Índice

Índice 1

Agradecimentos 2

Resumo 3

Introdução 6

Quimioterapia neo-adjuvante 7

Avaliação da resposta à quimioterapia 9

Quimiorresistência 11

P glicoproteína e MRP1 13

Mamocintigrafia com Sestamibi-Tc99m 15

Cox-2, Ki 67, p53, Bcl 2 16

Objectivos 19

Material e métodos 20

Resultados 27

Discussão 42

Conclusões 52

Referências Bibliográficas 53

Apêndice 60

Agradecimentos

Aos Srs Dra Teresa Silva, Dra Ana Paula Moreira, Dr José Mário Ruivo, cuja colaboração foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao seu orientador, Sr. Professor Carlos de Oliveira e à sua co-orientadora, Mestre Dulce Raimundo.

Ao CIMAGO, que financiou o trabalho, com o projecto nº 29/04 .

Resumo

A quimioterapia neoadjuvante (QTNA) permite a avaliação *in vivo* da quimiossensibilidade das células tumorais. A glicoproteína P (Pgp) promove o efluxo do citostático da célula tumoral impedindo a acumulação intracelular. A expressão da Pgp antes da QT com substratos da Pgp parece relacionar-se com a taxa de resposta ao tratamento. O Sestamibi-Tc99m é eliminado da célula pela via Pgp e a sua excreção está aumentada nos cancros com aumento de expressão dos genes *multidrug resistance* (MDR), que codificam a Pgp.

No carcinoma da mama foi sugerida a existência de correlação positiva entre a expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) e o MDR1. O celecoxib, inibidor da COX-2, já foi utilizado com sucesso em associação com citostáticos no tratamento do cancro da mama.

O objectivo primário deste trabalho foi o de avaliar o valor preditivo de resposta à quimioterapia da expressão da Pgp no fragmento de biópsia e da mamocintigrafia feita com Sestamibi-Tc99m, ambas realizadas antes do início da QT. Os objectivos secundários foram os de correlacionar a expressão da Pgp com a da COX-2 e avaliar o valor preditivo de resposta à quimioterapia de outros marcadores, como as proteínas p53, Bcl 2 e Ki67.

Foi feito um estudo prospectivo, para o qual foram recrutadas 47 doentes com carcinoma da mama, com diagnóstico e tratamento realizados no Serviço de Ginecologia dos Hospitais Universidade de Coimbra, de acordo com os protocolos deste serviço, com indicação para quimioterapia neoadjuvante, que realizaram mamocintigrafia com Sestamibi-Tc99m, antes do início da QT. No fragmento de biópsia foram estudadas a expressão da Pgp, da COX-2, da p53, da Bcl 2 e da Ki67. Foi avaliada a resposta à quimioterapia na peça de cirurgia.

Neste trabalho não se encontrou correlação entre a taxa de expressão da Pgp e a resposta à quimioterapia; não se encontrou diferença nos tempos de eliminação do Sestamibi-Tc99m nas doentes com e sem resposta à QT nem nas doentes com e sem expressão da Pgp. Não se encontrou correlação entre a expressão da COX-2 e da Pgp. Comparando os grupos de doentes que não tiveram resposta clínica à QT com os que tiveram resposta patológica completa, há a sugestão de diferença na expressão da Pgp e do tempo de eliminação do Sestamibi-99 Tc m. Nenhuma das proteínas estudadas mostrou relação com a resposta à quimioterapia.

Neste trabalho, não se conseguiu evidenciar o valor preditivo de resposta à quimioterapia neo-adjuvante da Pgp. A mamocintigrafia com Sestamibi-Tc99m não parece ser uma técnica útil para prever a resposta à quimioterapia.

No entanto, pela relevância clínica, era importante aumentar o número de casos para verificar a diferença entre os grupos de ausência de resposta clínica e o de resposta patológica completa.

Abstract

Neoadjuvant chemotherapy permits *in vivo* evaluation of the chemosensitivity of tumour cells. P glycoprotein (Pgp) prevents cancer cell accumulation of some chemotherapeutic agents. Analysis of Pgp expression before chemotherapy with Pgp substracts seems to be correlated with treatment response. Sestamibi-Tc99m washout is increased in breast cancers that overexpress *multidrug resistance* (MDR) genes, which codes for Pgp.

A positive correlation between cyclooxygenase 2 (COX-2) and MDR1 expression was also suggested. Celecoxib, a COX-2 inhibitor, has been successfully used in breast cancer treatment.

The primary endpoint of the present study was to evaluate the predictive value of chemotherapy response to both Pgp expression in biopsy specimens and Sestamibi-Tc99m washout from tumour in mammoscintigraphy performed before treatment. Secondary endpoints intended to correlate Pgp and COX-2 expressions and to evaluate p53, Bcl 2 and Ki67 expression in predicting treatment response.

A prospective study was carried out in the Department of Gynecology of the University Hospital of Coimbra with 47 breast carcinoma patients, according to the diagnostic and treatment protocols of the unit. Patients were submitted to a tumour biopsy and to a mammoscintigraphy before neoadjuvant chemotherapy. In the biopsy specimen it was studied Pgp, COX-2, p53, Bcl 2 and Ki67 expressions. Chemotherapy response was evaluated in the surgical breast specimen.

No correlation was found between Pgp expression and chemotherapy response; no difference was found between 99m Tc-Sestamibi T 1/2 washout time of chemotherapy

responders and no responders or between tumours with and without Pgp expression. Comparing tumours without clinic response with tumours with complete pathologic response there is a suggestion of Pgp expression difference between this groups and between 99m Tc- Sestamibi T 1/2 washout time.

None of the others studied proteins were found to be correlated with chemotherapy response.

We can conclude that Pgp expression is not correlated with chemothearpy response and that 99m Tc-Sestamibi mammoscintigraphy is not a reliable technique to predict response to therapy. It would be important to have a bigger sample to show if there is a true difference between tumours with a clinic response and tumours without a complete pathologic response.

O cancro da mama é o tumor maligno mais frequente na mulher e tem tido incidência crescente (Joaquim Gouveia 1993; Laranja Pontes 2001).

A taxa de mortalidade global tem diminuído (Giordano SH 2004). Para tal tem contribuído a maior precocidade no diagnóstico e /ou a maior eficácia dos tratamentos adoptados.

A maior acuidade na caracterização histológica e molecular do cancro da mama, com a utilização sistemática de marcadores moleculares com valor preditivo de resposta ao tratamento, tem permitido maior adequação e individualização terapêutica. É hoje obrigatória a caracterização do carcinoma da mama no que respeita a expressão dos receptores de estrogénios (RE), de progesterona (RP) e do factor de crescimento HER2. Os tumores que expressam receptores hormonais têm menor taxa de resposta clínica e patológica completa após quimioterapia primária quando comparados com os tumores que não expressam estes receptores (Bonnefoi H, Potti A et al. 2007). A expressão do receptor do factor de crescimento HER2 é preditiva da resposta ao anticorpo monoclonal anti–HER2, o Trastuzumab (Bonnefoi H 2009).

A quimioterapia sistémica permite melhorar a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, quer seja realizada a título primário ou adjuvante (Bonnefoi H, Potti A et al. 2007). No cancro da mama inicial, a quimioterapia com regimes que incluam antraciclinas ou a combinação ciclofosfamida, metotrexato e fluouracilo (CMF) reduzem significativamente o risco de recorrência e morte (Group. 1998). Porém, 20 a 30% das doentes têm recorrência tumoral (Matthew J Ellis 2004). O prognóstico do cancro recorrente também melhorou nos últimos anos, o que demonstra o impacto

das novas terapêuticas (Bonnefoi H 2009) (Arveux P, Grosclaude P et al. 2003).

Não há, ainda, forma de predizer a resposta à quimioterapia sistémica e são conhecidos mecanismos de resistência que fazem que os mesmos fármacos tenham diferente eficácia no tratamento de tumores aparentemente iguais (S Cleator 2002). A quimioterapia pré-operatória permite a avaliação *in vivo* da quimiossensibilidade das células tumorais.

Quimioterapia neo-adjuvante

Nos carcinomas da mama localmente avançado (CMLA) e inflamatório, o uso da quimioterapia primária ou neo-adjuvante (QTNA) mostrou induzir a regressão tumoral e facilitar o controlo local posterior por cirurgia e radioterapia (Penault-Llorca 2003; Gralow J R, Burstein H J et al. 2008). Pode reduzir o tamanho do tumor em 80 a 90% das doentes com carcinoma da mama e produzir resposta patológica completa em 20% (Sapunar F 2000; O'Driscoll L 2006). Assim, a quimioterapia pré-operatória é o tratamento padrão no grupo de doentes com CMLA (Chia S 2008; Gralow J R, Burstein H J et al. 2008).

Nos carcinomas da mama grandes operáveis (CMGO) (estádio II), a realização de QTNA permite obter controlo da doença a longo prazo sobreponível ao da quimioterapia adjuvante, havendo a sugestão de que tratamentos sistémicos pré e pós-operatórios são semelhantes nos resultados no intervalo livre de doença e sobrevivência global (By Jos A. van der Hage, Cornelis J.H. van de Velde et al. 2001) (Gralow J R, Burstein H J et al. 2008). Tem a vantagem de permitir a avaliação individual da quimiossensibilidade tumoral e aumentar a taxa de cirurgias conservadoras (Bonadonna G,

Brusamolino E et al. 1998; By Jos A. van der Hage, Cornelis J.H. van de Velde et al. 2001; Gralow J R, Burstein H J et al. 2008). Associa-se a taxa de resposta completa de 28% usando regime terapêutico com antraciclinas e taxanos (Frutuoso C, Henriques I et al. 2007).

Os fármacos utilizados a título neoadjuvante reflectem a evolução da terapêutica da doença metastática e adjuvante. As antraciclinas e os taxanos são os citostáticos mais eficazes no cancro da mama metastático com taxas de resposta em monoterapia de 35 a 50% (Matthew J Ellis 2004).

O mecanismo de acção das antraciclinas é sobretudo a inibição das topoisomerases II, enzima fundamental na replicação, reparação e transcrição do ADN (Edward Chu 2006). Os taxanos têm acção sobre as células em fase M, inibindo a formação do fuso mitótico por estabilização dos polímeros da tubulina, conduzindo a morte celular (Michael C Perry 2000).

Esquemas terapêuticos com antraciclinas permitiram melhorar as taxas de sobrevivência aos 10 anos em mais 25%, quando comparados com terapia local exclusiva e reduzem o risco anual de recorrência em 12% e o risco anual de morte em 11% quando comparados com o regimes com CMF (A'Hern R P 1993; O'Driscoll L 2006; Gralow J R, Burstein H J et al. 2008) (Fisher B 1990). Em relação aos taxanos, o estudo do *Breast Cancer International Research Group* 001 (BCIRG) mostrou diferença estatisticamente significativa na sobrevivência livre de doença com a associação de docetaxel, doxorrubicina e ciclofosfamida (TAC), quando comparada com a de ciclofosfamida, doxorrubicina e fluorouracilo (CAF), em regime adjuvante na doença operável com gânglios positivos (Miguel Martin, Tadeusz Pienkowski et al. 2005) (Henderson IC, Berry DA et al. 2003). Na terapêutica pré-operatória, a adição de taxanos às antraciclinas melhorou as taxas de resposta patológica completa; no entanto, não foi demonstrado que este facto permita uma melhoria

clinicamente significativa no prognóstico a longo prazo (Bear HD, Anderson S et al. 2006; Gralow J R, Burstein H J et al. 2008).

Avaliação da resposta à quimioterapia

A monitorização da resposta ao tratamento, quer na mama, quer na axila, deve ser feita durante a quimioterapia pré-operatória, sendo particularmente importante a identificação de progressão da doença por implicar mudança na estratégia de tratamento. Esta avaliação é classicamente realizada pela clínica e pela imagem e há alguma relação destas com a resposta patológica final (Smith IC 2002) (Amat S, Bougnoux P et al. 2003).

Vários estudos mostraram que o grau de resposta tumoral e a extensão do tumor residual depois da quimioterapia pré-operatória têm valor preditivo para recorrência e sobrevivência (Fisher B and Cruz 1998; Kuerer HM 1999; Carey LA, Dees et al. 2005). As mulheres que têm resposta patológica completa após QTNA têm uma sobrevivência global significativamente melhor do que as têm tumor residual (Smith IC 2002). As células que persistem no tumor residual após QTNA são resistentes à quimioterapia e as responsáveis pela recorrência (S Cleator 2002).

Não há, no entanto, nenhum sistema de classificação da resposta à quimioterapia que seja considerado padrão.

O *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) e o Instituto do Cancro de Milão apenas consideram a resposta na mama (Carey LA, Dees et al. 2005). Porém, quando não há doença invasiva residual na mama, o número de gânglios envolvidos é inversamente proporcional à sobrevivência, pelo que a resposta nos gânglios deve ser considerada (Symmans, Peintinger et al. 2007).

Kuerer *et al*, do MDAnderson Hospital, consideram a resposta na mama e na axila (Kuerer HM 1999).

Carey *et al* fizeram um estudo com 132 doentes com doença nos estádios clínicos IIA a IIIB no qual aplicaram o sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), revisto em 2003, às peças de cirurgia após quimioterapia pré-operatória e concluíram que este sistema é útil para predizer as recorrências e a sobrevivência (Carey LA, Dees et al. 2005).

Em nenhum dos sistemas referidos se estabelece relação com o estadiamento clínico pré-quimioterapia.

W Fraser Symmans *et al* propõem uma fórmula para avaliar o tumor residual que tem em consideração os dois maiores diâmetros do tumor residual, a proporção de carcinoma invasivo residual no leito tumoral primário, o número de gânglios invadidos e o tamanho da maior metástase ganglionar (Symmans, Peintinger et al. 2007). Esta fórmula permite definir subgrupos de prognóstico diferentes no conjunto dos doentes com tumor residual após quimioterapia e aponta para uma diferença na taxa de recorrência à distância de 48,2% entre os grupos com doença residual mínima e com doença residual extensa.

Jeruss *et al* propõem um modelo de avaliação de resposta que engloba o estadiamento clínico pré-quimioterapia e o estadiamento patológico após quimioterapia, associados ou não aos receptores de estrogénios e grau nuclear. Define 5 subgrupos de resposta aos quais se associam diferentes taxas de recorrência à distância aos 5 anos (tabela I) (Jeruss, Mittendorf et al. 2008).

A padronização do método de avaliação de resposta à quimioterapia pode permitir definir grupos que beneficiem de terapêutica adjuvante sistémica, nomeadamente com citostáticos de grupos diferentes dos utilizados na quimioterapia neo-adjuvante (Jeruss, Mittendorf et al. 2008).

Quimiorresistência

O desenvolvimento de um fenótipo *multidrug resistance* (MDR) é uma das maiores limitações ao tratamento actual do cancro da mama (Leonessa and Clarke 2003). É um fenómeno pelo qual a resistência a um fármaco pode resultar em resistência cruzada a outros citostáticos de diferente estrutura molecular, conduzindo ao fenótipo MDR (Yusuf, Duan et al. 2003).

O fenómeno da resistência clínica, em relação ao experimental, é mais complexo, de natureza multifactorial e é provável que estejam envolvidos vários mecanismos (Fojo AT 2005). A resistência pode surgir por mecanismos farmacológicos, multicelulares ou celulares (Leonessa and Clarke 2003). Os mecanismos farmacológicos dizem respeito à maior ou menor facilidade do citostático chegar à célula. Os mecanismos multicelulares estão relacionados com a estrutura tridimensional do tumor e incluem alterações na permeabilidade ao fármaco e no micro-ambiente extra-celular, por modificações de pH ou hipóxia, por exemplo. Os celulares incluem mecanismos que interferem com a capacidade do citostático chegar ao alvo intra-celular, por promoção do efluxo do fármaco ou por diminuição do influxo na célula; mecanismos que regulam a activação/inactivação do citostático; alterações qualitativas ou quantitativas da molécula alvo e alterações nas vias que regulam a resposta celular ao efeito do citostático, promovendo ou inibindo a apoptose, por exemplo. Alguns destes mecanismos, no entanto, tendem a ser alvo específicos, conferindo resistência a um número mais limitado de citostáticos, como por exemplo as antraciclinas e as alterações na topoisomerase II (O'Driscoll L 2006). Mas, por outro lado, cada célula tumoral pode ter mais do que um mecanismo de resistência (O'Driscoll L 2006). Para as antraciclinas são conhecidos como mecanismos de resistência, o aumento de expressão do gene MDR, a diminuição da

expressão ou mutação da topoisomerase II e o aumento da expressão das enzimas glutatião transferase (Edward Chu 2006). Para os taxanos, além do fenótipo MDR com aumento da expressão da Pgp, é possível a ocorrência de alterações na estrutura da tubulina e consequente diminuição da afinidade dos taxanos pela mesma (Edward Chu 2006).

A família ATP-binding cassete (ABC) de proteínas de transporte da membrana celular promove o fenótipo MDR por mecanismos celulares que interferem com a chegada do citostático ao alvo intracelular, já que induz o efluxo do citostático da célula e impede a acumulação intracelular (Leonessa and Clarke 2003). Por outro lado, a expressão destas proteínas de transporte em compartimentos intracelulares pode ser responsável por sequestro do citostático na célula e consequente impedimento de acesso ao alvo (O'Driscoll L 2006).

As células podem ser intrinsecamente resistentes (resistência intrínseca) ou adquirirem resistência depois da exposição aos citostáticos (resistência adquirida) (Fojo AT 2005). Um tratamento com citostáticos óptimo pode eliminar quase todas as células dos tumores sólidos, mas pode haver uma pequena percentagem de células, consideradas ser as *stem cells* do cancro (CSC), que são quimiorresistentes, possivelmente pelo elevado teor em proteínas transportadoras do grupo ABC e consequente aumento do efluxo celular do citostático (Dean M 2005). Esta pequena fracção de células permanece quiescente na fase G0, até que, devido a qualquer estímulo associado à morte celular, estas células quiescentes são induzidas a dividirem-se e a produzir células progenitoras. Algumas destas células progenitoras vão diferenciar-se em células tumorais maduras com o fenótipo quimiorresistente. Este é o modelo aceite para a resistência adquirida no cancro da mama (Dean M 2005).

Todas as proteínas da família ABC partilham um *ATP –binding domain* de 200-250 aminoácidos (nucleotide-binding domain: NBD), intracelular e tem uma

estrutura básica que incluem o NBD e um domínio transmembranar hidrofóbico (TMD) (Leonessa and Clarke 2003). Estas proteínas têm actividade ATPase e transportam diferentes substratos através da membrana ou entre compartimentos celulares (Leonessa and Clarke 2003). Os substratos, apesar de estruturalmente diferentes, são geralmente hidrofóbicos. Pensa-se que os substratos entram na célula por difusão passiva permitida pelo gradiente de concentração através da membrana e que são eliminados utilizando o NBD para hidrólise do ATP, como fonte de energia.

O fenótipo MDR é multifactorial e a família ABC de proteínas de transporte é apenas um dos mecanismos proteicos mais estudado (Fojo AT 2005). A Pgp foi a primeira proteína do grupo ABC a ser identificada; posteriormente outras foram identificadas, como a *multidrug resistance protein* (MRP1) e a *breast cancer resistance protein* (BCRP), por exemplo.

P glicoproteína e MRP1

A Pgp é uma proteína de transporte de membrana que pertence ao grupo B da família ABC. Na espécie humana, distinguem-se duas Pgp codificadas por genes MDR 1 (ABCB1) e MDR 2 (ABCB2), respectivamente Pgp 1 e Pgp 2 (Macus Tien Kuo, Patrick Bednarski et al. 2009).

O gene humano MDR1 está expresso na mucosa intestinal, fígado, pâncreas, rim, córtex supra-renal, placenta, sistema nervoso central, testículos e sangue; o MDR 2 aparece sobretudo no fígado e rim (Macus Tien Kuo, Patrick Bednarski et al. 2009) (Leonessa and Clarke 2003).

A Pgp/ MDR1 foi detectada em tecido mamário normal quer como proteína quer como mRNA (Leonessa and Clarke 2003).

Quer a Pgp quer a MRP1, outra proteína de transporte da família ABC com funções semelhantes às da Pgp, têm funções fisiológicas no organismo. Alguns estudos sugerem que ambas possam ter um papel na protecção do organismo das concentrações extremas de toxinas internas e externas, através da regulação da sua absorção, distribuição e excreção (Leonessa and Clarke 2003).

Os substratos da Pgp são vários, como as antraciclinas, os alcalóides vinca, macrólidos, os taxanos, alguns péptidos, quinolonas, esteróides, catiões organometálicos como o Sestamibi-Tc99m e outros, mas só a Pgp 1 é que funciona como transportador de citostáticos (Leonessa and Clarke 2003; Macus Tien Kuo, Patrick Bednarski et al. 2009).

A MRP1 não afecta o transporte dos taxanos, em particular do paclitaxel.

Os trabalhos feitos *in vitro* que mostram resistência ao citostático nas linhas celulares do tumor primário que expressam Pgp são escassos e heterogéneos na metodologia mas são consistentes ao mostrar uma correlação entre a resposta à doxorrubicina e a expressão da Pgp, dando suporte ao papel da Pgp na prática clínica (Leonessa and Clarke 2003).

Têm sido feitos estudos com o objectivo de mostrar se a Pgp tem valor preditivo de resposta à quimioterapia e ou valor de prognóstico.

A presença de Pgp antes do tratamento neo-adjuvante com citostáticos que sejam substratos desta proteína, parece correlacionar-se com a taxa de respostas patológicas completas ao tratamento (Verrelle, Meissonnier et al. 1991; Chevillard S, Pouillard et al. 1996; Leonessa and Clarke 2003); pelo contrário, nos casos em que se utilizam fármacos que não sejam substratos da Pgp, a presença da Pgp não parece correlacionar-se com a taxa de respostas (Leonessa and Clarke 2003).

A ser reconhecido o valor clínico da Pgp, a sua expressão podia ser utilizada na selecção de esquemas terapêuticos mais eficazes, recorrendo, por exemplo, a fármacos que não fossem substratos da Pgp ou inibidores da função da Pgp.

Mamocintigrafia com Sestamibi-Tc99m

As técnicas de imagem da medicina nuclear, em relação às outras técnicas de imagem, fornecem informações adicionais sobre a função da célula. O Sestamibi-Tc99m é um catião lipofílico marcado com Tecnesium primariamente usado na avaliação da perfusão do miocárdio (Wackers, Berman et al. 1989).

Vários estudos mostraram o influxo passivo do Sestamibi-Tc99m, que é um catião, em resposta aos potenciais negativos das membranas citoplasmática e mitocondrial e a acumulação reversível nas mitocôndrias (Freedman 2004; Travaini LL, Baio SM et al. 2007). A sua captação está aumentada em regiões de actividade mitocondrial aumentada, podendo ser usada na detecção do cancro, nomeadamente o da mama (Delmon-Moingeon LI 1990; Freedman 2004; Travaini LL, Baio SM et al. 2007).

O Sestamibi-Tc99m é excretado da célula pela via Pgp (Hendrikse, Franssen et al. 1999) (Bae K T and D. 1997) (Piwnica-Worms D, Chiu ML et al. 1993; Travaini LL, Baio SM et al. 2007). A sua excreção está aumentada nos cancros da mama com sobreexpressão dos genes MDR 1 e MDR2 (Freedman 2004).

Há estudos *in vitro* e *in vivo* que mostram que há uma relação inversa entre os níveis de Pgp e a captação e tempo de eliminação do Sestamibi-Tc99m (Mansi, Rambaldi et al. 1997) (Vecchio, Ciarmiello et al. 1997; Liu T J, Tsai SC et al. 2002).

Ciarmiello mostrou haver resposta patológica completa à epirrubicina em apenas 2 de 17 (12%) doentes com cancro da mama que tiveram uma rápida eliminação do Sestamibi-Tc99m do tumor em comparação com 14 de 22 (64%) dos que apresentaram eliminação lenta (Ciarmiello A, Del Vecchio S et al. 1998). Takeuchi teve resultados semelhantes com um grupo de 25 doentes (Takeuchi, Fukumoto et al. 2002).

Cayre *et al* mostraram, num grupo de 45 doentes, que a não captação do Sestamibi-Tc99m se associava a falta de resposta à QT com antraciclinas, quer clínica quer patológica (Cayre A, Cachin F et al. 2002). Massardo *et al*, num grupo de 34 doentes, mostraram que a relação entre a fixação do Sestamibi-Tc99m no tumor e no tecido mamário normal era significativamente mais alta nas doentes com resposta a QT com doxorrubicina, do que nas que não obtiveram resposta (Massardo, Alonso et al. 2002).

Há duas razões para que a mamocintigrafia seja mais eficaz a prever a resposta à quimioterapia do que a determinação simples da Pgp: a determinação do tempo de eliminação é uma avaliação funcional, não fornecida pela simples determinação da expressão da Pgp que pode apresentar expressão forte e não ser funcional. Por outro lado, o Sestamibi Tc99m é substrato não só da MDR1 mas também da MRP1 (Leonessa and Clarke 2003).

Cox-2, Ki 67, p53, Bcl 2

A COX-2 é uma enzima chave na via de síntese dos prostanóides. É reconhecido o papel desta enzima na carcinogénese, pela promoção da angiogénese e inibição da apoptose (Ruggeri, Sciacchitano et al. 2006). A expressão da COX-2 na mama está associada ao tamanho do tumor, à metastização axilar, aos receptores hormonais negativos e a pior prognóstico

(Maria Chiara Zatelli, Andrea Luchin et al. 2007). O celecoxib, um inibidor selectivo da COX-2, já foi usado no carcinoma da mama em associação com tratamento adjuvante com 5-fluoruracilo, epirrubicina e ciclofosfamida (FEC) mostrando maior eficácia do que a quimioterapia isolada (Chow LW 2003).

Ratnasinghe *et al* sugerem a possibilidade de correlação entre a expressão da COX-2 e o MDR1/Pgp no carcinoma da mama (Ratnasinghe D, Daschner PJ et al. 2001). Sugere que o *stress* celular induzido pela quimioterapia induz a COX-2 e a produção de prostaglandina E2 (PGE_2) e, por mecanismos de transdução de sinal, a expressão da MDR1/Pgp.

O Ki 67 é um marcador da actividade proliferativa da célula. A sua expressão é máxima durante a mitose mas tem expressão em todas as fases do ciclo celular, ainda que com diferentes graus de intensidade (Urruticoechea, Smith et al. 2005). Tem uma boa correlação com outros marcadores da proliferação celular como a fracção de células em fase S avaliada por citometria de fluxo ou o índice mitótico. No cancro da mama, há uma relação inversa entre a intensidade de expressão dos receptores RE e a positividade do Ki 67 (Colleoni M 2004) (Urruticoechea, Smith et al. 2005) (Carey LA, Dees EC et al. 2007). Há uma relação positiva com o grau histológico (Bottini A, Berruti A et al. 2001) (Trihia, Murray et al. 2003) (Urruticoechea, Smith et al. 2005). A maior quimiossensibilidade atribuída aos tumores RE negativos ou HER2 positivos é atribuída à sobre-expressão de genes de proliferação (Gianni L, Zambetti M et al. 2005) (Carey LA, Dees EC et al. 2007). Muitos investigadores mostraram que elevada actividade proliferativa se associa a melhor resposta à quimioterapia a curto prazo mas a pior evolução a longo prazo (Ravaioli, Bagli et al. 1998) (Parton M, Krajewska M et al. 2002). Urruticoechea sugere que a estratificação dos doentes de acordo com o grau de marcação da Ki 67 possa ajudar na definição do significado clínico da resposta à QTNA (Urruticoechea, Smith et al. 2005) .

A via da p53 é um dos mecanismos de supressão tumoral mais importante nos mamíferos. Encontram-se alterações na sinalização da p53 em mais de metade dos cancros na espécie humana (Macus Tien Kuo, Patrick Bednarski et al. 2009). A via da p53 pode ser activada por uma larga variedade de sinais internos e externos, incluindo destruição do DNA por radiações gama e ultravioleta, hipóxia, fármacos, activação de oncogenes, etc. O papel da p53 na quimiorresistência tem sido explorado em culturas celulares e em sistemas *in vivo*. Estudos iniciais *in vitro* mostraram que a p53 suprimia a expressão da MDR1 e da MRP1 (Scotto 2003; Macus Tien Kuo, Patrick Bednarski et al. 2009). No entanto, os efeitos da expressão da p53 na quimioterapia são complexos e há estudos clínicos que mostram correlação da p53 mutada com quimiorresistência e outros com quimiossensibilidade (Wallace-Brodeur RR 1999; Fojo 2005).

A maioria dos citostáticos usados na clínica induz a apoptose e há mecanismos envolvidos na resistência à quimioterapia que interferem com a cascata da apoptose activada pela quimioterapia (Hickman 1992). A família de proteínas Bcl regula a via mitocondrial da apoptose e há proteínas desta família, como a Bcl 2, que inibem a apoptose e outras, como a Bax, que promovem a indução da apoptose por numerosos citostáticos (Kamesaki, Kamesaki et al. 1993; Miyashita and Reed 1993). A Bcl-2 está sobre-expressada em 80% dos cancros da mama. A sobre-expressão da Bcl-2 protege muitas células da apoptose e é controverso o papel na resistência à quimioterapia.

A WTp53, *wild-type*, não mutada, promove a paragem do ciclo celular e a apoptose e também inibe a expressão do gene Bcl-2 e activa a expressão do gene Bax. Há trabalhos que relatam uma relação inversa entre a imunoexpressão da p53, que só marca na forma mutada, e a expressão da Bcl-2 (Laura M. Vargas-Roiga, F. Darıo Cuello-Carriona et al. 2008) .

Objectivos

O objectivo deste trabalho foi o de avaliar o valor preditivo de resposta à quimioterapia da mamocintigrafia feita com Sestamibi-Tc99m e de alguns marcadores moleculares, nas doentes com diagnóstico de cancro da mama, realizado no Serviço de Ginecologia dos HUC e tratadas segundo o esquema de tratamento adoptado neste serviço. Pretendeu-se integrar na prática clínica e sem alterar a metodologia de orientação de diagnóstico e tratamento já existente no serviço, um modelo simples, com recurso a técnicas conhecidas, que permitisse predizer a resposta à quimioterapia pela realização de mamocintigrafia prévia ao tratamento e pelo estudo de marcadores moleculares na biópsia, em doentes a quem se propunha QTNA. Aceitaram-se as hipóteses de a expressão da Pgp se associar à resposta à QTNA e de se associar ao tempo de eliminação do Sestamibi-Tc99m. Verficando-se estas hipóteses, estudou-se ainda a expressão da COX-2, que parece associar-se a mecanismos facilitadores da expressão da Pgp. Idealizou-se uma forma de inibir a quimiorresistência pela administração de inibidores da COX-2. Pretendeu-se:

1. Avaliar o valor preditivo de resposta à QTNA da expressão da Pgp;

2. Correlaccionar o tempo de eliminação do Sestamibi-Tc99m com a intensidade de marcação da Pgp;

3. Avaliar o valor preditivo de resposta à QTNA do tempo de eliminação do Sestamibi-Tc99m;

4. Correlaccionar a intensidade de marcação da Pgp com a da COX-2;

5. Correlaccionar o valor preditivo da Ki 67, da p53 e da Bcl 2 na resposta à quimioterapia.

Estudo prospectivo realizado nos Hospitais da Universidade de Coimbra de Janeiro de 2005 a Março de 2007, no âmbito do CIMAGO, que financiou o projecto sob o nº 29/04 e envolveu os serviços de Ginecologia, Medicina Nuclear e de Anatomia Patológica.

Foram avaliadas 47 mulheres submetidas a QTNA por carcinoma da mama classificado clinicamente como tumor grande operável, a quem se pretendia reduzir o tamanho do tumor para permitir cirurgia conservadora, ou com carcinoma da mama localmente avançado.

A estas mulheres foi realizada mamocintigrafia antes do início da quimioterapia. A mamocintigrafia foi realizada com Sestamibi-Tc99m e fez-se a determinação do tempo médio de eliminação do radiofármaco.

Procedeu-se à injecção intravenosa de 740MBq (20mCi) de Sestamibi-Tc99m num pé ou no braço contra lateral à lesão. Adquiriram-se imagens sequenciais de 1/1 minuto durante 15 minutos (matriz de 64 x 64 *pixels*) e imagens com 10 minutos de duração (matriz de 256 x 256 *pixels*), aos 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas após a administração. A doente foi posicionada em decúbito ventral com mama pendente, adquirindo-se imagens da região mamária, na projecção lateral, do lado da lesão. Utilizou-se uma câmara gama modelo XR/T (*GE*), equipada com um colimador de alta resolução, para baixa energia. Desenhou-se uma região de interesse (*ROI*) envolvendo cada lesão, obtendo-se uma curva de actividade / tempo (com correcção do decaimento e utilizando um *fitting* monoexponencial), da área seleccionada, para determinação do $T_{1/2}$ de eliminação do radiofármaco (minutos). Foram feitas três leituras por um especialista e considerada a média das três medições.

A todas as doentes foi feita a biópsia necessária ao diagnóstico. O material de biópsia foi preservado em formol e incluído em parafina. Foram utilizados os anticorpos descritos na tabela I para determinação por imunohistoquímica (IHQ) da Pgp, COX-2, Ki 67, p53 e Bcl 2.

Tabela I – Características dos anticorpos utilizados.

Anticorpo anti		**Tipo**	**Marcação**	**Interpretação resultados**
Pgp	MDR C494 Santa Cruz sc-59592 MDR C219 Signet 8710-01	Monoclonal, IgG2a Monoclonal, IgG1	Membrana e citoplasma	Qualquer marcação Qualquer intensidade
COX-2	SP21 NeoMakers RM-9121-S	Monoclonal, IgG		>10% Intensidade moderada e forte
Bcl 2	C124 Dako M0887	Monoclonal, IgG1	Citoplasma	
P53	C 318-6-11 Dako M3629	Monoclonal,	Nuclear	• Negativo • 1 a 5% • 5-25% • >25% Intensidade moderada e forte
Ki 67	Clone MIB-1 Dako M7240	Monoclonal, IgG1		

A técnica de IHQ utilizada foi a da Estreptavidina - Biotina / *Horseradisheroxidase* (HRP) que se descreve: desparafinar e hidratar; inibir a peroxidase endógena com H_2O_2 a 3% durante 10 minutos; lavar em água destilada; recuperação antigénica através de microondas, potência de 800 W, em tampão de citrato de sódio pH 6, durante 40 minutos; deixar o tampão arrefecer durante 10 minutos; lavar em solução salina tris-tamponada (TBS); incubar em soro normal de cabra (Ultra V Block - Labvision) durante 5 minutos; lavar em TBS; Incubar no soro primário durante 30 ou 60 minutos; lavar em TBS; incubar no secundário biotinilado (cabra anti-polivalente - Labvision) durante 15 minutos; lavar em TBS; incubar em streptavidina com peroxidase (Labvision) durante 15 minutos; lavar em TBS; revelar a marcação Ag / Ac com diaminobenzidina (DAB) durante 10 minutos; lavar em água corrente; contrastar com Hematoxilina de Gill durante 3 minutos; azular em água corrente durante 5 minutos; desidratar e montar em meio sintético.

A leitura das lâminas foi feita por uma única patologista.

As doentes foram submetidas a 6 ciclos de QT, em esquema sequencial com 3 ciclos de docetaxel (100mg/m2) seguidos de 3 ciclos de docetaxel (75mg/m2) e epirrubicina (90mg/m2); a duas doentes apenas se realizaram 5 ciclos por toxicidade hematológica.

A cirurgia foi feita 3 a 4 semanas depois do fim da QT, sendo realizada mastectomia ou cirurgia conservadora em função da classificação inicial, resposta à quimioterapia e a vontade da doente.

Foi realizada avaliação patológica da resposta à quimioterapia nas peças de cirurgia conservadora da mama ou de mastectomia radical modificada.

Para avaliação da resposta à quimioterapia foi utilizado um modelo proposto por Jeruss *et al* que engloba a classificação clínica pré-quimioterapia (TN) e a classificação patológica após quimioterapia (yTN), sendo utilizado o estadiamento da FIGO. Foi definido um *score* que estratifica as doentes em 5 grupos de acordo com a classificação clínica e patológica (tabela II) (Jeruss, Mittendorf et al. 2008). O *score* utilizado no tratamento estatístico resulta da soma do *score* pré e pós quimioterapia. Considerou-se resposta à QT o *score* de 0 e 1.

Tabela II – Estadiamento clínico pré-quimioterapia e patológico e respectivo *score* de acordo com os critérios de Jeruss

Estádio clínico Pré- QT	***Score* pré QT**	**Estádio patológico Após QT**	*Score* pós QT
I	0	0	0
IIA	0	I	0
IIB	1	IIA	1
IIIA	1	IIB	1
IIIB	2	IIIA	1
IIIC	2	IIIB	1
		IIIC	2

Foi utilizado este score de avaliação de resposta à QT por nos permitir avaliar as alterações produzidas pela QT no tumor, dado que compara as

características do tumor e dos gânglios antes e depois do tratamento e aproxima-se da metodologia usada na prática clínica no serviço de Ginecologia do Hospital da Universidade de Coimbra.

As doentes que não tiveram resposta clínica à quimioterapia e que foram submetidas a radioterapia neoadjuvante (RTNA) e a posterior cirurgia foram consideradas como não tendo tido resposta independentemente da avaliação histológica pós QT e RT.

No tratamento estatístico dos dados foram utilizados o programa SPSS e os testes Chi quadrado, teste exacto de Fisher e UMannWihitney nas determinações quantitativas das frequências; o teste T de Student e Anova 1 factor para diferença entre médias e o método Kaplan Meier na determinação das curvas de sobrevivência.

O recrutamento das doentes foi feito depois de assinado o consentimento informado, com informação oral sobre os procedimentos de diagnóstico, incluindo a biópsia e a mamocintigrafia e o tratamento previsto.

As tabelas III e IV mostram as características das doentes e dos tumores integrados no estudo.

Tabela III – Características das doentes e características histológicas e de IHQ dos tumores

	N (%)
Idade	55,27 Min - 29 Max -74
Estado hormonal	
Pré-menopausa	16 (34)
Pós-menopausa	31 (66)
Histologia	
Ductal	44 (93,6)
Lobular	3 (6,4)
Grau diferenciação	
GI	3 (7)
GII	32 (68)
GIII	12 (25)
RE	
Positivo	32 (68)
Negativo	15 (32)
RP	
Positivo	15 (31,9)
Negativo	21 (44,6)
Desconhecido	12 (23,5)
HER 2	
Positivo	11 (23)
Negativo	36 (77)

Tabela IV – Estadiamento clínico pré-quimioterapia e tratamentos realizados

Estadiamento	**N (%)**
IIA	13 (27,7)
T1N1	2
T2N0	11
IIB	16 (34)
T2N1	16
IIIA	10 (21,3)
T1N2	1
T2N2	1
T3N1	8
IIIB	8 (17)
T4aN1	2
T4bN1	5
T4cN2	1
Cirurgia	
Conservadora	15 (32)
Mastectomia radical modificada	32 (68)
Radioterapia	
Neo-adjuvante	4 (8,5)
Adjuvante	35 (74,5)
Quimioterapia adjuvante	12 (25,3)
Hormonoterapia adjuvante	32 (68,1)
Trastuzumab adjuvante	9 (19,1)

Foram integradas no estudo 47 doentes, embora não existam para todas os resultados dos seis marcadores estudados.

A tabela V mostra o número de casos estudados por cada marcador. A tabela VI mostra as características das doentes e dos tumores em cada grupo de casos, com e sem resposta à quimioterapia.

Tabela V – Casuística dos testes realizados.

					total
T1/2 99m Tc TF/Mibi					42
	Positivo			Negativo	
Pgp	9			14	23
COX-2	20			9	29
Bcl 2	32			9	41
	forte	médio	fraco		
P53	11	12	11	7	41
Ki 67	19	15	6	0	40

A identificação da Pgp por imunohistoquímica revelou-se complicada obrigando a testar vários anticorpos. Não se conseguiu obter qualquer marcação com o anticorpo MDR JSB-1 Isotipo IgG1 da Zymed. Durante a realização do trabalho foi descontinuada a produção do MDR C219 Signet 8710-01 (fig 1). A escassez do material de biópsia condicionou a determinação deste e de outros marcadores. Foi possível em 23 casos. Nos casos considerados positivos a intensidade de marcação foi fraca e na maioria dos casos não se identificou a Pgp, sendo a taxa de identificação de 39%. A COX-2 foi estudada em 29 doentes, teve marcação positiva e moderada a intensa em 68,9% dos casos (fig 2). As figuras 3 a 5 mostram os restantes marcadores.

A determinação do tempo médio de eliminação do Sestamibi-Tc99m do tumor só foi possível em 42 casos por impossibilidade de interpretação das imagens nas restantes cinco (fig 6).

Fig 1 – MDR, 400x

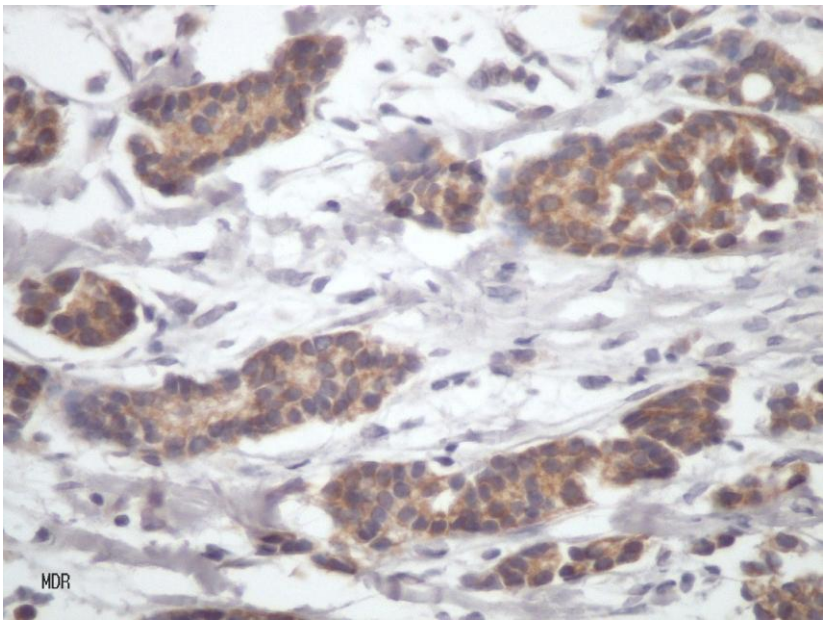


Fig 2 – COX-2, 1000x

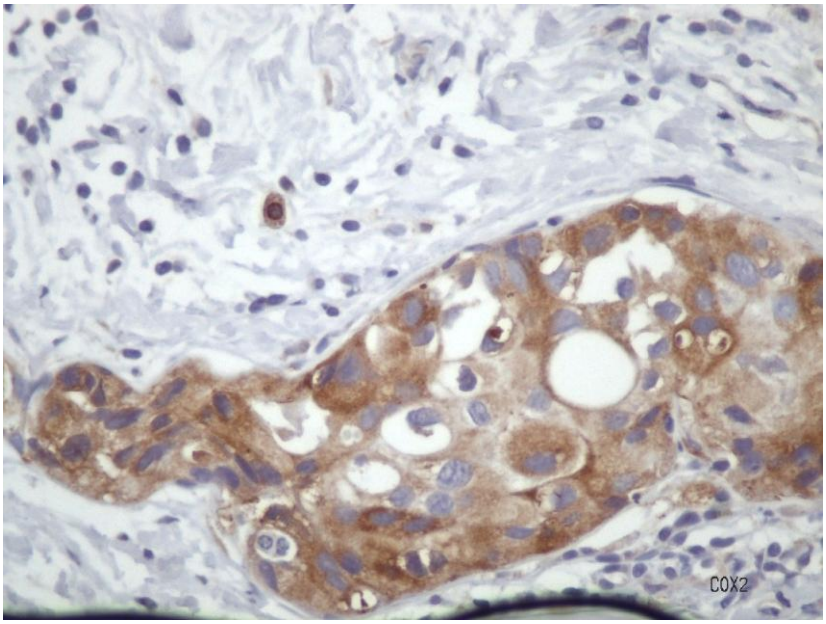


Fig 3 – Ki 67, 400x

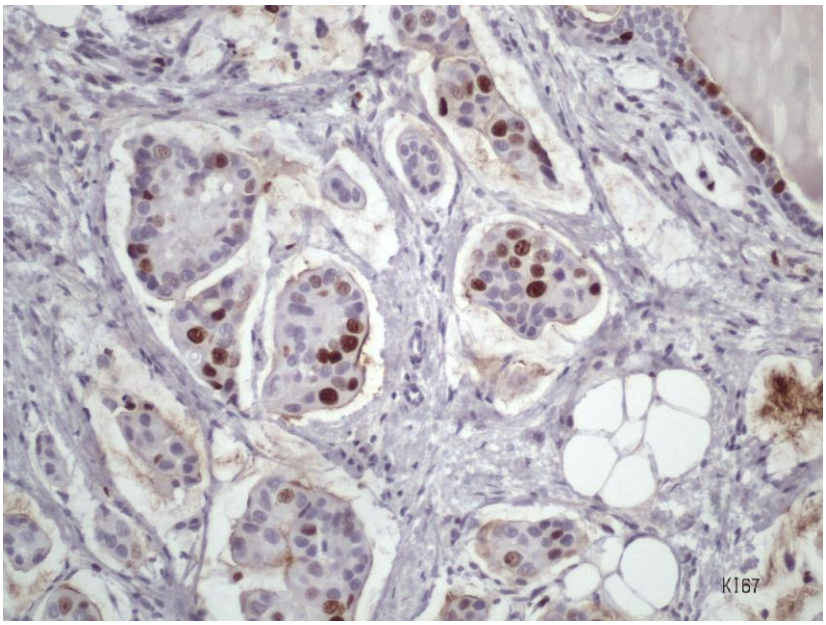


Fig 4 – p53, 400x

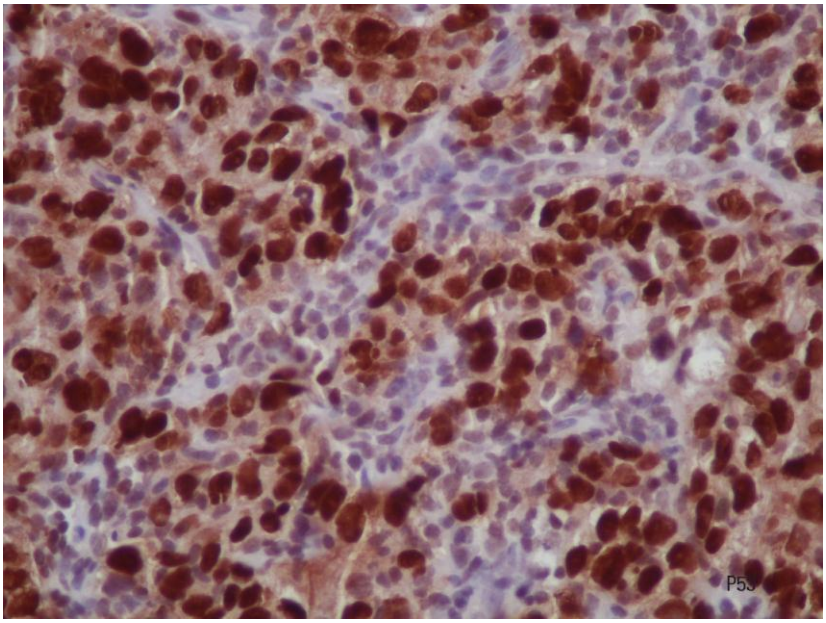


Fig 5 - Bcl 2, 400x

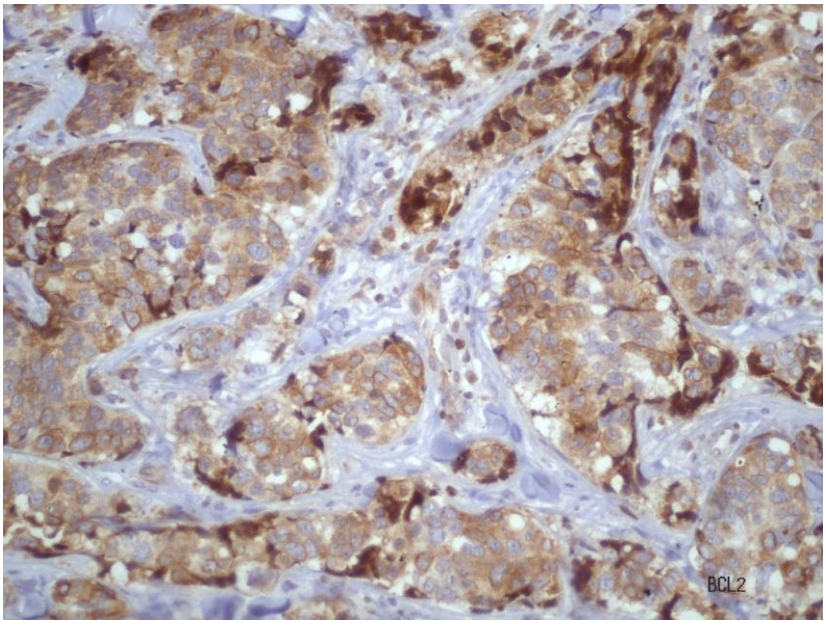
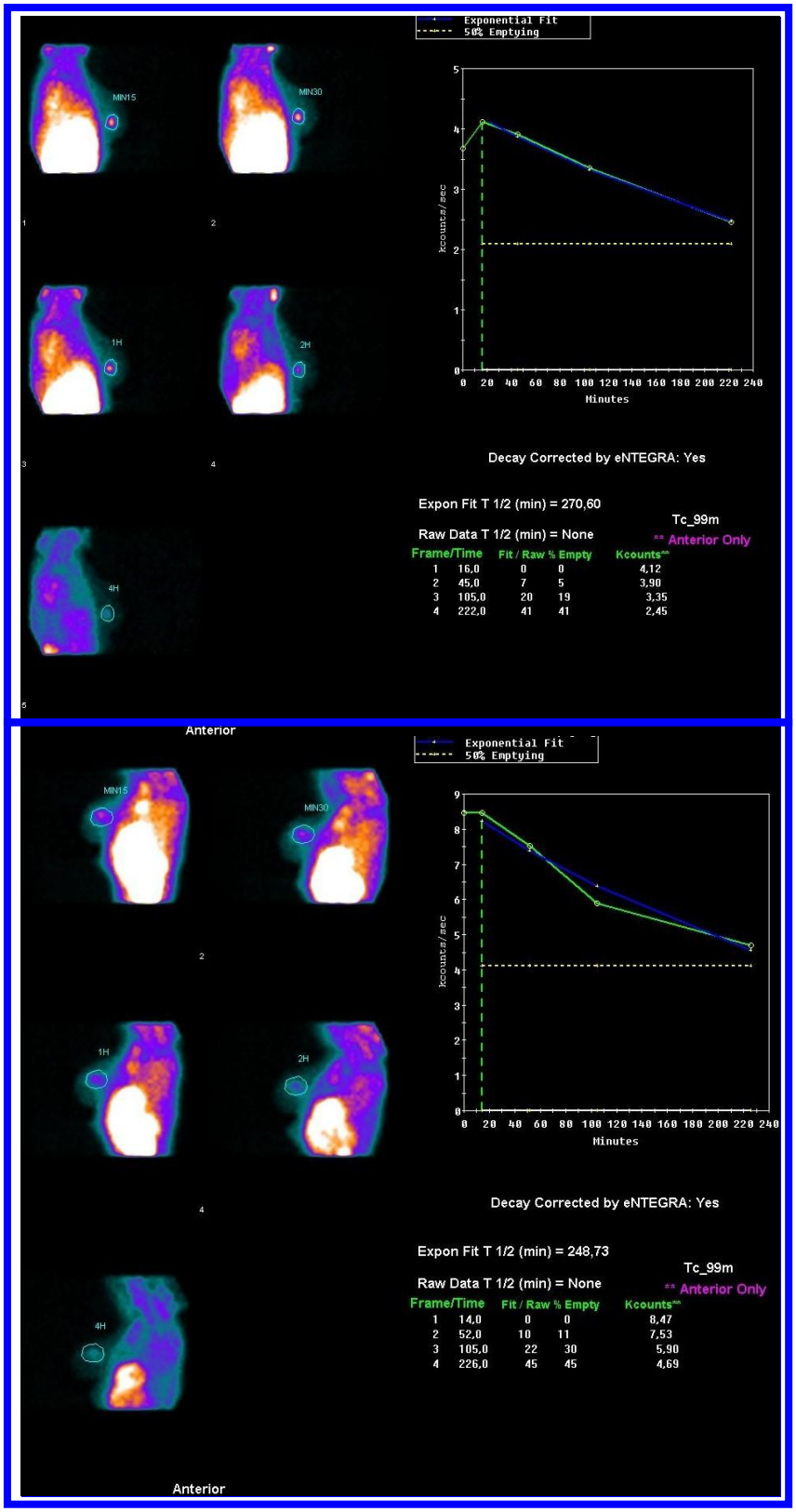


Fig 6 - curva de actividade / tempo de uma região de interesse (*ROI*) da lesão, para determinação do T1/2 de eliminação do radiofármaco (minutos).



A figura 7 e a tabela VI mostram o estadiamento dos tumores antes e depois da QT. Houve 6 (12,7 %) doentes nos quais o estadiamento patológico foi superior ao estadiamento clínico pré-quimioterapia e em 7 (14,9%) foi igual; nos restantes, 34 (72,4 %), o estadiamento patológico, após quimioterapia, foi mais baixo do que o clínico pré-tratamento. O agravamento de estádio após quimioterapia foi devido, em todos os casos, ao número de gânglios metastizados (tabela VI).

Fig. 7- Distribuição por estádios clínicos pré-quimioterapia e por estádios patológicos após quimioterapia

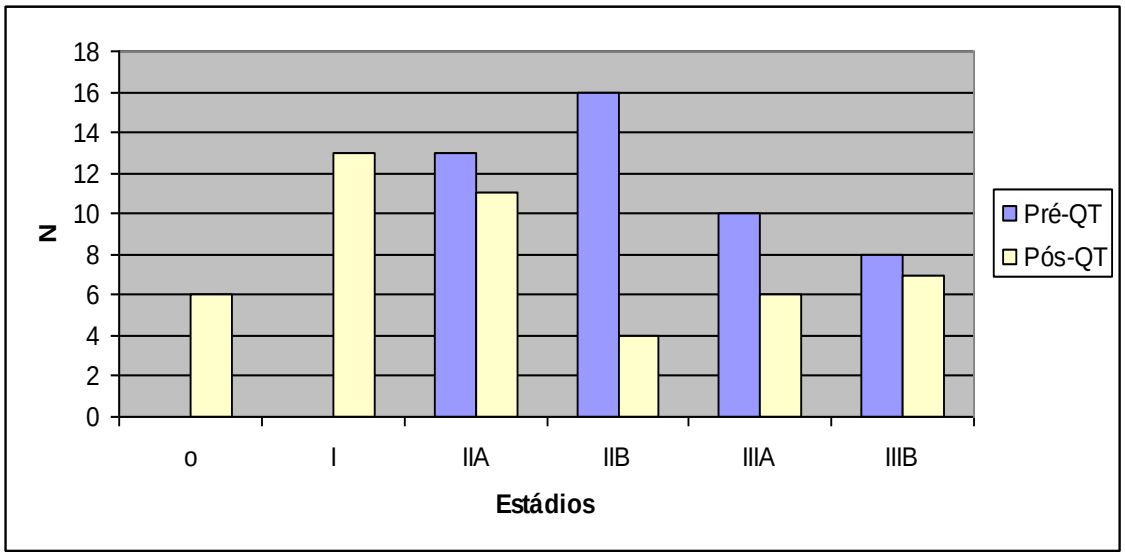


Tabela VI – Estadiamento clínico pré-quimioterapia e estadiamento patológico após QT.

Estadiamento	**Pré QT** **TN**	**Pós-QT** **yTN**
0	0	6 (12,7)
I	0	13 (27,7)
IIA	13 (27,7)	11 (23,4)
T0N1	0	3
T1N1	2	4
T2N0	11	4
IIB	16 (34)	4(8,5)
T2N1	16	4
IIIA	10 (21,3)	6 (12,7)
T1N2	1	4
T2N2	1	1
T3N1	8	(1)*
IIIB	8 (17)	7 (15)
T0N3	0	1
T1N3	0	2
T2N3	0	1
T4aN1	2	0
T4bN1	5	(3)*
T4cN2	1	0

*Submetidos a RT pré-operatória; foi considerada a apresentação clínica pré QT

Utilizando os critérios de Jerruss *et al* e aplicando o *score* de avaliação de resposta à QT, obtiveram-se 21 casos com resposta (44,7%) e 26 casos sem resposta (55,3%).

A aplicação deste *score* tem algumas contingências: tumores com estadiamento pré-quimioterapia superior a IIIA, mesmo que tenham resposta patológica completa, não farão nunca parte do grupo das doentes com resposta e os estádios IIB e IIIA precisam de resposta patológica completa para serem integrados nesse grupo (tabela II). Por outro lado, casos de tumores classificados como IIA pré-QT e IIB após tratamento têm *score* 1 e são integrados no grupo das doentes com resposta, apesar de terem metastização ganglionar. Há quatro casos com cabimento nas situações descritas, mas, mudando de grupo de resposta cada um dos quatro casos, os resultados não são alterados.

Houve 8,5% (4/47) de doentes sem resposta clínica. Apenas 12,7% (6/47) tiveram resposta patológica completa. Das doentes com resposta patológica completa, 4 (66,6%), tinham CMGO.

A tabela VII mostra as características das doentes e dos tumores por grupo de resposta à quimioterapia. Não se verificou diferença na idade e no estado hormonal das doentes. Não se encontrou diferença entre a frequência de tumores GII/GIII, HER2 positivo e RE negativos entre os grupos de resposta.

Tabela VII - Características das doentes e tumores por grupo de resposta ao tratamento.

	Com resposta N (%)	Sem resposta N (%)
Idade	56 Min - 29 Max -74	54,6 Min- 35 Max- 73
Estado hormonal		
Pré-menopausa	6 (12,7)	10 (21,2)
Pós-menopausa	14 (29,8)	17 (36,3)
Histologia		
Ductal	20 (42,5)	24 (51,2)
Lobular	1 (2,1)	2 (4,2)
Grau diferenciação		
GI	1 (2,1)	2 (4,2)
GII /GIII	20 (42,5)	24 (51,2)
RE		
Positivo	12 (25,5)	20 (42,5)
Negativo	4 (8,5)	11 (23,5)
		p = 0,5
HER 2		
Positivo	5 (10,6)	6 (12,7)
Negativo	16 (34,2)	20 (42,5)
		p = 0,7

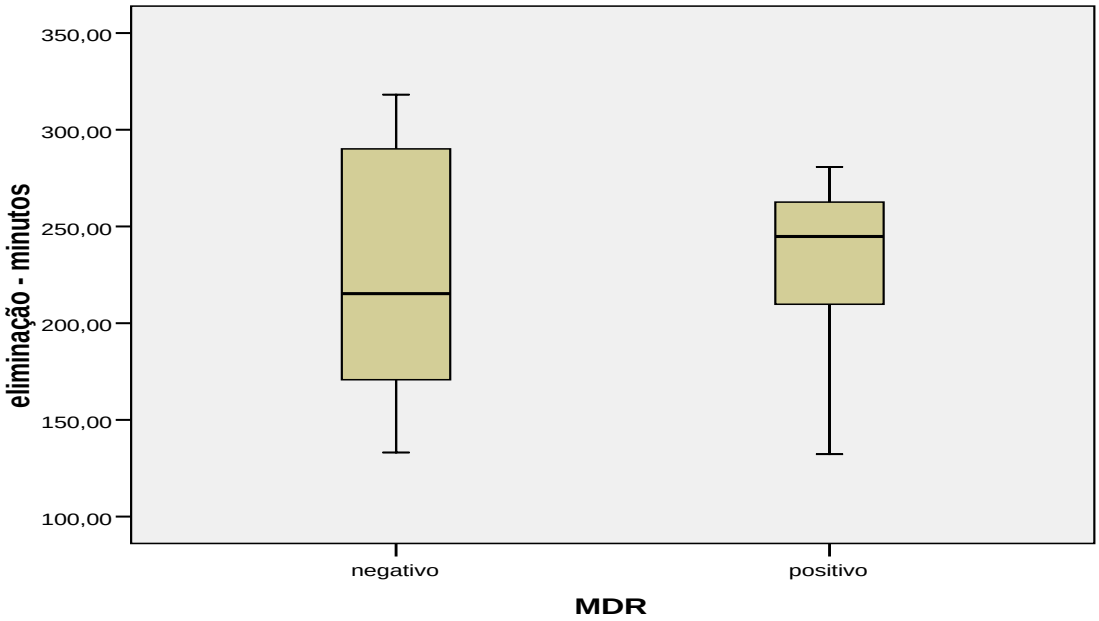
Não se conseguiu estabelecer qualquer correlação entre a expressão da Pgp/MDR e a resposta à quimioterapia (tabela VIII).

Tabela VIII – Média dos T 1/2 de eliminação do radiofármaco dos tumores sem e com expressão da MDR e expressão da MDR por grupo de resposta.

	MDR neg	**MDR pos**	
T ½ Sestamibi-Tc99m (minutos)	229±53	220±61	p=0,4
Com resposta	30,4 %(7)	8,8%(2)	
Sem resposta	30,4 %(7)	30,4 %(7)	p=0,4

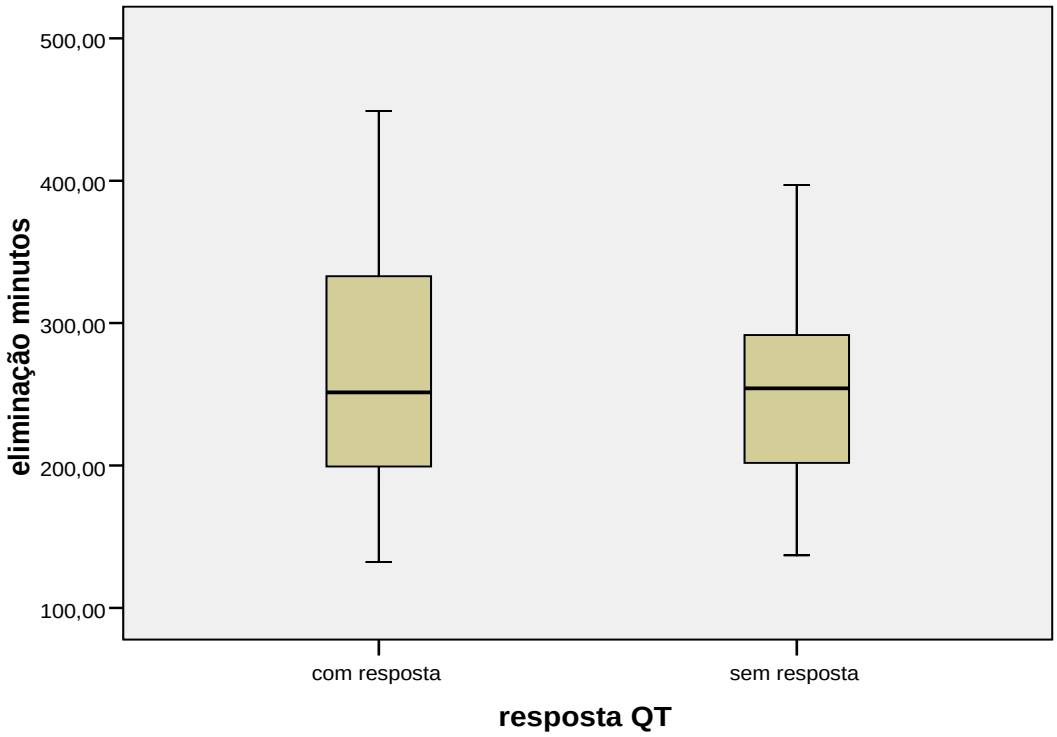
Não houve diferença entre as médias do T1/2 de eliminação do 99m Tc TF/Mibi entre os grupos de expressão da MDR (fig 8) (tabela VIII).

Fig 8 – Média dos T1/2 de eliminação do radiofármaco dos tumores sem e com expressão MDR



Não houve diferença entre as médias do T1/2 de eliminação do 99m Tc TF/Mibi entre os grupos de resposta (fig 9).

Fig 9- Média dos T 1/2 de eliminação do radiofármaco dos tumores com e sem resposta à QTNA



Não se conseguiu estabelecer correlação entre a expressão da MDR e a da COX-2 (tabela IX).

Tabela IX - Expressão da MDR por grupo de COX-2 negativa e positiva

	MDR neg	**MDR pos**	
COX-2 neg	2 (30,4%)	9 (39,1%)	
COX-2 pos	7 (8,7 %)	5 (21,7)	**p=0.6**

Não se conseguiu estabelecer qualquer correlação entre a expressão da p53, da Bcl 2 e do Ki 67 e a resposta à quimioterapia (tabela X).

Tabela X – Expressão da COX-2, da p53, da Bcl 2 e do Ki 67 por grupo de resposta

	Com resposta QT	**Sem resposta QT**	
	% (n)	**% (n)**	
COX-2 pos	40% (11)	31% (9)	p=0,6
COX-2 neg	13% (4)	16% (5)	
Bcl 2 pos	27,5% (11)	47,5%(19)	p=0,4
Bcl 2 neg	5% (2)	20% (8)	
P53 positivo	31,7 %(13)	31,7 %(13)	p=0,7
P53 negativo	14,6% (6)	22%(9)	
Ki 67 médio/ forte	40% (16)	45% (18)	p=0,6
Ki 67 fraco	5% (2)	10% (4)	

Se considerarmos apenas a resposta patológica completa na mama e na axila como resposta à QT e todos os outros casos como ausência de resposta, os resultados obtidos não são alterados.

Se considerarmos 3 categorias de resposta à quimioterapia (patológica completa, doença residual e ausência de resposta clínica), obtemos uma

diferença no T ½ Sestamibi-Tc99m entre os grupos resposta patológica completa e ausência de resposta clínica que sugere um tempo de eliminação mais longo nas doentes com resposta patológica completa (fig 10). Também para a Pgp/MDR verificamos diferença: nas doentes estudadas, 3 de 4 sem resposta e 4 de 6 com resposta patológica completa, a marcação foi, respectivamente, positiva em todas as doentes sem resposta clínica e negativa em todas as doentes com resposta patológica completa (tabela XI).

Fig 10 – Médias do T ½ Sestamibi-Tc99m por grupo de resposta à quimioterapia, considerando três categorias de resposta.

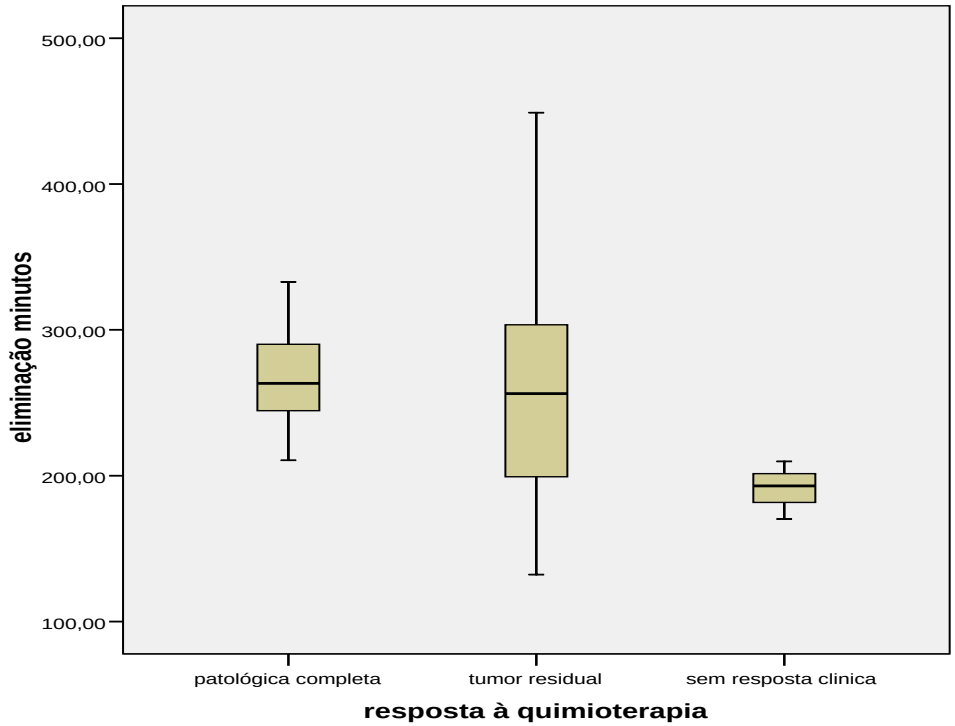


Tabela XI - Médias do T ½ Sestamibi-Tc99m e expressão da MDR por grupo de resposta à quimioterapia, considerando três categorias de resposta.

	Resposta patológica Completa	**Sem resposta clínica à QT**
T ½ Sestamibi-Tc99m (min)	268±46	191±19
MDR pos	0 % (0/4)	100% (3/3)

Se compararmos os mesmos grupos e fizermos a análise para os restantes marcadores de resistência à QT, não encontramos qualquer diferença.

Fez-se ainda a comparação da expressão da p53 com a da MDR e da p53 com a da Bcl2. Não se encontraram correlações (tabela XII).

Tabela XII – comparação da expressão da p53 com a da MDR e da Bcl2.

	p53 positiva	**p53 negativa**	
MDR			
positiva	4 (18,2 %)	4 (18,2 %)	
negativa	9 (40,9%)	5 (22,7%)	p = 0,5
Bcl 2			
positiva	21 (52,5%)	5 (12,5%)	
negativa	10 (25%)	4 (10%)	p = 0,5

O estudo da sobrevivência das doentes com resposta e sem resposta à QT mostrou diferença próximas da significância (p=0.06) (fig 11). Não se encontrou diferença na sobrevivência entre as doente com e sem marcação para a Pgp (fig 12).

Fig 11 - Curvas de sobrevivência por grupo de resposta àQT.

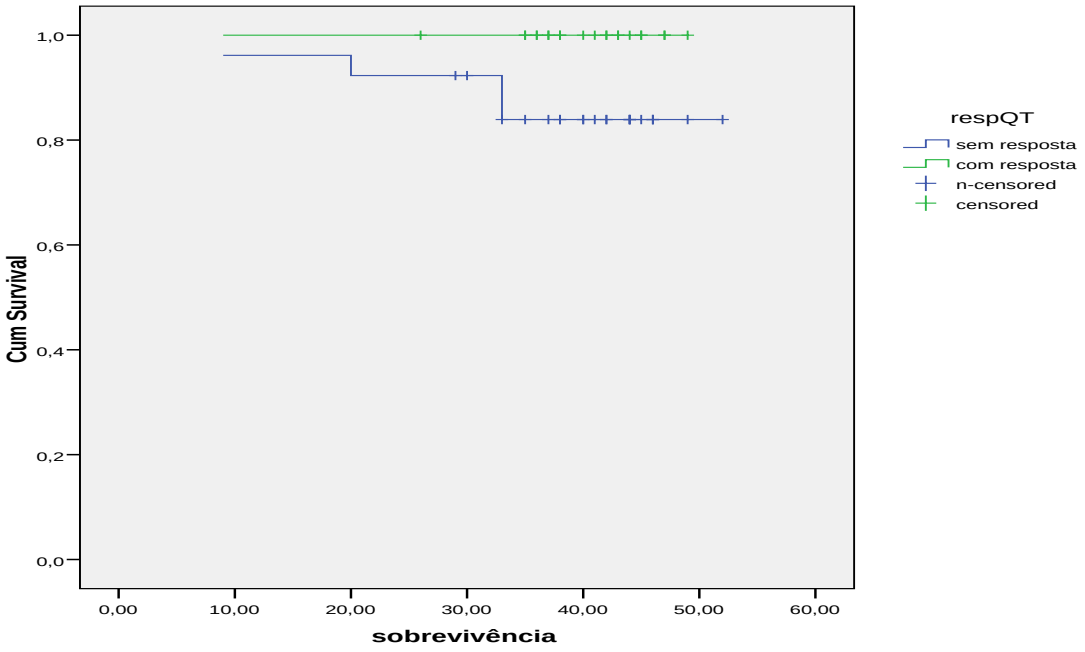
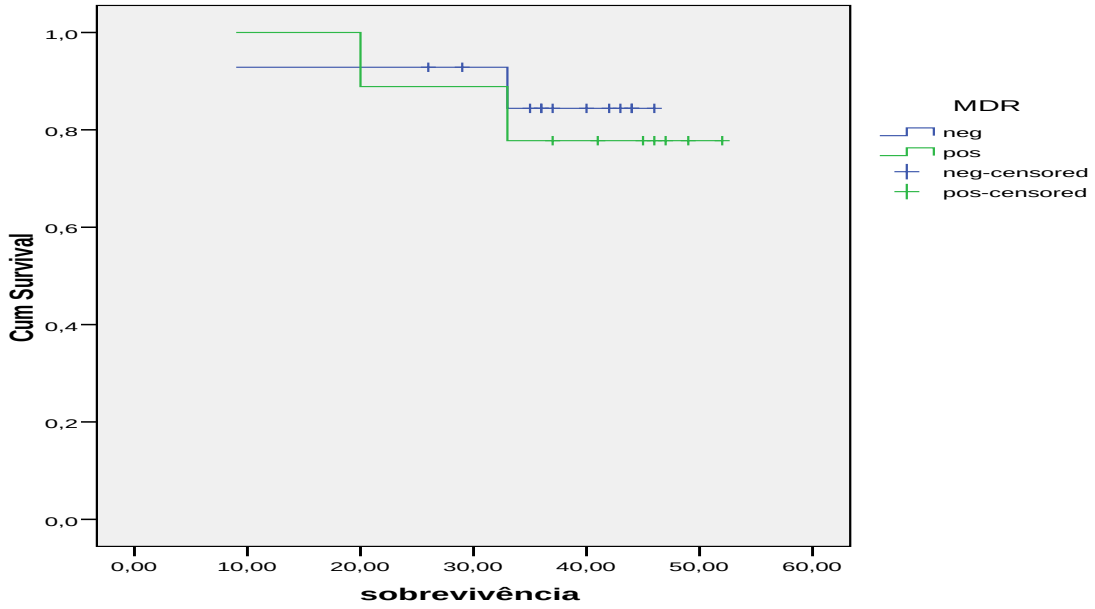


fig. 12 – Curvas de sobrevivência por grupo de expressão MDR



A quimioterapia é fundamental no tratamento do cancro da mama. Uma meta-análise do *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* mostrou que a quimioterapia permitia uma diminuição no risco anual de recorrência e de morte de, respectivamente, 24% e 15% (Bonadonna G, Brusamolino E et al.; Group. 1998).

Em Portugal, de acordo com o Registo Oncológico Nacional, houve um aumento de incidência de cancro da mama de 25,6 por 100 000 habitantes de 1993 para 2001, mantendo-se estável a taxa de mortalidade por 100 000 habitantes (Laranja Pontes 2001) (DGS) (Joaquim Gouveia 1993). A maior precocidade no diagnóstico inerente à organização dos programas de rastreio foi fundamental para a obtenção destes resultados; no plano terapêutico, foi a quimioterapia sistémica que se modificou e deu o seu contributo para o aumento do número de sobreviventes.

No cancro da mama, os citostáticos utilizados na poliquimioterapia, de segunda e terceira geração e considerados como sendo os mais eficazes, são os do grupo das antraciclinas e os taxanos. As antraciclinas mais usadas são a doxorrubicina e a epirrubicina e, do grupo dos taxanos, usam-se quer o paclitaxel quer o docetaxel. O fenótipo MDR traduz-se pela existência de resistência cruzada às antraciclinas e aos taxanos (Toshiaki Saeki 2005). Deste modo, espera-se que a manifestação deste fenótipo se associe a falta de resposta ao tratamento com qualquer um dos dois grupos de citostáticos mais frequentemente utilizados em primeira linha de tratamento. Pelo contrário, outros fenótipos, como o associado à mutação da p53, pode provocar resistência às antraciclinas mas facilitar a acção dos taxanos (Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C et al. 2000).

O ideal seria que existisse uma forma de determinar quais os tumores com elevada probabilidade de terem resistência ao tratamento padrão e assim evitar a morbilidade e os custos associados a uma quimioterapia ineficaz.

Neste trabalho, as doentes foram tratadas com antraciclinas e taxanos que são substratos da Pgp/MDR e a falta de resposta seria facilmente explicada pela sobre-expressão da Pgp/MDR. Houve 8,5% de doentes sem resposta clínica e 55,3% sem resposta de acordo com os critérios adaptados de Jeruss. Apenas 12,7% tiveram resposta patológica completa.

A análise dos resultados permite-nos constatar que as conclusões podem ser diferentes em função dos critérios de resposta à quimioterapia utilizados. O principal objectivo da avaliação da resposta ao tratamento sistémico pré-operatório é definir a estratégia de tratamento subsequente.

A avaliação clínica e imagiológica da resposta permite ao clínico decidir se a doente com CMLA é operada depois da QT ou se, pelo contrário, é submetida a radioterapia e se a doente com CMGO reúne condições para cirurgia conservadora ou se é submetida a mastectomia total. Se, em cada caso, os objectivos não são atingidos, se não se modifica a classificação clínica com a QTNA, considera-se que não houve resposta ao tratamento e que, aparentemente, não se modificou a história natural da doença. Mas se os objectivos são atingidos, mesmo que a avaliação patológica das peças de cirurgia nos mostre metastização de vários gânglios, fica a impressão de que alguma coisa foi feita e de que se modificou a evolução da doença. No entanto, estes casos são considerados sem resposta do ponto de vista patológico.

A resposta patológica completa está associada a maior sobrevivência (Honkoop, van Diest et al. 1998) (Kuerer HM 1999; Symmans, Peintinger et al. 2007). Porém, dicotomizar a resposta patológica em completa e

persistência de tumor residual é demasiado simplista dado que a extensão da doença residual é muito variável e parece haver diferença significativa na sobrevivência entre os subgrupos de doença residual (Symmans, Peintinger et al. 2007). Mesmo nos casos em que não há resposta patológica completa, a sobrevivência é melhorada em relação ao esperado pelo estadiamento clínico inicial.

Por outro lado, Carey *et al* mostraram que os tumores sem imunomarcação para os receptores hormonais e HER2, triplos negativos, apesar do reconhecido pior prognóstico a longo prazo, têm a mais elevada prevalência de resposta patológica completa (Carey LA, Dees EC et al. 2007). Porém, estes resultados, aparentemente paradoxais, explicam-se pela elevada taxa de recorrências nas doentes que ficam com doença residual após QTNA.

Não se sabe ainda se o principal determinante do prognóstico e da orientação terapêutica complementar é o estadiamento clínico inicial ou o estadiamento patológico após quimioterapia. Não há linhas de orientação para avaliação de resposta à quimioterapia, nomeadamente que integrem o estadiamento clínico pré-QT e o patológico após tratamento, mas na prática clínica estes dois parâmetros são tidos em consideração na decisão da estratégia de tratamento. O método de avaliação de resposta proposto por Jeruss *et al* é o que mais se aproxima desta conduta: considera o estadiamento clínico pré-quimioterapia e o patológicos pós-tratamento (Jeruss, Mittendorf et al. 2008).

Neste trabalho foi utilizado o método de avaliação de resposta proposto por Jeruss *et al* mas, pela escassez dos números da amostra, entendeu-se considerar doentes com resposta as que tinham *score* final de 0 ou 1, e, as restantes, sem resposta. A avaliação da sobrevivência mostrou existir diferença próxima da significância entre estes dois grupos o que mostra ter sido lógica a divisão efectuada.

Neste trabalho foi estudada a resistência intrínseca em tumores classificados como CMLA e CMGO. A taxa de detecção da Pgp/MDR foi de 39%. Não se conseguiu qualquer marcação positiva com o anticorpo mais referenciado na literatura, o JSB1. Foram usados dois anticorpos e considerada a marcação positiva desde que um dos dois anticorpos marcasse, de acordo com uma recomendação do *Workshop of methods to detect MDR* (Beck W T, Grogan T M et al. 1996). A marcação foi globalmente de fraca intensidade.

De acordo com um estudo de meta-análise de 2003, a taxa de detecção da proteína Pgp/MDR1 por imunohistoquímica no cancro da mama não tratado é de 40% com a possibilidade de estabelecer níveis de intensidade de marcação (Leonessa and Clarke 2003). Porém, a literatura mostra resultados contraditórios com taxas de detecção da MDR por imunohistoquímica de 0 a 100% (O'Driscoll L 2006). Na meta-análise de Leonessa *et al*, os anticorpos referenciados para o tecido mamário foram vários: JSB1, C219, MRK16, C494, 4E3 e UIC2. Os JSB1 e C219 foram os mais usados; ambos marcam o epitopo citoplasmático.

A detecção do mRNA Pgp/MDR1 por RT-PCR tem maior sensibilidade do que a detecção da proteína, estimando-se ser de 63% (Leonessa and Clarke 2003). A concordância entre as técnicas vai de 34% a 73% (Chevillard S, Pouillard et al. 1996; Hegewisch-Becker, Staib et al. 1998). Esta discrepância pode residir na contaminação por células não neoplásicas, em particular por linfócitos, que é uma das desvantagens da RT-PCR (Leonessa and Clarke 2003). Leonessa refere que a taxa de detecção por Northen Blot é de 28%.

A mesma meta-análise sugere que a expressão pode ser dependente do tamanho do tumor: tumores não tratados de dimensões inferiores ou iguais a dois centímetros (T1) expressam a Pgp/MDR em 23% dos casos enquanto que os que tem dois a cinco (T3) têm esta expressão em 50% dos casos (Leonessa and Clarke 2003). Ainda em relação à extensão tumoral, não há

estudos que suportem a relação entre expressão da Pgp/MDR e a invasão ganglionar. Não parece também haver diferença na expressão da Pgp/MDR entre o tumor primário e o metastático (Leonessa and Clarke 2003; O'Driscoll L 2006). Neste trabalho, há apenas dois casos de tumores com dois centímetros, não se podendo, como tal, atribuir ao tamanho do tumor a fraca expressão da Pgp/MDR.

A expressão da Pgp/MDR antes da QT com substratos da Pgp/MDR parece relacionar-se com a taxa de respostas completas, mas não com a sobrevivência global (Verrelle, Meissonnier et al. 1991; Chevillard S, Pouillard et al. 1996; Honkoop, van Diest et al. 1998). Pelo contrário, quando se utiliza uma QT sem substratos da Pgp/MDR, a taxa de expressão da Pgp/MDR não parece relacionar-se com a taxa de resposta (Bottini A, Berruti A et al. 2000).

Há estudos que mostram que a QT, com ou sem substratos da MDR1, produz indução da expressão da Pgp/MDR detectada por IHQ e do mRNA Pgp/MDR1 detectado por RT-PCR (Rudas M, Filipits M et al. 2003; O'Driscoll L 2006) (Leonessa and Clarke 2003).

Neste trabalho a determinação foi realizada na biópsia, antes de qualquer tratamento, dado que o objectivo era identificar factores com valor preditivo de resposta que permitissem evitar a morbilidade associada a uma quimioterapia ineficaz.

Alguns autores defendem que a expressão da Pgp/MDR após o tratamento com antraciclinas tem maior valor preditivo de resposta do que a expressão antes da QT: taxa de resposta de 93% (56 /60) nas doentes com Pgp/MDR negativas após QT e de 52% (45/82) nas que expressam Pgp/MDR (Chevillard S, Pouillard et al. 1996; Botti G, Chiappetta G et al. 1993).

Chevillard determinou a expressão da Pgp/MDR antes da QT com antraciclinas e ao 8º e 28º após o ciclo de QT e correlacionou uma subida

acentuada da intensidade de expressão ao 8º dia com pior intervalo livre de doença e sobrevivência global (Chevillard S, Pouillard et al. 1996). Este dado sugere que a indução da expressão da Pgp/MDR pela quimioterapia possa ter maior significado para predizer a resposta ao tratamento do que a determinação simples realizada antes ou depois da QT.

Neste trabalho não se estabeleceu qualquer relação entre a expressão da Pgp/MDR e a resposta à QTNA. Schneider *et al* também não encontraram relação entre a expressão da proteína Pgp/MDR1 e a resposta à QT com CAF, CMF ou docetaxel e epirrubicina (Schneider J, Lucas R et al. 2000). Barbara T *et al* referem não haver relação com significado entre a expressão da Pgp/MDR1 e a resposta ao tratamento com taxanos (Barbara T. McGrogan, Breege Gilmartin et al. 2008).

Neste trabalho mostrou-se não existir correlação entre a expressão da Pgp/MDR e o tempo médio de eliminação do Sestamibi-Tc99m. Travaini *et al* , num estudo realizado com 51 doentes com CMLA submetidas a QTNA, concluíram que nem a taxa de captação nem o tempo de eliminação do Sestamibi-Tc99m se relacionavam com a resposta à QT (Travaini LL, Baio SM et al. 2007). Travaini *el al* referem que a persistência de captação de Sestamibi-Tc99m após QT se relaciona com doença residual extensa e pior prognóstico. Outros autores concluíram o mesmo (Marshall, Eremin et al. 2005).

Considerando as duas situações extremas de ausência de resposta clínica e de resposta patológica completa, há pelo menos a sugestão da relação entre a resposta à QT e a expressão da Pgp/MDR e diferença relevante, mas distante da significância no tempo de eliminação do radiofármaco.

Identificar os doentes que não tem resposta clínica à QTNA tem grande interesse terapêutico. Se a mamocintigrafia mostrasse ser curto o tempo de

eliminação do radiofármaco e se se verificasse ausência de resposta clínica após 3-4 ciclos de QT, a doente com CMLA poderia ser submetida radioterapia mais precocemente ou a doente com CMGO ser submetida a cirurgia. Era importante aumentar o número de casos para verificar a diferença entre os grupos de ausência de resposta clínica e o de resposta patológica completa. Porém, as actuais linhas de orientação de tratamento com QTNA recomendam que só se houver progressão da doença, e não apenas ausência de resposta, se deve mudar a estratégia definida no início do tratamento (Symmans, Peintinger et al. 2007).

Foram estudados outros potenciais marcadores de resposta à quimioterapia: o Ki 67, a p53 e a Bcl 2. Provavelmente pelo tamanho da amostra e pelos critérios de resposta à quimioterapia utilizados, para nenhum deles foi possível estabelecer relação com a resposta à quimioterapia.

Neste trabalho, todos os casos tiveram marcação para o Ki67 e 85% dos tumores tiveram intensidade de marcação de moderada a forte. Os mesmos tumores tiveram ausência de expressão de RE em 32% dos casos, 23% expressavam HER2 e foi atribuído o grau histológico GIII a 25% dos casos. Na literatura, são vários os autores que encontram relação entre a marcação do Ki 67 e a resposta à quimioterapia (Faneyte IF 2003) (Petit T, Wilt M et al. 2004) (Urruticoechea, Smith et al. 2005). Estevez *et al*, não encontrou relação (Estévez LG 2003).

A p53 mutada tem semi-vida mais longa do que a normal, levando a acumulação intra-nuclear e tornando possível a sua expressão por IHQ (S Cleator 2002). Porém, nem todas as mutações se expressam por IHQ. Há vários trabalhos com QTNA que não mostraram relação entre a expressão da p53 e a resposta à quimioterapia (Bonetti A, Zaninelli M et al. 1998; Rozan S, Vincent-Salomon A et al. 1998; S Cleator 2002)}. Geisler *et al* mostraram que

há mutações específicas da p53 que se associam à resistência à doxorrubicina e muitas destas não têm imunoexpressão (Geisler S, Lonning PE et al. 2001).

Em relação à Bcl 2, Pusztai mostrou que a ausência de marcação antes da quimioterapia estava associada a maior probabilidade de resposta patológica completa (Pusztai, Krishnamurti S et al. 2004). Laura M Vargas-Roig *et al* não encontrou qualquer relação entre a expressão da Bcl 2 e a resposta à quimioterapia (Laura M. Vargas-Roiga, F. Darıo Cuello-Carriona et al. 2008). Esta autora refere que é a relação entre as proteínas da família Bcl com papel anti-apoptótico e as que têm papel pró-apoptótico que define se há sensibilidade ou resistência à quimioterapia, não sendo suficiente a determinação simples da expressão da Bcl-2. Shinoura *et al* consideraram ainda que o nível de expressão da Bcl-2 é crucial para determinar o papel desta proteína na apoptose: expressão elevada é pró-apoptótica e expressão fraca pode ser anti-apoptótica (Shinoura, Yoshida et al. 1999).

Neste trabalho, pensou-se estudar a expressão da COX-2 e tentar correlacionar a sua expressão com a da Pgp/MDR porque são pouco animadores os resultados obtidos com a utilização de inibidores directos da Pgp/MDR. Se COX-2 promove a expressão dos genes MDR, um inibidor da COX-2, além do efeito antitumoral directo, pode inibir a expressão do fenótipo MDR (Maria Chiara Zatelli, Andrea Luchin et al. 2007).

O celecoxib é um inibidor selectivo da COX-2 que já foi usado no carcinoma da mama em associação a poliquimioterapia com antraciclinas (Chow LW 2003). Foi utilizado em doentes com CMLA que foram tratadas com FEC a título neo-adjuvante, associado ou não a celecoxib e houve maior taxa de resposta no grupo em que se utilizou celecoxib.

Zatelli mostrou que da exposição das células MCF7 nativas à doxorrubicina resulta resistência a este citostático, em associação com aumento da expressão

da MDR1 (Maria Chiara Zatelli, Andrea Luchin et al. 2007). O clone resistente rMCF7, que expressa COX-2 e MDR1, quando tratado com NS-398, inibidor da COX-2, inibe a expressão da MDR1 induzida pela doxorrubicina e promove a acumulação intra-celular deste citostático. Estes resultados dão suporte à possibilidade de utilização na clínica de um inibidor da COX-2, quer no tratamento neo-adjuvante, quer no da doença metastática (Maria Chiara Zatelli, Andrea Luchin et al. 2007).

A experiência clínica com alguns inibidores da Pgp/MDR não tem mostrado benefícios já que tem sido elevada a toxicidade e nula a eficácia terapêutica (Barbara T. McGrogan, Breege Gilmartin et al. 2008). Os ensaios clínicos mostraram ser necessária uma elevada concentração citoplasmática para obter o mesmo efeito *in vivo,* o que acarretava elevada toxicidade e não chegou a ser provada a sua eficácia (Barbara T. McGrogan, Breege Gilmartin et al. 2008). Um ensaio fase II, que combinava vinorelbine com Tariquidar, um análogo da ciclosporina e potente antagonista da Pgp/MDR, usado em cancros da mama metastizados e resistentes, foi interrompido por se ter verificado ser maior o risco de progressão e morte com a associação (Barbara T. McGrogan, Breege Gilmartin et al. 2008).

Actualmente, nos casos de progressão de doença após antraciclinas e taxanos, tentam-se novos fármacos, tentando contornar a resistência cruzada. A vinorelbine, capecitabina e as terapêuticas alvo são exemplos. Os epotilones são agentes com acção estabilizadora dos microtubulos mas de estrutura diferente dos taxanos, que não são substratos da Pgp/MDR. Em linhas celulares resistentes aos epotilones, não se detectou alteração na expressão da Pgp/MDR (Swain 2005).

Os avanços recentes na área da genómica e proteómica dos tumores da mama em comparação com o tecido normal e das células tumorais resistentes em

comparação com as sensíveis, podem ajudar a clarificar algumas discrepâncias entre os estudos existentes e a conhecer novos marcadores.

Actualmente a comunidade científica está empenhada na identificação de perfis genéticos com valor preditivo de quimiossensibilidade.

Há dois perfis genéticos em aplicação: o *Oncotype*, de 21 genes que permite a definição de um *score* de baixo, intermédio e alto grau de recorrência; o *Mammaprint*, de 70 genes, que estratifica os doentes em bom e mau prognóstico (Bonnefoi H, Potti A et al. 2007).

Estão em curso dois estudos prospectivos com estes dois perfis genéticos (Bonnefoi H, Potti A et al. 2007). O objectivo é o de identificar grupos que beneficiam com a quimioterapia.

São mais complexos os ensaios que tenham por objectivo definir perfis genéticos associados a quimiossensibilidade específica de determinado citostático.

A imunohistoquímica não se mostrou um bom método de identificação da Pgp/MDR pela baixa taxa de detecção e fraca intensidade de marcação.

Neste trabalho, não se conseguiu evidenciar o valor preditivo de resposta à quimioterapia neo-adjuvante da Pgp. Não se conseguiu correlacionar o T 1/2 de elimininação do Sestamibi-Tc99 com a expressão da Pgp nem com a resposta à quimioterapia. Há apenas a sugestão de alguma diferença na expressão da Pgp e do T 1/2 de elimininação do Sestamibi-Tc99 entre a ausência de resposta clínica e a resposta patológica completa.

A COX-2, o Ki67, A p53 e a Bcl2 não mostraram ter valor preditivo de resposta à quimioterapia.

Dada a relevância clínica, era importante aumentar o número de casos para verificar se é real a diferença entre os grupos de ausência de resposta clínica e o de resposta patológica completa.

Utilizando esta metodologia, não se verificou a hipótese de ser possível integrar na prática clínica diária e utilizando técnicas conhecidas, uma forma de predizer a resposta à quimioterapia.

A'Hern R P, S. I. E., Ebbs S R (1993). "Chemotherapy and survival in advanced breast cancer: the inclusion of doxorubicin in copper-types regimes." Br. J. Cancer **67**: 801-805.

Amat S, Bougnoux P, et al. (2003). "Neoadjuvant docetaxel for operable breast cancer induces a high pathological response and breast-conservation rate." Br J Cancer **88**(9): 1339-45.

Arveux P, Grosclaude P, et al. (2003). Breast cancer survival in France: a relative survival analysis based on 68,449 cases treated in 20 French comprehensive cancer centers between 1980 and 1999. Proc Am Soc Clin Oncol. 2003;22:3437a.

Bae K T and P.-W. D. (1997). "Pharmacokinetic modeling of multidrug resistance P-glycoprotein transport of gamma-emitting substrates." Q J Nucl Med **41**(2): 101-10.

Barbara T. McGrogan, Breege Gilmartin, et al. (2008). "Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer." Biochimica et Biophysica Acta **1785**: 96–132.

Bear HD, Anderson S, et al. (2006). "Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer:National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27." J Clin Oncol **1;24**(13): 2019-27.

Beck W T, Grogan T M, et al. (1996). "Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations." Cancer Res **56**(13): 3010-20.

Bonadonna G, Brusamolino E, et al. (1976). "Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer." N Engl J Med **294**: 405–410.

Bonadonna G, Brusamolino E, et al. (1998). "Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute." J Clin Oncol **16**(1): 93-100.

Bonetti A, Zaninelli M, et al. (1998). "bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer." Clin Cancer Res **4(10)**: 2331-6.

Bonnefoi H, Potti A, et al. (2007). "Validation of gene signatures that predict the response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy: a substudy of the EORTC 10994/BIG 00-01 clinical trial." Lancet Oncol **8**(12): 1071-8.

Bonnefoi H, U. C., Iggo R, Cameron D. (2009). "Predictive signatures for chemotherapy sensitivity in breast cancer: are they ready for use in the clinic?" Eur J Cancer **45**(10): 1733-43.

Botti G, Chiappetta G, et al. (1993). "PCNA/cyclin and P-glycoprotein as prognostic factors in locally advanced breast cancer. An immunohistochemical, retrospective study." Tumori. **79**: **214-8**.

Bottini A, Berruti A, et al. (2000). "p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients." Clin Cancer Res **6**(7): 2751-8.

Bottini A, Berruti A, et al. (2001). "Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer." Br J Cancer **85**(8): 1106-12.

By Jos A. van der Hage, Cornelis J.H. van de Velde, et al. (2001). "Preoperative Chemotherapy in Primary Operable Breast Cancer: Results From the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902." Journal of Clinical Oncology, **19**(22): 4224-4237.

Carey LA, Dees EC, et al. (2007). "The triple negative paradox: primary tumour chemosensitivity of breast cancer subtypes." Clin Cancer Res **13**: 2329–2334.

Carey LA, M., R., E. C. Dees, et al. (2005). "American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome." J Natl Cancer Inst **97**(15): 1137-42.

Cayre A, Cachin F, et al. (2002). "Single static view 99mTc-sestamibi scintimammography predicts response to neoadjuvant chemotherapy and is related to MDR expression." Int J Oncol **20**(5): 1049-55.

Chevillard S, Pouillard, et al. (1996). "Sequencial assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of s phase fraction as predictive markers of breast cancer reposnse no neo-adjuvant therapy." Cancer **77**: 292-300.

Chia S, S. S., Byrd DR, Mankoff DA (2008). "Locally advanced and inflammatory breast cancer." J Clin Oncol **10;26(5)**: 786-90.

Chow LW, T. M. T. Y. (2003). "Neoadjuvant celecoxib and 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide for the treatment oflocally advanced breast cancer." Proceedings of the American Society of Clinical Oncology. **22**: 787-788.

Ciarmiello A, Del Vecchio S, et al. (1998). "Tumor clearance of technetium 99m-sestamibi as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer." J Clin Oncol **16**(5): 1677-83.

Colleoni M, V. G., Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, Gelber R D,Curigliano G,Torrisi R,Luini A,Intra M,Galimberti V, Renne G,Nole F, Peruzzotti G, Goldhirsch A. (2004). "Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment." Clin Cancer Res **10**(19): 6622-8.

Dean M, F. T., Bates S. (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." Nat Rev Cancer **5**(4): 275-84.

Delmon-Moingeon LI, P.-W. D., Van den Abbeele AD, Holman BL, Davison A, Jones AG. (1990). "Uptake of the cation hexakis(2-methoxyisobutylisonitrile)-technetium-99m by human carcinoma cell lines in vitro." Cancer Res **50(7)**: 2198-202.

DGS Publicação Anual da DGS. Risco de Morrer.

Edward Chu, V. T. D. (2006). Physician´s Cancer Chemotherapy Drug Manual. Sudbury, Massachusetts, Jones and Bartlett.

Estévez LG, C. J., Antón A, Florián J, López-Vega JM, Velasco A, Lobo F, Herrero A, Fortes J. (2003). "Weekly docetaxel as neoadjuvant chemotherapy for stage II and III breast cancer: efficacy and correlation with biological markers in a phase II, multicenter study." Clin Cancer Res. **9(2)**: 686-92.

Faneyte IF, S. J., Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ. (2003). "Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome." Br J Cancer **88(3)**: 406-12.

Fisher B, B., J, Wolmark, N.Mamounas, E.Brown, A.Fisher, E. R.Begovic, M.DeCillis, A.Robidoux, A. and A. B. Cruz, Jr.Hoehn, J. L.Lees, A. W.Dimitrov, N. V.Bear, H. D. (1998). "Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer." J Clin Oncol **16**(8): 2672-85.

Fisher B, B. A., Dimitrov NV, et al. (1990). "Two months of doxorubicin–cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors:results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15." J Clin Oncol **8**: 1483-96.

Fojo AT, M. M. (2005). "Microtubule targeting agents: basic mechanisms of multidrug resistance (MDR)." Semin Oncol **32**(6 Suppl 7): S3-8.

Fojo, T. (2005). "p53 as a therapeutic target: unresolved issues on the road to cancer therapy targeting mutant p53." Drug Resist Update **5**: 209–216.

Freedman, M. (2004). Imaging: new tecniques. Diseases of the Breast. M. E. L. Jay R Harris, Monica Morrow, C Kent Osborne. Philadelphia, Lippincott Williams & wilkins**:** 181-198.

Frutuoso C, Henriques I, et al. (2007). "Primary chemotherapy with sequencial docetaxel followed by docetaxel and epirrubicin in large operable breast cancer." EJCO **28, 6**: 447-450.

Geisler S, Lonning PE, et al. (2001). "Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer." Cancer Research **61**: 2505–2512.

Gianni L, Zambetti M, et al. (2005). "Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer." J Clin Oncol **23**(29): 7265-77.

Giordano SH, B. A., Smith TL, et al. (2004). "Is breast cancer survival improving?" Cancer **100**: 44-52.

Gralow J R, Burstein H J, et al. (2008). "Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease." J Clin Oncol **26**(5): 814-9.

Group., E. B. C. T. C. (1998). "Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials." Lancet **352**: 930-42.

Hegewisch-Becker, S., F. Staib, et al. (1998). "No evidence of significant activity of the multidrug resistance gene product in primary human breast cancer." Ann Oncol **9**(1): 85-93.

Henderson IC, Berry DA, et al. (2003). "Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary
breast cancer." J Clin Oncol **21**: 976–983.

Hendrikse, N. H., E. J. Franssen, et al. (1999). "Visualization of multidrug resistance in vivo." Eur J Nucl Med **26**(3): 283-93.

Hickman, J. (1992). "Apoptosis induced by anticancer drugs." Cancer Metastasis Rev. **11(2)**: 121-39.

Honkoop, A. H., P. J. van Diest, et al. (1998). "Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer." Br J Cancer **77**(4): 621-6.

Jeruss, J. S., E. A. Mittendorf, et al. (2008). "Staging of breast cancer in the neoadjuvant setting." Cancer Res **68**(16): 6477-81.

Joaquim Gouveia, M. A. d. S., Victor Veloso (1993). "Registo Oncológico Nacional."

Kamesaki, S., H. Kamesaki, et al. (1993). "bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair." Cancer Res **53**(18): 4251-6.

Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, et al. (2000). "TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients." Clin Cancer Res. **6(1)**: 50-6.

Kuerer HM, N. L., Smith TL, et al. (1999). " Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumour and axillary lymph node response to doxorrubicin-based chemotherapy." J Clin Oncol **17**: 460-9.

Laranja Pontes, M. A. d. S., Ricardo da Luz (2001). "Registo Oncológico Nacional."

Laura M. Vargas-Roiga, F. Darıo Cuello-Carriona, et al. (2008). "Prognostic value of Bcl-2 in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline based chemotherapy." Molecular Oncology **2**: 1 0 2 – 1 1 1.

Leonessa, F. and R. Clarke (2003). "ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer." Endocr Relat Cancer **10**(1): 43-73.

Liu T J, Tsai SC, et al. (2002). "Comparison of the expression of P-glycoprotein, Ki-67, and P-53 to technetium-99m tetrofosmin mammoscintigraphic findings." Cancer Invest **20**(2): 199-205.

Macus Tien Kuo, Patrick Bednarski, et al. (2009). "Redox Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy." Antioxid Redox Signal **11(1)**: 99–134.

Mansi, L., P. F. Rambaldi, et al. (1997). "Diagnostic and prognostic role of 99mTc-Tetrofosmin in breast cancer." Q J Nucl Med **41**(3): 239-50.

Maria Chiara Zatelli, Andrea Luchin, et al. (2007). "Cyclooxygenase-2 inhibitors prevent the development of chemoresistance phenotype in a breast cancer cell line by inhibiting glycoprotein p-170 expression." Endocrine-Related Cancer **14**: 1029-1038.

Marshall, C., J. Eremin, et al. (2005). "Monitoring the response of large (>3 cm) and locally advanced (T3-4, N0-2) breast cancer to neoadjuvant chemotherapy using (99m)Tc-Sestamibi uptake." Nucl Med Commun **26**(1): 9-15.

Massardo, T., O. Alonso, et al. (2002). "Diagnostic value of 99mTc-methylene diphosphonate and 99mTc-pentavalent DMSA compared with 99mTc-sestamibi for palpable breast lesions." J Nucl Med **43**(7): 882-8.

Matthew J Ellis, D. F. H., Marc E Lippman (2004). In Diseases of the breast.Treatment of metastatic breast cancer. Diseases of the Breast. M. E. L. Jay R Harris, Monica Morrow, C Kent Osborne. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins**:** 1101- 1159.

Michael C Perry, C. M. A., Ross G Donehower (2000). Chemotherapy. Clinical Oncology. Martin D Abellof, James O. Armitage, Allen S. Lichter and J. E. Niederhuber. New York, Churchill Livinstone**:** 377-422.

Miguel Martin, M. D., M. D. Tadeusz Pienkowski, et al. (2005). "Adjuvant Docetaxel for Node-Positive Breast Cancer." N Engl J Med **Volume 352, 22**: 2302-2313.

Miyashita, T. and J. C. Reed (1993). "Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line." Blood **81**(1): 151-7.

O'Driscoll L, C. M. (2006). "Biomarkers and Multiple Drug Resistance in Breast Cancer." Current Cancer Drug Targets **6**: 365-384 365.

Parton M, K. S., Smith I, Krajewska M, et al. (2002). "Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy." Clin Cancer Res **8**(7): 2100-8.

Penault-Llorca, F. V.-S., A. (2003). "Roles of the pathologist in neoadjuvant chemotherapy: evaluation of response, prognostic and predictive factors." Ann. Pathol **23**: 555-563.

Petit T, Wilt M, et al. (2004). "Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy." Eur J Cancer **40(2)**: 205-11.

Piwnica-Worms D, Chiu ML, et al. (1993). "Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organotechnetium complex." Cancer Res **1;53(5)**: 977-84.

Pusztai, L., Krishnamurti S, et al. (2004). "Expression of BAG-1 and BCL-2 proteins before and after neoadjuvant chemotherapy of locally advanced breast cancer." Cancer Invest. **22**: 248–256.

Ratnasinghe D, Daschner PJ, et al. (2001). "Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible?" Anticancer Res. **2001 May-Jun;21(3C)**): 2141-7.

Ravaioli, A., L. Bagli, et al. (1998). "Prognosis and prediction of response in breast cancer: the current role of the main biological markers." Cell Prolif **31**(3-4): 113-26.

Rozan S, Vincent-Salomon A, et al. (1998). "No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer." Int J Cancer. **79(1)**: 27-33.

Rudas M, Filipits M, et al. (2003). "Expresssion of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy." Breast Cancer Res. Treat. **81**: 149-157.

Ruggeri, R. M., S. Sciacchitano, et al. (2006). "Immunoexpression of multidrug-resistance protein 2 and cyclooxygenase 2 in medullary thyroid carcinomas." Arch Pathol Lab Med **130**(7): 1014-9.

S Cleator, M. P. a. M. D. (2002). "The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer." Endocrine-Related Cancer **9**: 183–195.

Sapunar F, S., I. E. (2000). "Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer." Ann. Med. **32**: 43-50.

Schneider J, Lucas R, et al. (2000). "Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer:correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP." Anticancer Res. **20**: 4373-4377.

Scotto, K. (2003). "Transcriptional regulation of ABC drug transporters." Oncogene **22**: 7496–7511.

Shinoura, N., Y. Yoshida, et al. (1999). "Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function." Cancer Res **59**(16): 4119-28.

Smith IC, H. S., Hutcheon AW et al. (2002). "Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel." J Clin Oncol **20**: 1456-66.

Swain, J. J. L. e. a. M. (2005). "Development of no chemotherapeutic agents to evade the mecanisms of multidrug resistance." Seminars in Oncology **32 suppl 7**: s22-s26.

Symmans, W. F., F. Peintinger, et al. (2007). "Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy." J Clin Oncol **25**(28): 4414-22.

Takeuchi, N., M. Fukumoto, et al. (2002). "Scintigraphic prediction of response to chemotherapy in patients with breast cancer: Technetium 99m-tetrofosmin and thallium-201 dual single photon emission computed tomography." Int J Oncol **20**(1): 53-8.

Toshiaki Saeki, T. T., Wakao Sato, Kiyoshiro Nishikawa (2005). "Drug resistance in chemotherapy for breast cancer." Cancer Chemother Pharmacol **56 (Suppl 1)**: s84–s89.

Travaini LL, Baio SM, et al. (2007). "Neoadjuvant therapy in locally advanced breast cancer: 99mTc-MIBI mammoscintigraphy is not a reliable technique to predict therapy response." Breast. **16(3)**: 262-70.

Trihia, H., S. Murray, et al. (2003). "Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker?" Cancer **97**(5): 1321-31.

Urruticoechea, A., I. E. Smith, et al. (2005). "Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer." J Clin Oncol **23**(28): 7212-20.

Vecchio, S. D., A. Ciarmiello, et al. (1997). "In vivo detection of multidrug-resistant (MDR1) phenotype by technetium-99m sestamibi scan in untreated breast cancer patients." Eur J Nucl Med **24**(2): 150-9.

Verrelle, P., F. Meissonnier, et al. (1991). "Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **83**(2): 111-6.

Wackers, F. J., D. S. Berman, et al. (1989). "Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging." J Nucl Med **30**(3): 301-11.

Wallace-Brodeur RR, L. S. (1999). "Clinical implications of p53 mutations." Cell Mol Life Sci **55**: 64–75.

Yusuf, R. Z., Z. Duan, et al. (2003). "Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation." Curr Cancer Drug Targets **3**(1): 1-19.

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AJCC-American Joint Committee on Cancer

ATPase- enzima que cataliza a hidrólise do ATP

BCIRG- Breast Cancer International Research Group

Bcl2- Família de genes ou proteínas a que estes dão origem; B cell Lymphoma 2

CAF- esquema de poliquimioterapia com ciclofosfamida, doxorrubicina e fluoruracilo

CIMAGO- Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia

CMF- esquema de poliquimioterapia com ciclofosfamida, metotrexato e fluoruracilo

CMLA- Carcinoma da mama localmente avançado

CMGO- Carcinoma da mama grande operável

COX-2- ciclooxigenase 2

FIGO- Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FEC - esquema de poliquimioterapia com fluoruracilo, epirrubicina e ciclofosfamida

Gene MDR- Gene multidrug resistence

HER 2- Human Epidermal growth factor Receptor *2*

Ki 67- proteína utilizada como marcador da proliferação celular

mRNA- Acido RiboNucleico Mensageiro

NSABP- National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

p53- proteína 53, factor de transcrição codificado pelo gene TP 53 que é um gene supressor tumoral

QTNA- quimioterapia neo-adjuvante

RT-PCR- Transcriptase Reverse Polimerase Chain Reaction

Sestamibi-Tc99m- catião lipofílico marcado com Tecnesium utilizado na mamocintigrafia

TAC- esquema de poliquimioterapia com docetaxel, doxorrubicina e ciclofosfamida