

GRACE IMACULADA PEREIRA CAMPOS

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA P-GLICOPROTEÍNA
E CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA
NEO-ADJUVANTE EM PACIENTES COM CARCINOMA DE
MAMA ESTÁDIO III**

Dissertação de Mestrado

**ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS TEIXEIRA
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA**

**Unicamp
2006**

GRACE IMACULADA PEREIRA CAMPOS

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA P-GLICOPROTEÍNA
E CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA
NEO-ADJUVANTE EM PACIENTES COM CARCINOMA DE
MAMA ESTÁDIO III**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS TEIXEIRA
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA

Unicamp
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
Unicamp**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C157a

Campos, Grace Imaculada Pereira

Avaliação imunoistoquímica da p-glicoproteína e correlação com a resposta à quimioterapia neo-adjuvante em pacientes com carcinoma de mama estágio III / Grace Imaculada Pereira Campos. Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadores: Luiz Carlos Teixeira, Marcelo Alvarenga
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Quimioterapia neo-adjuvante. 2. Câncer - mama.
3. Glicoproteína P. I. Teixeira, Luiz Carlos. II. Alvarenga, Marcelo. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(Slp/fcm)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: GRACE IMACULADA PEREIRA CAMPOS

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS TEIXEIRA

Co-Orientador: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA

Membros da Banca:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 10/03/2006

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais, Antonio e Maria Imaculada,
por terem me educado com tanto amor,*

*Aos meus filhos ,Pedro,Kally e Haroldo,
por estarem me reeducando
e crescendo comigo.*

*Á minha avó Maria,
responsável pelo meu amor ao estudo da mama,
a doença não abalou sua fé.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Teixeira, pela confiança e orientação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alvarenga, pela orientação e avaliação imunoistoquímica.

A Profa. Dra. Glauce Aparecida Pinto, pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Emílio Marussi, pela confiança e amizade.

Á toda equipe de técnicos do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM/ Unicamp em especial à técnica Marisa Almeida Matsura.

Ao Estatístico Leonardo, pela competência na análise dos dados.

Aos funcionários do SAME, pela paciência e colaboração no levantamento dos prontuários.

Á Sueli Chaves e á ASTEC, pela dedicação nas etapas finais deste trabalho.

Ä Margareth A. Donadon pela dedicação.

Ao Prof. Dr. Indelécio Garcia Chaves pelo incentivo e exemplo em minha formação.

Ao Prof. Dr. José Salvador pela amizade e dedicação na formação de novos profissionais médicos.

Ao Prof. Dr. José Henrique Salvador pela confiança e competência profissional.

Á Profa. Dra. Sophie Françoise pela confiança e apoio.

Ao Prof. Dr. Henrique Benedito Brenelli pela oportunidade de participar do Serviço de mastologia do CAISM.

*“O tempo muito me ensinou.
Ensinou a amar a vida.
Não desistir da luta.
Recomeçar na derrota.
Renunciar palavras e
pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos.
Ser otimista.
Acreditar nos moços.
Exalto sua confiança,
generosidade e idealismo.
Creio nos milagres da ciência e na
descoberta de uma proficiência futura
dos erros e violências do presente.
Aprendi que mais vale lutar do que
recolher dinheiro fácil.
Antes acreditar do que duvidar.”*

(Cora Coralina)

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	viii
Resumo	ix
Summary	xi
1. Introdução	13
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Sujeitos e Métodos.....	19
3.1. Desenho do estudo	19
3.2. Casuística.....	19
3.3. Tamanho amostral	19
3.4. Seleção dos sujeitos	20
3.4.1. Critérios de Inclusão	20
3.4.2. Critérios de Exclusão	20
3.5. Definição de variáveis, técnicas e procedimentos	21
3.5.1. Definições das variáveis	21
3.5.2. Técnica e procedimentos	22
3.6. Instrumento para coleta.....	26
3.7. Processamento de dados e estatística	26
3.8. Aspectos éticos	27
4. Resultados	28
5. Discussão.....	33
6. Conclusões	39
7. Referências Bibliográficas.....	40
8. Bibliografia de Normatizações	49
9. Anexos	50
9.1. Anexo 1 – Ficha de Coleta de Dados.....	50
9.2. Anexo 2 – Resultado Imunoistoquímico.....	52
9.3. Anexo 3 – Banco de Dados.....	55
9.4. Anexo 4 – Publicação.....	59

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AC	Adriamicina, ciclofosfamida
P-gp	Gliocoproteína – P de 170.000 Daltons codificada por dois genes: MDR1 e MDR3
FAC	5, Fluorouracil, Adriamicina, Ciclofosfamida
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
DAB	3,3, Tetra hidrocloreto diamino benzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
et al	E outros
MDR	Resistência à múltiplas drogas
P	Significância estatística
PBS	Tampão Salino Difosfato
RECIST	Response evaluation Criteria in Solid Tumors
UICC	União Internacional contra o Câncer
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Objetivo: Avaliar a expressão imunoistoquímica da P-glicoproteína e sua correlação com a resposta à quimioterapia com esquemas contendo antraciclina em mulheres portadoras de carcinoma de mama estágio III. **Sujeitos e Métodos:** Estudo de coorte retrospectivo, em que foram analisados 88 prontuários de pacientes matriculadas no período de Junho de 1996 a novembro de 2003 no Ambulatório de Oncologia Clínica do CAISM-Unicamp, e portadoras de carcinoma ductal infiltrativo localmente avançado, que receberam quimioterapia neo-adjuvante com esquemas contendo antraciclina, excluindo as portadoras de carcinoma inflamatório. O tumor foi biopsiado antes do tratamento (core biopsy ou incisional) e submetido a exame imunoistoquímico pelo sistema envision peroxidase, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-P-glicoproteína (P-gp), C494 (Signet) trans-membrana e C219 (Signet) intra-citoplásmico. Considerou-se positivo coloração citoplasmática ou trans-membrana em 10% ou mais das células. O controle externo positivo usado foi tecido normal de rim humano. A resposta clínica foi avaliada antes da cirurgia, após no mínimo dois ciclos de quimioterapia e os dados correlacionados com a expressão da p-glicoproteína. Empregou-se o

teste exato de Fisher ou qui-quadrado para avaliar as possíveis associações.

