

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CLÍNICA MÉDICA

CRISTIANE RIOS PETRARCA

**EXPRESSÃO DE MARCADORES MOLECULARES PREDITIVOS DE RESPOSTA
À TERAPÊUTICA NEOADJUVANTE EM CÂNCER DE MAMA EM AMOSTRAS
TUMORAIS**

Porto Alegre

2010

CRISTIANE RIOS PETRARCA

**EXPRESSÃO DE MARCADORES MOLECULARES PREDITIVOS DE RESPOSTA
À TERAPÊUTICA NEOADJUVANTE EM CÂNCER DE MAMA EM AMOSTRAS
TUMORAIS**

Dissertação para postular o Título de Mestre em Clínica Médica. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, concentração em Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea

Porto Alegre

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P493e Petrarca, Cristiane Rios
Expressão de marcadores moleculares preditivos de resposta à
terapêutica neoadjuvante em câncer de mama em amostras tumorais /
Cristiane Rios Petrarca. – Porto Alegre, 2010.

72 f.: il. gráf. tab.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação
em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica
Médica.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea.

1. Neoplasias da Mama/Quimioterapia. 2. Terapia Neoadjuvante.
3. Biomarcadores. 4. Survivina. 5. Ciclina d1. 6. ETS-1. 7. PDEF.
8. BCL-2. 9. Estudos de Coortes. I. Garicochea, Bernardo. II. Título.

CDD 618.19
NLM WP 870

Dedico este trabalho aos pacientes desta sofrida doença. Razão de todo este empenho. Exemplos de perseverança e coragem. Pessoas com as quais aprendo diariamente a rever minha lista de prioridades.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Dr. Bernardo Garicochea pelos ensinamentos e por acreditar que esta conclusão era possível, mesmo quando tudo parecia impossível.

A enfermeira Gisele Carvalho pelo auxílio constante e sem a qual a conclusão deste trabalho não seria possível.

A Dra. Alessandra Morelle pelos ensinamentos e incentivo no crescimento profissional.

Ao epidemiologista Dr. Samuel de Carvalho Dumith, com quem muito aprendi durante a análise deste estudo, por sua competência, paciência e profissionalismo.

Aos funcionários da pós-graduação Ernesto e Vanessa sempre disponíveis, bem humorados e atentos no auxílio dos trâmites administrativos.

A Silvana Lunardi Alves pelo empenho em resgatar e catalogar os blocos de parafina.

Ao Thiago Giuliani pela atenção com o preparo do material da imunoistoquímica.

A patologista Dra. Adriana Brondani pelo cuidado com a análise imunoistoquímica.

Ao Patryck Boschetti pela atenção em relação as fotos das lâminas da análise imunoistoquímica.

Aos alunos Marluce Mennemann, Raquel Cristine Breunig, Bruna Zago Munhoz, Fernanda Bonkevitch e Vagner Menegotto Comin pela coleta dos dados nos prontuários, tabulação e controle de qualidade dos dados.

Aos meus pais Luiz Fernando Petrarca (in memoriam) e a minha mãe Luci Rios Petrarca por acreditar na minha capacidade, pelo apoio e incentivo e pelo exemplo de vida. Mas principalmente por terem proporcionado todas as condições para minha realização pessoal e profissional.

Aos meus sogros Francisco José Kiss e Eva Kiss pelo apoio recebido.

As minhas filhas Sofia e Luisa, ambas nascidas durante a realização deste trabalho, razão pela qual tudo passou a verdadeiramente fazer sentido. Com elas conheci o amor incondicional.

Ao meu marido Esteban Kiss, por achar que esta tarefa não era tão difícil acabou tornando, de certa forma, tudo mais fácil. Pelo apoio e paciência nesta etapa final.

"Imagination is more important than knowledge".

(Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: A decisão terapêutica em câncer de mama atualmente é o produto da avaliação de diversas variáveis, o que corrobora a heterogeneidade da doença e a tendência cada vez maior da individualização do tratamento. A quimioterapia neoadjuvante é uma modalidade de tratamento bastante eficiente em diferentes situações, incluindo os tumores inflamatórios e localmente avançados. A quimioterapia neoadjuvante, além de permitir a ressecção completa do tumor em muitas situações em que seriam necessários procedimentos muito extensos, também possibilita observar a sensibilidade tumoral ao tratamento quimioterápico. Desta forma, esta modalidade terapêutica também pode ser compreendida como um importante modelo de resposta podendo ser utilizada como marcador de intervalo livre de doença e sobrevida global.

A descoberta de novos marcadores biológicos que permitam a predição de resposta a certas drogas, da mesma forma que a expressão de receptores hormonais ou de Her-2 o fazem atualmente, é detrimental para a melhora da individualização do tratamento do câncer de mama. O contexto da neoadjuvância é o mais adequado para se testar estes biomarcadores, dada a rapidez de resposta que esta modalidade terapêutica confere. Entre os inúmeros candidatos a preditores de resposta, encontram-se proteínas responsáveis pela sobrevivência celular, pela apoptose e fatores de transcrição que ativam o ciclo celular. No presente trabalho avaliamos a expressão de Survivina, Ciclina D1, Bcl-2, PDEF e ETS1 em pacientes com câncer de mama submetidas a neoadjuvância com um esquema quimioterápico padrão.

Métodos: Pacientes com câncer de mama Estágios Clínicos II e III receberam quimioterapia pré-operatória com protocolo AC-T (doxorrubicina 60mg/m² D1 e Ciclofosfamida 600 mg/m² D1 por 4 ciclos de 21 dias, seguidos de Docetaxel 75 mg/m² D1 por 4 ciclos de 21 dias). A cirurgia da mama foi realizada, aproximadamente, 30 dias após. Níveis de expressão de Survivina, Ciclina D1, Bcl-2, PDEF e ETS1 foram avaliados pela técnica de imunistoquímica por visualização direta em amostras de tumor obtidas na biópsia do diagnóstico. Foram associados

os níveis de cada marcador molecular com a resposta patológica completa, para tal utilizamos: Teste Exato de Fisher, Regressão de Cox e Teste de Mann Witney.

Resultados: Foram estudadas 45 pacientes. Duas pacientes (4,44%) apresentaram doença irresssecável. A idade média foi de 47,24 (25 à 70). O estadiamento conforme TNM apresentou a seguinte distribuição: IIA n=13 (29%), IIB n=10 (22%), IIIA n=13 (29%), IIIB n=4 (9%) e IIIC n=4 (9%). Três pacientes (7,14%) obtiveram resposta patológica completa. A média da expressão de Survivina foi de 3,99 (0 à 11). A média da expressão dos demais marcadores foi de 7,67 (0 à 15) para ETS1, de 8,72 (2,33 à 15) para Bcl2, de 2,24 (0 à 15) para PDEF e de 2,35 (0 à 9) para Ciclina D1. O nível médio de Survivina foi significativamente maior ($P=0,01$) naquelas pacientes com resposta completa (9,33) do que naquelas sem resposta completa (3,42). Os demais marcadores não tiveram significância.

Conclusões: A Survivina é potencial marcador de resposta à terapêutica neoadjuvante em câncer de mama e conseqüentemente de sobrevida global e intervalo livre de doença.

Palavras-Chave: Câncer de Mama. Quimioterapia Primária. Quimioterapia Neoadjuvante. Biomarcadores. Survivina. Ets-1. Pdef. Ciclina D1. Bcl-2.

ABSTRACT

Expression of Molecular Markers Predictive to Neoadjuvant Therapeutic Response in Breast Cancer in Tumor Samples.

Justificative: The current therapeutic decision in breast cancer is the evaluation product of several variables. Such fact corroborates the heterogeneity of the disease as well as the greater tendency of the treatment individualization. The neoadjuvant chemotherapy is a very efficient treatment modality for a great number of situations, including the locally advanced inflammatory tumors. The neoadjuvant chemotherapy, besides yielding the complete tumor resection in many cases in which very extensive procedures would be necessary, also allows the observation of the tumor sensitivity to the chemotherapeutic treatment. Thus, this therapeutic modality can be understood as an important response model and be used as a disease free interval marker and of global survival.

The discovery of new biological markers which allow the response prediction to certain drugs, in the same way the expression of hormonal receptors or Her-2 nowadays, is detrimental to the treatment individualization of breast cancer. The neoadjuvant context is the most adequate to test these biomarkers, given the rapid response of this therapeutic modality. Among the innumerable candidates to response predictors, are proteins responsible for cell survival, for apoptosis and transcription factors that activate the cell cycle.

In the present work we evaluate the expression of Survinine, Cyclin D1, Bcl-2, PDEF and ETS1 in patients with breast cancer submitted to neoadjuvancy with a standard chemotherapeutic scheme.

Methods: Patients with Clinic Stages II and III received pre-operative chemotherapy with AC-T protocol (doxorubicina 60mg/m²D1 and Cyclophosphamide 600 mg/m² D1 for 4 cycles of 21 days, followed by Docetaxel 75 mg/m² D1 again, for 4 cycles of 21 days). The breast surgery was performed approximately 30 days later. Survinine, Cyclin D1, Bcl-2, PDEF and ETS1 expression levels were evaluated by the immunohistochemistry technique through direct visualization in tumor samples

obtained in the diagnosis biopsy. The Fisher Exact Test, Cox Regression and Mann Whitney Test were used to associate the levels of each molecular marker with full pathologic response.

Results: 45 patients were studied. Two patients (4.44%) presented irresectable disease. The average age was 47.24 (25 – 70). The staging, according to TNM, presented the following distribution: : IIA n=13 (29%), IIB n=10 (22%), IIIA n=13 (29%), IIIB n=4 (9%) and IIIC n=4 (9%). Three patients (7.14%) received a full pathologic response. The Survivine Expression average was 3.99 (0 to 11). The average of the remaining markers was 7.67 (0 to 15) for ETS1, 8.72 (2.33 to 15) to Bcl2, 2.24 (0 to 15) for PDEF and 2.35 (0 to 9) for Cyclin D1. The average level of Survivine was significantly higher ($P = 0,01$) in the patients with complete response (9.33) than in those without complete response (3.42). The remaining markers were of no significance.

Conclusions: Survivine is a potential response marker of neoadjuvant therapeutics in breast cancer and consequently of global survival and disease free interval.

Key words: breast cancer, primary chemotherapy, neoadjuvant chemotherapy, biomarkers, survivine, ETS-1, PDEF, Cyclin D1, Bcl-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de apoptose.....	26
Figura 2 – O ciclo celular e as ciclinas	29
Figura 3 – Vias de apoptose.....	30
Figura 4 – Ciclina D1 – escore final 6.....	37
Figura 5 – Ciclina D1 – escore final 5,33.....	38
Figura 6 – BCL2 – escore final15	38
Figura 7 – ETS1 – escore final 15	38
Figura 8 – Survivina – escore final 11,67	39
Figura 9 – Survivina – escore final 10	39
Figura 10 – Padrão da apresentação do marcador Bcl2 por escore final.....	42
Figura 11 – Distribuição da amostra por idade.....	44
Figura 12 – Tamanho do Tumor primário conforme TNM	47
Figura 13 – Status Linfonodal das pacientes em estudo	47
Figura 14 – Estadiamento conforme TNM.....	48
Figura 15 – Tipo de cirurgia realizada após tratamento neoadjuvante.....	49
Figura 16 – Expressão de Estrogênio	50
Figura 17 – Expressão de Progesterona.....	50
Figura 18 – Resposta patológica ao tratamento.....	51
Figura 19 – Nível de expressão de Survivina versus resposta patológica ao tratamento quimioterápico	52
Figura 20 – Expressão de Survivina conforme faixa etária	53
Figura 21 – Média do escore de cada marcador	53
Figura 22 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador Survivina.....	55
Figura 23 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador PDEF.....	55
Figura 24 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador ETS1	56
Figura 25 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador Ciclina D1	56
Figura 26 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador Bcl2	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Demonstração da avaliação imunoistoquímica por escore de positividade e intensidade do marcador Bcl2	41
Tabela 2 – Perfil das pacientes submetidas ao tratamento neoadjuvante	45
Tabela 3 – Tempo médio de seguimento conforme status de sobrevida (em anos) – início seguimento data da biópsia	46
Tabela 4 – Média da expressão dos marcadores.....	51
Tabela 5 – Distribuição dos marcadores versus resposta completa	52
Tabela 6 – Média da expressão dos marcadores conforme resposta completa	54
Tabela 7 – Prevalência de óbito e análise de sobrevida conforme o escore dos marcadores	54
Tabela 8 – Prevalência de óbito conforme idade	57
Tabela 9 – Prevalência de óbito conforme tamanho tumoral	57
Tabela 10 – Prevalência de óbito conforme comprometimento linfonodal	57
Tabela 11 – Prevalência de óbito conforme expressão de receptores de progesterona	57
Tabela 12 – Prevalência de óbito conforme expressão de receptor de estrogênio ...	58
Tabela 13 – Prevalência de óbito conforme expressão de Cerb B2.....	58
Tabela 14 – Prevalência de óbito versus resposta ao tratamento, conforme critério Recist	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC-T	–	Adriamicina, Ciclofosfamida, Docetaxel
ASCO	–	American Society of Clinical Oncology
EUA	–	Estados Unidos da América
SEER	–	Surveillance, Epidemiology and Results
CDI	–	Carcinoma Ductal Invasor
CK	–	Cytokeratin
CLI	–	Carcinoma Lobular Invasor
DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
FISH	–	Hibridização Fluorescente in Situ
HER2	–	Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 2
HR	–	Hazard Ratio
HSL	–	Hospital São Lucas
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
IR	–	Índice de Recorrência
PUCRS	–	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RE	–	Receptor de Estrógeno
RP	–	Receptor de Progesterona
RNA	–	Ácido Ribonucléico
EA	–	Esvaziamento Axilar
BLS	–	Biópsia de Linfonodo Sentinela
DP	–	Desvio Padrão
CI	–	Intervalo de Confiança
RECIST	–	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RT –PCR	–	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PDEF	–	Prostate Derived Epithelial Factor
Cerb-B2 / HER2	–	Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 2
IAP	–	Protein Inhibits Caspase Activity
BRCA-1	–	Breast Cancer 1, Early Onset
BRCA-2	–	Breast Cancer 2, Early Onset
ETS	–	Epithelial-Specific E26 Transforming Sequence
HR	–	Hazard Ratio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVAS.....	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	17
1.3 TRATAMENTOS VIGENTES E QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE	18
1.4 ESTAGIAMENTO.....	20
1.5 MARCADORES PROGNÓSTICOS	21
1.6 BIOMARCADORES	22
1.6.1 Receptor Estrógeno	22
1.6.2 Receptor Progesterona	23
1.6.3 Her2	23
1.7 PROGNOSTICADORES MOLECULARES	24
1.8 POTENCIAIS BIOMARCADORES EM CÂNCER DE MAMA	25
1.8.1 Survivina	25
1.8.2 ETS1 e PDEF	27
1.8.3 Ciclina D1	28
1.8.4 BCL-2	29
2 OBJETIVOS	32
3 DESENHO DO ESTUDO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 AMOSTRA	34
4.1.2 Critérios de Inclusão	35
4.1.3 Critérios de Exclusão	35
4.2 TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA.....	35
4.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	37
4.4 ASPECTOS ESTATÍSTICOS.....	43
4.4.1 Cálculo da Amostra	43
4.4.2 Análise estatística	43
5 RESULTADOS	44
5.1 PERFIL DAS PACIENTES ESTUDADAS	44
5.2 EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES	49
6 DISCUSSÃO	60

7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVAS

O câncer de mama é neoplasia freqüente e tem sido evidenciado aumento da sua incidência em vários países do mundo.

Por ser uma doença extremamente heterogênea inúmeros estudos têm buscado identificar preditores de resposta e prognósticos na tentativa de individualizar cada vez mais seu tratamento.

A descoberta de preditores de resposta mais sensíveis é especialmente relevante em neoplasias de comportamento clínico muito heterogêneo (1, 2), não só pelo aspecto farmacoeconômico, já que medicamentos caros podem ser reservados exclusivamente para casos com alta probabilidade de resposta, mas especialmente pela possibilidade de se poupar o paciente da toxicidade de um tratamento que será ineficiente.

Novos marcadores preditivos poderão permitir que esquemas de quimioterapia diferentes possam ser testados com maior rapidez, o que será extremamente vantajoso no contexto de desenvolvimento de novas drogas anticâncer (3-5).

Preditores de resposta obtidos por assinatura molecular ou pela expressão de transcritos ou proteínas específicas, trata-se de uma estratégia extremamente promissora que permitiria a individualização da decisão terapêutica (4, 6-8).

Mais de uma centena de biomarcadores com potencial preditivo ao tratamento neoadjuvante já foram relatados na literatura.

É provável que a predição de resposta terapêutica seja avaliada no futuro por meio da combinação de biomarcadores.

Em princípio qualquer ativador ou inibidor das vias de sinalização do ciclo celular são potenciais biomarcadores de resposta à terapêutica e potencial definidor prognóstico e, portanto, devem ser estudados.

No presente estudo avaliamos os potenciais biomarcadores Survivina, Bcl-2, Ciclina D1, ETS1 e PDEF por estarem envolvidos em importantes passos na formação do câncer como inibição da apoptose, progressão do ciclo celular,

carcinogênese, reparo do DNA, migração, invasão e proliferação.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o um problema de saúde pública mundial (2). É o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 20% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (9).

O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2010 será de 49.240 com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (9).

Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais freqüente nas mulheres das regiões Sul (64/ 100.000), Centro-Oeste (38/ 100.000) e Nordeste (30/ 100.000). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (17/ 100.000) (9).

Nos Estados Unidos o câncer de mama é o mais freqüente em mulheres e o segundo que mais mata. Em 2007 no EUA foram 176.296 novos casos e 40.515 causas de morte, representado 26% e 13,5% respectivamente (10).

Desde 1990 nos EUA se observou uma redução das mortes por câncer de mama bem como nos outros tumores. Acredita-se que se deva a detecção precoce com exames de rastreamento e com o tratamento adjuvante proporcionado às pacientes, principalmente a quimioterapia adicionada ou não a radioterapia e hormonioterapia (2, 10).

Fatores de risco para o câncer de mama já documentados na literatura são: histórico familiar positivo, status hormonal pós-menopáusico, idade da menarca precoce e da primeira gestação a termo após os 30 anos ou nuliparidade, menopausa tardia, terapia com estrógenos e envelhecimento (2, 9, 10).

São fatores de proteção: amamentação, gestação precoce, alimentação saudável e atividade física regular (9). O risco de desenvolver câncer de mama pode ser estimado no programa Breast Cancer Risk, disponível em <http://www.seer.cancer.gov> (10).

Fatores genéticos também estão associados a um maior risco de desenvolvimento do câncer de mama, como em mulheres que apresentam mutação nos genes BRCA1 e BRCA2. A chance de desenvolver câncer de mama neste grupo de mulheres é de 85% antes dos 70 anos de idade (9).

Sabe-se que a exposição à radiação ionizante e tratamento quimioterápico para linfomas aumentam o risco de desenvolver câncer de mama, principalmente nas mulheres mais jovens (2, 9).

Aproximadamente 10% à 30% de todas as pacientes com câncer de mama apresentam doença localmente avançada ao diagnóstico, como câncer inflamatório, invasão de pele ou tórax, extenso envolvimento linfonodal ou com tamanho não favorável a ressecção (11).

No Brasil aproximadamente 40% das pacientes apresentam estágio clínico avançado ao diagnóstico IIB e III (tumores maiores que 2 cm e com metástase linfonodal axilar) (9).

1.3 TRATAMENTOS VIGENTES E QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

A utilização de quimioterapia em câncer de mama é uma das grandes conquistas no controle desta doença, sendo provavelmente um dos fatores mais relevantes na redução da taxa de mortalidade e de recorrência da mesma nos últimos anos (12, 13).

Quimioterapia neoadjuvante é o tratamento quimioterápico realizado previamente ao tratamento cirúrgico. Tal modalidade foi introduzida na prática clínica em 1970 em pacientes com câncer de mama inoperáveis ao diagnóstico. Nesta ocasião se observou a visível redução do volume tumoral na maioria das pacientes submetidas a este tipo de tratamento. Na década de 80 se observou que as pacientes com câncer de mama inoperável ou candidatas a mastectomia tinham maior chance de receber tratamento cirúrgico conservador se submetidas a quimioterapia pré-operatória (11). Na mesma década foi demonstrado que a quimioterapia neoadjuvante possibilita testar a resposta e a quimiossensibilidade do tumor ao tratamento proposto (14, 15). Posteriormente foi demonstrado que o benefício da quimioterapia adjuvante é equivalente ao da quimioterapia

neoadjuvante em termos de sobrevida global e intervalo livre de doença (16, 17).

Kuerer e colaboradores demonstraram que a quimioterapia neoadjuvante é capaz de promover resposta patológica completa; ou seja, a ausência de identificação de células tumorais nos linfonodos axilares e na mama após o tratamento quimioterápico (13). Tal resposta tem associação direta com sobrevida livre de doença e sobrevida global (12, 13). Bonadonna e colaboradores descreveram o seguimento de pacientes com câncer de mama localmente avançado após quimioterapia pré-operatória por oito anos e obtiveram similaridade, em termos de sobrevida global e intervalo livre de progressão, quando comparado aos achados do tratamento quimioterápico pós-operatório. Desde então a quimioterapia pré-operatória passou a ser considerada tão efetiva quanto a quimioterapia adjuvante (pós-operatória) (18).

A resposta patológica, que é a redução da lesão por avaliação clínica após o tratamento, varia de 10 - 36% (12, 17, 18); enquanto que, a resposta patológica completa varia de 6% à 19% (11, 19, 20) e se associa com prognóstico favorável.

A progressão do câncer durante a quimioterapia pré-operatória é identificada em aproximadamente 3% dos casos e se associa com prognóstico extremamente desfavorável (13, 21, 22).

O tratamento neoadjuvante é o tratamento padrão para câncer de mama inflamatório e localmente avançado, possibilitando proporcionar à paciente uma cirurgia conservadora da mama e observar a sensibilidade tumoral ao tratamento quimioterápico (16-18).

Nas pacientes tratadas de forma neoadjuvante o prognóstico é ditado pelas características histológicas observadas após a quimioterapia como grau do tumor, status linfonodal, tamanho do tumor e expressão de receptores hormonais (1, 18, 23).

Quimioterapia neoadjuvante representa o modelo ideal para desenvolvimento de novas estratégias de tratamento sendo importante modelo de resposta à terapêutica. Tal modelo permite acompanhar a resposta tumoral no decorrer do tratamento e tem sido utilizado para avaliar resposta a novos protocolos quimioterápicos (13, 18, 24).

A quimioterapia pré-operatório conforme consenso de St Gallen 2009 deve ser considerada com a intenção de promover a cirurgia conservadora da mama. Os regimes deverão conter taxano e antraciclina. No caso de haver hiperexpressão de

HER-2 deverá ser acrescido de droga anti-HER-2. A terapia endócrina neoadjuvante pode ser considerada nas pacientes com expressão de receptores hormonais e pós-menopáusicas. O tratamento deve durar 5 à 8 meses ou até resposta máxima (1).

1.4 ESTAGIAMENTO

O estadiamento do câncer de mama segue protocolo TNM conforme descrito abaixo **(25)**.

T1 ≤ 2 cm (**T1mic** - microinvasão ≤ 0,1 cm; **T1a** > 0,1 cm e ≤ 0,5 cm; **T1b** > 0,5 cm e ≤ 1 cm; **T1c** > 1 cm e ≤ 2 cm)

T2 > 2 cm e ≤ 5 cm

T3 > 5 cm

T4 qualquer tamanho, com extensão direta para a parede torácica (**T4a**), pele (**T4b**) ou ambos (**T4c**); (**T4d**) câncer inflamatório.

N1 metástase para linfonodos axilares ipsolaterais móveis.

N2a metástase para linfonodos axilares ipsolaterais fixos entre eles ou a outras estrutura.

N2b metástase clinicamente aparente apenas em linfonodos da cadeia mamária interna ipsolateral, na *ausência* de metástase clinicamente aparente na cadeia axilar.

N3a metástase para linfonodos da cadeia infraclavicular ipsolateral, com ou sem envolvimento da cadeia axilar

N3b metástase clinicamente aparente na cadeia mamária interna ipsolateral, na *presença* de metástase clinicamente positiva na região axilar.

N3c metástase na cadeia supraclavicular ipsolateral, com ou sem envolvimento das cadeias axilar ou mamária interna.

M1 Metástase a distância.

Agrupamento do TNM simplificado

I - T1N0M0

IIA - T0-1N1M0 ou T2N0M0

IIB - T2N1M0 ou T3N0M0

IIIA - T0-2N2M0 ou T3N1-2M0

IIIB - T4N0-2M0; **IIIC** - qqTN3M0

IV-qqTqqNM1

1.5 MARCADORES PROGNÓSTICOS

Atualmente, critérios prognósticos bem conhecidos podem auxiliar na decisão terapêutica e na definição prognóstica de cada paciente.

O tamanho tumoral, tipo histológico, grau do tumor, presença de metástases linfonodais axilares (18) ou à distância, idade da paciente, expressão de receptores hormonais ou de HER-2 são exemplos de fatores prognósticos já definidos na literatura (2, 3, 26).

É possível contar com o auxílio do programa ADJUVANT, que utiliza variáveis já definidas como prognósticas, para estimar o risco de recidiva e óbito. Disponível em www.adjuvantonline.com. Tal programa observou concordância entre os valores estimados e os observados em 10 anos de acompanhamento com uma diferença de apenas 1% e auxilia na decisão da terapêutica adjuvante em câncer de mama (27).

Conforme já mencionado no tratamento neoadjuvante o prognóstico da paciente é ditado pelas características do tumor após o tratamento (1, 18, 23).

A obtenção de resposta patológica completa é marcador prognóstico de intervalo livre de doença e sobrevida global (12, 13, 28).

A chance obter resposta patológica completa após tratamento neoadjuvante é maior em tumores que demonstram baixa diferenciação, alta proliferação e RE negativo (29).

1.6 BIOMARCADORES

1.6.1 Receptor Estrógeno

O estrógeno é reconhecido biomarcador em câncer de mama. Tem implicância na carcinogênese e efeitos no aumento da proliferação e na inibição de apoptose (30, 31).

O comportamento e a agressividade dos tumores de mama estão associados à expressão ou não do estrogênio nas células tumorais (2, 9, 10).

Mais de 70% dos cânceres de mama diagnosticados na pós-menopausa são receptores hormonais positivos, caracterizando uma população de cânceres de mama com evolução diferente dos demais e, portanto, com tratamento também diferenciado (32).

As variações histológicas também estão relacionadas ao receptor de estrogênio como os carcinomas medulares em RE negativo e os carcinomas tubulares e lobulares com RE positivos (2, 9).

A positividade para receptor de estrogênio indica a possibilidade de resposta com o uso de tamoxifeno, já em uso há mais de 25 anos (32) mas definido para terapêutica adjuvante das pacientes com expressão de estrogênio desde 1998 (33). Os inibidores da aromatase foram evidenciados na última década, sugerindo um pequeno benefício em detrimento do tamoxifeno na população pós menopáusicas (34, 35).

A intensidade da expressão de estrógeno se associa diretamente com o benefício do uso de tamoxifeno adjuvante (33), quanto maior a expressão maior o benefício; no entanto, desde que expresso o marcador há benefício na terapêutica (36).

Pacientes com tumores sem expressão de receptores são mais sensíveis à quimioterapia citotóxica neoadjuvante, nesta situação a chance de resposta patológica completa ultrapassa 30%. No entanto, a sobrevida das pacientes com este fenótipo é menor do que nas pacientes com expressão de receptores hormonais, mesmo que a resposta patológica completa seja menor no segundo grupo (1, 37).

A positividade ou não do receptor de estrogênio auxilia indicação terapêutica para o câncer de mama, seja em caráter adjuvante, neoadjuvante ou paliativo. É, portanto, um dos primeiros biomarcadores em câncer de mama e mantém sua importância na definição terapêutica na atualidade (1).

1.6.2 Receptor Progesterona

Em 1975 Horowitz and McGuire sugeriram que a baixa expressão de progesterona em tumores de mama com expressão de receptores de estrogênio era um marcador de resistência endócrina, acreditando que a baixa expressão de progesterona interferiria na sinalização do receptor de estrógeno desencadeando a via de sinalização intracelular (38).

Posteriormente, foi demonstrado que os tumores com expressão estrogênica e sem expressão de progesterona apresentam uma resistência seletiva ao uso de Tamoxifeno e melhor resposta aos inibidores da aromatase (39-41).

No entanto, recente meta-análise sugere similar benefício no tratamento com inibidor da aromatase ou Tamoxifeno independente do status do receptor progesterona (42).

1.6.3 Her2

O gene HER-2 está localizado no cromossomo 17 e possui um ligante transmembrana com atividade intrínseca tirosina-kinase. A amplificação de HER-2 ou superexpressão é identificada em aproximadamente 20% das pacientes com câncer de mama e é um marcador de doença agressiva (2, 43, 44).

A superexpressão e / ou amplificação de HER-2 é rotina usada na prática clínica para selecionar pacientes candidatas ao uso de terapia anti-HER-2, Trastuzumab, desde 2005. Tal terapêutica tem alta efetividade em reduzir o risco de recidiva e morte neste grupo de pacientes. O acréscimo da medicação Trastuzumab aumenta o intervalo livre de doença quando comparada ao grupo controle,

independente da análise de subgrupos ou outros fatores prognósticos (26, 45-49).

Dados de tratamento neoadjuvante com terapia endócrina sugerem que inibidores da aromatase são mais efetivos em mulheres pós-menopáusicas, com expressão de receptores de estrogênio e doença HER-2 positiva. A resposta clínica neste grupo de pacientes no estudo P024 foi de 88% para Letrozol versus 21% para o Tamoxifeno, com $p=0,0004$ (50).

Hongxia Zhu e colaboradores sugerem uma possível interação entre o tratamento com Trastuzumab e a expressão de Survivina em cânceres de mama. Onde a superexpressão de Survivina pode anular a inibição do crescimento celular promovido pelo Trastuzumab e o uso de Trastuzumab pode reduzir a expressão de Survivina. Sugerindo uma possível via de ação do Trastuzumab e uma potencial via a ser explorada para novos tratamentos antineoplásicos (51).

1.7 PROGNOTICADORES MOLECULARES

Acredita-se que, na prática clínica, a informação obtida com o perfil genético do tumor primário, seja possível modificar a decisão terapêutica com relação a quimioterapia em aproximadamente 30% dos casos (1, 52).

Oncotype DX é um teste que avalia o perfil molecular do câncer de mama em 21 genes por RT-PCR, dos quais 16 são relacionados ao tumor e 5 são genes de referência. Pode ser usada para prever o risco de recorrência em mulheres com câncer de mama, expressão de receptor de estrogênio e axila negativa. O desenvolvimento deste teste foi embasado em dados retrospectivos (23, 53).

O resultado é expresso em índice de recorrência (IR) em 10 anos. Tal teste auxilia na indicação, ou não, de quimioterapia adjuvante. Pacientes com baixo risco, IR menor que 18 podem ser tratadas apenas com hormonioterapia adjuvante. Mulheres com IR maiores que 31 devem receber quimioterapia citotóxica adjuvante seguido de hormonioterapia. IR entre 11 e 31 ficam classificadas no grupo intermediário e deverão ter seu tratamento discutidos juntamente com outros marcadores prognósticos (23, 53).

Mamaprint é um teste com o mesmo objetivo e perfil do Oncotype DX mas utiliza 70 genes (54-56).

TAILORx Trial e **MINDACT Trial** são estudos em andamento que objetivam avaliar a melhor alternativa para pacientes com risco intermediário.

1.8 POTENCIAIS BIOMARCADORES EM CÂNCER DE MAMA

1.8.1 Survivina

A inibição da apoptose tem implicância direta na formação e evolução do câncer. Estando associada não somente a carcinogênese, mas também na disseminação e promoção de resistência terapêutica (57-59).

O gene Survivina é membro da família IAP e está implicado na inibição da apoptose, desregulação da mitose, progressão do ciclo celular, carcinogênese, bioativação e no reparo do DNA (60, 61).

A Survivina bloqueia a apoptose através da inibição / ativação das caspases 3 e 7 e regula o ciclo celular na fase G2 da Mitose (62, 63). Este processo está ilustrado na Figura 1.

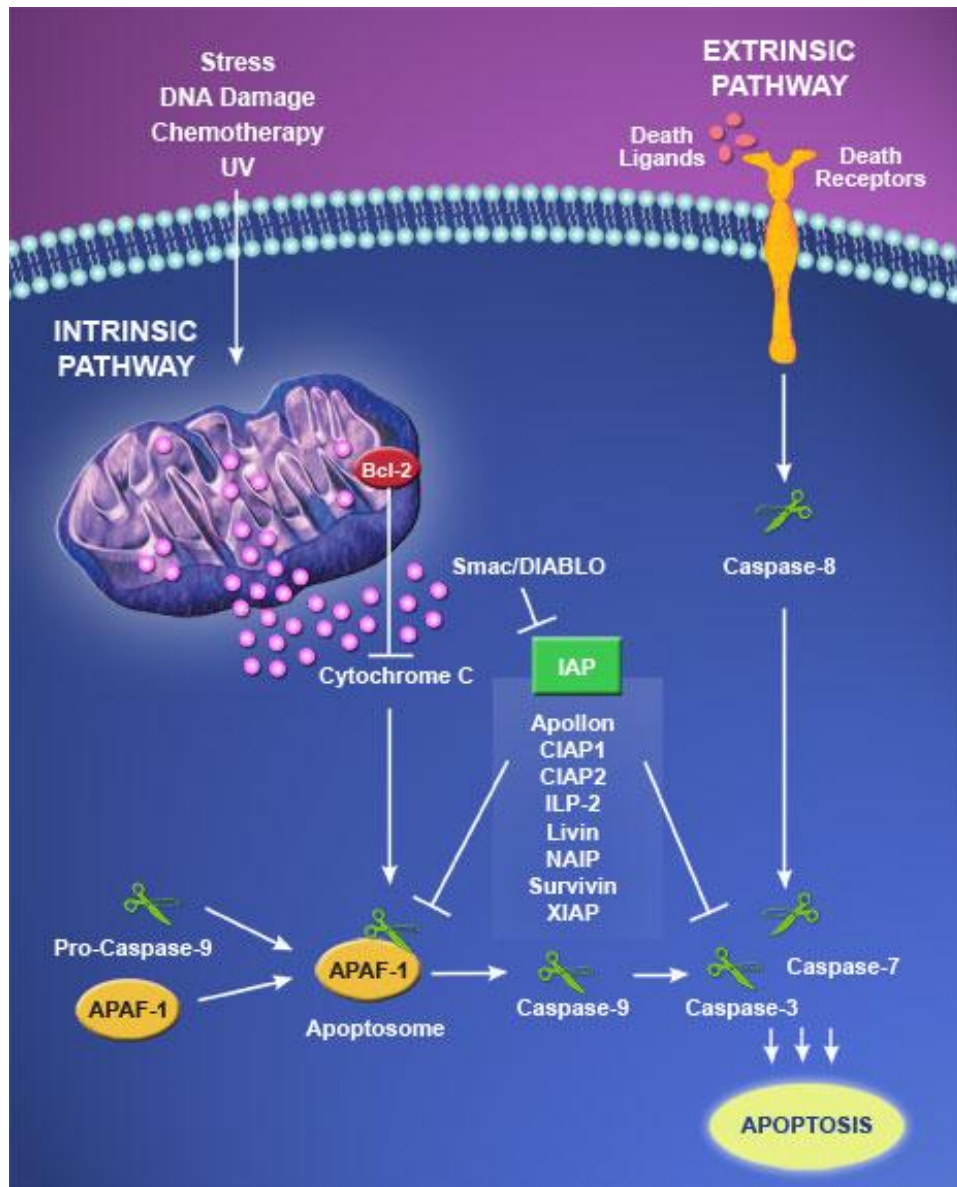


Figura 1 – Vias de apoptose
Disponível em: <<http://www.Imagenex.com>>. Acesso em: 12 fev. 2009.

A Survivina é identificada em várias neoplasias humanas como mama, pulmão, próstata, pâncreas e cólon, mas não em tecidos adultos normais (64).

Em câncer de mama, estudos com imunohistoquímica, revelaram uma associação muito significativa entre a expressão de Survivina e sobrevida de pacientes com carcinoma ductal in situ (65).

No entanto, o valor prognóstico da Survivina tem se mostrado de forma ambígua em diferentes estudos: associação irrelevante ao prognóstico (66), associação com pior prognóstico (67, 68) ou com melhor prognóstico (69).

A Survivina é expressa no citoplasma celular e é encontrada em 45% das lesões benignas da mama, (70) em 55 à 95% dos carcinomas ductais in situ e em 17% dos carcinomas invasivos de mama (71).

O valor prognóstico da Survivina foi demonstrado por Knutsen e colaboradores em pacientes com câncer de reto e identificaram associação da expressão deste marcador com resposta a radioterapia pré-operatória (72).

Devido ao crucial papel da Survivina em diversas vias de apoptose e sua possível associação com valor prognóstico (72, 73) tem sido estimulado o desenvolvimento de drogas e vacinas anti-survivina que se encontram em testes em protocolos clínicos (74-78).

Estes dados suportam a evidência de que a Survivina é importante marcador a ser estudado. Potencialmente está envolvida na progressão e agressividade dos cânceres de mama já nas fases mais iniciais da doença. Com este raciocínio escolhemos este marcador em um cenário de terapêutica neoadjuvante para testar sua expressão com resposta.

1.8.2 ETS1 e PDEF

A família ETs consiste em fatores transcripcionais que, caracteristicamente, compartilham um domínio de ligação no DNA capaz de reconhecer uma seqüência específica de bases, o sítio de ligação ETs. Tal evento é responsável por ativar ou reprimir a transcrição do DNA em cooperação com outros membros de transcrição, exercendo papel na proliferação, apoptose, desenvolvimento, diferenciação e transformação oncogênica. ETs-1 e PDEF são genes da família ETs que possui aproximadamente 30 membros identificados em mamíferos (79-82).

A hiperexpressão de ETs-1 tem sido associada com invasividade, progressão, angiogênese, inibição da apoptose, migração, e resistência a múltiplas drogas (83-85).

A proteína PDEF é expressa exclusivamente em células epiteliais, o que a torna única entre os membros da família ETs. Sua expressão é restrita a tecidos como próstata, mama, endométrio, ovário, cólon e glândula salivar. Em alguns estudos se associa com crescimento e em outros com inibição da invasão e

migração (86-90).

Turcotte e colaboradores identificaram associação entre a superexpressão de PDEF com expressão de receptores hormonais e presença de metástase linfonodal em cânceres de mama (91).

Em linhagens celulares de câncer de mama a superexpressão da proteína PDEF inibiu o crescimento celular e reduziu a migração e a invasão. Em outros estudos induziu a invasividade e a metastatização do câncer de mama (88).

Em 2005, Katayama S e colaboradores avaliaram 137 casos de câncer de mama com 83,4% dos casos expressando ETs-1 e nenhuma expressão em tecido normal de mama ou câncer não invasor (92).

Não identificamos relato na literatura de estudos com este grupo de marcadores neste cenário, associação da expressão de ETs-1 e PDEF como preditores de resposta a terapêutica neoadjuvante em pacientes câncer de mama.

1.8.3 Ciclina D1

As Ciclinas e as kinases dependentes de ciclinas são reconhecidas como uma das chaves que liga o maquinário do ciclo celular. É identificada como peça central para desencadeamento do ciclo celular em várias neoplasias e, portanto, potencial via para mutação oncogênica e desregulação do ciclo celular (93-95). Demonstrado na Figura 2.

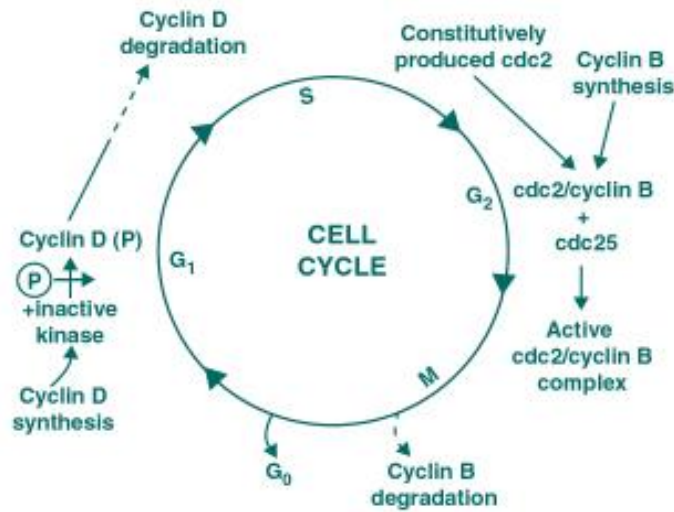


Figura 2 – O ciclo celular e as ciclinas
 Fonte: Disponível em: <<http://www.moffitt.org>>. Acesso em: 12 abr. 2009.

A Ciclina D1 é importante regulador da proliferação celular, mas pode alterar sua expressão em muitos cânceres. A hiperexpressão de Ciclina D1 tem sido associada com tumores de mama com melhor prognóstico e longo intervalo livre de doença, provavelmente com significativa implicação na terapêutica (96).

Rudas e colaboradores observaram uma expressão de Ciclina D1 que variou de 55-60% em tumores de mama, com uma sobrevida e intervalo livre de doença menor em pacientes que portavam tumores de mama positivos para Ciclina D1 em relação a tumores negativos (97).

Chunder e colaboradores, analisando a expressão de Ciclina D1 no cromossomo 11, observaram deleção e amplificação mais intensa em pacientes femininas jovens com câncer de mama, grupo que sabidamente tem prognóstico mais reservado (98).

1.8.4 BCL-2

A hiperexpressão de Bcl-2 foi detectada em inúmeras neoplasias humanas (99-103).

É um dos seis membros antiapoptóticos da família BCL-2 que possuem o

Tal expressão parece ser fator preditivo de resposta a diferentes agentes quimioterápicos, podendo ser indutor de quimiorresistência ou de resposta (106, 109-112).

No contexto atual, onde Bcl-2 e Ciclina D1 estão claramente associados à carcinogênese mamária, o estudo destes marcadores no cenário de neoadjuvância se torna iminente.

2 OBJETIVOS

Verificar se a expressão de Survivina, Bcl-2, Ciclina D1, PDEF e ETs-1 no tumor primário pode prever resposta patológica completa ao tratamento neoadjuvante com protocolo AC-T em pacientes com câncer de mama localmente avançado.

Verificar se a expressão dos marcadores se correlaciona com tempo de progressão de doença.

3 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de coorte mista com pacientes com câncer de mama localmente avançado, estágios clínicos II e III, do ambulatório de Oncologia do HSL- PUCRS para avaliação de marcadores tumorais no tumor primário e posterior correlação com resposta patológica completa após tratamento com quimioterapia neoadjuvante padrão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto “Avaliação de marcadores moleculares em terapêutica neoadjuvante e tratamento de doença metastática em pacientes com câncer de mama localmente avançado” obteve aprovação pelo Comitê de Ética em julho de 2004. A emenda intitulada “Expressão de marcadores moleculares preditivos de resposta à terapêutica neoadjuvante em câncer de mama em amostras tumorais”, foi aprovada em novembro de 2009, sob o protocolo de pesquisa registro CEP 04/01972.

4.1 AMOSTRA

Amostra consecutiva de todas as mulheres com câncer de mama localmente avançado em tratamento quimioterápico neoadjuvante provenientes do ambulatório de oncologia do HSL-PUCRS que receberam protocolo padrão, conforme literatura vigente desde 2004.

Foram elegíveis as pacientes com câncer de mama localmente avançado, estágios clínicos II e III conforme descrito abaixo, classificadas conforme TNM.

IIB – T2N1M0 ou T3N0M0

IIIA – T0N2M0 ou T1-2N2M0 ou T3 (> ou = 5cm) N1-2M0

IIIB – T4 (invasão de pele, parede torácica ou câncer inflamatório) N0-2M0

IIIC – qualquer T N3M0

Após verificação dos critérios de elegibilidade foram submetidas à tratamento quimioterápico, conforme rotina do serviço de oncologia do HSL-PUCRS, com 4 ciclos de AC (Adriamicina 60 mg/m² e ciclofosfamida 600mg/ m²) a cada 21 dias e a seguir 4 ciclos de T (Docetaxel 75 mg/ m² a cada 21 dias). As pacientes foram submetidas a cirurgia aproximadamente 30 dias após o término do último ciclo de quimioterapia.

O acompanhamento das pacientes fez parte da rotina de atendimento do ambulatório de oncologia do HSL-PUCRS.

Foram recuperados os blocos de parafina que contêm a biópsia do

diagnóstico do tumor a ser tratado.

Níveis de expressão de Survivina, Ciclina D1, Bcl-2, ETs-1 e PDEF foram avaliados pela técnica de imunohistoquímica em amostras de tumor obtidas da biópsia do diagnóstico das pacientes consideradas para terapia neoadjuvante.

4.1.2 Critérios de Inclusão

- a) Carcinoma invasor de mama T2, T3 ou T4;
- b) Ausência de metástases à distância nos exames de estadiamento;
- c) Idade Mínima 18 anos e máxima 70 anos e
- d) Assinatura do Termo de consentimento.

4.1.3 Critérios de Exclusão

- a) Doença metastática ou recidivada;
- b) Co-morbidades sistêmicas graves que impeçam o uso de antraciclina e/ou taxanos, como insuficiência cardíaca (a partir do histórico clínico da paciente, medicações em uso contínuo e exame clínico atual), renal ou hepática (a partir do histórico da paciente e análise laboratorial com transaminases, bilirrubinas, uréia e creatinina) e
- c) Histórico de outras neoplasias que não carcinoma basocelular de pele.

4.2 TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

Para o preparo das lâminas e posterior análise imunohistoquímica, foram feitas secções de 3µm de espessura, obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM

2000R, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas pré-tratadas com Histogrip(Zymed, USA) e levados à estufa a 60°C por 24h.

Os cortes foram desparafinizados por incubação em xileno por 10 minutos por três vezes, seguido da re-hidratação dos cortes em seqüência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto 90%, 80% e 70% por 3 minutos em cada diluição. A seguir, os cortes foram lavados três vezes em água destilada.

A exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida por calor à alta temperatura sob pressão, foi realizada pela incubação das lâminas em cubas de Coplin, com tampão de recuperação Dako Target retrieval Solution, pH 9 (Dako, USA), colocados dentro de panela de pressão para microondas (NordicWare Microwave Tender Cooker/Biogenex, USA), em potência máxima até atingir a pressão do recipiente e , a partir desse ponto, as lâminas foram aí mantidas por 5 minutos para recuperação antigênica.

Após este período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7.2. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H₂O₂ em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS, pH7.2.

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com a solução comercial Protein Block Serum-Free (Dako, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os cortes foram incubados pela metodologia de capilaridade através da estação de imuno-coloração Sequenza (Thermo Shandon, USA) overnight em temperatura entre 2°C e 6°C e diluídos em solução de diluição (Antibody Diluent with background reducing componentes, Dako, USA) para os seguintes anticorpos: Bcl2 (Zymed) 1:200, Ciclina D1(Dako) 1:50, ETs1 (Novocastra) 1:50, PDEF (Santa Cruz) 1:25 e Survivina (Dako) 1:50. Cada marcador teve testagem para controles externos. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por 3 passagens de tampão PBS, pH7.2. Para amplificação da reação antígeno-anticorpo utilizou o sistema Picture Max, HRP Polymer Comjugate Broad Spectrum (Invitrogen, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, pH7.2 e incubadas com solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System, USA) por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto seguido de lavagem em água corrente até remoção completa do corante e

incubadas em um solução de amônia 37mM por 15 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico absoluto (quatro incubações de 2 minutos) e após dois tratamentos com xileno por 5 minutos. As lâminas foram montadas com meio sintético Entellan (Merck, Alemanha).

4.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Foram capturadas imagens de cada seção das lâminas com aumento de 400X, obtida com adaptação de câmara digital (Sony Corp, Tokyo, Japan) ao microscópio Leica/CME microscopic (Leica, Wetzlar, Germany).

Nas Figuras 4 à 9 são apresentadas algumas imagens capturadas das lâminas estudadas com seu respectivo escore final.

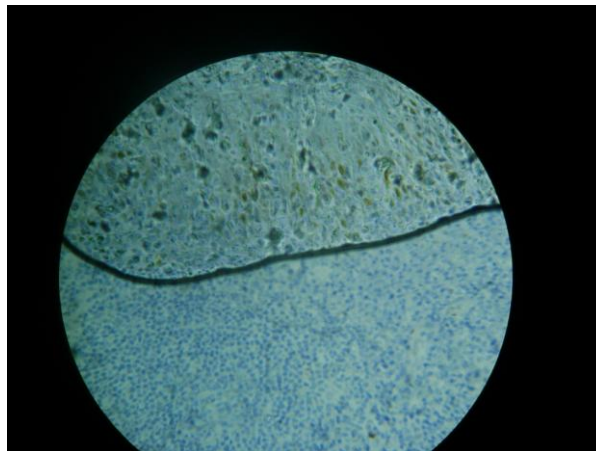


Figura 4 – Cyclina D1 – escore final 6
Fonte: A autora (2009)

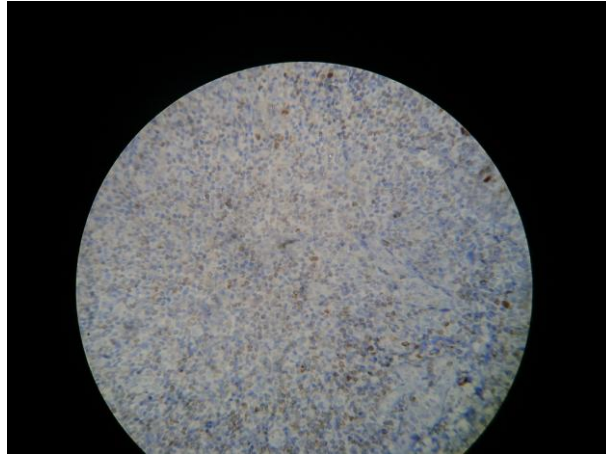


Figura 5 – Ciclina D1 – escore final 5,33
Fonte: A autora (2009)

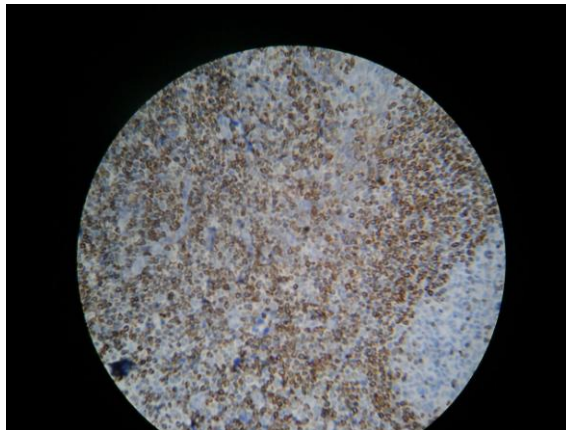


Figura 6 – BCL2 – escore final 15
Fonte: A autora (2009)

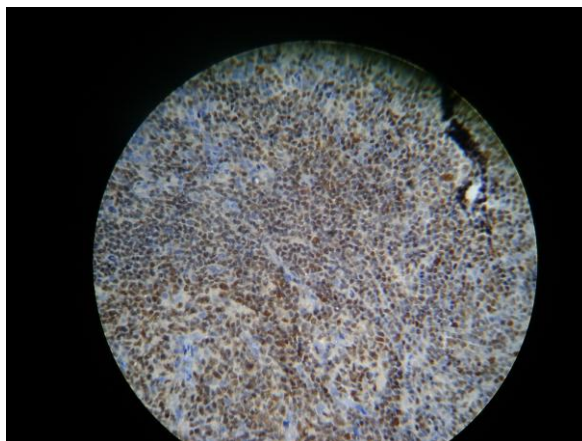


Figura 7 – ETS1 – escore final 15
Fonte: A autora (2009)

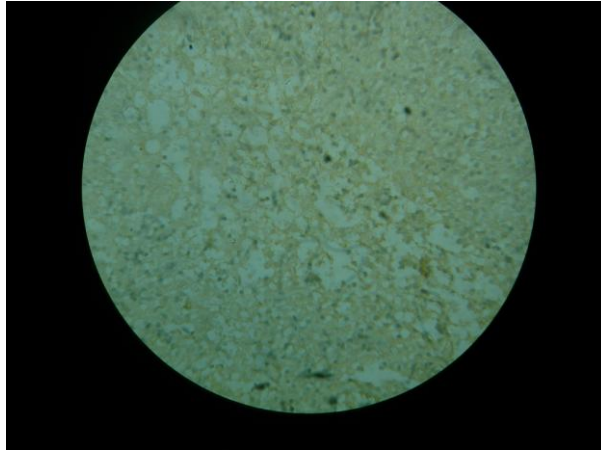


Figura 8 – Survivina – escore final 11,67
Fonte: A autora (2009)

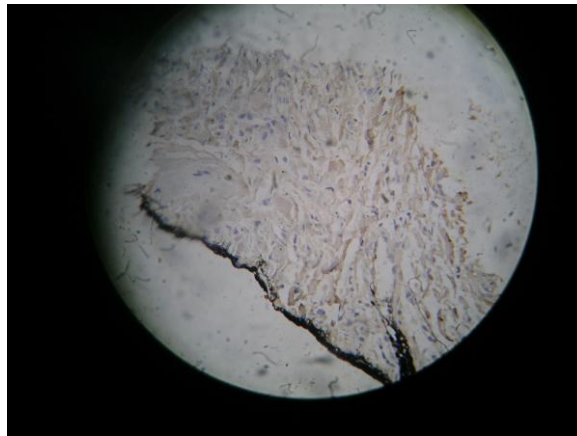


Figura 9 – Survivina – escore final 10
Fonte: A autora (2009)

As imagens foram salvas no formato TIFF e transferidas para programa de análise da imagem para avaliação futura.

A análise imunoistoquímica foi realizada por visualização direta. Três patologistas, em momentos distintos e independentes, efetuaram a análise das lâminas pontuando cada uma delas com o escore final.

O escore foi realizado conforme o descrito por Schmidt *et. al.* (113).

Tal escore pontua em porcentagem a positividade de cada marcador e sua intensidade.

Quanto a positividade de apresentação do marcador, pontua-se a porcentagem de células tumorais positivas da seguinte forma: 0%, escore = 0; <5%,

escore = 1; 5–20%, escore = 2; 21–50%, escore = 3; 51–75%, escore = 4, >75%, escore 5.

Quanto a intensidade do marcador pontua-se da seguinte forma: ausência, escore = 0; fraca, escore = 1; moderada, escore = 2; forte, escore = 3.

Ambos escores são multiplicados e compõem o escore final que varia de zero à quinze para cada cultura de célula tumoral.

Após ser obtida a nota (escore) final indicada por cada patologista (total de três) é feita uma média para cada escore de cada marcador considerado como escore final, conforme demonstrado na Tabela 1 e Figura 10.

Tabela 1 – Demonstração da avaliação imunoistoquímica por escore de positividade e intensidade do marcador Bcl2

Imagem	Patologista 1			Patologista 2			Patologista 3			Média %	Média Int	Escore	DP
	%	Int	escore	%	Int	escore	%	Int	escore				
1	4	3	12	5	3	15	5	2	10	4,67	2,67	12,33	2,52
2	5	2	10	5	3	15	5	2	10	5,00	2,33	11,67	2,89
3	4	3	12	5	3	15	5	2	10	4,67	2,67	12,33	2,52
4	5	3	15	5	3	15	5	2	10	5,00	2,67	13,33	2,89
5	4	2	8	5	3	15	4	1	4	4,33	2,00	9,00	5,57
6	4	3	12	5	3	15	4	3	12	4,33	3,00	13,00	1,73
7	5	3	15	5	3	15	5	3	15	5,00	3,00	15,00	0,00
8	3	2	6	4	2	8	4	1	4	3,67	1,67	6,00	2,00
10	4	1	4	4	1	4	3	1	3	3,67	1,00	3,67	0,58
11	3	2	6	4	2	8	5	1	5	4,00	1,67	6,33	1,53
13	4	2	8	4	2	8	5	1	5	4,33	1,67	7,00	1,73
14	4	2	8	5	3	15	5	1	5	4,67	2,00	9,33	5,13
15	4	1	4	4	2	8	3	1	3	3,67	1,33	5,00	2,65
16	5	2	10	5	3	15	5	3	15	5,00	2,67	13,33	2,89
17	5	3	15	5	3	15	5	3	15	5,00	3,00	15,00	0,00
18	5	3	15	5	3	15	5	2	10	5,00	2,67	13,33	2,89
19	5	2	10	5	3	15	3	2	6	4,33	2,33	10,33	4,51
20	5	2	10	5	3	15	3	2	6	4,33	2,33	10,33	4,51
21	5	2	10	5	3	15	4	2	8	4,67	2,33	11,00	3,61
22	5	2	10	5	3	15	4	3	12	4,67	2,67	12,33	2,52
23	4	2	8	5	3	15	4	2	8	4,33	2,33	10,33	4,04
24	3	2	6	4	3	12	2	2	4	3,00	2,33	7,33	4,16
25	5	2	10	5	3	15	4	3	12	4,67	2,67	12,33	2,52
26	3	3	9	4	3	12	2	3	6	3,00	3,00	9,00	3,00
28	4	3	12	5	3	15	5	2	10	4,67	2,67	12,33	2,52
29	5	3	15	5	3	15	5	2	10	5,00	2,67	13,33	2,89
30	5	3	15	5	3	15	4	2	8	4,67	2,67	12,67	4,04
32	4	3	12	4	3	12	4	3	12	4,00	3,00	12,00	0,00
33	5	3	15	5	3	15	4	3	12	4,67	3,00	14,00	1,73
34	4	3	12	4	3	12	3	3	9	3,67	3,00	11,00	1,73
35	4	3	12	4	3	12	3	3	9	3,67	3,00	11,00	1,73

Continua...

Continuação da Tabela 1:

Tabela 1 - Demonstração da avaliação imunoistoquímica por escore de positividade e intensidade do marcador Bcl2

Imagem	Patologista 1			Patologista 2			Patologista 3			Média %	Média Int	Escore	DP
	%	Int	escore	%	Int	escore	%	Int	escore				
36	5	2	10	5	2	10	4	2	8	4,67	2,00	9,33	1,15
37	5	2	10	4	2	8	5	2	10	4,67	2,00	9,33	1,15
38	3	2	6	3	3	9	3	2	6	3,00	2,33	7,00	1,73
39	4	3	12	5	3	15	5	2	10	4,67	2,67	12,33	2,52
40	2	1	2	5	1	5	2	1	2	3,00	1,00	3,00	1,73
41	4	2	8	4	3	12	3	2	6	3,67	2,33	8,67	3,06
42	5	2	10	5	3	15	5	2	10	5,00	2,33	11,67	2,89
43	4	1	4	5	1	5	5	1	5	4,67	1,00	4,67	0,58
44	3	1	3	3	2	6	2	1	2	2,67	1,33	3,67	2,08
45	3	1	3	3	3	9	2	2	4	2,67	2,00	5,33	3,21

Fonte: A autora (2009)

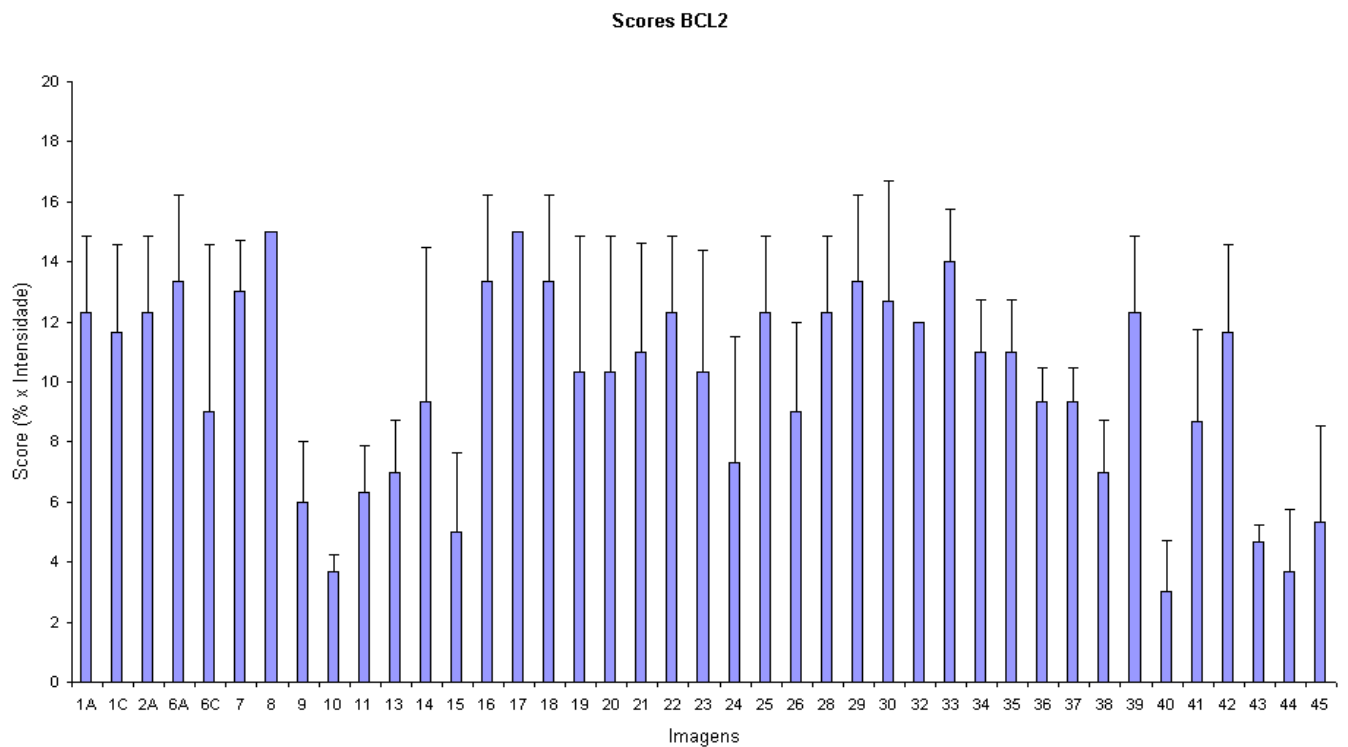


Figura 10 – Padrão da apresentação do marcador Bcl2 por escore final
Fonte: A autora (2009)

4.4 ASPECTOS ESTATÍSTICOS

4.4.1 Cálculo da Amostra

Com base nos dados encontrados na literatura, assumimos a prevalência de Bcl-2 de 55%, Ciclina D1 de 55 a 60% e Survivina de 17% em cânceres de mama.

O cálculo da amostra previa um poder de 80% e um nível de confiança de 95%.

Assumimos uma taxa de resposta patológica de 30%.

Tomando o marcador Survivina como preditor de resposta patológica completa e Bcl-2 e Ciclina D1 com associação inversa. A amostra necessária para identificar uma diferença relativa de quatro vezes entre aquelas com e sem tais marcadores variou de 42 pacientes para Survivina a 57 pacientes para Bcl-2.

ETs-1 e PDEF não participaram do cálculo amostral tendo em vista os restritos dados da literatura vigente quanto a sua prevalência e quanto ao tipo de associação com resposta.

4.4.2 Análise estatística

Foram associados os níveis de cada marcador molecular com a resposta patológica completa ao tratamento quimioterápico, para tal utilizamos o Teste Exato de Fisher.

Para a comparação do escore médio de cada marcador de acordo com a resposta ao tratamento, utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

A análise do status vital ao final do seguimento foi feita através da regressão de Cox.

Os dados foram processados no programa *Stata 10.0*, a um nível de significância de 5% para testes bicaudais.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DAS PACIENTES ESTUDADAS

Foram incluídas no estudo 45 pacientes com doença localmente avançada as quais realizaram terapia neoadjuvante conforme protocolo.

A média de tempo de seguimento das pacientes, data do diagnóstico, considerada como a data da biópsia do tumor primário, e final do seguimento (01/09/2009) ou óbito, foi de 3,6 anos, o tempo mínimo de seguimento foi de 0,8 ano e máximo de 5,7 anos.

A faixa etária das pacientes variou de 25 à 70 anos, média de 47,2 e desvio-padrão de 10,48. Conforme apresentado na Figura 11.

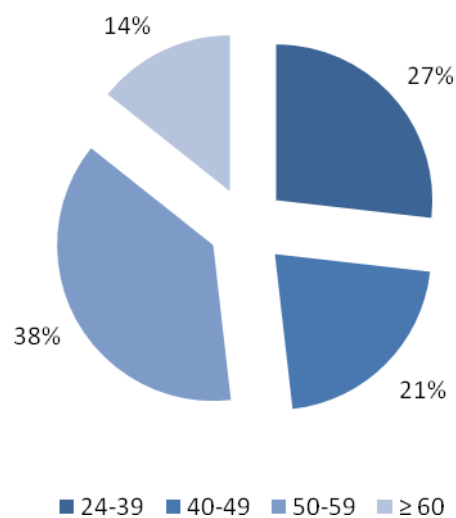


Figura 11 – Distribuição da amostra por idade
Fonte: A autora (2009)

O perfil da população em estudo está descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Perfil das pacientes submetidas ao tratamento neoadjuvante

Variável	N	%
Tamanho do tumor		
T1	0	0
T2	22	50,0
T3	19	43,2
T4	3	6,8
Comprometimento Linfonodal		
N0	16	39,0
N1	13	31,7
N2	10	24,4
N3	2	4,9
Estadiamento Clínico (TNM)		
I	0	0,0
IIA	13	28,9
IB	0	0,0
IIB	11	24,4
IIC	0	0,0
IIIA	13	28,9
IIIB	4	8,9
IIIC	4	8,9
IV	0	0
Receptor de Progesterona		
ignorado	1	2,2
positivo	24	53,3
negativo	20	44,4
Receptor de Estrogênio		
ignorado	1	2,2
positivo	29	64,4
negativo	15	33,3

Continua...

Continuação da Tabela 2:

Tabela 2 – Perfil das pacientes submetidas ao tratamento neoadjuvante

Variável	N	%
Cerb B2		
ignorado	7	15,6
1+	14	31,1
2+	7	15,6
3+	17	37,7
Tipo de cirurgia		
Doença irrissecável	2	4,4
Mastectomia + EA /BLS	19	42,2
Setorectomia + EA/BLS	24	53,3
Total	45	100

Fonte: A autora (2009)

O tempo médio de seguimento conforme status de sobrevida está descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Tempo médio de seguimento conforme status de sobrevida (em anos) – início seguimento data da biópsia

Óbito	N	Média	DP
Não	30	4,1	0,9
Sim	15	2,6	1,3
Total	45	3.6	1,3

Fonte: A autora (2009)

A faixa etária das pacientes ficou entre 25 e 70 anos idade sendo 47,24 a idade média. Considerando o estadiamento clínico, conforme classificação TNM, as pacientes incluídas apresentaram a seguinte distribuição: estágio IIA n=13 (29%) IIB n=10 (22%), estágio IIIA n=13 (29%), estágio IIIB n=4 (9%) e estágio IIIC n=4 (9%). Conforme demonstrado nas figuras 12 -14.

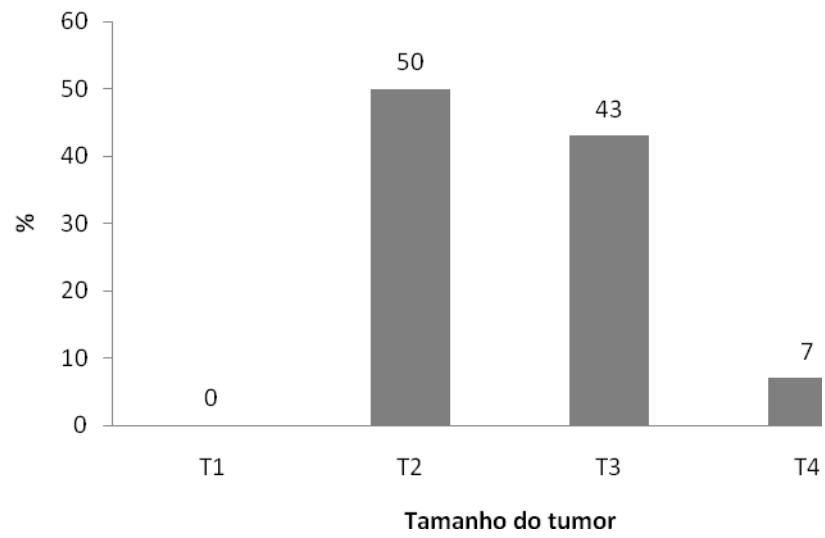


Figura 12 – Tamanho do Tumor primário conforme TNM
Fonte: A autora (2009)

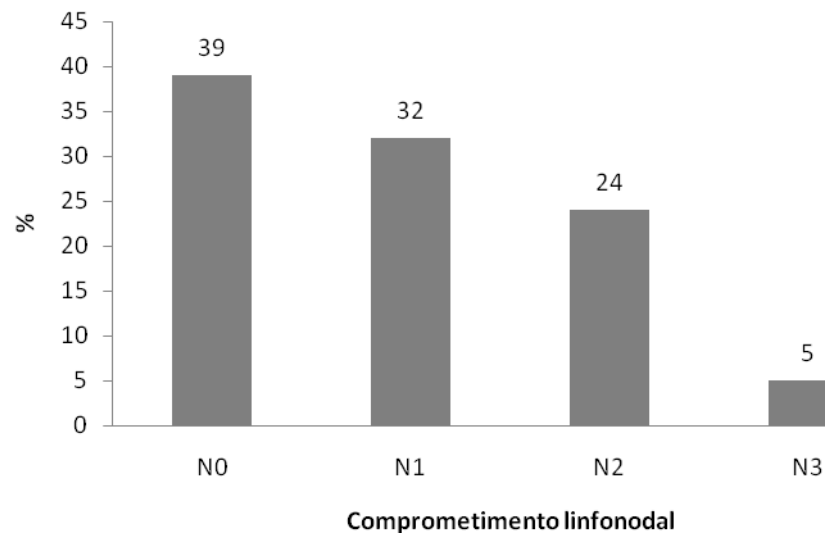


Figura 13 – Status Linfonodal das pacientes em estudo
Fonte: A autora (2009)

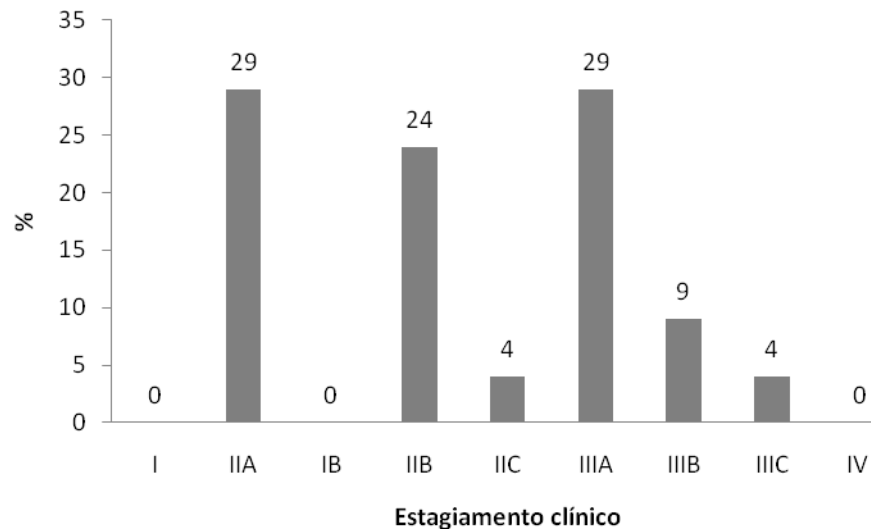


Figura 14 – Estadiamento conforme TNM
Fonte: A autora (2009)

Os tipos histológicos identificados na biópsia do diagnóstico foram: 33 (73,33%) carcinoma ductal invasor, 3 (6,67%) carcinoma lobular invasor, 5 (11,11%) outros tipos histológicos (túbulo-lobular, mucinoso e intraductal) e 4 (8,89%) não tiveram seu tipo histológico definido ao diagnóstico.

Todas as pacientes foram submetidas à avaliação cirúrgica após o término do estudo; sendo que duas pacientes (4,44%) apresentaram doença irresssecável. Das 43 pacientes elegíveis à cirurgia, 42,22% (19) realizaram mastectomia radical modificada com esvaziamento axilar e 53,34% (24) realizaram setorectomia e esvaziamento axilar ou biópsia de linfonodo sentinela. Conforme descrito na Figura 15.

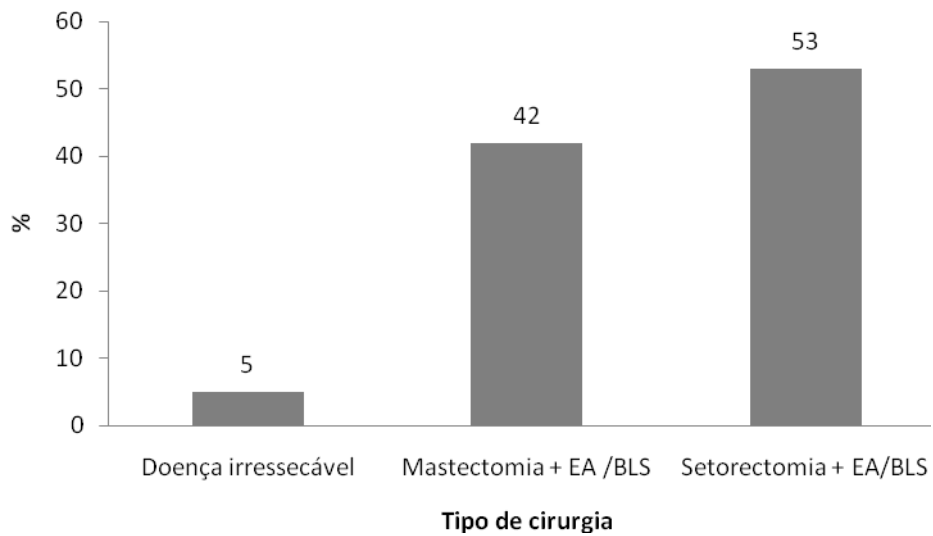


Figura 15 – Tipo de cirurgia realizada após tratamento neoadjuvante
Fonte: A autora (2009)

5.2 EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES

Das 45 pacientes incluídas no estudo, 29 (64,44%) apresentavam resultado positivo para receptor de estrogênio (RE), 24 (53,33%) para receptor de progesterona (RP) descritos nas figuras 16 e 17. A expressão Cerb B2 foi de 37,7% (17) 3+, 15,5% (7) 2+, 31,1% (14) 1+ e 15,5% (7) ignorado na biópsia do diagnóstico.

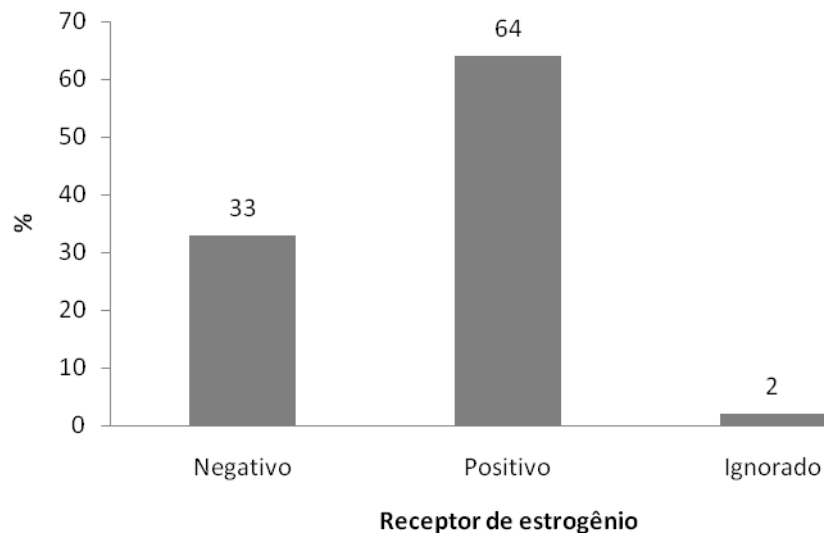


Figura 16 – Expressão de Estrogênio
Fonte: A autora (2009)

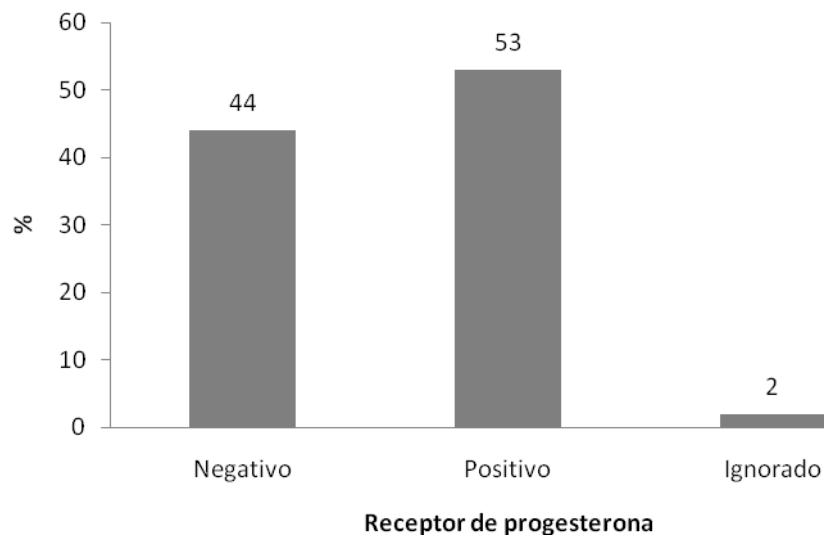


Figura 17 – Expressão de Progesterona
Fonte: A autora (2009)

Três (7,14%) das pacientes que foram a cirurgia obtiveram resposta patológica completa após o tratamento neoadjuvante. Conforme descrito na figuras 18. As pacientes tinham respectivamente: 53, 29 e 63 anos ao diagnóstico, estadiamento IIB, IIIA e IIIB e Status Her-2 negativo, positivo e ignorado. Destas 3 pacientes, a primeira apresentava expressão para RE e RP enquanto as duas últimas não apresentavam expressão para tais receptores.

Resposta ao tratamento

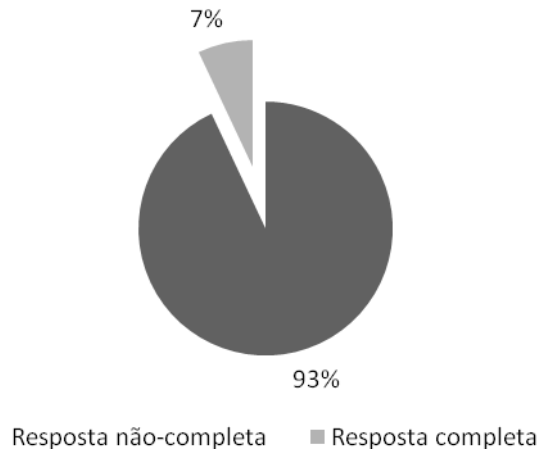


Figura 18 – Resposta patológica ao tratamento
Fonte: A autora (2009)

A média da expressão de Survivina foi de 3,99 (0 à 11). A média dos demais marcadores foi de 7,67 (0 à 15) para ETs 1, de 8,72 (2,33 à 15) para Bcl2, de 2,24 (0 à 15) para PDEF e de 2,35 (0 à 9) para Ciclina D1. Conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Média da expressão dos marcadores

Variável	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Survivina	42	4.00	3.21	0	11
Ciclina	41	2.35	1.78	0	9
PDEF	41	2.24	2.55	0	15
BCL2	39	8.73	3.39	2.3	15
ETS1	42	7.67	4.00	0	15

Fonte: A autora (2009)

A distribuição dos marcadores após serem agrupados está descrita na Tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição dos marcadores versus resposta completa

Variável	N	% resposta completa	Valor p*
Survivina			0.02
0-5	30	0.0	
6-15	12	27.3	
Ciclina			1.00
0-5	38	8.3	
6-15	3	0.0	
PEDF			0.22
0-5	38	5.6	
6-15	3	33.3	
BCL2			1.00
0-5	7	0.0	
6-15	32	9.7	
ETS1			0.28
0-5	15	0.0	
6-15	27	12.0	

* Teste exato de Fisher
 Fonte: A autora (2009)

O nível médio de Survivina foi significativamente maior ($P=0,01$) naquelas pacientes com resposta completa (9,33) do que naquelas sem resposta completa (3,42), conforme Figura 19. A distribuição da expressão de Survivina por idade está evidenciada na Figura 20.

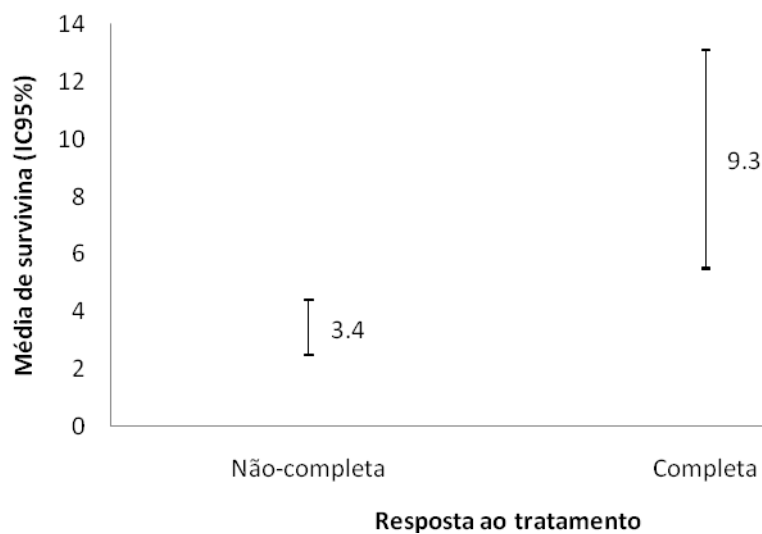


Figura 19 – Nível de expressão de Survivina versus resposta patológica ao tratamento quimioterápico
 Fonte: A autora (2009)

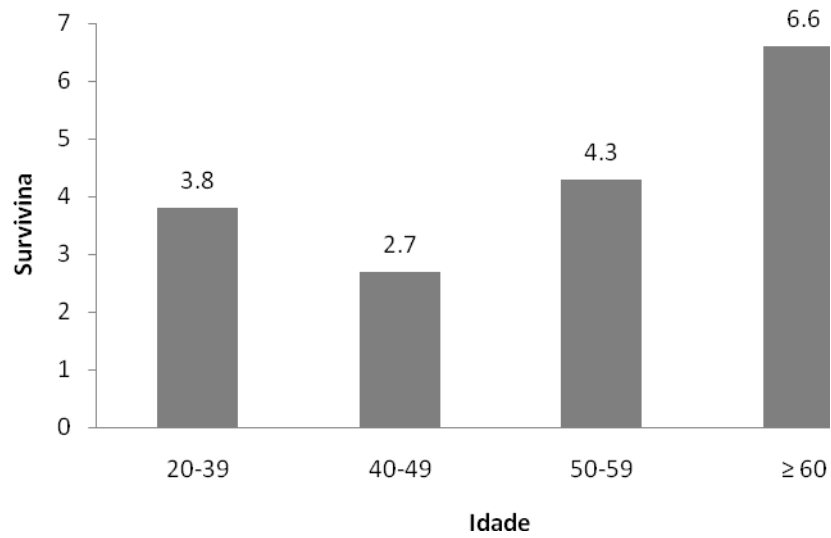


Figura 20 – Expressão de Survivina conforme faixa etária
Fonte: A autora (2009)

Os demais marcadores não tiveram significância estatística apesar de evidenciarem uma possível tendência, conforme descrito na Figura 21 e tabela 5.

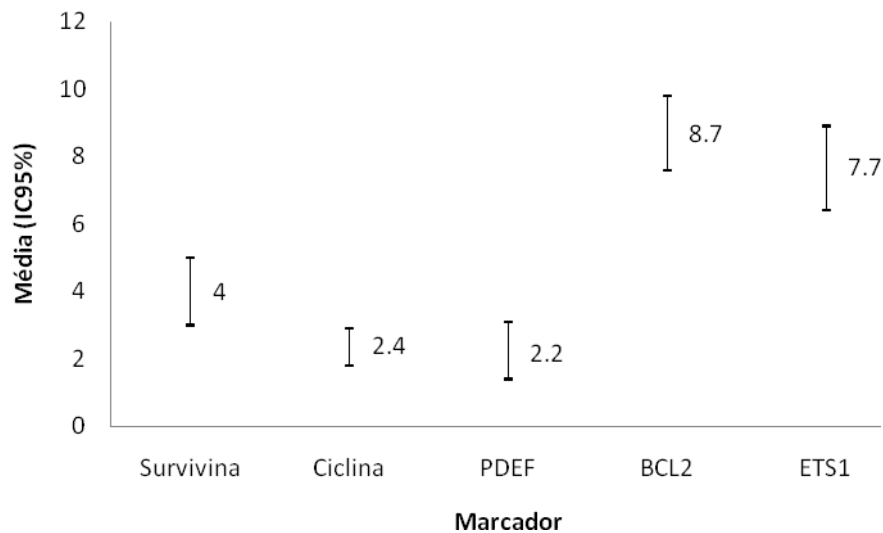


Figura 21 – Média do escore de cada marcador
Fonte: A autora (2009)

Tabela 6 – Média da expressão dos marcadores conforme resposta completa

Variável	Resposta completa ao tratamento		Valor p*
	Não	Sim	
	Média (DP)	Média (DP)	
Survivina	3.42 (0.47)	9.33 (0.88)	0.01
Ciclina	2.26 (0.30)	2.78 (1.16)	0.48
PEDF	2.16 (0.44)	3.66 (1.20)	0.14
BCL2	8.56 (0.55)	10.67 (0.33)	0.24
ETS1	7.55 (0.69)	7.89 (1.06)	0.82

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney
 Fonte: A autora (2009)

A taxa de mortalidade ao longo do estudo não foi estatisticamente diferente conforme a expressão de cada marcador, conforme aponta a Tabela 7.

Tabela 7 – Prevalência de óbito e análise de sobrevida conforme o escore dos marcadores

Variável	Prevalência de óbito (%)	HR (95%CI)	Valor p*
Survivina			0.85
0-5	33.3	1.00	
10-15	33.3	0.90 (0.28; 2.87)	
Ciclina			0.78
0-5	31.6	1.00	
10-15	33.3	0.74 (0.10; 5.78)	
PEDF			0.76
0-5	34.2	1.00	
10-15	33.3	0.72 (0.10; 5.60)	
BCL2			0.15
0-5	57.1	1.00	
10-15	28.1	0.42 (0.13; 1.36)	
ETS1			0.65
0-5	40.0	1.00	
10-15	29.6	0.78 (0.27; 2.25)	

HR: Hazard ratio
 * Regressão de Cox
 Fonte: A autora (2009)

Da mesma forma a curva de sobrevida não apresentou diferença estatística significativa quanto a expressão ou não dos marcadores estudados. Nas Figuras 22 à 26 está representada a expressão dos marcadores estudados versus sobrevida.

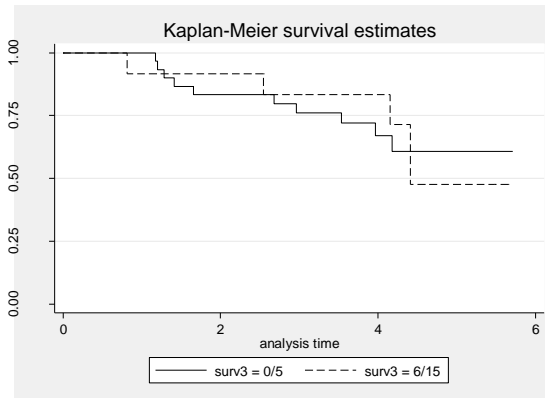


Figura 22 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador Survivina
Fonte: A autora (2009)

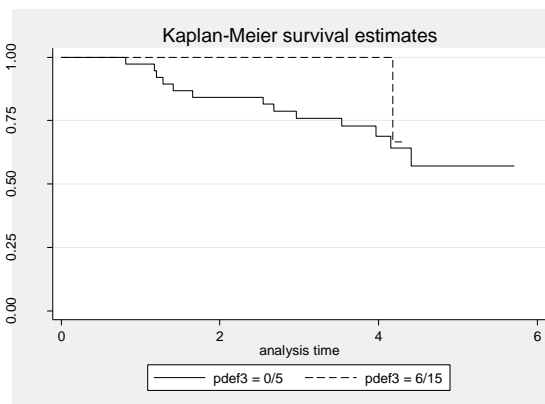


Figura 23 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador PDEF
Fonte: A autora (2009)

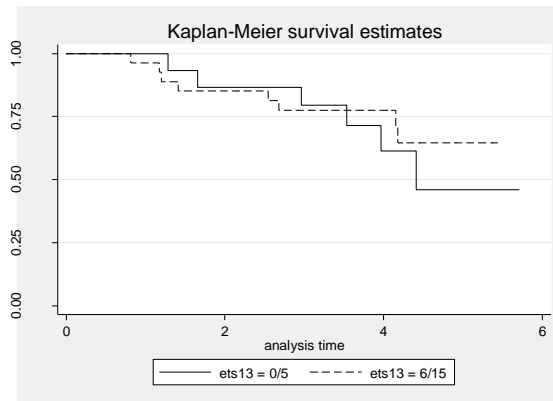


Figura 24 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador ETS1
Fonte: A autora (2009)

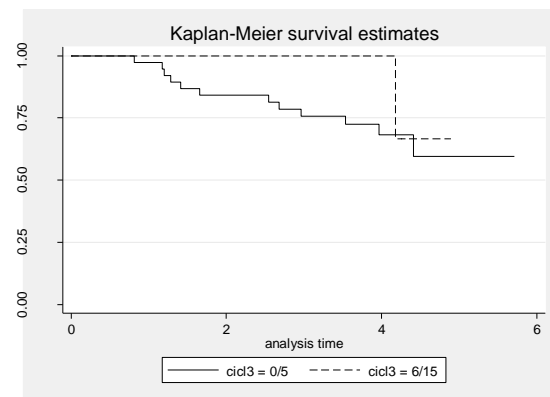


Figura 25 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador Ciclina D1
Fonte: A autora (2009)

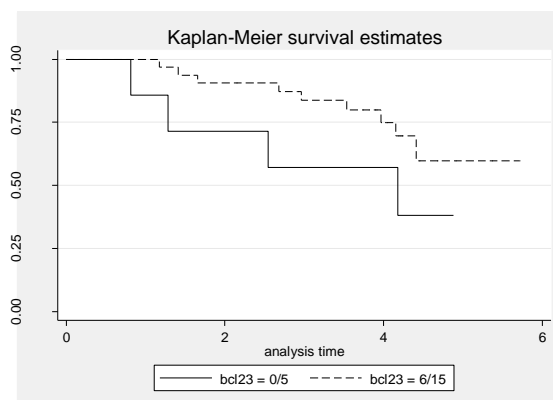


Figura 26 – Estimativa de sobrevida versus expressão do marcador Bcl2
Fonte: A autora (2009)

Idade, tamanho tumoral ao diagnóstico, presença de comprometimento linfonodal, estadiamento clínico conforme TNM, expressão de receptores hormonais

e resposta ao tratamento quimioterápico não foram preditivas de óbito no presente estudo. Conforme evidenciado nas tabelas 8 - 14.

Tabela 8 – Prevalência de óbito conforme idade

Idade	Óbito		Total
	Não	Sim	
	Porcentagem (%)	Porcentagem (%)	
25/44	10 (71,4)	4 (28,6)	14
45/70	20 (64,5)	11 (35,5)	31
Total	30 (66,7)	15 (33,3)	45 (100)

Teste Exato de Fisher = 0,74
Fonte: A autora (2009)

Tabela 9 – Prevalência de óbito conforme tamanho tumoral

Tamanho tumor (TNM)	Óbito		Total
	Não	Sim	
	Porcentagem (%)	Porcentagem (%)	
T1	0 (0)	0 (0)	0
T2	18 (81,8)	4 (18,2)	22
T3	11 (57,9)	8 (42,1)	19
T4	1 (33,3)	2 (66,7)	3
Total			44 (100)

Teste Exato de Fisher=0,08
Fonte: A autora (2009)

Tabela 10 – Prevalência de óbito conforme comprometimento linfonodal

Metástase linfonodal (TNM)	Óbito		Total
	Não	Sim	
	Porcentagem (%)	Porcentagem (%)	
Nx			
N0	14 (82,4)	3 (17,7)	17
N1	8 (61,5)	5 (38,5)	13
N2	7 (63,6)	4 (36,4)	11
N3	1 (25,0)	3 (75,0)	4
Total			45 (100)

Teste Exato de Fisher=0,14
Fonte: A autora (2009)

Tabela 11 – Prevalência de óbito conforme expressão de receptores de progesterona

Receptor Progesterona	Óbito		Total
	Não	Sim	
	Porcentagem (%)	Porcentagem (%)	
ignorado	1 (100)	0	1
positivo	18 (75,0)	6 (25,0)	24
negativo	11 (55,0)	9 (45,0)	20
Total	30 (66,7)	15 (33,3)	45 (100)

Teste Exato de Fisher=0,31
Fonte: A autora (2009)

Tabela 12 – Prevalência de óbito conforme expressão de receptor de estrogênio

Receptor Estrogênio	Óbito		Total
	Não	Sim	
	Porcentagem (%)	Porcentagem (%)	
Ignorado	1 (100)	0	1
Positivo	21 (72,4)	8 (27,6)	29
Negativo	8 (53,3)	7 (46,7)	15
Total	30 (66,7)	15 (33,3)	45 (100)

Teste Exato de Fisher=0,46
Fonte: A autora (2009)

Tabela 13 – Prevalência de óbito conforme expressão de Cerb B2

Expressão de Cerb B2	óbito		Total
	Não	Sim	
	Porcentagem (%)	Porcentagem (%)	
ignorado	5 (71,4)	2 (28,6)	7
1+	11 (78,6)	3 (21,4)	14
2+	6 (85,7)	1 (14,3)	7
3+	8 (47,1)	9 (52,9)	17
Total			45 (100)

Teste Exato de Fisher=0,22
Fonte: A autora (2009)

Tabela 14 – Prevalência de óbito versus resposta ao tratamento, conforme critério Recist

Resposta ao tratamento	Óbito		Total
	Não	Sim	
	Porcentagem (%)	Porcentagem (%)	
Completa	3 (100)	0 (0)	3
Parcial	23 (67,7)	11 (32,4)	34
Doença estável	3 (60,0)	2 (40,0)	5
Total			42 (100)

Teste Exato de Fisher=0,68
 Fonte: A autora (2009)

6 DISCUSSÃO

Muitas evidências apontam que o câncer é uma doença multifatorial. O processo de múltiplas alterações genéticas em seqüência causa perda do controle e da regulação da sinalização molecular e da proliferação celular. Estas alterações incluem a ativação de oncogenes e a perda de genes de supressão, perda do controle da apoptose, ativação de fatores de crescimento e fatores transcricionais. Alguns tumores podem produzir imunossupressão promovendo maior progressão da doença. Estas alterações citogenéticas vão se somando enquanto a célula se mantém viva pela perda do controle de apoptose. Esta heterogeneidade contribui para diferentes evoluções e respostas aos tratamentos de tumores do mesmo tipo histológico, como é o caso da mama (4, 5).

Da mesma forma que a identificação de HER-2 e de receptores de estrogênio no tumor proporcionou o desenvolvimento do Trastuzumab e Tamoxifeno, modificando a história natural das pacientes com positividade para estes biomarcadores, a identificação de outras vias para origem e progressão do câncer é de relevância clínica para o desenvolvimento de tratamentos mais individualizados (26, 36, 42).

Como já discutido, é provável que a predição de resposta terapêutica seja avaliada no futuro por meio da combinação de biomarcadores, como já se faz com o Oncotype DX e Mamaprint. Estes testes são indicados para pacientes com risco intermediário, com positividade para receptores de estrogênio e sem comprometimento de linfonodos axilares (22, 23, 51-53).

A descoberta de preditores de resposta mais sensíveis é especialmente relevante não só pelo aspecto farmacoeconômico, já que medicamentos caros podem ser reservados exclusivamente para casos com alta probabilidade de resposta, mas especialmente pela possibilidade de se poupar o paciente da toxicidade de um tratamento que será ineficiente.

A mamografia como exame de rastreamento tem sido indicada no Brasil para mulheres acima dos 50 anos (9). A presente amostra apresenta faixa etária mais jovem, com 41% das pacientes com menos de 50 anos de idade.

A promoção de resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante varia de 6% à 19% (11, 19, 20) e é reconhecida como marcador de

intervalo livre de doença e sobrevida global (12, 13). Identificamos 7% de pacientes com resposta patológica completa. Das pacientes elegíveis para cirurgia 53% realizaram cirurgia conservadora da mama.

A maior prevalência de expressão de RE na presente amostra pode ter contribuído para uma menor chance de resposta completa ao tratamento quimioterápico (1).

A frequência de positividade de HER-2 em pacientes com câncer de mama na literatura varia de 19% à 37%. Recente estudo sugere uma possível interação entre expressão de Survivina e resposta ao tratamento com Trastuzumab (51). A avaliação da expressão de HER-2 por IHQ tem pouca validade no presente estudo. Primeiro pela reconhecida positividade laboratório-dependente e a avaliação por IHQ ser inferior a avaliação por FISH (114). Além deste fato identificamos neste grupo uma positividade acima da esperada pela literatura vigente, 37,7% paciente 3+ consideradas como positivo mais 15,3% de pacientes com 2+ consideradas como possivelmente positivas. A positividade para HER-2 nesta amostra não foi confirmada por FISH. Portanto a não associação desta variável com resposta completa ou com sobrevida tem valor extremamente limitado.

Há reconhecida limitação em comparar análise de biomarcadores. Seja pelas diferentes técnicas utilizadas (imunoistoquímica, imunofluorescência, Western Blot, RT-PCR, Elisa entre outros), pela capacidade de cada laboratório em reproduzir a técnica proposta, a heterogeneidade da leitura do material ou pela forma em analisar a expressão do biomarcador em razão da resposta ao tratamento (115). A técnica imunoistoquímica foi realizada dentro dos padrões atuais e a análise feita por visualização direta com escores de positividade e intensidade (113) realizada por 3 patologistas em momentos diferentes. O resultado final em escore é a média destes valores. Tal cuidado infere maior confiabilidade no resultado obtido.

Knutsen e colaboradores estudaram a Survivina em pacientes com câncer de reto e identificaram associação da expressão deste marcador como fator prognóstico em pacientes submetidos a radioterapia pré-operatória (70).

A chance de resposta patológica completa varia de 6% à 19% (11, 19, 20). Na presente amostra identificamos 6% de resposta patológica completa nas pacientes que foram submetidas a cirurgia.

Nas pacientes estudadas a expressão de Survivina apresentou forte associação com resposta patológica completa, mesmo em uma amostra restrita de pacientes com câncer de mama e com baixo índice de resposta patológica completa.

A análise da expressão de Survivina versus resposta patológica completa pelo Teste exato de Fisher com associação confirmada pelo Teste não paramétrico de Mann-Whitney demonstra o poder desta associação.

Possivelmente, a expressão deste marcador esteja associado ao desenvolvimento tumoral em fases mais precoces da doença, já que a alta expressão se associou fortemente com resposta no contexto de neoadjuvância, quando as pacientes eram recém diagnosticadas e apresentadas a um primeiro tratamento antineoplásico.

Endo e colaboradores demonstraram em portadores de câncer colorretal que as taxas expressão de Survivina foram maiores nos pacientes com mais de 70 anos do que nos pacientes abaixo desta faixa etária (116).

O escore da expressão de Survivina foi maior no grupo de pacientes com mais de 50 anos, aumentando proporcionalmente a progressão da idade. Possivelmente a Survivina seja um preditor de resposta a quimioterapia neoadjuvante em pacientes pós-menopáusicas, possivelmente com maior expressão estrogênica. Este dado concorda com o fato de que alguns genes oncogênicos, como a Survivina, possam estar associados com a senescência.

No entanto, Ranade KJ e colaboradores identificaram, em um grupo de pacientes com câncer de mama, que a expressão de Survivina se correlacionou com a expressão de progesterona, mas não apresentou associação com a expressão de estrogênio (117). Este dado sugere interação entre a expressão de progesterona e de Survivina como promotores da resistência a apoptose. Acrescentando uma possível nova linha de raciocínio no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O cálculo amostral previa a inclusão de 57 pacientes para identificar uma diferença relativa de quatro vezes entre aquelas pacientes com e sem a expressão de Bcl-2 e Ciclina D1 prevendo um poder de 80%, nível de confiança de 95% e 30% de resposta patológica completa.

A resposta patológica completa ficou aquém do esperado, bem como o número de pacientes incluídas.

A associação esperada para Bcl-2 era inversa, sendo fator de resistência a resposta patológica completa (106).

Ciclina D1 tem associações ambíguas na literatura, sendo associada com maior ou menor sobrevida. Assumimos a Ciclina D1 como fator de resistência a resposta patológica completa.

Ciclina D1 e Bcl-2 mostraram uma tendência de associação com resposta na direção esperada, mas sem significância estatística. Talvez em uma amostra maior de pacientes esta associação possa ser demonstrada ou estes marcadores possam estar associados com mutações genéticas em fases mais avançadas e tardias da doença, este não era contexto deste estudo.

PDEF e ETs-1 não participaram do cálculo amostral tendo em vista os restritos dados na literatura vigente quanto a sua prevalência em tumores de mama e a ambígua associação com resposta.

Não encontramos associação da expressão de PDEF e ETs-1 com resposta patológica completa. Provavelmente porque não são relevantes para este grupo de pacientes. No entanto, é possivelmente a primeira vez que estes marcadores são estudados neste novo cenário em câncer de mama.

A taxa de mortalidade ao longo do estudo não foi estatisticamente diferente conforme a expressão de cada marcador, nem mesmo para a Survivina. Talvez a associação possa ser diferente no acompanhamento de um grupo maior de pacientes por um intervalo mais prolongado.

Seria interessante a confirmação da expressão do marcador Survivina com a técnica de RT-PCR por ser o padrão-ouro na análise de marcadores.

A análise da taxa de mortalidade destas pacientes necessita um seguimento mais longo. Este não era o end-point primário deste estudo.

A possibilidade de pesquisar Survivina em sangue periférico buscando a mesma associação com resposta tem potencial de utilização clínica.

7 CONCLUSÃO

A Survivina é potencial marcador de resposta à terapêutica neoadjuvante em câncer de mama e conseqüentemente de sobrevida global e intervalo livre de doença.

REFERÊNCIAS

1. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009;20(8):1319-29.
2. DeVita HaRs. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott. Williams & Wilkins; 2008.
3. Shet T, Agrawal A, Chinoy R, Havaladar R, Parmar V, Badwe R. Changes in the tumor grade and biological markers in locally advanced breast cancer after chemotherapy--implications for a pathologist. *Breast J* 2007;13(5):457-64.
4. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008;358(5):502-11.
5. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008;358(25):2704-15.
6. Wan Y, Nordeen SK. Overlapping but distinct profiles of gene expression elicited by glucocorticoids and progestins. *Recent Prog Horm Res* 2003;58:199-226.
7. Wan Y, Nordeen SK. Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestins in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2002;16(6):1204-14.
8. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(18):10393-8.
9. INCA. Estimativa da incidência de câncer de mama no Brasil para 2010. In: <http://www.inca.gov>; 2010.
10. SEER. Sueveillance, Epidemiologia and results. In: <http://www.seer.cancer.gov>; 2010.
11. Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, et al. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. *J Clin Oncol* 2003;21(13):2600-8.
12. Kuerer HM, Sahin AA, Hunt KK, Newman LA, Breslin TM, Ames FC, et al. Incidence and impact of documented eradication of breast cancer axillary lymph node metastases before surgery in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 1999;230(1):72-8.
13. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17(2):460-9.
14. Forrest AP, Levack PA, Chetty U, Hawkins RA, Miller WR, Smyth JF, et al. A human tumour model. *Lancet* 1986;2(8511):840-2.
15. Kaufmann M, Kubli F. [Current state of chemosensitivity testing of tumors]. *Dtsch Med Wochenschr* 1983;108(4):150-4.
16. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16(8):2672-85.
17. Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women

- with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol* 1997;15(7):2483-93.
18. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol* 1998;16(1):93-100.
 19. von Minckwitz G, Costa SD, Raab G, Blohmer JU, Eidtmann H, Hilfrich J, et al. Dose-dense doxorubicin, docetaxel, and granulocyte colony-stimulating factor support with or without tamoxifen as preoperative therapy in patients with operable carcinoma of the breast: a randomized, controlled, open phase IIb study. *J Clin Oncol* 2001;19(15):3506-15.
 20. Buzdar AU, Singletary SE, Theriault RL, Booser DJ, Valero V, Ibrahim N, et al. Prospective evaluation of paclitaxel versus combination chemotherapy with fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide as neoadjuvant therapy in patients with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(11):3412-7.
 21. Anderson ED, Forrest AP, Hawkins RA, Anderson TJ, Leonard RC, Chetty U. Primary systemic therapy for operable breast cancer. *Br J Cancer* 1991;63(4):561-6.
 22. van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol* 2001;19(22):4224-37.
 23. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16(10):1569-83.
 24. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(16):3676-85.
 25. Wittekind LHSaC. TNM Classification of Malignant Tumours -. Washington, USA; 2002.
 26. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1673-84.
 27. Olivetto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ, Norris BD, et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(12):2716-25.
 28. Hortobagyi GN, Smith TL, Legha SS, Swenerton KD, Gehan EA, Yap HY, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1983;1(12):776-86.
 29. Bottini A, Berruti A, Brizzi MP, Bersiga A, Generali D, Allevi G, et al. Cytotoxic and antiproliferative activity of the single agent epirubicin versus epirubicin plus tamoxifen as primary chemotherapy in human breast cancer: a single-institution phase III trial. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(2):383-92.
 30. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(3):270-82.
 31. Park BW, Kim KS, Heo MK, Yang WI, Kim SI, Kim JH, et al. The changes of estrogen receptor-beta variants expression in breast carcinogenesis: Decrease of estrogen receptor-beta2 expression is the key event in breast cancer development. *J Surg Oncol* 2006;93(6):504-10.

32. Baum M, Brinkley DM, Dossett JA, McPherson K, Patterson JS, Rubens RD, et al. Improved survival among patients treated with adjuvant tamoxifen after mastectomy for early breast cancer. *Lancet* 1983;2(8347):450.
33. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;351(9114):1451-67.
34. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365(9472):1687-717.
35. Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, Howell A, Tobias JS, Baum M. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 2008;9(1):45-53.
36. Bedard PL, Piccart-Gebhart MJ. Progress in tailoring adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with early breast cancer. *Curr Opin Oncol* 2009;21(6):491-8.
37. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res* 2004;10(19):6622-8.
38. Horwitz KB, McGuire WL. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science* 1975;189(4204):726-7.
39. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002;359(9324):2131-9.
40. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2005;23(30):7721-35.
41. Punglia RS, Kuntz KM, Winer EP, Weeks JC, Burstein HJ. The impact of tumor progesterone receptor status on optimal adjuvant endocrine therapy for postmenopausal patients with early-stage breast cancer: a decision analysis. *Cancer* 2006;106(12):2576-82.
42. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, Coates A, Forbes J, Bliss J, et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol*;28(3):509-18.
43. Moretti E, Oakman C, Di Leo A. Predicting anthracycline benefit: have we made any progress? *Curr Opin Oncol* 2009;21(6):507-15.
44. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(1):18-43.
45. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1659-72.
46. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(8):809-20.
47. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9555):29-36.

48. Hind D, Pilgrim H, Ward S. Questions about adjuvant trastuzumab still remain. *Lancet* 2007;369(9555):3-5.
49. Untch M, Gelber RD, Jackisch C, Procter M, Baselga J, Bell R, et al. Estimating the magnitude of trastuzumab effects within patient subgroups in the HERA trial. *Ann Oncol* 2008;19(6):1090-6.
50. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Janicke F, et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001;19(18):3808-16.
51. Zhu H, Zhang G, Wang Y, Xu N, He S, Zhang W, et al. Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. *Cancer Sci.*
52. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol*;11(1):55-65.
53. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(27):2817-26.
54. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(17):1183-92.
55. Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, Keijzer R, Wesseling J, Nuyten DS, van Krimpen C, et al. Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117(3):483-95.
56. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(25):1999-2009.
57. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
58. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411(6835):342-8.
59. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(9):2941-53.
60. Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2683-92.
61. Rahman KW, Li Y, Wang Z, Sarkar SH, Sarkar FH. Gene expression profiling revealed survivin as a target of 3,3'-diindolylmethane-induced cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66(9):4952-60.
62. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001;40(4):1117-23.
63. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396(6711):580-4.

64. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3(1):46-54.
65. Son BH, Choi JS, Lee JH. Prognostic values of KAI1 and survivin expression in an infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Pathology* 2005;37(2):131-6.
66. O'Driscoll L, Linehan R, S MK, Cronin D, Purcell R, Glynn S, et al. Lack of prognostic significance of survivin, survivin-deltaEx3, survivin-2B, galectin-3, bag-1, bax-alpha and MRP-1 mRNAs in breast cancer. *Cancer Lett* 2003;201(2):225-36.
67. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):127-34.
68. Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, et al. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem* 2004;50(11):1986-93.
69. Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88(7):1077-83.
70. Singh M, Bleile MJ, Shroyer AL, Heinz D, Jarboe EA, Shroyer KR. Analysis of survivin expression in a spectrum of benign to malignant lesions of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12(4):296-304.
71. Barnes N, Haywood P, Flint P, Knox WF, Bundred NJ. Survivin expression in in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer* 2006;94(2):253-8.
72. Knutsen A, Adell G, Sun XF. Survivin expression is an independent prognostic factor in rectal cancer patients with and without preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60(1):149-55.
73. Nassar A, Sexton D, Cotsonis G, Cohen C. Survivin expression in breast carcinoma: correlation with apoptosis and prognosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008;16(3):221-6.
74. Peng XC, Yang L, Yang LP, Mao YQ, Yang HS, Liu JY, et al. Efficient inhibition of murine breast cancer growth and metastasis by gene transferred mouse survivin Thr34-->Ala mutant. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:46.
75. Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato Y, Tamura Y, Hariu H, et al. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res* 2005;11(4):1474-82.
76. Plescia J, Salz W, Xia F, Pennati M, Zaffaroni N, Daidone MG, et al. Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell* 2005;7(5):457-68.
77. Paduano F, Villa R, Pennati M, Folini M, Binda M, Daidone MG, et al. Silencing of survivin gene by small interfering RNAs produces supra-additive growth suppression in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5(1):179-86.
78. Li QX, Zhao J, Liu JY, Jia LT, Huang HY, Xu YM, et al. Survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers. *Cancer Biol Ther* 2006;5(7):860-6.
79. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D, Helgeson BE, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(7):3396-400.
80. Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 2003;303:11-34.

81. Feldman RJ, Sementchenko VI, Watson DK. The epithelial-specific Ets factors occupy a unique position in defining epithelial proliferation, differentiation and carcinogenesis. *Anticancer Res* 2003;23(3A):2125-31.
82. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310(5748):644-8.
83. Wernert N, Stanjek A, Kiriakidis S, Hugel A, Jha HC, Mazitschek R, et al. Inhibition of Angiogenesis In Vivo by ets-1 Antisense Oligonucleotides- Inhibition of Ets-1 Transcription Factor Expression by the Antibiotic Fumagillin. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999;38(21):3228-3231.
84. Lelievre E, Lionneton F, Soncin F, Vandembunder B. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(4):391-407.
85. Dittmer J. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2003;2:29.
86. Nozawa M, Yomogida K, Kanno N, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, et al. Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2000;60(5):1348-52.
87. Seth A, Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(16):2462-78.
88. Feldman RJ, Sementchenko VI, Gayed M, Fraig MM, Watson DK. Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression. *Cancer Res* 2003;63(15):4626-31.
89. Turner DP, Findlay VJ, Kirven AD, Moussa O, Watson DK. Global gene expression analysis identifies PDEF transcriptional networks regulating cell migration during cancer progression. *Mol Biol Cell* 2008;19(9):3745-57.
90. Findlay VJ, Turner DP, Moussa O, Watson DK. MicroRNA-mediated inhibition of prostate-derived Ets factor messenger RNA translation affects prostate-derived Ets factor regulatory networks in human breast cancer. *Cancer Res* 2008;68(20):8499-506.
91. Turcotte S, Forget MA, Beauseigle D, Nassif E, Lapointe R. Prostate-derived Ets transcription factor overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer. *Neoplasia* 2007;9(10):788-96.
92. Katayama S, Nakayama T, Ito M, Naito S, Sekine I. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol* 2005;20(1):119-26.
93. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994;79(4):573-82.
94. Hosokawa Y, Arnold A. Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22(1):66-71.
95. Konstantinidis AK, Radhakrishnan R, Gu F, Rao RN, Yeh WK. Purification, characterization, and kinetic mechanism of cyclin D1. CDK4, a major target for cell cycle regulation. *J Biol Chem* 1998;273(41):26506-15.
96. Bose S, Chandran S, Mirocha JM, Bose N. The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol* 2006;19(2):238-45.
97. Rudas M, Lehnert M, Huynh A, Jakesz R, Singer C, Lax S, et al. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(6):1767-74.

98. Chunder N, Mandal S, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK. Analysis of different deleted regions in chromosome 11 and their interrelations in early- and late-onset breast tumors: association with cyclin D1 amplification and survival. *Diagn Mol Pathol* 2004;13(3):172-82.
99. Spender LC, Inman GJ. Targeting the BCL-2 family in malignancies of germinal centre origin. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13(12):1459-72.
100. Anai S, Sakamoto N, Sakai Y, Tanaka M, Porvasnik S, Urbanek C, et al. Dual targeting of Bcl-2 and VEGF: A potential strategy to improve therapy for prostate cancer. *Urol Oncol* 2009.
101. Jayanthan A, Howard SC, Trippett T, Horton T, Whitlock JA, Daisley L, et al. Targeting the Bcl-2 family of proteins in Hodgkin lymphoma: in vitro cytotoxicity, target modulation and drug combination studies of the Bcl-2 homology 3 mimetic ABT-737. *Leuk Lymphoma* 2009;50(7):1174-82.
102. Rubenstein M, Tsui P, Guinan P. Treatment of prostate and breast tumors employing mono- and bi-specific antisense oligonucleotides targeting apoptosis inhibitory proteins clusterin and bcl-2. *Med Oncol* 2009.
103. Nakano Y, Bilim V, Yuuki K, Muto A, Kato T, Nagaoka A, et al. Molecular targeting of Bcl-2 overcomes prostate cancer cell adaptation to XIAP gene downregulation. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2009;12(1):34-40.
104. Reed JC. Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt* 1996(97):72-100.
105. Patel MP, Masood A, Patel PS, Chanan-Khan AA. Targeting the Bcl-2. *Curr Opin Oncol* 2009;21(6):516-23.
106. Noguchi S. Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. *Cancer Sci* 2006;97(9):813-20.
107. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15(4):1126-32.
108. Pusztai L, Krishnamurti S, Perez Cardona J, Sneige N, Esteva FJ, Volchenok M, et al. Expression of BAG-1 and Bcl-2 proteins before and after neoadjuvant chemotherapy of locally advanced breast cancer. *Cancer Invest* 2004;22(2):248-56.
109. Han JY, Hong EK, Choi BG, Park JN, Kim KW, Kang JH, et al. Death receptor 5 and Bcl-2 protein expression as predictors of tumor response to gemcitabine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Med Oncol* 2003;20(4):355-62.
110. Chang GC, Hsu SL, Tsai JR, Wu WJ, Chen CY, Sheu GT. Extracellular signal-regulated kinase activation and Bcl-2 downregulation mediate apoptosis after gemcitabine treatment partly via a p53-independent pathway. *Eur J Pharmacol* 2004;502(3):169-83.
111. Lee KH, Im SA, Oh DY, Lee SH, Chie EK, Han W, et al. Prognostic significance of bcl-2 expression in stage III breast cancer patients who had received doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel as adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* 2007;7:63.
112. Gutierrez-Puente Y, Zapata-Benavides P, Tari AM, Lopez-Berestein G. Bcl-2-related antisense therapy. *Semin Oncol* 2002;29(3 Suppl 11):71-6.
113. Schmidt M, Bachhuber A, Victor A, Steiner E, Mahlke M, Lehr HA, et al. p53 expression and resistance against paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129(5):295-302.

114. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1323-33.
115. Owzar K. Alternate statistical tools and limitations in genetic marker association studies in single-arm drug cancer trials. *J Clin Oncol* 2008;26(9):1400-1.
116. Endo T, Abe S, Seidler HB, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M, et al. Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(9):770-6.
117. Ranade KJ, Nerurkar AV, Phulpagar MD, Shirsat NV. Expression of survivin and p53 proteins and their correlation with hormone receptor status in Indian breast cancer patients. *Indian J Med Sci* 2009;63(11):481-90.