

# QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA É PREDITIVA DA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA

## Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer: immunohistochemical analysis is predictive of response to chemotherapy

Dr. Daniel Herchenhorn<sup>1</sup>, Dra. Lídia Magalhães Rezende<sup>2</sup>, Dr. Luiz Claudio Thuler<sup>3</sup>, Dra. Raquel C. Maia<sup>4</sup>, Dr. Morvan Medina<sup>5</sup>, Dr. Mário Alberto Dantas da Costa<sup>6</sup>

### Resumo

A quimioterapia é o tratamento padrão inicial para câncer de mama localmente avançado. A correlação entre a resposta à quimioterapia neoadjuvante e fatores prognósticos pode ser útil nesta doença.

De setembro 1996 a dezembro de 1997, 25 pacientes portadoras de câncer de mama localmente avançado (UICC – estágio IIIA, IIIB e inflamatório (1), foram submetidas a 4 ciclos de quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina 60mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida 600mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias, mastectomia à Patey e tratamento adjuvante. A resposta clínica e patológica foi correlacionada com marcadores obtidos através de análise imunohistoquímica da biópsia do tumor. Os marcadores analisados foram: receptores hormonais, p53, HER/neu (cerb-B2), MIB, grau nuclear, PCNA.

A resposta clínica objetiva foi de 74%. Vinte e um de 23 pacientes (91%) analisadas foram submetidas à cirurgia. Quatro pacientes não apresentavam doença microscópica na mama (19%). Destas pacientes, 2 também não apresentavam doença em linfonodos axilares, enquanto 4 apresentavam doença residual na mama de até 2 cm (19%). Todos os marcadores apresentaram positividade em percentuais elevados. A positividade do p53 e do MIB apresentou correlação com a resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, porém não alcançou significância estatística. Os resultados iniciais sugerem uma relação entre a positividade do p53 com a resposta clínica e com a resposta patológica, relação esta que não é demonstrada em estudos anteriores. A presença do MIB positivo também esteve associada com uma resposta patológica favorável.

**Palavras-chave:** Câncer de mama localmente avançado, quimioterapia neoadjuvante, marcadores biológicos

1. Médico Oncologista Clínico, ex-residente do Hospital do Câncer

2. Patologista do Serviço da Anatomia Patológica do Hospital do Câncer

3. Médico Epidemiologista do Serviço de Pesquisa Clínica do Hospital do Câncer

4. Médica Hematologista do Hospital do Câncer

5. Médico Mastologista do Hospital do Câncer

6. Médico Oncologista Clínico do Hospital do Câncer

Endereço para correspondência: Serviço de Oncologia Clínica  
Instituto Nacional de Câncer - Unid. Hosp. I  
Praça da Cruz Vermelha, 23 - Cep. 20230-130  
Rio de Janeiro - RJ

## ABSTRACT

Neoadjuvant chemotherapy is the standard initial treatment for locally advanced breast cancer, and correlation between response to chemotherapy and prognostic factors may be useful in this disease.

From September 1996 to December 1997, 25 patients with breast cancer stage IIIA, IIIB and inflammatory were submitted to 4 cycles of neoadjuvant chemotherapy consisting of doxorubicin 60mg/m<sup>2</sup> and cyclophosphamide 600mg/m<sup>2</sup> every 3 weeks, Patey mastectomy and adjuvant treatment. Clinical and pathological responses were related to biological markers studied by immunohistochemical analysis.

The markers analyzed were: hormonal receptors, p53, HER/neu (cerb-B2), MIB, nuclear grade and PCNA. Objective clinical response was 74%. Twenty one out of 23 patients (91%) were operated. Four patients had a complete response on the breast (19%), and two of them also had no axillary disease; 4 patients had residual tumor of less than 2 cm (19%).

All markers were overexpressed. Overexpression of p53 and MIB on immunohistochemical analysis had an association with response to neoadjuvant chemotherapy, but it was not statistically significant.

There was a positive relation between p53 and clinical and pathological response that was not found in previous studies. Besides p53, MIB overexpression was also related to a favorable pathological response.

*Key words: locally advanced breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, biological markers*

## I. Introdução

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais freqüente entre as mulheres segundo estatísticas do Instituto Nacional de Câncer americano (2). Cerca de 182.000 novos casos foram diagnosticados nos naquele país em 1995 e, nesse ano, 46.000 mortes foram relacionadas a esta neoplasia (2).

Também segundo estatísticas americanas 10 a 20% das pacientes se apresentam com tumores localmente avançados UICC IIIA e III B (2). De acordo com dados do Serviço de Mastologia do Hospital do Câncer - INCA foram diagnosticadas 2.321 novos casos de câncer de mama neste serviço no período de 1988 a 1994. Deste total, 1.023 pacientes (44%) se apresentavam com câncer de mama estágio III. Esta alta incidência de tumores em fase mais avançada está de acordo com dados de outros países em desenvolvimento, onde o acesso ao sistema de saúde, e medidas preventivas, como mamografias de rotina, não são realizadas na maioria da população.

Este grupo de pacientes é candidato a tratamento quimioterápico pré-operatório (neoadjuvante), que visa reduzir o volume tumoral, possibilitar ressecção posterior do tumor, e ainda tratar possíveis focos de micrometástases precocemente. A taxa de resposta média a quimioterapia neoadjuvante é de 70% a 90% na maioria

das séries, variando conforme as doses e esquema de quimioterápicos empregados (3, 4).

Apesar das taxas de resposta objetiva à quimioterapia serem altas e o tratamento local radical, a maioria das pacientes acaba recaindo com doença loco-regional ou à distância. Tal progressão pode ocorrer, em parte, pelo desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos empregados. Assim, apenas cerca de 50% das pacientes estarão vivas em 5 anos a despeito do tratamento realizado (2).

Como a quimioterapia tem papel fundamental no tratamento destas pacientes, o estudo do desenvolvimento de resistência a estas drogas é de suma importância, podendo inclusive indicar subgrupos de pacientes de pior prognóstico previamente ao tratamento quimioterápico.

Além disso, a identificação de marcadores biológicos que tenham não só valor prognóstico, mas também valor preditivo da resposta ao tratamento permitiria no futuro a individualização dos esquemas quimioterápicos, além do desenvolvimento de terapias direcionadas contra marcadores celulares específicos.

Assim sendo, correlacionamos neste estudo preliminar, a expressão de marcadores biológicos com a resposta à



quimioterapia neoadjuvante. Incluiremos futuramente, a dosagem de p-glicoproteína antes e após a quimioterapia, e sua relação com a resposta ao tratamento.

Os marcadores biológicos (ou tumorais) são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente, pelo paciente, em resposta à presença do tumor. A utilização dos marcadores biológicos na avaliação do prognóstico do câncer de mama têm sido alvo de inúmeros estudos recentemente. Muitos destes marcadores, podem agora ser identificados através de imunohistoquímica ou hibridização *in situ*. Incluem-se nesta ampla categoria uma variedade de proteínas, algumas relacionadas a oncogenes e outras a atividade proliferativa do tumor (5).

Serão avaliados neste estudo os seguintes marcadores: p53, receptores hormonais (estrogênio e progesterona), cerb-B2, catepsina D, MIB-1, PCNA. Estes marcadores foram escolhidos por serem, segundo a literatura, os mais importantes em termos de prognóstico do câncer e também pela facilidade operacional.

Diversos mecanismos de resistência têm sido intensamente estudados nos últimos anos, dentre estes destaca-se a resistência a múltiplas drogas (MDR) a qual é mediada pela glicoproteína-P (gpP), codificada pelo gene *mdr1*. A principal característica deste fenômeno de resistência é o acúmulo reduzido das drogas no interior da célula; resultado direto da expressão da gpP na membrana celular das células resistentes (6). A glicoproteína-P funciona como uma bomba de efluxo, dependente de energia, para um grupo de agentes citotóxicos não relacionados estruturalmente e funcionalmente. No câncer de mama (especialmente tumores localmente avançados), freqüentemente encontramos níveis elevados da gpP ou do gen *mdr1*. De fato, existem evidências que a gpP/*mdr1* pode ter um papel na resistência a determinadas drogas citotóxicas (drogas indutoras de *mdr*) utilizadas no tratamento do câncer de mama. Além da gpP, um fator prognóstico potencial em câncer de mama, é o acúmulo da proteína p53. A p53 mutante tem sido sugerida como co-responsável pela resistência aos quimioterápicos e por tumores mais agressivos e que determinam menor sobrevida (7, 8). A proteína p53 tipo selvagem é um gene supressor tumoral que, nos casos de lesão do DNA regula o ciclo celular, proporcionando tempo para o reparo. Não havendo o reparo ocorre indução de apoptose (morte celular programada). Se a p53 está inativa, ocorre perda da função controladora do crescimento celular e, conseqüentemente, lesão do genoma. Observou-se que

no câncer humano, ocorre freqüentemente perda da atividade da p53 selvagem (9). O acúmulo da p53 pode ser visto no câncer de mama e parece estar associado com vários fatores prognósticos, indicando um tumor mais agressivo e rapidamente proliferativo. A coexpressão da p53 com a gpP tem sido considerada como um fator de pior prognóstico no câncer de mama. Estudos *in vitro* tem demonstrado que a p53 mutante pode ativar o promotor do gene *mdr1* e estar de algum modo envolvida no fenômeno da resistência às drogas (9). Pinedo e colaboradores também demonstraram correlação da presença da gpP com a p53, principalmente em tumores localmente avançados, além de confirmar a associação de ambas as proteínas como importante fator prognóstico neste grupo de pacientes (9). Porém, neste estudo não houve pior resposta à quimioterapia neoadjuvante no grupo de pior prognóstico (p53 e p-gp positivos). Tal fato pode estar relacionado ao pequeno número de pacientes avaliados ou às doses mais altas de quimioterapia empregadas. A expressão da p53 em estudos como de Pinedo et al. (9) e Linn et al. (8) não se correlacionou com a resposta à quimioterapia, enquanto que outros autores como Berruti et al. (10) e Koechli et al. (11) demonstraram uma relação inversa entre a expressão do marcador e a resposta à quimioterapia neoadjuvante.

A presença de receptores hormonais (estrogênio ou progesterona) tem se mostrado como fator prognóstico favorável, além de ser um fator preditivo da resposta ao tratamento hormonal. Estudos em pacientes com câncer de mama avançado evidenciaram taxas de resposta ao tratamento hormonal em 77% dos pacientes com receptor hormonal positivo e 11% para aqueles em que o receptor negativo (12). O valor prognóstico dos receptores hormonais é mais evidente nas mulheres na pré menopausa (13).

O *cerbB-2*, também conhecido como HER/*neu2*, é um proto-oncogene que codifica uma glicoproteína transmembrana com estrutura similar ao receptor do fator de crescimento epidérmico. Foi encontrada uma freqüência amplificada da ordem de 50% no carcinoma ductal *in situ*.

Mansour et al. demonstraram em um grupo de pacientes com câncer de mama axila negativa e receptores positivos que 80% apresentava sobrevida livre de doença para os tumores que exibiam baixa expressão de HER/*neu*, enquanto que a sobrevida para os tumores com alta expressão foi de 43% (14). A positividade para o HER/*neu* ocorre em cerca de 10% a 30% dos tumores de mama, e, principalmente nas pacientes mais jovens, com tumores de alto grau histológico e com receptores



hormonais negativos (15). Assim sendo, a positividade deste marcador está associada a tumores mais agressivos, com pouca resposta a manipulação hormonal, já tendo sido demonstrado que estes pacientes se beneficiam do uso de quimioterapia adjuvante (16). Recentemente, estudos clínicos iniciais com anticorpos anti-HER/neu, isolados ou em combinação com quimioterápicos demonstraram ser uma opção terapêutica valiosa no tratamento do câncer de mama avançado (17).

A catepsina D é uma proteinase ácida lisossomal que está envolvida no turnover de proteínas intracelulares. Foi demonstrado que níveis aumentados de catepsina D no câncer de mama pode estar associado à agressividade do tumor, ao seu tamanho, ao alto grau histológico e ao acometimento dos linfonodos axilares (18).

Outro dado de interesse para avaliarmos a agressividade dos tumores é a avaliação da atividade mitótica. A contagem de mitoses requer padronização e envolve algum grau de subjetividade. Atualmente existem técnicas que permitem esta avaliação, por proteínas celulares que só estão presentes em células em proliferação. Vários antígenos tem sido identificados, incluindo o Ki-67 (MIB) e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Uma alta proporção de células tumorais coradas pelo Ki-67 e PCNA associa-se com a desdiferenciação celular e com a agressividade tumoral (19).

O Ki-67 é uma proteína nuclear não-histona achada em todas as fases do ciclo celular, menos na Go. O PCNA é também uma proteína nuclear não-histona que funciona como uma proteína acessória à DNA polimerase delta; seus níveis se correlacionam particularmente com a síntese de DNA. A medição destes dois marcadores demonstrou associação com a atividade mitótica e o grau tumoral. Honkoop et al. em recente estudo demonstraram a relação de altos índices de K1-67 após a quimioterapia, com pior prognóstico (7).

Tais marcadores nos fornecerão dados da agressividade dos tumores do grupo em estudo, e possibilitarão a correlação de sua expressão com a resposta clínica e patológica à quimioterapia neoadjuvante.

## II - Materiais e Métodos

O estudo foi realizado em pacientes com tumores localmente avançados (UICC-AJCC SYSTEM IIIA/IIIB) e inflamatórios vistos nos Serviços de Oncologia Clínica, Mastologia e Anatomia Patológica (1). Na figura 1 temos a seqüência de avaliação e tratamento das pacientes.

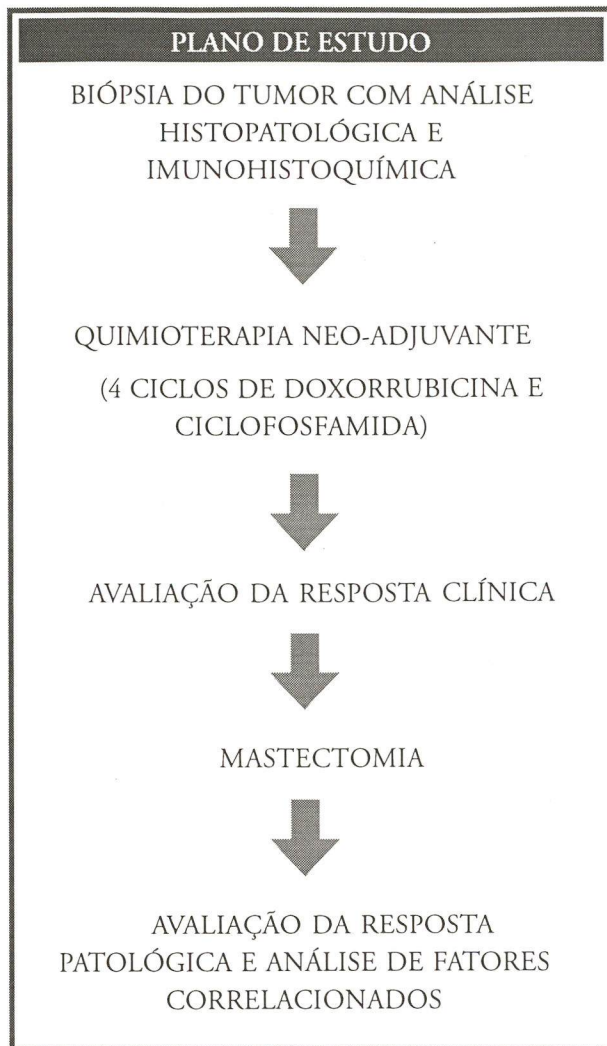


Figura 1 - Seqüência de avaliação e tratamento de câncer de mama com tumores localmente avançados e inflamatórios (UICC - AJCC System IIIA/IIIB)

## 2.1 Seleção de Pacientes

No período de Setembro de 1996 a Dezembro de 1997 foram selecionadas 25 pacientes portadoras de câncer de mama sem tratamento prévio, doença localmente avançada estágio clínico IIIA, IIIB e inflamatório (UICC) com idade até 75 anos. As pacientes não possuíam doença hepática, cardíaca ou renal que contra-indicasse a quimioterapia.

Foram feitos os seguintes exames antes do tratamento: hemograma completo, contagem plaquetária, bioquímica sérica (sódio, potássio, uréia, creatinina, glicose, cálcio, desidrogenase láctica, transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubinas), parasitológico de fezes, elementos anormais e sedimento de urina (se indicado), ecocardiograma (se indicado), ECG, cintilografia óssea, USG abdominal, RX tórax, mamografia bilateral. Previamente a cada ciclo de

quimioterapia era realizado novo hemograma e nova avaliação clínica. Os exames de estadiamento foram repetidos após o último ciclo de QT neoadjuvante.

Todas as pacientes apresentavam PS 0-1, e estavam cientes de sua participação na pesquisa mediante consentimento informado assinado previamente.

## 2.2 Esquema de Tratamento e Avaliação de Resposta

O esquema de quimioterapia neoadjuvante consistiu de doxorubicina 60mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida 600mg/m<sup>2</sup> i.v. em infusão lenta por 30 minutos, a cada 3 semanas (ou epirrubina 60mg/m<sup>2</sup> no lugar de doxorubicina) num total de 4.

As pacientes foram divididas em relação à resposta à quimioterapia de acordo com os seguintes critérios: resposta clínica completa - ausência de tumor palpável ao exame clínico, resposta clínica parcial - diminuição de mais de 50% do volume tumoral (medida bidimensional ao exame clínico), doença estável - diminuição menor que 50% do volume tumoral ou aumento do volume tumoral menor que 25%, progressão de doença - aumento do tumor maior que 25% ou surgimento de novas lesões locais ou à distância.

Consideramos como resposta clínica favorável todos os pacientes que obtiveram resposta clínica objetiva, ou seja, resposta clínica completa e resposta parcial. Com relação à avaliação patológica, consideramos como resposta patológica objetiva aquelas pacientes que apresentavam na peça cirúrgica doença residual até 2 cm no maior diâmetro (pT1) (incluindo as respostas patológicas completas). Todos as pacientes com doença residual maior que 2 cm foram consideradas como tendo ausência de resposta patológica. Este limite de 2 cm foi estabelecido após a análise dos dados preliminares, que evidenciaram haver uma grande semelhança no padrão de expressão dos marcadores imunohistoquímicos no grupo de pacientes sem doença residual e com doença residual microscópica comparando com o grupo com doença residual até 2cm.

Ao final do tratamento neoadjuvante as pacientes eram encaminhadas à cirurgia e, após a cirurgia as pacientes completavam o tratamento quimioterápico de acordo com o critério do investigador (baseado na resposta ao tratamento neoadjuvante, na idade e na dosagem dos receptores hormonais), sendo que todas foram submetidas à radioterapia no plastrão em caráter adjuvante.

## 2.3 Análise de Técnica

As análises imunohistoquímicas foram realizadas em blocos de parafina de onde foram feitos cortes de 3 a 4 mm (10 cortes por bloco) que eram colocados em lâmina com cola especial. Após a desparafinização dos cortes, a recuperação antigênica foi obtida através de calor úmido (panela de pressão). O método de detecção utilizado foi a reação do complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP). Os anticorpos utilizados, clones, diluição e respectivos fabricantes, são colocados ao lado de cada um dos marcadores na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados para técnica de imunohistoquímica

Receptor de estrogênio: AC monoclonal anti-estrogênio; clone 1D5; 1/50; DAKO

Receptor de progesterona: AC monoclonal anti-progesterona; clone 1 A6; 1/20; NOVOCASTRA

Cerb-B2: AC policlonal - oncoproteína anti-cerbB-2; 1/400; DAKO

Catepsina D: AC policlonal anti-catepsina D; 1/300; DAKO

MIB-1 (K1-67): AC monoclonal anti-MIB-1; clone K1-67; 1/50; AMAC

PCNA: AC monoclonal anti-PCNA; clone PC-10; 1/200; DAKO

p53: AC monoclonal anti-p53; clone DO-7; 1/100; DAKO

As lâminas foram todas analisadas e revisadas pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer, sendo realizada comparação dos resultados com amostra de grupo controle sem que houvesse conhecimento prévio da resposta clínica ou patológica de cada paciente. Foi realizada avaliação da porcentagem de células coradas e somente aquelas intensamente coradas foram consideradas positivas. O ponto de corte utilizado (*cut-off*) para separar colorações positivas das negativas foi de 10% de células coradas, seguindo critérios utilizados na literatura (20).

## 2.4 Análise Estatística

As frequências serão apresentadas como números absolutos e proporções, sendo a significância estatística entre duas diferenças verificada pelo teste do qui-quadrado. Para



a medida da intensidade da associação entre os marcadores tumorais e o desfecho clínico ou patológico será calculada a razão de chances (*odds ratio*). A análise estatística foi realizada com o apoio do “software” EPI INFO (Center for Disease Control and Prevention- USA).

### III - Resultados

Das 25 pacientes previamente selecionadas, 2 foram retiradas do estudo após abandono do tratamento. Assim, 23 pacientes serão substrato para análise. O tempo dos sintomas até o início do tratamento variou de 3 a 30 meses, média de 10 meses. Treze pacientes apresentavam tumor estágio IIIB, 5 estágio IIIA e 5 com tumor inflamatório. A idade variou de 30 a 72 anos, média de 49 anos. Todas as pacientes tinham PS 0-1 na avaliação inicial. Invasão cutânea na biópsia inicial foi verificada em 9 pacientes (39%); 22 pacientes eram portadoras de carcinoma ductal infiltrante e 1 carcinoma mucinoso. O tamanho dos tumores à avaliação inicial ficou entre 5cm e 16cm no maior diâmetro, média de 9,2cm.

Vinte e uma pacientes receberam os 4 ciclos propostos de quimioterapia sem redução ou atraso de dose (91%). Uma paciente recebeu um 5º ciclo por atraso na realização da cirurgia e, em outra paciente doxorubicina foi substituída por epirrubina por se tratar de paciente cardiopata e idosa. O tratamento foi muito bem tolerado, não tendo ocorrido nenhuma toxicidade grau 3 (segundo padrões da tabela de toxicidade da Organização mundial da Saúde).

Vinte e uma pacientes (91%) realizaram cirurgia posterior - Mastectomia à Patey e esvaziamento axilar, ficando sem evidência de doença após o procedimento. Uma paciente apresentou progressão de doença em fossa supraclavicular imediatamente após o 4º ciclo de quimioterapia, sendo encaminhada à radioterapia exclusiva, e outra paciente não foi operada por apresentar plaquetopenia prolongada, sendo retirada da análise patológica.