Resultados: A frequência da positividade da P-glicoproteína na amostra foi de 23,86%. A resposta clínica objetiva à quimioterapia foi semelhante nos casos com e sem expressão da p-glicoproteína, considerando o tumor primário (57,1% vs 58,2%), axila (67,8% vs 78,8%) e resposta total (57,2% vs 65,7 %, $p = 0,851$).

Conclusão: Não encontramos relação entre a expressão da P-glicoproteína e a resposta clínica à quimioterapia neo-adjuvante, sugerindo que este marcador não deve ser considerado como fator preditivo de resposta à quimioterapia com antraciclina.

Palavras-chave: câncer de mama, quimioterapia neo-adjuvante, P-glicoproteína.

Summary

Objective: Evaluate the immunohistochemical expression of P-glycoprotein and its correlation to the response to chemotherapy with schemes containing antraciclín in women who are carriers of stage III breast carcinoma. **Subjects and Methods:** In the study of retrospective cohort, 88 files of patients who are carriers of locally advanced infiltrative ductal carcinoma were analyzed, and received neoadjuvant chemotherapy containing antraciclín, excluding the inflammatory cases, from June 1996 to November 2003, in the Oncology Clinic of CAISM-Unicamp. The tumor was biopsized before treatment (core biopsy or incisional biopsy) and subjected to the immunohistochemical exam by using the envision peroxidase system and utilizing anti-P-glycoprotein monoclonal antibodies (P-gp), C494 (Signet) trans-membrane and C219 (Signet) intra-cytoplasmatic. The cytoplasmatic coloring or trans-membrane was considered positive in a rate of 10% or more of the cells. The external positive control which was used was human kidney normal tissue. Clinical response was evaluated before surgery, after a minimum of two cycles of chemotherapy and the data was correlated to the expression of P-glycoprotein. The exact Fisher test or Qui-square test was used to evaluate any possible

associations. **Results:** The frequency of the positivity of P-glycoprotein in the samples was 23.86%. The objective clinical response to chemotherapy was similar in the cases with and without the expression of P-glycoprotein, considering the primary tumor (57.1% vs 58.2%), arm pit (67.8% vs 78.8%) and total response (57.2% vs 65.7%, $p = 0.851$). **Conclusion:** The relation between the expression of P-glycoprotein and the clinical response to to neoadjuvant chemotherapy was not found, what suggests that this marker should not be considered as a response predictive factor to chemotherapy with anthracyclin.

Key Words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, P-glycoprotein.

1. Introdução

O câncer de mama localmente avançado, em regiões economicamente desenvolvidas é de aproximadamente 5%, enquanto nos países em desenvolvimento correspondem 30% a 50% dos casos diagnosticados, incluindo o carcinoma inflamatório, que representa 1% a 3% de todos os câncer de mama (Jardines et al., 2000; Hortobagyi et al., 1996).

O carcinoma de mama avançado inclui tumores maiores de 5cm, com ou sem metástase linfonodal axilar, ou tumores de qualquer tamanho com extensa invasão da axila e ou pele e ou parede torácica. Pode estar presente comprometimento dos linfonodos supra e ou infraclaviculares e ou cadeia mamária interna. Ausência de metástase sistêmica (Hortobagyi et al., 2004).

O carcinoma inflamatório é usualmente incluído nesse grupo, no estágio IIIB, embora tenha características histológica padrão de crescimento e prognóstico diferentes do não inflamatório (Perez et al., 1994; Merajver e Sabel, 2004).

O tratamento inicial, atualmente utilizado em pacientes com tumores neste estágio é a quimioterapia, que pode reduzir o volume tumoral locoregional em cerca de 60% a 80% dos casos, além de prolongar a sobrevida, pois trata precocemente a doença sistêmica (Hortobagyi et al., 1983; Perloff et al., 1988; van der Hage et al., 2001).

Além de permitir o tratamento das micrometástases sistêmicas, a quimioterapia neoadjuvante possibilita a realização de cirurgias conservadoras e avalia, in vivo, a quimiossensibilidade das células tumorais (Bonadonna et al., 1998; Dickson e Lippman, 2001).

Respostas parciais ou completas estão associadas a maior sobrevida (Fisher et al., 1998; Pierga et al., 2000) e os esquemas de associação de antineoplásicos mais efetivos são aqueles que contêm antraciclina (Hortobagyi et al., 1995; Bonadonna et al., 1998; Hortobagyi et al., 2000).

Recentemente, esquemas contendo paclitaxel ou docetaxel, associados à antraciclina aumentaram as respostas, principalmente as completas patológicas, para até 28% (Semiglazov et al., 2001; Evans et al., 2002).

As antraciclina são, portanto, as drogas mais utilizadas em quimioterapia neoadjuvante, entretanto as respostas observadas às vezes estão aquém do esperado (Kuerer et al., 1999), talvez porque as células neoplásicas desenvolveram resistência às drogas.

A resistência às drogas, como as antraciclinas, é um problema na neoadjuvância e prever quais tumores não responderão ao tratamento, permitindo escolher outras drogas e obter melhores resultados. O mecanismo intracelular de resistência inclui as alterações na expressão do alvo específico de cada agente citotóxico, por amplificação do gene que o codifica (Ferguson e Cheng, 1989; Teeter, 1989).

De modo geral, a célula torna-se resistente a agentes citotóxicos que apresentem o mesmo mecanismo de ação. O gene MDR (“multi drug resistance”) está associado à resistência múltipla às drogas, geralmente originadas de produtos naturais como vincristina e doxorubicina e seria responsável pela produção de proteínas que diminuiriam a concentração intracelular destas drogas (Bech-Hanson et al., 1976; Juliano e Ling, 1976).

Esta molécula foi denominada 170P-glicoproteína, por julgarem na época relacionar-se à permeabilidade da membrana celular (P), e devido ao seu peso molecular de aproximadamente 170.000 daltons. Foram isolados de células humanas dois genes codificadores da P-glicoproteína, denominados “MDR1 e MDR3”, sendo que apenas o primeiro tem sido associado à resistência a múltiplas drogas (Ueda et al., 1987; Shen et al., 1986; van der Bliek et al., 1987). A P-glicoproteína se compõe de duas porções semelhantes, com um total de 1.276 a 1.280 aminoácidos e 12 regiões hidrofóbicas, que preenchem a condição de área transmembrânica. Na porção externa da molécula, existe uma região com potencial de glicosilação e nos radicais carboxílicos intracelulares encontram-se áreas de ligações nucleotídicas com provável afinidade pelo ATP (Deuchars e Ling, 1989).

Estudos utilizando técnicas de imunoperoxidase demonstraram a presença da P-gp em tecidos normais e tumorais (Fojo et al., 1987; Broxsternan, 1989; Goldstein et al., 1989; Volm et al., 1989; Cordon-Cardo e O'Brien, 1991). Observou-se aumento de MDR1 RNA após o emprego de quimioterápicos (Pastan e Gottesman, 1988; Chintamani et al., 2005) e tumores com níveis elevados de MDR1 RNA fazem parte do grupo de neoplasias mais resistentes aos citotóxicos (De Vita, 1989). Por outro lado, órgãos tidos como resistentes aos quimioterápicos também exibem níveis elevados de MDR1 RNA, como fígado, cólon, rim, pulmão, intestino delgado, adrenal e capilares cerebrais (Thiebaut, 1987; 1989).

A P-gp é um componente permanente da membrana celular e sua função é de transporte e excreção. O aumento de sua expressão, como ocorre em algumas células tumorais resulta em aumento do efluxo da droga e diminuição de sua concentração intracelular. Este fenômeno ocorre com vários agentes citotóxicos, como antraciclinas, alcalóides da vinca e derivados da epipodofilotoxina e taxanes e tem sido freqüentemente descrito em câncer de mama (Trock et al., 1997).

A amplificação do gene MDR1 pode estar também associada à instabilidade decorrente da perda da função do gene P-53 não mutante. Assim, haveria uma correlação direta entre a presença da P-gp nas células do câncer de mama e má resposta à quimioterapia (Bodey et al., 1997). Pacientes P-gp positivas têm menor sobrevida livre de doença, mostram significativamente, curto período de sobrevida livre de doença e respondem três vezes menos à quimioterapia em relação as pacientes P-gp negativas (Chintamani *et al.*, 2005; Liux et al., 1997; Trock et al., 1997).

Assim, considerando que a P-gp é o marcador que melhor caracteriza, até o momento, o mecanismo de resistência a drogas como as antraciclinas, que o esquema de quimioterapia neoadjuvante mais empregado contém adriamicina e que o carcinoma mamário estágio III é muito prevalente em nosso meio, torna-se pertinente a análise da expressão desta proteína, que poderia selecionar pacientes cujos tumores sejam sensíveis a esta droga.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão da P-gp e sua correlação com a resposta clínica à quimioterapia neo-adjuvante, contendo antraciclina, em mulheres portadoras de carcinoma da mama estágio IIIA e IIIB.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a frequência da expressão da P-gp em mulheres portadoras de carcinoma da mama estágio III.
- Avaliar a correlação da resposta clínica da mama à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp.
- Avaliar a correlação da resposta clínica da axila à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp.
- Avaliar a correlação da resposta clínica global à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp.

3. Sujeitos e Métodos

3.1. Desenho do estudo

Constituiu-se em estudo de coorte e retrospectivo.

3.2. Casuística

Foram avaliados, os prontuários de 88 mulheres portadoras de carcinoma de mama estágio IIIA e IIIB mensurável sendo excluído os carcinomas inflamatórios, com indicação de quimioterapia neo-adjuvante, matriculadas no Ambulatório de Oncologia Clínica do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Unicamp, no período de junho de 1996 a novembro de 2003.

3.3. Tamanho amostral

Considerando-se que o índice de falha à quimioterapia contendo antraciclina em mulheres portadoras de carcinoma de mama estágio III é de 73% para os casos P-gp positivo e de 22% nos casos P-gp negativo (Bodey et al., 1997)

calculou-se para um erro tipo I de 5% e um erro tipo II de 20%, um tamanho amostral de 88 pacientes, considerando-se um mínimo de 10% de positividade da expressão da P-gp.

3.4. Seleção dos sujeitos

3.4.1. Critérios de Inclusão

- Mulheres portadoras de carcinoma ductal invasivo da mama, estádios IIIA e IIIB, segundo o sistema TNM – UICC, 1998.
- Biopsiadas antes da quimioterapia (core biopsy ou incisional).
- Tumores mensuráveis ao exame clínico.
- Submetidas a, no mínimo, dois ciclos de quimioterapia neoadjuvante com esquemas contendo adriamicina (60mg/m²) e ciclofosfamida (600mg/m²), ou fluorouracil (600mg/m²), adriamicina (60mg/m²) e ciclofosfamida (600mg/m²).
- Sem evidências de metástases à distância, incluindo linfonodos supraclaviculares.

3.4.2. Critérios de Exclusão

- Tratamento prévio com antitumoral ou hormônios.
- Diagnóstico de carcinoma inflamatório.

- Portadora de neoplasia de outras localizações, excetuando-se carcinoma *in situ* do colo uterino e carcinomas epidermóides ou basocelulares da pele.
- Carcinoma bilateral sincrônico ou assincrônico.
- No ciclo gravídico-puerperal.
- Que não tinham todos os dados necessários no prontuário, ou material do bloco de parafina insuficiente para exame imunoistoquímica.

3.5. Definição de variáveis, técnicas e procedimentos

3.5.1. Definições das variáveis

3.5.1.1 Variável independente

- **P-gp:** glicoproteína de 170.000 daltons, codificada por dois genes "MDR1 E MDR3" (Kerr et al., 1994; van der Bliek et al., 1987). Foi pesquisado previamente à quimioterapia, por imunoistoquímica em blocos de parafina contendo fragmentos de carcinoma de mama. A observação de coloração em 10% ou mais das células com padrão citoplasmático ou trans-membrana foi considerada positivo.

3.5.1.2 Variáveis dependentes

- **Resposta clínica ao tratamento:** segundo os critérios Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) (Therasse et al., 2000). Foram considerados como medida clínica inicial e final do tumor e

linfonodos axilares os maiores diâmetros, em milímetros, especificados no prontuário. A resposta clínica global foi estabelecida como a soma dos diâmetros do tumor da mama e da axila, avaliadas antes da cirurgia e consideradas como:

- Resposta completa: desaparecimento de todas as lesões mensuráveis.
- Resposta parcial: redução em pelo menos 30% do valor dos maiores diâmetros das lesões mensuráveis, sem aparecimento de novas lesões.
- Resposta objetiva; soma das respostas completa e parcial.
- Resposta estável: redução menor que 30% ou aumento menor que 20% dos valores dos maiores diâmetros das lesões mensuráveis.
- Progressão: aumento de pelo menos 20% dos diâmetros das lesões, ou aparecimento de novas lesões.

3.5.2. Técnica e procedimentos

3.5.2.1 Seleção de material biológico

Foram identificados os números dos blocos de parafina correspondente às mulheres selecionadas para o estudo. Este material foi procurado nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (FCM). Todos os blocos de parafina contendo tecido tumoral da mama, previamente fixados em formol a 10%, foram processados no laboratório de Patologia Experimental-CAISM.

Os cortes de 4 μ m feitos a partir dos blocos de parafina foram colocados em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas em solução de organossilano a 20% (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma, cód. A3648) em acetona e colocadas por 1 hora em estufa a 100°C, para secagem e fixação dos cortes.

3.5.2.2 Imunoistoquímica

As lâminas foram desparafinadas com um banho em xilol a 100°C e posterior passagem em dois xilóis à temperatura ambiente. Após, as lâminas receberam três banhos em concentração decrescente de álcool absoluto (100%, 80% e 50%) a temperatura ambiente. Foram então lavadas em água corrente e passadas em água destilada.

Para inibição da peroxidase endógena, as lâminas passaram por três banhos de três minutos cada em solução de peróxido de hidrogênio a 10%, a temperatura ambiente e novamente lavadas em água corrente por três minutos e passadas por água destilada.

Na recuperação antigênica as lâminas foram imersas em tampão citrato 10mM, pH 6.0, durante 30 minutos a cerca de 98°C usando panela a vapor. Posteriormente esperou-se o conjunto esfriar. Foi então, feita lavagem das lâminas em água corrente e água destilada e imersão em PBS.

As lâminas foram Incubadas com os anticorpos primários C219: (dil 1/25); C494: (dil 1/40), todos monoclonais, produzidos em camundongos. A diluição foi feita em soro albumina-bovina 0,1% em PBS. A incubação foi por toda a noite a 4°C,

em câmara úmida, após o que, o excesso desses anticorpos foi retirado, seguindo-se três lavagens em PBS, de cinco minutos cada a temperatura ambiente.

Utilizou-se para a detecção da reação antígeno-anticorpo o sistema Envison Peroxidase conforme recomendações do fabricante.

A coloração foi feita com DAB (3,3' diaminobenzidina. Sigma, cód. D5637), um cromógeno de cor marrom. As lâminas foram imersas numa solução (60 mg DAB em 100ml PBS com 500ul peróxido de hidrogênio a 30% e 1ml DMSO (dimetil sulfoxido Merck), por dois a três minutos, ou até visualização da coloração levemente acastanhada dos cortes. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada. Seguiu-se a contra coloração com Hematoxilina de Mayer e seguiu-se lavagem em água amoniacal e nova lavagem em água corrente e água destilada. A seguir as lâminas foram desidratadas em álcool absoluto (três banhos) e xilol (três banhos). Em seguida as lâminas foram montadas com resina Entellan (Merck, cód. 7961).

A leitura dos resultados foi realizada em microscópio óptico comum no aumento de 400X sendo considerados positivos os casos que apresentaram pelo menos 10% das células coradas com padrão citoplasmático ou transmembrana, independente da intensidade da coloração (Figuras 1 e 2). As lâminas foram analisadas por um médico-patologista. Foi usado como controle externo, sabidamente positivo, tecido normal de rim humano.

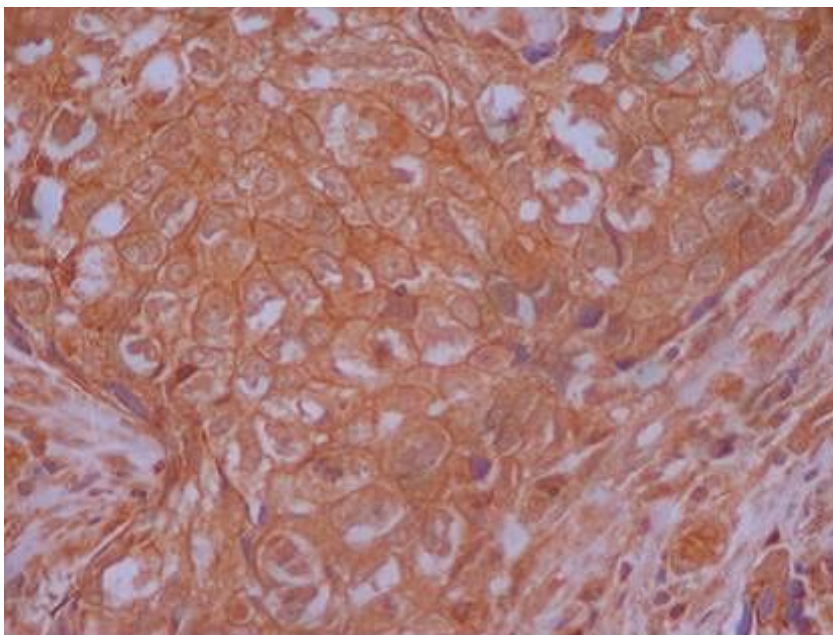


Figura 1: Aumento de 400X mostrando a expressão da P-gp no citoplasma de células de carcinomas Ductal Invasivo (C494) (Fonte: Material biológico, sujeito da pesquisa, 2005)

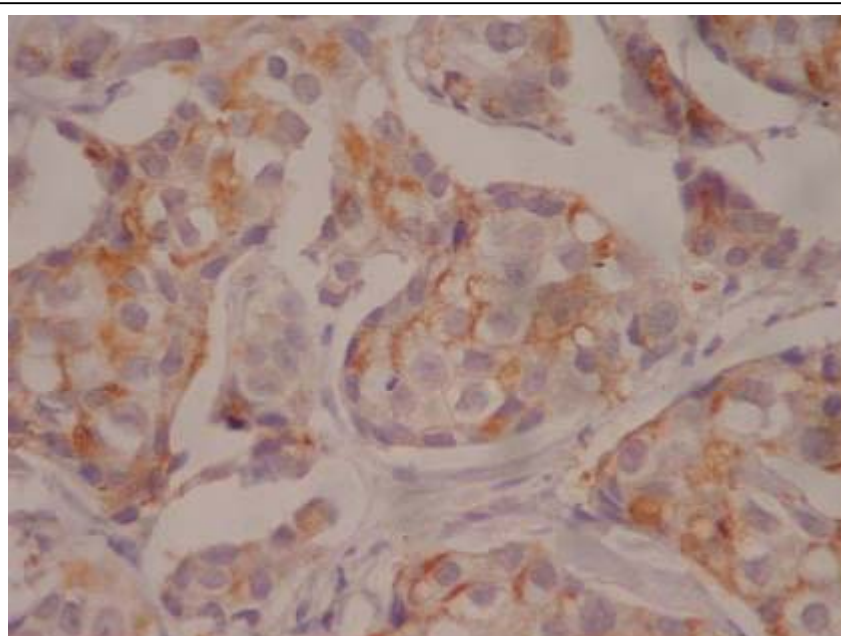


Figura 2: Aumento de 400X mostrando a expressão da P-gp em transmembrana de células de carcinomas Ductal Invasivo (C219) (Fonte: Material biológico, sujeito da pesquisa, 2005)

3.6. Instrumento para coleta

Os dados foram extraídos dos prontuários das pacientes portadoras de carcinoma localmente avançado da mama, tratadas no Ambulatório de Oncologia Clínica do CAISM-Unicamp, no período de junho de 1996 a novembro de 2003, e transcritos para a Ficha de Registro elaborada pelo investigador.

3.7. Processamento de dados e estatística

Para a realização do processamento de dados foi preparada uma ficha pré-codificada de informações dos dados registrados (Anexo 1).

Foi criado um banco de dados no qual foram arquivadas as informações utilizando-se o programa Microsoft Windows Excel-Versão 2000. Os dados foram digitados duas vezes para identificar inconsistências e códigos ilícitos por meio do mesmo programa. Foram feitas todas as correções antes do início do processo de tabulação.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o Software Statistica. Teste de associação entre as variáveis categóricas foi realizado utilizando-se o qui-quadrado, com correção de Yates, quando apropriado, ou Teste Exato de Fisher (Fisher e Van Belle, 1993).

3.8. Aspectos éticos

Foram respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque (2000) e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 1996) mantendo-se em sigilo a identidade da paciente, cujos dados foram identificados apenas pelo número de registro no projeto e número do prontuário hospitalar. O projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do CAISM e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-Unicamp.

Sendo um estudo de coorte retrospectivo e os tratamentos terem sido realizados segundo rotina do Ambulatório de Oncologia Clínica do CAISM – Unicamp, não apresentou implicações outras que a manutenção de sigilo das informações.

4. Resultados

As pacientes incluídas no estudo tiveram a mediana de idade calculada em 49 anos, sendo que 59,10% delas se encontravam na pré-menopausa (Tabela1).

TABELA 1
Distribuição das características das pacientes

Características	Frequência absoluta – n (88)	Frequência relativa – (%)
Idade (anos)		
Mediana (extremos)	49 (31-69)	
Estado Menopausal		
Pré	52	59,10
Pós	36	40,90

Os tumores destas pacientes foram analisados segundo o tamanho tumoral inicial que eram maiores na mama que na axila. Quanto ao estágio clínico, cerca de 2/3 das pacientes tinham tumores estágio IIIB, correspondendo a 75%

de lesões T4 a e b (Tabela 2). Das pacientes 30,68% não tinham metástase clínica axilar e mais da metade tinham conglomerado linfonodal axilar.

TABELA 2
Distribuição das pacientes segundo as características iniciais da doença

Características	Frequência absoluta n (88)	Frequência relativa (%)
Mediana tamanho tumoral mm		
Mama (extremos)	72,5 (20-150)	
Axila	20 (0-70)	
Estádio		
IIIA	22	25%
IIIB	66	75%
Tumor primário		
T2	10	11,36
T3	17	19,32
T4a	2	2,27
T4b	59	67,05
Linfonodos axilares		
N0	27	30,68
N1	16	18,18
N2	47	51,14

A expressão da P-gp por imunoistoquímica foi positiva em 23,86% das pacientes (Tabela 3). Os esquemas de quimioterapia neo-adjuvante usados nestas pacientes foram: AC 66 pacientes e FAC 22 pacientes. A mediana de ciclos de quimioterapia administrados foi de 3; sendo o mínimo de 2 e o máximo de 6. As medianas do tamanho tumoral, após a quimioterapia neo-adjuvante, foram de 50mm da mama e 0mm da axila. A somatória dos diâmetros foi de 50mm.

TABELA 3**Distribuição das pacientes segundo a expressão da P-gp**

170Pgp	Frequência absoluta –n (88)	Frequência relativa – (%)
Positiva	21	23,86
Negativa	67	76,14

TABELA 4**Distribuição das pacientes segundo a resposta clínica da mama à quimioterapia neo-adjuvante**

Resposta	Frequência absoluta – n (88)	Frequência relativa –(%)
Completa	7	7,95
Parcial	44	50,00
Estável	37	42,05
Progressão	0	0
Total	88	100

TABELA 5**Distribuição das pacientes segundo a resposta clínica da axila à quimioterapia neo-adjuvante**

Resposta	Frequência absoluta – n (63)	Frequência relativa – (%)
Completa	24	38,10
Parcial	24	38,10
Estável	12	19,05
Progressão	3	4,75
Total	63	100

TABELA 6**Distribuição das pacientes segundo a resposta clínica global à quimioterapia neo-adjuvante**

Resposta	Frequência absoluta – n (88)	Frequência relativa – (%)
Completa	6	6,82
Parcial	50	56,82
Estável	32	36,36
Progressão	0	0
Total	88	100

TABELA 7

**Avaliação da associação entre a resposta clínica da mama
à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp**

Resposta	P-gp				P
	Positivo		Negativo		
	n	(%)	n	(%)	
Completa	2	9,50	5	7,50	0,9413
Parcial	10	47,60	34	50,70	
Estável	9	42,90	28	41,80	
Progressão	0	0	0	0	

TABELA 8

**Avaliação da associação entre resposta clínica da axila
à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp**

Resposta	P-gp				P
	Positivo		Negativo		
	n	(%)	n	(%)	
Completa	4	25,00	20	42,60	0,568
Parcial	7	42,80	17	36,20	
Estável	4	25,00	8	17,00	
Progressão	1	6,30	2	4,30	

TABELA 9

**Avaliação da associação entre a resposta clínica global
à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp**

Resposta	P-gp				P
	Positivo		Negativo		
	n	(%)	n	(%)	
Completa	1	4,80	5	7,50	0,851
Parcial	11	52,40	39	58,20	
Estável	9	42,90	23	34,30	
Progressão	0	0	0	0	

As respostas clínicas foram avaliadas previamente a cirurgia, observando-se respostas objetivas em 51 pacientes no tumor da mama (57,95%), em 48 pacientes no tumor axilar (76,20%) e 56 pacientes no tumor global (63,64%). A frequência absoluta da resposta completa foi em sete pacientes no tumor primário, 24 pacientes no tumor da axila e seis pacientes na somatória (mama + axila). As respostas clínicas parciais nos tumores da mama, axila e global foram observadas em 44, 24 e 50 pacientes respectivamente. Quanto à doença estável da mama, axila e global foram em 37, 12 e 32 pacientes, respectivamente. A doença em progressão só foi observada na axila. Inicialmente a doença axilar era mensurável em 61 pacientes. Após a quimioterapia ocorreu progressão em três casos sendo duas pacientes inicialmente N0 e uma paciente N2 (Tabelas 4, 5 e 6).

A avaliação da associação entre a expressão da P-gp e as respostas clínicas nos tumores da mama, axila e global não foram significativas neste estudo (Tabelas 7, 8 e 9).

5. Discussão

O estudo que contou com a participação de 88 pacientes, demonstrou que a frequência da P-gp em pacientes portadoras de carcinoma da mama localmente avançada foi de 23,86%. A P-gp tem mostrado níveis de positividade de 10% a 50% dos casos de tumores da mama e se relaciona com o pior prognóstico da doença (Castagna et al., 1991; Jackisch et al., 1991; ChunG et al., 1997; Chintamani et al., 2005).

O tamanho do tumor primário bem como o volume tumoral total, incluindo doença axilar, relaciona-se inversamente com a resposta clínica a quimioterapia (Kuerer *et al.*, 1998;1999; Hortobagyi et al., 2000; Kraft, 2001; Chintamani et al., 2005).

A taxa de resposta completa, segundo o tamanho do tumor primário, variou de 21% para pacientes com tumores T1 a T2 e 7% para aquelas com tumores T3 e T4, observado na literatura (Kuerer et al.,1999; Dieras et al., 2004; Thomas et al., 2004). No presente estudo a mediana do tumor primário foi de 7cm, portanto T3 e T4, a taxa de resposta clínica completa de 7,95%, conforme estudos citados acima.

A presença ou não de linfonodos axilares comprometidos não se constitui em fator preditivo de resposta loco-regional à quimioterapia neo-adjuvante nos carcinomas localmente avançados da mama e irrecutíveis. (McCready et al., 1989). Em tumores irrecutíveis, entretanto, está relacionado com a resposta clínica completa à quimioterapia primária (Fisher et al., 1997; 1998). Observou-se, no presente estudo, que o comprometimento linfonodal axilar foi de 69,32% e a resposta objetiva da mama de 57,95%, também não foi fator preditivo de resposta clínica à quimioterapia neo-adjuvante.

A identificação de fatores associados à resposta a quimioterapia poderiam auxiliar na seleção de pacientes com maior probabilidade de alcançarem resposta objetiva e na definição de melhores estratégias terapêuticas, evitando-se exposição desnecessária à toxicidade. A resposta completa foi identificada como fator prognóstico favorável em relação à evolução clínica das pacientes portadoras de neoplasia mamária localmente avançada (Hortobagyi et al., 1995).

Os esquemas de quimioterapia neo-adjuvante mais usados contêm antraciclina, principalmente a doxorubicina, que promovem uma taxa de resposta clínica completa entre 10% e 51% e patológica entre 3% e 30%. Estas respostas são similares em todos os sítios envolvidos pelo tumor primário potencialmente operável, isto é, mama e axila, e provavelmente nas micrometástases a distância (Smith et al., 2000; Dickson e Lippman, 2001; Hortobagyi et al, 2004).

No presente estudo avaliou-se a resposta clínica objetiva da mama, da axila e de ambas, que foi de 57,95%, 76,20% e 63,64%, respectivamente, Nossos

resultados em relação à resposta completa da mama, axila e global foi 7,95%, 38,10% e 6,82% respectivamente e abaixo dos descritos nos estudos anteriormente citados. A diferença encontrada pode ser devido ao fato que os tumores primários destes estudos eram potencialmente operáveis. Observou-se melhor resposta nos linfonodos que no tumor da mama. Talvez isto possa ser explicado por ser as células tumorais, presente nos linfonodos, clones mais indiferenciados geneticamente, o que determinaria diferente sensibilidade à quimioterapia, com maior resposta linfonodal (Kuukasjarvi et al., 1997; Kuerer et al., 1999).

Assim, a identificação de marcadores para avaliar a resposta ao tratamento primário, permitirá a seleção de esquemas quimioterápicos mais efetivo (Clarck, 2000; Wolf e Davidson, 2000). Entretanto, existem obstáculos para a eficácia da quimioterapia, principalmente a resistência das células tumorais às drogas antitumorais e a toxicidade relacionada a elas. Dos mecanismos de resistência destaca-se a resistência a múltiplas drogas (MDR), que é mediada pela P-glicoproteína (P-gp), codificada pelo gene MDR1.

A P-gp pode ser um marcador clinicamente importante na avaliação de tratamento, prognóstico e evolução do tumor. A facilidade de sua avaliação pela técnica da imunoperoxidase, mesmo após inclusão em parafina e a possibilidade de uso de tecidos normais como controle, permitem sua utilização no diagnóstico de tumores intrinsecamente resistentes às múltiplas drogas (Fojo et al., 1987; Goldstein et al., 1989; Spoelstra et al., 1991).

A prevalência da expressão da P-gp em câncer da mama primário é discutível, variando de não detectável pelo método de Western Blot, com anticorpo monoclonal C219 (Merkel et al., 1989) até 85% de positividade utilizando-se o anticorpo C494 (Verrelle et al., 1991).

Utilizando o anticorpo C219, Schneider *et al.* (1989) observou reatividade da P-gp em 2/12 amostras, enquanto Sanfilippo *et al.*, 1991; descreve a expressão em 10/34 das amostras. Por outro lado, Charpin et al., 1994 ao avaliar 213 amostras de tumor da mama primário sem tratamento prévio usando como anticorpo o JSB1 encontrou 53% de positividade sendo que em 28% das amostras dos tumores a P-gp foi encontrada em apenas 5% da área tumoral.

Geralmente a prevalência desta proteína varia de 10,6% a 19,1%, dependendo do anticorpo usado (Wang et al., 1997). No presente estudo a prevalência da P-gp foi de 10,2%, quando usamos o anticorpo C219 e 19,3% com o C494.

Observamos uma prevalência de 23,86% da P-gp considerando a positividade com pelo menos um dos anticorpos empregados. Estes dados são semelhantes aos de Wang *et al.*, 1997; que estudando 48 tumores de mama encontrou positividade de 10,6% com o monoclonal JSB1, 12,8% com o C494 e em pelo menos um deles, a positividade foi de 25%.

Em vários tipos de câncer, como a leucemia mieloide aguda, o sarcoma pediátrico, neuroblastoma pediátrico e carcinoma da mama localmente avançado a

super expressão do MDR1 P-gp tem sido correlacionada com baixas taxas de resposta a quimioterapia (Baldini et al., 1995; Leighton e Goldstein, 1995).

Em câncer de mama a expressão da P-gp parece ser mais comum em tumores localmente avançados (Giaccon et al., 1995; Pinedo e Giaccon 1995) e em osteosarcomas a P-gp foi relacionada com sobrevida livre de doença e com tratamento pré e pós-operatório (Baldini et al., 1995). Portanto, sua positividade pode ser um fator preditivo de pouca resposta a quimioterapia. Entretanto não se tem observado correlação com a resposta a quimioterapia neo-adjuvante, o que nos leva a concluir que a P-gp é mais um marcador de agressividade de tumor do que de resposta ao tratamento (PINEDO e Giaccon, 1995).

Estudo recente prospectivo de 50 casos de tumor de mama localmente avançado mostrou relação significativa entre a resposta a quimioterapia com antraciclina e a expressão da P-gp, também avaliou a positividade da P-gp após a quimioterapia e foi observado aumento, de 52% para 73,5% das pacientes (Chintamani et al., 2005).

No presente trabalho não foi encontrada relação entre a P-gp e a resposta ao tratamento neo-adjuvante. Respostas obtidas quando ela era positiva foram semelhantes àsquelas quando a proteína era negativa.

Assim, pelos achados do estudo não é possível considerar que a expressão da P-gp esteja correlacionada com a resposta a quimioterapia neo-adjuvante com antraciclina, talvez porque a resistência a múltiplas drogas seja

multifatorial, envolvendo vários genes com ação isolada ou associada (Cordon-Cardo O'Brien, 1991).

A literatura mostra que o MDR está associado à falha da quimioterapia com antraciclina justificando-se investigações para identificação de genes responsáveis pelo transporte de drogas e avaliando sua amplificação e super expressão de proteínas como a P-gp que poderia predizer a sensibilidade do tumor ao esquema de quimioterapia (Dietel, 1993; Beck et al., 1996; Lehnert et al., 1996; Marie et al., 1997).

6. Conclusões

- A frequência da expressão da P-gp foi de 23,6% em mulheres portadoras de carcinoma da mama estágio III.
- Não houve correlação entre a resposta clínica do tumor mamário à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp.
- Não houve correlação entre a resposta clínica do tumor da axila à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp.
- Não houve correlação entre a resposta clínica global à quimioterapia neo-adjuvante e a expressão da P-gp.

7. Referências Bibliográficas

Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G, Manara MC, Maurici D, Bacci G, et al. Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. ***N Engl J Med*** 1995; 333:1380-5.

Bech-Hanson NT, Till JE, Ling V. Pleiotropic phenotype of colchicine – resistant CHO cells: cross resistance and collateral sensitivity. ***J Cell Physiol*** 1976; 88:23-32.

Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, et al. Methods to detect P-glicoprotein-associated multidrug resistance in patients tumors: Consensus recommendations. ***Cancer Res*** 1996; 56:3010-20.

Bodey B, Bodey B JR, Groger AM, Luck JV, Siegel SE, Taylor CR, et al. Immunocytochemical detection of the p170 multidrug resistance (MDR) and the p53 tumor suppressor gene proteins in human breast cancer cell: clinical and therapeutical significance. ***Anticancer Res*** 1997; 17:1311-8.

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; 16:93-100.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução 196/96 do Conselho Nacional Saúde. ***Bioética***, 4: 15-25, 1996.

Broxterman HJ, Pinedo HM, Kuiper CM, van der Hoeven JJ, de Lange P, Quak JJ, et al. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein in human tumor cells with a low degree of drug resistance. **Int J Cancer** 1989; 43:340-3.

Castagna M, Viacava P, Cianfriglia M, et al. Immunohistochemical localization of the P- glycoprotein by monoclonal antibody MAB 57 in human breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 1991; 117(suppl 3):S92.

Charpin C, Vielh P, Duffaud F, Devictor B, Andrac L, Lavaut MN, et al. Quantitative immunocytochemical assays of P-glycoprotein in breast carcinomas: correlation to messenger RNA expression and to immunohistochemical prognostic indicator. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:1539-45.

CHITAMANI, Singhal V.; SINGH J. P.; MITTAL, M. K.; SAXENA, S.; BANSAL, A.; BHATIA, A, et al. Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer-a prospective clinical study. **World J Surg Oncol** 2005; 3:61-4.

Chung HC, Rha SY, Kim JH, Roh JK, Minj S, Kim BS, et al. **p-Glycoprotein:** the immediate end point of drug resistance to induction chemotherapy in locally advanced breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 1997; 42:65-72.

Clarck GM. Prognostic and predictive factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. **Diseases of the breast**. 2. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.489-514.

Cordon-Cardo C, O'brien J. The multidrug resistance phenotype in human cancer. In: De Vita V, Hellamn S, Rosenberg AS (eds): **Important advances in oncology**. Philadelphia: JB. Lippincott Company; 1991. p.19-38.

De Vita VT. Principles of chemotherapy. In: De Vita VT, Hellman S, Rosemberg SA. (eds): **Cancer: Principles and practice of oncology**. 3a. ed., Philadelphia: JB Lippincott;1989. p.276-300.

Declaración de Helsinki - Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica en seres humanos. **52ª Asamblea general Edimburgo**, Escocia, octubre 2000.

Deuchars K, Ling V. P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. **Sem Oncology** 1989; 16:156-65.

Dickson RB, Lippman ME. Cancer of the breast. In: De Vita Jr VT, Hellman S. Rosenberg SA. **Cancer - Principles e practices of oncology**. 6a. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1633-717.

Dieras V, Fumoleau P, Romieu G, Tubiana-Hulin M, Namer M, Mauriac L, *et al.* Randomized parallel study of doxorubicin plus paclitaxel and doxorubicin plus cyclophosphamide as neoadjuvant treatment of patients with breast cancer. **J Clin Oncol** 2004; 22:4958-65.

Dietel M. Second international symposium on cytostatic drug resistance: Meeting report. **Cancer Res** 1993; 53:2683-88.

Evans T, Gloud A, Foster E. *et al.* Phase III randomized trial of adriamycin (A) and docetaxel (D) versus A and cyclophosphamide (C) as primary medical therapy (PMT) in woman with breast cancer. An ACCOG study. **Proc.Am.Soc. Clin. Oncol** 2002; 21:351, (abstr. 136).

Ferguson PJ, Cheng Y. Critical issues relating to clinical drug resistance. **Cancer Bull** 1989; 41:7-13.

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; 15:2483-93.

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

Fisher LD, Van Belle GB. Biostatistics: a methodology for the healthy. **Sciences**, New York, John Wiley Sons, 91.1993.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of multidrug resistance gene in human tumors and tissues. **Proc Natl Acad Sci** 1987;84:265-9.

Giaccon G, Linn SC, Pinedo HM. Multidrug resistance in breast cancer: mechanisms, strategies. **Eur J Cancer** 1995; 31(suppl 7):S15-S7.

Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81:116-24.

Hortobagyi GN, Spanos W, Montague ED, Buzdar AU, Yap HY, Blumenshein GR. Treatment of locoregionally advanced breast cancer with surgery, radiotherapy, and combination chemioimmunotherapy. **Int J Rad Biol Phys** 1983; 9:643-65.

Hortobagyi GN, Buzdar AU, Strom EA, Ames FC. Primary chemotherapy for early and advanced breast cancer. **Cancer Lett** 1995; 90:103-9.

Hortobagyi GN, Singletary E, Mcneese M. Treatment of locally advanced and inflammatory breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. (eds). **Disease of the breast**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996. p. 585-99.

Hortobagyi GN, Singletary SE, Strom EA. Treatment of locally advanced and inflammatory breast cancer, In: Harris JR, Lippman M, E, Morrow M, Osborne C, K. **Diseases of the breast** .2a. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.645-60.

Hortobagyi GN, Singletary SE, Strom EA. Locally advanced a breast cancer, In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. **Diseases of the breast** .3 ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.952-69.

Jackisch C, Brandt B, Blum M. Detection of P-glycoprotein in breast cancer cells and consequences in therapeutics management. **J Cancer Res Clin Oncol** 1991; 117(suppl 3): S113.

Jardines L, Haffty Bg, Royce M, Jaiyesimi I. Cancernetwork.com. Breast Cancer. Advanced Disease. Stages III and IV breast cancer. cap. 11., 2000. Disponível em: <http://www.cancernetwork.com/contents/breast.htm#Advanced%20Disease>>. Acesso em: 06.01.2006.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants – **Biochim Biophys Acta** 1976; 455:152-62.

Kerr JF, Winterford CM, Hormon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer** 1994; 73:2013-26.

Kraft ML. **Fatores associados com a resposta à quimioterapia neo-adjuvanti em mulheres com carcinoma mamário localmente avançado**. Campinas, 2001. [Tese – Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp].

Kuerer HM, Newman LA, Buzdar AU, Hunt KK, Dhingra K, Buchholz TA, et al. Residual metastatic axillary lymph nodes following neoadjuvant chemotherapy predict disease-free survival in patients with locally advanced breast cancer. **Am J Surg** 1998; 176:502-9.

Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK. 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; 17:460-9.

Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. **Cancer Res** 1997; 7:1597-604.

Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer: A multifactorial problem. **Eur J Cancer** 1996; 32:912-30.

Leighton JC, Goldstein LJ. P-glycoprotein in adult solid tumors: expression and prognostic significance. **Hematol Oncol Clin North Am** 1995; 9:251-74.

Liux Song S, Shi C. Clinical significance of expression of multidrug resistance gene in breast cancer tissue. **Chung Hvan I Sueh ISA** 1997; 77:488-90.

Marie JP, Legrand O, Perrot JY, Chevillard S, Huet S, Robert J. Measuring multidrug resistance expression in human malignancies: elaboration of consensus recommendations. **Semin Oncol** 1997; 34(suppl 5):63-71.

McCready DR, Hortobagyi GN, Kau SW, Smith TL, Buzdar AU, Balch CM. The prognosis significance of lymph node metastases after preoperative chemotherapy for locally advanced breast cancer. **Arch Surg** 1989; 124:21-5.

Merajver Sd, Sabel MS. Inflammatory breast cancer, In: HarrisJR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. **Disease of the breast**. 3a. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.971-82.

Merkel DE, Fuqua SAW, Tandon AK, Hill SM, Buzdar AU, McGuire WL. Electrophoretic analysis of 248 clinical breast cancer specimens for P-glycoprotein overexpression or gene amplification. **J Clin Oncol** 1989; 7:1129-36.

Pastan I, Gottesman MM. Molecular biology of multidrug resistance in human cells. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg AS. (eds) - **Important advances in oncology**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1988. p.3-16.

Perez CA, Fields JN, Fracasso PM, Philpott G, Soares RI, Taylor ME. et al. