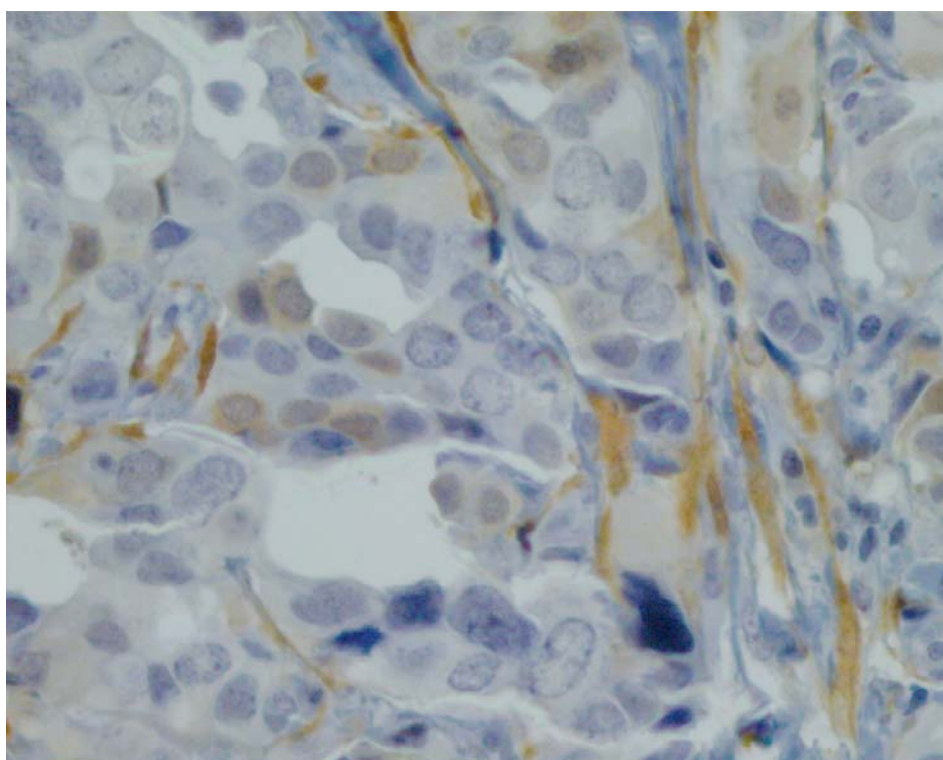
Lavou-se em água corrente e água destilada. E em seguida contracoradas com Hematoxilina de Harris por um minuto e lavadas em água destilada, submersas duas vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

As lâminas foram desidratadas em etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 100% por duas vezes de 30 segundos cada, xilol quatro vezes por 30 segundos cada e montadas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha) (Figuras 11, 12, 13 e 14).

---

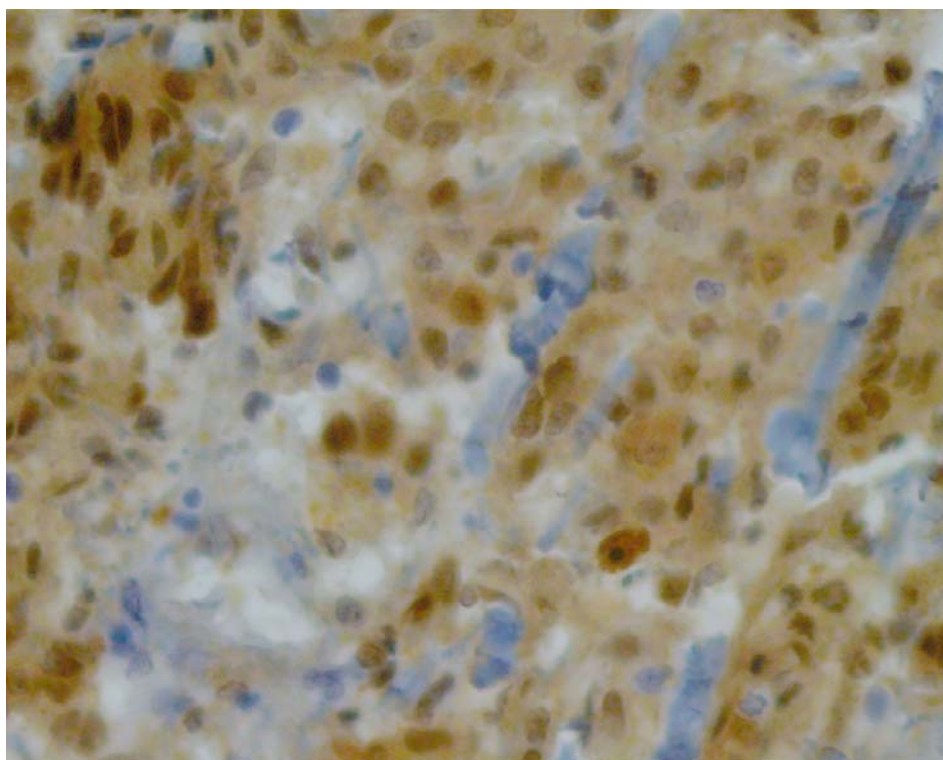


**Figura 11** – Controle negativo para as imunorreações – p16 (20x) paciente 16.

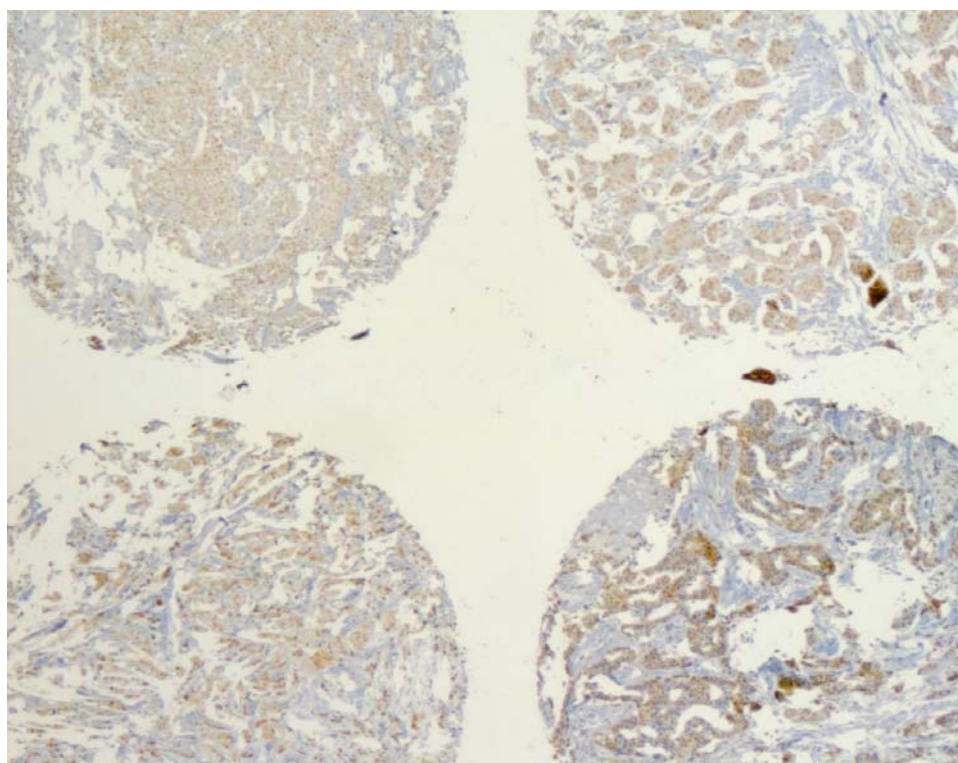


**Figura 12** – Controle negativo para as imunorreações – p16 (40x) paciente 24.

---



**Figura 13** – Imunorreação positiva para p16 (40x) paciente 4.

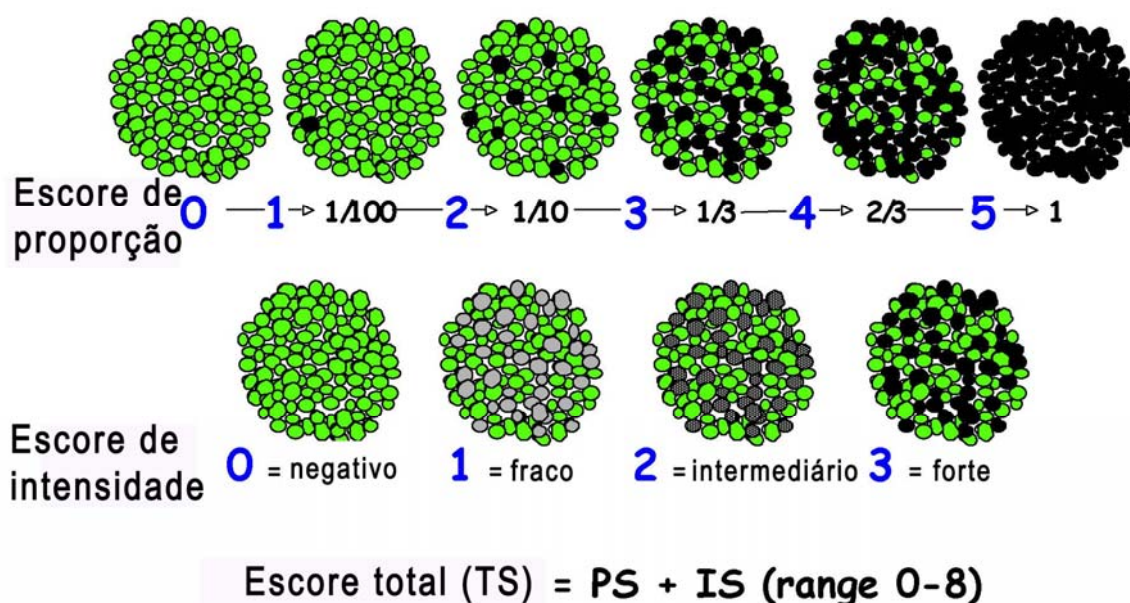


**Figura 14** – Imunorreação para receptores de estrógeno em TMA (20x).

---

### 3.2.3 Método semiquantitativo para avaliação da imunorreação do gene p16

A imunorreação do p16 foi avaliada de forma semiquantitativa, seguindo-se os critérios utilizados por Allred para os casos positivos. Utilizou-se um sistema de avaliação com dois parâmetros principais adotados: a intensidade da coloração das células e a fração de células neoplásicas coradas (Allred et al., 1998) (Figura 15):



**Figura 15** – Método de Allred para avaliação imunistoquímica de cortes histológicos.

Quanto à intensidade da coloração, empregou-se a classificação do Quadro 1, com pontuação variável de zero a três (Quadro 2):

**Quadro 2** – Escala de avaliação quanto à intensidade da coloração das células

INTENSIDADE	ESCORE
Negativo	Zero
Fracamente corado	1
Moderadamente corado	2
Fortemente corado	3

Com relação à quantidade ou fração de células coradas em cada lâmina, empregou-se a classificação do quadro 3, adotando-se uma pontuação variável de zero a cinco. Estes dois parâmetros foram empregados para cada imunorreação:

**Quadro 3** – Escala de avaliação quanto à fração de células coradas

<b>FRAÇÃO DE CÉLULAS</b>	<b>ESCORE</b>
Ausência de células coradas	Zero
<1/100	1
>1/100 <1/10	2
>1/10 <1/3	3
>1/3 <2/3	4
>2/3	5

A soma destes dois escores parciais resultou num escore final que poderia ser zero quando negativo e entre dois e oito nos casos positivos.

### **3.2.4 Método estatístico**

Para a análise estatística foi utilizado um protocolo de cálculos específicos para cada situação. Foi definido um erro alfa de 0,05 para todos os testes, ou seja, um Intervalo de Confiança de 95%.

As freqüências de p16 entre os grupos, tanto tratadas como controles (placebo), foram calculadas de forma simples, em percentuais, considerando-se os casos positivos sobre o total dos casos. Comparou-se a imunorreação de p16 antes e depois do tratamento com tamoxifeno, anastrozol e com os controles (placebos) e de igual forma também foi feita esta comparação para os casos controle nas amostras iniciais e as obtidas no momento da cirurgia. Para comparar as medidas (positivo e negativo) entre tempos e grupos foi utilizado o GEE (General Estimating Equations). Para comparar as medidas (medida) entre tempos e grupos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas com transformação por postos,

buscando encontrar mudança de comportamento entre as amostras pareadas, em dois momentos distintos de um mesmo indivíduo.

Os escores das imunorreações de p16 foram categorizados em negativo (escore = zero ou um) ou positivo (escore 2 ou 3) e os escores para imunorreações de receptores de estrógeno e progesterona foram categorizados como negativo (escore entre 0 e 2) e positivo (escore entre 3 e 8) e analisados através do teste Exato de Fisher.

---



## **4. RESULTADOS**

---

---

Com as amostras das 58 pacientes efetivamente incluídas no estudo foram montados dois blocos distintos de TMA, um contendo as amostras colhidas para avaliação em todas as amostras no momento pré, ou seja, no diagnóstico e avaliação clínica inicial onde foram colhidos os dados e realizadas as biópsias incisionais das pacientes, e outro distinto onde foram alocadas as amostras pós-tratamento. Em ambos os espécimes avaliou-se a expressão do gene p16.

Para comparar as medidas categóricas (positivo e negativo) entre tempos e grupos foi utilizado o teste estatístico GEE (General Estimating Equations). Foi considerado um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Ao analisar a tabela 1, a positividade do p16 variou de 22 para 17%, respectivamente pré e pós tratamento com anastrozol; de 8 para 4% no grupo placebo e não houve variação, com 7% de positividade no grupo que recebeu tamoxifeno. A comparação entre grupos e tempos não apresentou relação significativa para o p16 ( $p=0,17$ ).

**Tabela 1** – Positividade do p16 nos três grupos pré e pós-tratamento (anastrozol, placebo e tamoxifeno)

	Pré		Pós	
	Positivo	Total	Positivo	Total
A	4 22%	18	3 17%	18
P	2 8%	25	1 4%	25
T	1 7%	15	1 7%	14
Total	7 12%	58 100%	5 9%	57 100%

Variáveis	p-valor
Grupo	0,1713
Tempo	0,6246
Grupo x Tempo	0,9225

Na comparação entre os grupos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

**Tabela 2** – Expressão de p16 nos grupos (anastrozol, tamoxifeno e placebo)

<b>Comparação entre Grupos</b>	<b>p-valor*</b>
A x P	0,0658
A x T	0,1166
P x T	1,0000

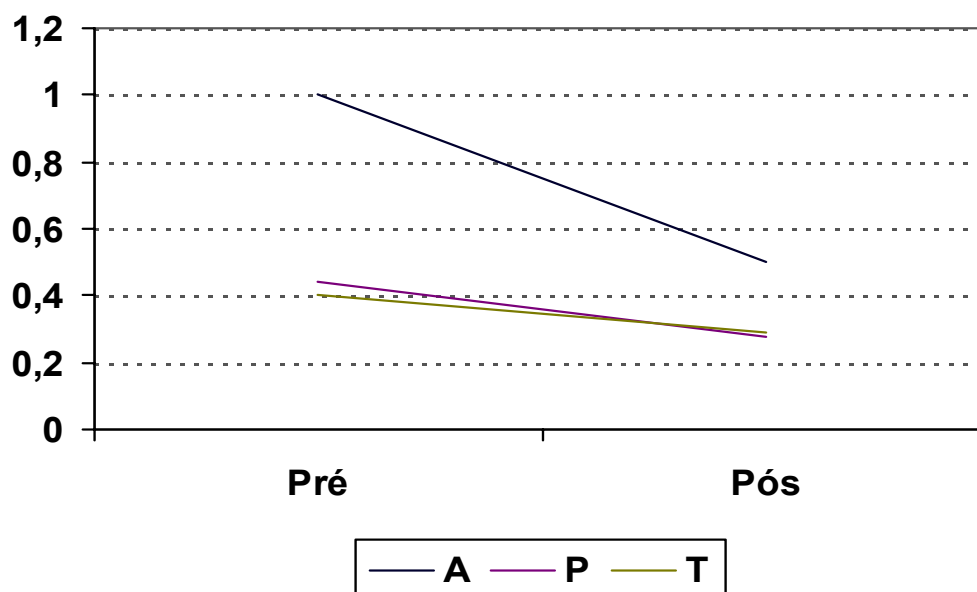
\* p-valor corrigido para comparações múltiplas (Bonferroni)

Ao compararmos os grupos que receberam anastrozol e tamoxifeno com placebo não houve diferença significativa entre os tempos (Tabela 3).

A expressão pré de p16 foi significativamente maior ( $p=0,02$ ) nos três grupos estudados (Figura 16).

**Tabela 3** – Comparação da variação de expressão do p16 entre grupos e tempos, agrupando-se os grupos anastrozol e tamoxifeno frente ao grupo placebo

<b>Variável</b>	<b>Tempo</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
p16	Pré	P	25	0,44	0,65	0	0	2
		A/T	33	0,73	0,80	0	1	3
		Total	58	0,60	0,75	0	0	3
p16	Pós	P	25	0,28	0,54	0	0	2
		A/T	32	0,41	0,71	0	0	2
		Total	57	0,35	0,64	0	0	2
<b>Variáveis</b>	<b>p-valor</b>		Diferença significativa da medida entre tempos					
Grupo	0,1524							
Tempo	0,0289							
Grupo x Tempo	0,4067							



**Figura 16** – Expressão gráfica da comparação entre os grupos (anastrozol, tamoxifeno e placebo) e tempos (pré e pós tratamento).

Entretanto, não foi encontrada diferença significativa na expressão pré e pós por grupos (Tabela 4).

**Tabela 4** – Análise da variação da expressão do p16 e comparação entre os grupos anastrozol e tamoxifeno em relação ao grupo placebo

		Pré/ Pós			Total
		Aumenta	Igual	Diminui	
Grupo	P	3 12%	15 60%	7 28%	25
	A+T	5 16%	13 41%	14 44%	32
	Total	8 14%	28 49%	21 37%	57 100%

Teste Exato de Fisher: p-valor = 0,3556

Na análise comparativa de expressão entre os receptores de estrógeno e progesterona com o p16 ( $p=0,2$ ) não foi encontrada relação estatística significativa.

## **5. DISCUSSÃO**

---

---

A descoberta e introdução da terapêutica hormonal com tamoxifeno foi um dos mais importantes fatores responsáveis pela redução da mortalidade nas pacientes com câncer de mama. Esta droga mostrou-se eficaz também na redução da taxa de recidiva local, aumento do intervalo livre de doença e redução na incidência de carcinoma contralateral (Fisher et al., 1989; Fisher et al., 1998).

Nas últimas décadas, os inibidores da aromatase surgiram como uma alternativa ao tamoxifeno, no tratamento hormonal adjuvante e paliativo de pacientes na pós-menopausa, com câncer de mama com receptores hormonais positivos. Essas drogas agem bloqueando a atividade da aromatase, tornando os níveis circulantes de estrógenos praticamente indetectáveis.

Entretanto, o mecanismo de ação destas drogas não está ainda totalmente estabelecido, e um dos objetivos deste estudo foi verificar se existe alguma relação entre a exposição in vivo de células tumorais ao tamoxifeno e ao anastrozol com alguns reguladores da proliferação celular que pudessem sinalizar preditividade de resposta e prognóstico.

Estabelecer marcadores preditivos de resposta terapêutica bem como fatores prognósticos necessita estudos clínicos prolongados, avaliando intervalo livre de doença e sobrevida. A definição de que pacientes RE+ se beneficiam de terapia antiestrogênica mudou a evolução da doença em um grupo de pacientes com câncer de mama, mas existe um subgrupo que não obtém o benefício esperado.

Uma vez que o tamoxifeno e o anastrozol estão ligados ao complexo mecanismo de proliferação e apoptose celular, definir alguma proteína como marcador preditivo de resposta traria vantagens em definir o subgrupo não responsivo. Contudo, um marcador tem valor preditivo apenas se sua expressão ou ausência sinalizar sensibilidade a uma determinada terapia.

Pela escassez de dados na literatura em relação a expressão de p16 e terapia endócrina neoadjuvante, buscou-se no presente estudo avaliar a expressão do gene p16 antes e após a exposição ao tamoxifeno e anastrozol por curto período (26 dias), comparando-se com um grupo controle (placebo).

Neste estudo, buscou-se qualificar a positividade das imunorreações de uma forma mais objetiva, associando dois critérios: a intensidade de

---

coloração e a fração de células coradas sobre as amostras, adotando-se o escore de Allred (Allred et al., 1998; Harvey et al., 1999).

Para cálculo da variação das médias, os grupos foram avaliados separadamente, antes e após 26 dias. O estudo buscou demonstrar diferença na expressão de p16 entre os tratamentos neoadjuvantes utilizados, mas não encontrou diferença entre os grupos ( $p=0,17$ ).

Estes resultados estão de acordo com a literatura se comparados ao estudo de Ichikawa et al., em 2008, que estudaram após quatro dias de endocrinoterapia não demonstrando alteração na expressão da proteína do gene p16. Este resultado poderia ser atribuído ao tempo de exposição à medicação (Ichikawa et al., 2008).

Em nosso estudo houve tendência para redução no grupo tratado com anastrozol ( $p=0,06$ ), o que significaria dizer que talvez, com um número maior de pacientes estudadas ou com aumento no tempo de tratamento houvesse redução significativa.

Pela escassez de dados na literatura relacionando inibidores de aromatase e p16, fica clara a necessidade de mais estudos.

O que poderia ser questionado é se existe alguma diferença entre as amostras pelo fato de serem obtidas em margens tumorais opostas ou trauma cirúrgico justificando a pequena redução do biomarcador nos três grupos. A manipulação prévia do tumor talvez desencadeasse liberação de fatores teciduais de ação intracelular com interferência no ciclo celular, modificando a expressão da proteína p16.

Uma maneira de responder a essas dúvidas seria a pesquisa de RNA mensageiro (RNAm) em material tumoral fresco, que explicaria se houve falha nos comandos celulares para efetivação da produção protéica, se realmente não houve incentivo nuclear (à partir do DNA) para desencadear a produção da proteína ou se apenas não ocorreu o período celular necessário para que houvesse a expressão antigênica. Em tumores, a expressão fisiológica pode ser comprometida, tornando-se irregular e heterogênea.

Como a superexpressão do p16 se relaciona com prognóstico desfavorável poderia se inferir uma correlação com os receptores de estrogênio

---

e progesterona. Entretanto, a expressão do p16 não variou significativamente em nosso estudo onde foram analisadas apenas amostras RE ou RP positivas. Estes achados estão em concordância com a literatura onde também não houve evidência de correlação entre a expressão de p16 e o status hormonal (Feng et al., 2007).

Ressalte-se que embora o p16 tenha sido relacionado à positividade do receptor de estrogênio, não houve variação conforme a intensidade da expressão nos grupos RE e RP positivos. No nosso estudo não foi possível fazer tal comparação já que não foram incluídos tumores receptores negativos (Munot et al., 2006).

Em síntese, a pouca variação na positividade da proteína p16 após uma exposição in vivo ao tamoxifeno e ao anastrozol por 26 dias, induz a uma reflexão sobre a possibilidade de que a alteração desta proteína não ocorra de forma precoce na resposta celular precoce da endocrinoterapia. É possível que tal proteína seja destituída de valor preditivo de resposta precoce à endocrinoterapia.

Futuros estudos com métodos moleculares poderão esclarecer dúvidas suscitadas a respeito do tempo de exposição à droga necessária para interferir nos biomarcadores e proteínas oriundas da transcrição gênica relacionadas com a proliferação celular.

---



## **6. CONCLUSÕES**

---

---

- Não houve diferença significativa na expressão de p16 entre os grupos anastrozol, tamoxifeno e placebo comparando-se as amostras pré tratamento e pós tratamento.
  - A expressão de p16 foi significativamente menor após a biopsia.
  - Não houve correlação entre a expressão de p16 e o status hormonal dos receptores de estrógeno e progesterona.
-

## **7. ANEXOS**

---

---

## Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – EPM



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 7 de março de 2008  
**CEP 1880/07**

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) ALEXANDRE SANTOS MELITTO

Co-Investigadores: André Mattar, Yong Kyun Joo, Ricardo João Gonzalez, Luis Henrique Gebrim

Disciplina/Departamento: Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Análise imunohistoquímica de marcadores tumorais em câncer de mama submetido à hormonioterapia neoadjuvante comparação entre tamoxifeno anastrozol e placebo”**.

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Retrospectivo - blocos de parafina.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Sem risco, utilizando material estocado.

**OBJETIVOS:** Determinar, através da análise imuno-histoquímica, a ação de diferentes drogas relacionadas direta ou indiretamente com o estrogênio e seu receptor, ou ainda sua ação por vias independentes, com foco principal no estudo da via da ciclina D1..

**RESUMO:** Estudo retrospectivo, analisando material estocado em parafina de 90 mulheres menopausadas com diagnóstico de câncer de mama que foram randomizadas em 3 grupos com 30 pacientes cada: 1- placebo, 2- tamoxifeno, 3- anastrozol, que participaram de um estudo anterior ( CEP nº 0904/04). Serão realizadas reações imuno-histoquímicas para receptores hormonais, proliferação celular e apoptose, no material parafinado obtido no período de julho de 2004 a fevereiro de 2007..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudo retrospectivo, analisando marcadores tumorais em blocos de parafina. Apresenta as cartas de aprovação dos CEPs do estudo do qual serão utilizados as amostras estocadas. Este estudo visa analisar por imuno-histoquímica, receptores hormonais, proliferação celular e apoptose em amostras de fragmentos de mama de pacientes submetidos a tratamento com tamoxifeno, anastrozol e placebo.

**MATERIAL E MÉTODO:** Foram atendidas as pendências emitidas pelos relatores, descrevendo de forma adequada, a metodologia empregada..

**TCLE:** apresenta justificativa conforme Res 347/05.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo.

**CRONOGRAMA:** 24 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Mestrado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 7/3/2009 e 7/3/2010.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.


1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 1880/07

**Anexo 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – EPM**

 **UNIFESP**  
**PAULISTA**  
**ESCOLA DE MEDICINA**

Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 5 de novembro de 2004  
**CEP 0904/04**

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) **ANDRÉ MATTAR**  
Disciplina/Departamento: Ginecologia da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Estudo do efeito da endocrinoterapia neoadjuvante na expressão de marcadores tumorais em carcinomas mamários. Comparação entre tamoxifeno e anastrozole”.**

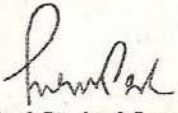
Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **05/novembro/2005**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **05/novembro/2006**.

Atenciosamente,



**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

“Resaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa.”

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil  
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

**Anexo 3 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Pérola Byington**



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE**  
Centro de Referência da Saúde da Mulher

**Comitê de Ética em Pesquisa**

**TÍTULO DO ESTUDO : “Efeitos da terapia neoadjuvante com inibidor de aromatase nos receptores hormonais nas pacientes com câncer de mama.”**

**Ref: PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA**

O Protocolo de Pesquisa Clínica “Efeitos da terapia neoadjuvante com inibidor de aromatase nos receptores hormonais nas pacientes com câncer de mama.”o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido , foram avaliados por este Comitê de Ética em Pesquisa e considerados **APROVADOS** sem restrições.

Para tal aprovação, foram seguidas as exigências das Resoluções nacionais 196/96 e 251/97, relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos. No presente projeto, foram devidamente enfatizados itens que correspondem ao objetivo do Estudo e seu racional; antecedentes científicos justificáveis; adequação dos materiais e métodos; análise criteriosa de riscos e benefícios; referência bibliográfica pertinente; responsabilidade do pesquisador na condução do estudo, bem como possibilidade de interrupção do estudo no caso em que se verifiquem riscos aos voluntários.

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da legislação 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio de relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo. Solicitamos que este CEP seja informado quando da inclusão do primeiro paciente.

Atenciosamente

**Dr. Jorge Yoshimori Shida**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do CRSM



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
Centro de Referência da Saúde da Mulher

**Comitê de Ética em Pesquisa**

São Paulo, 30 de março de 2006.

**FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

DATA DA APROVAÇÃO : 29/03/06

TÍTULO DO ESTUDO: "Efeitos da terapia neoadjuvante com inibidor de aromatase nos receptores hormonais nas pacientes com câncer de mama."

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. André Mattar

**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ,tendo sido a referida aprovação constado em ata.

**Dr. Jorge Yoshinori Shida**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do CRSM



**Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**“Estudo dos efeitos farmacodinâmicos do tamoxifeno e dos inibidores de aromatase (Arimidex<sup>R</sup>) em pacientes com câncer de mama.”**

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinada, fui esclarecida sobre o objetivo do presente estudo e eventuais desconfortos que poderei sofrer.

Confirmando ter revisado o conteúdo de informação precedente, relativo ao estudo a que estou concedendo a minha participação por livre e espontânea vontade.

Estou ciente dos propósitos do estudo, dos procedimentos a serem realizados, desconforto e riscos, vantagens e benefícios, bem como a garantia do sigilo total de minha participação e esclarecimentos permanentes durante a pesquisa. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo, sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Data: \_\_/\_\_/\_\_.

Assinatura da paciente ou representante legal: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_.

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

Eu, André Mattar, declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido da paciente acima ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_  
Assinatura do pesquisador

---

## Informações ao Paciente

O câncer de mama é hoje um dos tumores mais freqüentes entre as mulheres. A dificuldade em se prevenir e fazer o diagnóstico precocemente faz do tratamento uma importante etapa no combate desta doença.

Os inibidores de aromatase (Arimidex<sup>®</sup>) bem como o tamoxifeno são alguns dos principais medicamentos utilizados no tratamento hormonal do câncer mamário. Face à sua eficácia quer na prevenção ou no tratamento, inúmeros são os estudos utilizando estes medicamentos objetivando entender melhor sua ação.

O objetivo do presente estudo é avaliar a ação dos inibidores de aromatase (Arimidex<sup>®</sup>) em comparação ao tamoxifeno em etapas iniciais do seu tratamento no câncer de mama.

Para tanto, contaremos com pacientes portadoras de câncer de mama, que deverão ser submetidas à biópsia (pequena cirurgia para retirada de um fragmento do tumor) para fazer o diagnóstico. Uma vez confirmado o diagnóstico de carcinoma mamário, será realizado o planejamento do seu tratamento. Não tomar nenhum medicamento não irá prejudicar em nada o prognóstico das pacientes já que rotineiramente não prescrevemos nenhum medicamento pré-operatório.

As pacientes que participarem do estudo deverão tomar o Arimidex<sup>®</sup> ou o tamoxifeno uma vez ao dia por 25 dias antes do tratamento cirúrgico (mastectomia ou quadrantectomia) ou não tomar nenhum medicamento, que é o que ocorre normalmente com as pacientes que não participam do estudo.

Ressaltamos que todas as pacientes receberão tratamento habitual para a doença, de acordo com o protocolo adotado na instituição.

Como todo medicamento, podem ocorrer efeitos indesejáveis, dentre os quais se destacam as ondas de calor, cefaléias, náuseas, tonturas e prurido vulvar. Quando estes medicamentos são utilizados por tempo prolongado podem provocar tromboembolismo, além de osteoporose no caso dos inibidores de aromatase e câncer de endométrio no caso do tamoxifeno.

A participação neste trabalho é totalmente voluntária sendo que toda paciente poderá desistir de sua participação na pesquisa em qualquer momento do estudo. Lembramos que a recusa na participação do estudo não resultará em perda dos benefícios ao tratamento médico instituído no serviço.

Não haverá custos adicionais na participação desta pesquisa médica. Tanto para a obtenção de medicamentos quanto para a realização de exames inerentes ao estudo.

Caso ocorra a necessidade de tratamento de eventuais efeitos colaterais resultantes da medicação em estudo, este será prontamente instituído e realizado no Hospital São Paulo, sem qualquer custo para a paciente.

Sua participação será confidencial, não sendo revelada em momento algum a sua identidade. Caso você queira tomar ciência do andamento do estudo ou de qualquer outra informação a respeito do trabalho, poderá ser solicitado para qualquer responsável do estudo.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida em relação à ética do projeto de estudo poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa que fica na Rua Botucatu 572, 1º andar, conj. 14 ou pelo telefone 5539-7162.

Este estudo está sendo realizado na Disciplina de Mastologia da Universidade Federal de São Paulo sob responsabilidade do Dr. André Mattar, Dr. Yong Kyun Joo e do Prof. Dr Luiz Henrique Gebrim.

---

**Anexo 5** – Análise estatística (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máxima) das variáveis clínicas das pacientes incluídas no estudo

Variável	Grupo	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	Máximo
Idade	A	17	62,82	8,67	42	66	73	0,1089
	P	25	69,48	7,74	56	70	85	
	T	15	64,73	13,13	43	64	87	
	Total	57	66,25	9,95	42	67	87	
Tamanho do Tumor	A	17	3,59	0,67	2,5	4	5	0,1257
	P	25	4,34	1,29	2,5	4	8	
	T	15	3,90	0,87	2,5	4	6	
	Total	57	4,00	1,06	2,5	4	8	
Menarca	A	17	13,47	1,74	10	14	16	0,3659
	P	25	12,84	1,65	9	13	16	
	T	14	12,71	1,68	10	12,5	15	
	Total	56	13,00	1,68	9	13	16	
Menopausa	A	17	48,71	6,23	40	50	60	0,8643
	P	25	47,88	5,09	39	50	55	
	T	14	47,50	5,30	40	49	55	
	Total	56	48,04	5,43	39	50	60	
Filhos	A	17	2,53	2,55	0	2	9	0,4163
	P	25	4,08	3,79	0	3	13	
	T	15	3,00	3,05	0	2	9	
	Total	57	3,33	3,29	0	3	13	
Idade do Primeiro Filho	A	17	18,35	12,36	0	19	42	0,8731
	P	25	17,88	9,84	0	21	30	
	T	15	15,53	12,14	0	20	31	
	Total	57	17,40	11,10	0	20	42	
Altura	A	17	158,06	5,74	149	158	167	0,6229
	P	25	156,38	7,31	139	155	169	
	T	15	155,90	5,57	144,5	156	165	
	Total	57	156,75	6,39	139	156	169	
Peso	A	17	68,58	12,32	41,5	69,5	94	0,9988
	P	25	69,51	18,39	40	70,3	120	
	T	15	69,63	15,72	52	63,8	104	
	Total	57	69,26	15,82	40	69,5	120	
IMC	A	17	27,54	5,21	17,27	28,72	36,36	0,9566
	P	25	28,46	7,58	16,65	29,36	53,33	
	T	15	28,45	4,99	21,99	27,61	38,67	
	Total	57	28,18	6,23	16,65	28,62	53,33	

**Anexo 6 – Pacientes excluídas do estudo por falta de dados.**

<b>Casos excluídos</b>	
6	A
8	T
9	A
13	A
15	A
20	T
34	T
40	T
48	T
49	P
59	A
61	T

**Anexo 7 – Média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo das pacientes.**

<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
Idade	57	66,25	9,95	42	67	87
Tamanho do Tumor	57	4,00	1,06	2,5	4	8
Menarca	56	13,00	1,68	9	13	16
Menopausa	56	48,04	5,43	39	50	60
Filhos	57	3,33	3,29	0	3	13
Altura	57	156,75	6,39	139	156	169
Peso	57	69,26	15,82	40	69,5	120
IMC	57	28,18	6,23	16,6	28,6	53,3
CQ	57	101,22	10,90	79	102	128
CA	57	97,11	15,48	68	97	160

**Anexo 8 – Estadiamento clínico das pacientes, tipo histológico e grau SBR.**

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
TNM		
T2N0	33	58%
T2N1	15	26%
T2N2	1	2%
T3N1	1	2%
T3N2	1	2%
T4bN0	1	2%
T4bN1	3	5%
T4bN2	2	4%
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>100%</b>

**Estadio Clínico**

2A	34	60%
2B	14	25%
3A	3	5%
3B	6	11%
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>100%</b>
TH/G		
CDI 1	2	4%
CDI 2	38	76%
CDI 3	6	12%
CLI 1	1	2%
CLI 2	2	4%
CLI 3	1	2%
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>100%</b>

**Anexo 9** – Escore de Allred do p16, Receptor de Estrógeno e Receptor de Progesterona, nos momentos pré e pós tratamento nos grupos anastrozol, tamoxifeno e placebo.

Paciente	Grupo	p16		R. Estrógeno		R. Progesterona	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
3	P	1	1	8	8	7	8
4	A	2	2	7	8	7	7
5	T	0	0	8	7	8	8
7	A	1	0	6	7	7	8
12	P	2	0	8	6	8	8
16	P	0	0	7	8	0	5
17	P	1	0	8	7	8	8
18	A	1	0	8	7	7	2
19	P	1	1	6	6	2	0
21	T	0	2	8	8	7	7
22	A	1	0	7	8	2	0
23	T	0	1	7	7	7	6
24	A	0	0	8	8	0	0
25	P	0	0	5	4	8	8
26	T	1	0	8	8	0	2
28	P	0	0	7	6	0	0
29	A	1	0	8	8	0	0
31	T	1	0	8	7	0	6
32	P	1	0	7	8	4	6
35	T	1	0	5	8	8	8
37	T	0	0	7	7	8	8
38	A	1	1	8	7	0	0
39	P	0	0	7	8	6	6
41	P	0	0	5	6	2	0
42	P	1	0	8	8	8	8
43	A	1	0	8	7	8	0
44	A	0	0	7	8	7	8
45	P	0	0	8	7	8	0
46	P	0	0	8	8	7	5
47	T	1	0	7	6	6	6
50	A	1	1	7	6	0	0
51	P	0	0	7	7	6	6
52	P	0	2	8	8	8	8
53	A	2	0	7	8	0	0
56	P	0	0	4	7	5	7

Continua...

...continuação

Paciente	Grupo	p16		R. Estrógeno		R. Progesterona	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
57	P	1	0	8	8	8	8
58	P	0	0	8	8	4	5
62	T	2	0	6	8	8	8
63	A	1	2	8	8	2	0
64	A	3	2	8	0	7	0
66	A	0	0	8	0	7	0
67	P	0	0	0	0	6	7
69	T	0	0	7	5	7	8
70	P	1	0	7	8	0	0
73	T	0	1	8	7	2	7
74	P	0	1	5	7	6	8
75	T	0	0	5	6	6	7
77	P	2	1	7	8	6	7
78	T	0	0	7	4	7	6
80	A	0	0	8	7	7	6
81	P	0	0	8	7	4	0
83	A	0	1	3	3	0	0
84	A	1	0	8	8	7	4
85	P	0	0	4	7	0	7
86	A	2	0	7	8	8	0
87	P	0	1	7	4	7	0
88	T	0	0	6	5	7	6
89	T	0	0	8	6	0	8

**Anexo 10 – Receptores de estrógeno - frequência e percentual.**

	Pré		Pós	
	N	%	N	%
<b>Estrógeno</b>				
0	1	2%	3	5%
2	0	0%	0	0%
3	1	2%	1	2%
4	2	3%	3	5%
5	5	9%	2	3%
6	4	7%	8	14%
7	19	33%	17	29%
8	26	45%	24	41%
Total	58	100%	58	100%

**Estrógeno - Classificação**

Negativo	1	2%	3	5%
Positivo	57	98%	55	95%
Total	58	100%	58	100%

**Anexo 11 – Receptores de progesterona – frequência e percentual**

	Pré		Pós	
	N	%	N	%
<b>Progesterona</b>				
0	13	22%	19	33%
2	5	9%	2	3%
3	0	0%	0	0%
4	3	5%	1	2%
5	1	2%	3	5%
6	7	12%	9	16%
7	16	28%	8	14%
8	13	22%	16	28%
Total	58	100%	58	100%

**Progesterona - Classificação**

Negativo	18	31%	21	36%
Positivo	40	69%	37	64%
Total	58	100%	58	100%



**Anexo 12 – P16 frequência e porcentual**

	Pré		Pós	
	N	%	N	%
<b>p16</b>				
0	31	53%	42	74%
1	20	34%	10	18%
2	6	10%	5	9%
3	1	2%	0	0%
Total	58	100%	57	100%
<b>p16 - Classificação</b>				
Negativo	51	88%	52	91%
Positivo	7	12%	5	9%
Total	58	100%	57	100%

Para comparar as medidas (medida) entre tempos e grupos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas com transformação por postos. Houve diferença significativa da medida considerando os grupos e tempo. No momento pré a medida de p16 é significativamente maior do que no momento pós.

**Anexo 13 – Teste ANOVA para p16**

Variável	Tempo	Grupo	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
p16	Pré	A	18	1,00	0,84	0	1	3
		P	25	0,44	0,65	0	0	2
		T	15	0,40	0,63	0	0	2
		Total	58	0,60	0,75	0	0	3
p16	Pós	A	18	0,50	0,79	0	0	2
		P	25	0,28	0,54	0	0	2
		T	14	0,29	0,61	0	0	2
		Total	57	0,35	0,64	0	0	2
<b>Variáveis</b>		<b>p-valor</b>						
Grupo		0,0421						
Tempo		0,0220						
Grupo x Tempo		0,4048						

**Anexo 14 – Pré/ Pós (positivo e negativo) por grupo (A, T e P)**

		Pré/ Pós			Total
		Neg/ Pos	Igual	Pos/ Neg	
<b>Grupo</b>	A	1 6%	15 83%	2 11%	18 100%
	P	1 4%	22 88%	2 8%	25 100%
	T	1 7%	12 86%	1 7%	14 100%
	Total	3 5%	49 86%	5 9%	57 100%

Teste Exato de Fisher: p-valor = 1,0000

**Anexo 15 – Pré/ Pós (positivo e negativo) por grupo (A/T e P).**

		Pré/ Pós			Total
		Neg/ Pos	Igual	Pos/ Neg	
<b>Grupo</b>	P	1 4%	22 88%	2 8%	25 100%
	A/T	2 6%	27 84%	3 9%	32 100%
	Total	3 5%	49 86%	5 9%	57 100%

Teste Exato de Fisher: p-valor = 1,0000

**Anexo 16 – Pré/ Pós (escore) por grupo (A, T e P).**

		Pré/ Pós			Total
		Aumenta	Igual	Diminui	
Grupo	A	2	7	9	18
		11%	39%	50%	100%
	P	3	15	7	25
		12%	60%	28%	100%
	T	3	6	5	14
		21%	43%	36%	100%
	Total	8	28	21	57
		14%	49%	37%	100%

Teste Exato de Fisher: p-valor = 0,5464

**Anexo 17 – Análise estatística e correlação entre expressão do p16 e receptor de estrógeno.**

Variáveis	p-valor
Grupo	0,2782
Tempo	0,7003
R. Estrógeno	0,3918
Grupo x Tempo	0,2115
Grupo x R. Estrógeno	0,2048
Tempo x R. Estrógeno	0,3296

**Anexo 18 – Análise estatística e correlação entre expressão do p16 e receptor de progesterona.**

Variáveis	p-valor
Grupo	0,2394
Tempo	0,5698
R. Progesterona	0,9903
Grupo x Tempo	0,6940
Grupo x R. Progesterona	0,5828
Tempo x R. Progesterona	0,8916

## **8. REFERÊNCIAS**

---

---

- 
- Abrial C, Mouret-Reynier MA, Cure H, Feillel V, Leheurteur M, Lemery S, Le Bouedec G, Durando X, Dauplat J, Chollet P. Neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Breast* 2006;15(1):9-19.
- Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11(2):155-68.
- Andrade VPC, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *J Bras Patol Med Lab.* 2007;43(1):55-60.
- Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(17):1254-61.
- Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, Sahmoud T. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002;359(9324):2131-9.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-96.
- Brenner AJ, Paladugu A, Wang H, Olopade OI, Dreyling MH, Aldaz CM. Preferential loss of expression of p16(INK4a) rather than p19(ARF) in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2(12):1993-8.
- Cameron DA, Ritchie AA, Miller WR. The relative importance of proliferation and cell death in breast cancer growth and response to tamoxifen. *Eur J Cancer.* 2001;37:1545-53.
- Canepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, Ogara MF. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 2007;59(7):419-26.
- Carlson RW, Brown E, Burstein HJ, Gradishar WJ, Hudis CA, Loprinzi C, et al. NCCN Task Force Report: Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2006;4(1):S1-26.
- Carpenter R. Choosing early adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone-sensitive breast cancer: aromatase inhibitors versus tamoxifen. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(7):746-55.
- Cataliotti L, Buzdar AU, Noguchi S, Bines J, Y Takatsuka, Petrakova K, Dube P, Oliveira CT. Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: the Pre-Operative "Arimidex" Compared to Tamoxifen (PROACT) trial. *Cancer.* 2006;106(10):2095-103.
- Cheung KL. Endocrine therapy for breast cancer: an overview. *Breast.* 2007;16(4):327-43.
- Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2001;344(4):276-85.
-

- 
- Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol.* 2007;25(5):486-92.
- Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer." *N Engl J Med.* 2004;350(11):1081-92.
- Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones SE, et al. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;369(9561):559-70.
- Cooper GM. (Ed.) *The cell cycle. The cell: a molecular approach.* 1997.
- Cotran RK, Robbins V (Ed.). *Robbins Basic Pathology.* Philadelphia, WB Saunders. 2003.
- Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, Salvi S, Casciano I, Gelvi I, et al. p16(INK4a) promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma. *Int J Cancer.* 2005;114(3):414-21.
- Dirks PB, Rutka JT. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review. *Neurosurgery.* 1997;40(5):1000-13; discussion 1013-5.
- Dixon JM, JH. Anastrozole demonstrates clinical and biological effectiveness in erb-B2 ER positive breast cancers. 2002;San Antonio: abstr. 263.
- Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, Boeddinghaus I, et al. Biomarker changes during neoadjuvant anastrozole, tamoxifen, or the combination: influence of hormonal status and HER-2 in breast cancer- a study from the IMPACT trialists. *J Clin Oncol.* 2005;23(11):2477-92.
- EBCTCG. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet.* 1992;339 (8784):1-15.
- EBCTCG. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 1998;351(9114):1451-67.
- Emig R, Magener A, Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, Wallwiener D, Sinn HP. Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation. *Br J Cancer.* 1998;78(12):1661-8.
- Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet.* 2001;10(26):3001-7.
- Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002;196(1):1-7.
-

- 
- Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, Huan S, et al. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):R57.
- Fisher B. Re: tamoxifen prevention of breast cancer: an instance of the fingerpost." *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(8):659-60.
- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(18):1371-88.
- Fisher B, Dignam J, Bryant J, Wolmark N. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer: updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(9): 684-90.
- Fisher B, et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med.* 1989;320(8):479-84.
- Fisher B, Powles TJ, Pritchard KJ. Tamoxifen for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer.* 2000;36(2):142-50.
- Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol.* 2002;20(3):751-7.
- Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(19):1793-802.
- Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(5):1474-81.
- Hayes DF. Markers of endocrine sensitivity. *Breast Cancer Res.* 2008;10 Suppl 4: S18.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995;55(20):4525-30.
- Honoki K, Tsujiuchi T, Mori T, Yoshitani K, Tsutsumi M, Takakura Y, Mii Y. Expression of the p16INK4a gene and methylation pattern of CpG sites in the promoter region in rat tumor cell lines. *Mol Carcinog.* 2004;39(1):10-4.
- Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hochtin-Boes G, Houghton J, Locker GY, Tobias JS. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet.* 2005;365(9453):60-2.
-

- 
- Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JF, Sutherland RL. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2000;6(7):2777-87.
- Ichikawa A, Ando J, Suda K. G1 arrest and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in tamoxifen-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Hum Cell*. 2008;21(2):28-37.
- Instituto Nacional do Câncer - INCA, M.d.S. (2008). *Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil [monograph online]*.
- Ito Y, Kobayashi T, Takeda T, Nakano Y, Tamaki Y, Komoike Y, et al. Expression of p16 and cyclin-dependent kinase 4 proteins in primary breast carcinomas. *Oncology*. 1997;54(6):508-15.
- Janczukowicz J. The prognostic role of proliferation activity in human CNS tumours: the determination of AgNOR, PCNA and Ki-67 expression. Part 1: AgNOR expression in CNS tumours. *Folia Neuropathol*. 2003;41(2):97-101.
- Jonat W, Gnant M, Boccardo F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I, Greenwood M, Jakesz R. Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2006;7(12):991-6.
- Jordan VC. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;31(1):41-52.
- Jordan VC. Estrogen receptor as a target for the prevention of breast cancer. *J Lab Clin Med*. 1999;133(5):408-14.
- Jordan VC, Dowse LJ. Tamoxifen as an anti-tumour agent: effect on oestrogen binding. *J Endocrinol*. 1976;68(02):297-303.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994;264(5157):436-40.
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus." *Nat Genet*. 1994;8(1):23-6.
- Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(8):606-16.
- Kim SY, Laxmi YR, Suzuki N, Ogura K, Watabe T, Duffel MW, Shibutani S. Formation of tamoxifen-DNA adducts via O-sulfonation, not O-acetylation, of alpha-hydroxytamoxifen in rat and human livers. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(11):1673-8.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
-



- 
- Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7(4):257-69.
- Lajtha LG. On the Concept of the Cell Cycle. *J Cell Physiol*. 1963;62:SUPPL1:143-5.
- Leblond CP. Classification of Cell Populations on the Basis of Their Proliferative Behavior. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1964;14:119-50.
- Lee A, Park WC, Yim HW, Lee MA, Park G, Lee KY. Expression of c-erbB2, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. *Jpn J Clin Oncol*. 2007;37(9):708-14.
- Licznar A, Caporali S, A Lucas, Weisz A, Vignon F, Lazennec G. Identification of genes involved in growth inhibition of breast cancer cells transduced with estrogen receptor. *FEBS Lett*. 2003;553(3):445-50.
- Liu T, Niu Y, Feng Y, Niu R, Yu Y, Lv A, Yang Y. Methylation of CpG islands of p16(INK4a) and cyclinD1 overexpression associated with progression of intraductal proliferative lesions of the breast. *Hum Pathol*. 2008;39(11):1637-46.
- McDermott KM, Zhang J, Holst CR, Kozakiewicz BK, Singla V, Tlsty TD. p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells." *PLoS Biol*. 2006;4(3):e51.
- Merlo P, Fulco M, Costanzo A, Mangiacasale R, Strano S, Blandino G, Taya Y, Lavia P, Levrero M. A role of p73 in mitotic exit. *J Biol Chem*. 2005;280(34):30354-60.
- Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B, Loning T. Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype." *Breast Cancer Res Treat*. 2001;67(1):61-70.
- Morena AM, Oshima CT, Gebrim LH, Egami MI, Silva MR, Segreto RA, Giannotti Filho O, Teixeira VP, Segreto HR. Early nuclear alterations and immunohistochemical expression of Ki-67, Erb-B2, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF-beta1) and integrine-linked kinase (ILK) two days after tamoxifen in breast carcinoma. *Neoplasma*. 2004;51(6):481-6.
- Munot K, Bell SM, Lane S, Horgan K, Hanby AM, Speirs V. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2006;37(8):989-99.
- Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, et al. p16INK4 mutations and altered expression in human tumors and cell lines. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:49-57.
- Osborne C, Tripathy D. Aromatase inhibitors: rationale and use in breast cancer. *Annu Rev Med*. 2005;56:103-16.
- Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;51(3):227-38.
- Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res*. 1983;43(8):3583-5.
-

- 
- Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol*. 2000;18(17):3172-86.
- Patel RR, Sharma CG, Jordan VC. Optimizing the antihormonal treatment and prevention of breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14(2):113-22.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
- Piccart MJ, Cardoso F, Atalay G. Letrozole's superiority over progestins and tamoxifen challenges standards of care in endocrine therapy for metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2002;38 Suppl 6:S52-4.
- Ponzzone R, Montemurro F, Maggiorotto F, Robba C, Gregori D, Jacomuzzi ME, et al. Clinical outcome of adjuvant endocrine treatment according to PR and HER-2 status in early breast cancer. *Ann Oncol*. 2006;17(11):1631-6.
- Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori*. 2008;94(3):370-83.
- Roy PG, Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. *Breast*. 2006;15(6):718-27.
- Rudas M, Lehnert M, Huynh A, Jakesz R, Singer C, S Lax, Schippinger W, et al. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14(6):1767-74.
- Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, et al. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer*. 2006;118(9):2190-4.
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*. 1998;153(6):1741-8.
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int*. 1998;48(8):580-5.
- Sapino A, Marchio C, Senetta R, Castellano I, Macri L, Cassoni P, et al. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch*. 2006;449(3):288-96.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704-7.
- Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5108-16.
- Stendahl M, Ryden L, Nordenskjold B, Jonsson PE, Landberg G, Jirstrom K. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006;12(15):4614-8.
-

- 
- Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1983;19(5):615-21.
- Thuerlimann B, Koeberle D, Senn HJ. Guidelines for the adjuvant treatment of postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: past, present and future recommendations." *Eur J Cancer*. 2007;43(1):46-52.
- Ueki T, Hsing AW, Gao YT, Wang BS, Shen MC, Cheng J, Deng J, Fraumeni Jr. JF, Rashid A. Alterations of p16 and prognosis in biliary tract cancers from a population-based study in China. *Clin Cancer Res*. 2004;10(5):1717-25.
- Watts CK, Sweeney KJ, Warlters A, Musgrove EA, Sutherland RL. Antiestrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;31(1):95-105.
- WHO (2008). World health statistics annual.
- Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN, et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):619-29.
- Wogan GN. Review of the toxicology of tamoxifen. *Semin Oncol*. 1997;24(1 Suppl 1): S1-87-S1-97.
- Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast." *J Pathol*. 2001;194(1):35-42.
- Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Nobori T, Yim SF, Lai KW, Phil M, Yu AL, Diccianni MB, Li TZ, Chang AM. p16INK4 and p15INK4B alterations in primary gynecologic malignancy. *Gynecol Oncol*. 1997;65(2):319-24.
- Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;354(3):270-82.
- Yoshida N, Omoto Y, Inoue A, Eguchi H, Kobayashi Y, Kurosumi M, Saji S, Suemasu K, et al. Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer Sci*. 2004;95(6):496-502.
- Zhao Y, Zhang S, Fu B, Xiao C. Abnormalities of tumor suppressor genes P16 and P15 in primary maxillofacial squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;112(1):26-33.
-

## Abstract

**Background:** Frequent deletions or mutations of the INK4 gene, which encodes the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16INK4a, have been documented in various human cancers, but little is known about the role of this tumor suppressor gene in primary breast cancer and there is a lack in the literature about its expression behavior in neoadjuvant endocrinotherapy with tamoxifen or anastrozole. **Objective:** Analysis of p16INK4a expression in patients with invasive ductal carcinomas (IDC) prior to tamoxifen and anastrozole neoadjuvant treatment and possible correlation between predictive and prognostical factors – estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR). **Methods:** We examined p16INK4a mRNA expression and its relationship with short period (26 days) neoadjuvant endocrine therapy with tamoxifen and anastrozole in 58 primary breast cancers with palpable ER-positive IDC. They were double-blind randomized in three neoadjuvant treatment groups for 21 days: Anastrozole 1mg/day (n= 17), Placebo (n=25) and Tamoxifen 20mg/day (n=15). Biomarkers status (ER, PgR and p16) were obtained by comparing single immunohistochemical evaluation of pre and post-surgery samples using Allred's method. Statistical analyses were performed using the SPSS software for Windows. **Results:** Variation in p16 was 22% to 17% in anastrozole group, 8% to 4% in placebo group and there was no variation in tamoxifen group, standing in 7%. There was no significant statistical difference in p16INK4a expression among the three groups (p=0.17). Variation in p16 was 12% to 9% (p<0.05) when considering the three groups together. There was a significant decrease of p16 expression in pre and post surgery results. There was no significant statistical correlation between p16 expression and hormonal status (RE and RP). **Conclusions:** There was no significant statistical difference in p16INK4a expression among the three groups. There was a significant statistical decrease in p16INK4a expression when compared pre and post surgery values. These findings could indicate that expression of p16 and variation in pre and post surgery samples are associated with hormone responsiveness and mechanisms of resistance. There were no significant statistical correlation between p16 expression and hormonal status (RE and RP). Further studies are necessary to understand their functional interrelationships and whether high p16INK4a expression may be associated with a lack of hormone responsiveness in breast cancer.

**Key-words:** breast cancer, postmenopausal women, tamoxifen, anastrozole, p16INK4a.

## **Bibliografia Consultada**

Abrahamsohn P. Redação Científica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 2004.

Fonseca JS, Martins GA. "Curso de Estatística". 3ª ed. São Paulo: Atlas; 1982.

Holanda AB. Novo dicionário da Língua Portuguesa. 3ª Ed. Positivo; 2004.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª Ed. São Paulo; 2005.

Silva, MO. O Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa: o que muda e o que não muda. São Paulo; 2009.

# 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](#)