A taxa de resposta objetiva clínica foi de 74%, sendo que 2 pacientes obtiveram resposta clínica completa (8,7%) e 15 resposta parcial (65,3%). Cinco pacientes evoluíram com doença estável (21,7%), porém puderam ser submetidas a cirurgia.

Na análise patológica, 4 pacientes não apresentavam tumor residual na mama (19%), e destas, 2 também não apresentavam doença axilar. Outras 4 pacientes (19%) apresentavam doença residual até 2 cm no maior

diâmetro, e as demais apresentavam doença residual volumosa. Foram isolados da dissecação axilar de 4 a 29 linfonodos axilares (média - 18), 7 pacientes não apresentavam doença axilar (33%), 5 pacientes apresentavam de 1 a 3 linfonodos (23%) e 9 pacientes apresentavam mais de 4 linfonodos acometidos (43%). O seguimento foi de 8 a 23 meses (mediana-20 meses), e até o momento deste relato 21 em 23 pacientes estão vivas e sem evidência de doença.

Após a cirurgia as pacientes foram tratadas com AC (doxorubicina e ciclofosfamida), CMF (ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluoro-uracil) ou tamoxifen de acordo com a idade e resposta a quimioterapia inicial. Todas foram submetidas à radioterapia no plastrão.

A positividade dos marcadores na análise imunohistoquímica está disposta na tabela 2. A alta incidência de expressão dos marcadores de alta proliferação como MIB e PCNA, além da expressiva positividade do p53 e do *cerb-B2* confirmam dados da literatura, onde a incidência destes marcadores se mostrou mais presente em tumores localmente avançados quando comparados com tumores menores (9). Além disso, a expressão aumentada de fatores de mau prognóstico corrobora para considerarmos este grupo de pacientes com prognóstico muito reservado, não só pelo volume inicial do tumor, mas também, por ser ele tumor com altos índices de proliferação celular e potencial metastático. Além disto, todos os tumores apresentavam grau nuclear 2 ou 3 na análise da contagem mitótica.

Tabela 2. Expressão dos marcadores imunohistoquímicos analisados

Marcador	Positividade %
p53	47
Receptor hormonal (est ou prog)	60
<i>cerb-B2</i>	48
Catepsina D	91
MIB	65
PCNA	78

*est* = estrogênio

*prog* = progesterona

Quando comparamos a expressão dos marcadores imunohistoquímicos com a resposta clínica e patológica (tabelas 3 e 4), podemos observar a presença de forte

Tabela 3: Relação dos marcadores imunohistoquímicos com a resposta clínica

marcador	resposta clínica objetiva	ausência de resposta	odds ratio	p
RH -	11(64,8%)	2(33,3%)	4,7	0,1
CATPD -	16(94%)	5(83,3%)	3,2	0,46
P53 +	10(58,8%)	1(16,7%)	7,1	0,09
CerbB-2+	9(52%)	1(16,7%)	5,6	0,14
MIB +	13(76,5%)	2(33,3%)	4,8	0,13
PCNA +	14(82,4%)	4(66,7%)	2,3	0,39

*Resposta clínica objetiva = resposta clínica completa + resposta parcial*

*Ausência de resposta = doença estável ou progressão de doença*

Tabela 4: Relação dos marcadores imunohistoquímicos com a resposta patológica

marcador	resposta patológica objetiva	doença residual	odds ratio	p
RH+	4(50%)	5(38,5%)	0,96	0,66
Catep. D+	1(22,5%)	1(7,7%)	1,7	0,62
P53 +	6(75%)	4(30,8%)	6,7	0,06
Cerb-B2 +	5(57,2%)	5(38,5%)	2,6	0,26
MIB +	7(87,5%)	7(53,8%)	8,1	0,07
PCNA +	7(87,5%)	9(69,2%)	3,1	0,34

*Resposta patológica objetiva = doença residual na cirurgia < 2cm*

*Doença residual = a doença > 2cm na cirurgia*

associação entre a positividade do p53 e uma resposta clínica e patológica favorável. Dez em 11 pacientes com p53 positivos apresentaram resposta clínica objetiva, enquanto que 7 em 12 com p53 negativo não apresentaram resposta objetiva clínica. Com relação à resposta patológica, 6 em 10 com p53 positivo tiveram resposta patológica favorável e apenas 2 em 11 com p53 negativo obtiveram resposta patológica. Tal relação se traduziu em uma razão de chances (*odds ratio*) em torno de 7 vezes para ambas as respostas. Porém não alcançou significância estatística, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes analisados.

A positividade do MIB também mostrou forte associação com a resposta patológica. Sete em 14 pacientes com MIB positivo tiveram resposta comparado com apenas 1 em 7 com MIB negativo.

#### IV - Discussão

O câncer de mama localmente avançado tem se mostrado como modelo clínico interessante para investigação da expressão de marcadores celulares e sua

relação com o tratamento quimioterápico. O grande volume tumoral, com fácil acesso para biópsia e a rapidez com que obtemos dados de resposta ao tratamento estimulam tais estudos.

Diversos estudos têm correlacionado fatores como p53 e cerbB-2 com tumores que determinam pior sobrevida global e livre de doença. Recentemente, com o início da terapia genética, utilizando anticorpos anti-HER/neu (cerb-B2) em pacientes que expressam tal antígeno obteve-se resultados favoráveis com o uso isolado ou associado à quimioterapia destes anticorpos (17). Há correlação entre a positividade destes marcadores e ausência de resposta ao tratamento hormonal, bem como parece haver benefício com uso de quimioterapia adjuvante a base de antracíclicos nestes pacientes.

Em nosso estudo preliminar, apesar do pequeno número de pacientes avaliáveis, observamos uma forte relação entre a expressão do p53 com a resposta clínica e patológica e do MIB com a resposta patológica. A positividade do p53, que ocorreu em 47% dos casos, esteve associada à resposta clínica objetiva com *odds*



ratio de 7 vezes e  $p=0,09$  e para resposta patológica o *odds ratio* foi de 6 vezes com  $p=0,07$ ; enquanto que o MIB esteve presente em 65% dos pacientes e sua positividade se associou com a resposta patológica com *odds ratio* de 8 vezes e  $p=0,07$ .

Não houve associação entre a expressão dos outros marcadores analisados e a taxa de resposta a quimioterapia, assim como não foi possível correlacionar a positividade do HER/neu com a resposta ou falha ao tratamento quimioterápico. Também não houve associação com a negatividade dos receptores hormonais ou idade.

Recentemente, 3 estudos publicados por grupos holandeses falharam em correlacionar os fatores aqui estudados com a resposta à quimioterapia em um grupo de 40 pacientes com tumor localmente avançado (7, 8, 9). Estes estudos se diferenciam pelo tipo de quimioterapia empregada e pela titulação dos anticorpos utilizados para análise imunohistoquímica. Seria possível que, com o esquema de quimioterapia neoadjuvante mais intenso tendo doxorrubicina  $100\text{mg}/\text{m}^2$  e ciclofosfamida  $1.000\text{mg}/\text{m}^2$  por 3 a 6 ciclos, sobrepujássemos tais mecanismos de resistência. Além disso, Pinedo et al. não observaram relação do MIB com a resposta a quimioterapia (9). Porém, estudo anterior de Remvikos et al. demonstrou associação da positividade do MIB com resposta a quimioterapia à base de doxorrubicina (22). Ao contrário do nosso achado, outros autores como Berruti et al. e Koechli et al. demonstraram uma relação inversa entre a expressão do marcador e a resposta à quimioterapia neoadjuvante (10, 11). O grande volume dos tumores por nós analisados (média de 9cm), além do parâmetro utilizado como resposta patológica em nosso estudo (*cut-off* de 2cm) são diferenças entre nosso estudo e o de Pinedo, onde o parâmetro para resposta patológica foi a presença de resposta completa ou doença apenas microscópica na peça cirúrgica.

Berruti et al. demonstraram relação entre a ausência de mutação do p53 e resposta clínica completa à quimioterapia neoadjuvante com CMF (ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluoro-uracil) ou epirrubicina isolada; também não foi analisada a relação com a resposta patológica (10).

Devemos também considerar a possibilidade de diferenças em relação às técnicas utilizadas nas diversas séries e no *cut-off* de cada estudo. Em nosso trabalho não subdividimos os pacientes de acordo com a intensidade

da positividade do marcador, apenas dividimos entre negativos e positivos (>10% de expressão).

Todos os aspectos supra citados, justificam que tenhamos extrema cautela na análise dos resultados obtidos especialmente no que diz respeito a relação direta sugerida entre o p53 e respostas favoráveis à quimioterapia neoadjuvante. É fundamental que ampliemos o número de pacientes analisados para conclusões mais concretas e maior valor estatístico, principalmente quando confrontamos nossos dados com os dados dos estudos acima citados.

Devemos ressaltar que, apesar das diferenças existentes entre as avaliações clínica e patológica em nosso estudo, tais diferenças não foram estatisticamente significativas.

## V - Conclusão

As taxa de resposta objetiva ao esquema AC empregado foi de 74%, compatível com dados da literatura.

A presença de marcadores biológicos de mau prognóstico como p53, *cerb-B2*, MIB, PCNA e grau nuclear foi significativamente elevada neste grupo de pacientes, confirmando o grande potencial de malignidade do grupo estudado e a alta expressão de marcadores em tumores localmente avançados.

Houve associação entre a positividade da p53 e do MIB e respostas favoráveis ao tratamento.

O emprego destes marcadores na predição da resposta à quimioterapia neoadjuvante não deve ser indicada de rotina, devendo-se aguardar estudos maduros com maior número de pacientes para conclusões definitivas.

## IV - Referências Bibliográficas

1. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Manual of staging of cancer. Philadelphia: J.B.Lippincott Co., 4th ed, 1992.
2. HARRIS, JR.; MORROW, M.; BONADONNA, G. Cancer of the Breast. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott. 5th edition vol 2: 1557-1616, 1997.



3. BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P.; ZAMBETTI, M.; et al. Prognostic factors in locally advanced noninflammatory breast cancer. Long-term results following primary chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 15: 137-147, 1990.
4. FISHER B, MAMOUNAS E. et al.: Preoperative chemotherapy: a model for studying the biology and therapy of primary breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, vol 13,3:537-540, 1995.
5. ROSEN, P.P. Breast Pathology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
6. MAIA, RC.; RUMJANEK, VM. Importância clínica da resistência a múltiplas drogas nas leucemias agudas. *Rev Ass Med Brasil*, 42(2): 101-108, 1996.
7. HONKOOP, AH.; VAN DIEST, PJ.; JONG, JS.- Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. *Br. J. Cancer*, 77(4): 621-26, 1998.
8. LINN, C.; PINEDO, HM.; HONKOOP, AH.- Expression of drug resistance proteins in relation to chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 71:787-795, 1997.
9. PINEDO, HM.; HONKOOP, AH.; VAN DIEST, PJ.; JONG, JS.: p53 and P-glycoprotein are often co-expressed and are associated with poor prognosis in breast cancer. *Br Journal Cancer*, 74: 63-68, 1996.
10. BERRUTI, A.; BOTTINI, A.; BERSIGA, M.; et al.: p53 expression and reduction in kinetic cell activity in predicting clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients. *Proceedings American Soc. of Clinical Oncology*, abstr. 393, 1998.
11. KOECHLI, O.; SCHARE, GN.; SEIFERT, B. et al.: Mutant p53 protein associated with chemosensitivity in breast cancer specimens. *Lancet*, 344:1647-1648, 1994.
12. OSBORN, CK.; YOCHMOWITZ, MG.; KNIHT, WA. Et al. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*, 46:2884-2888, 1980.
13. THORPE, SM. Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Research*, 47:6125-6133. 1987.
14. MANSOUR, EG.; RAVDIN, PM.; DRESSLER, L. Prognostic factors in early breast cancer. *Cancer*, 74:381-400, 1994.
15. ALFRED, DC.; CLARCK, GM.; MOLINA, R. et al. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Human Pathology*, 23:974-979, 1992.
16. CARLOMANGO, C.; BIANCO, AR.; LAURENTTIS, M.; et al.: 20 year update of the Naples Gun Trial of adjuvant breast cancer therapy: evidence of interaction between CerbB-2 expression and Tamoxifen efficacy. *Proceedings American Soc. of Clinical Oncology*, abstr. 387, 1998.
17. SLAMON, D.; LEYLAND-JONES, B.; SHAK, S.; et al.: Addition of Herceptin to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer markedly increases anticancer activity. A randomized controlled phase III trial. *Proceedings American Soc. of Clinical Oncology*, abstr. 377, 1998.
18. GION, M.; MIONE, R.; DITTADI, R. et al.: Relationship between cathepsin D and other pathological and biological parameters in 1752 patients with primary breast cancer. *European Journal of Cancer*, 31 A:671-677, 1995.
19. LEONG, AS.; LEE, AK. Biological indices in the assessment of breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 48: M221-M238, 1995.
20. ROSEN, PP.; LESSER, ML.; ARROYO, CD. et al.: p53 in node-negative breast cancer: imunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 13:821-830, 1995.
21. BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P.; BRAMBILLA, C. et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight year experience at the Milan Cancer Institute. *Journal of Clinical Oncology*, 16:93-100, 1998.
22. REMVIKOS, Y.; BEUZEBOC, P.; ZAJDELA, A.; VOILLEMOT, N. Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with response to cytotoxic chemotherapy. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 81:1383-1389, 1989.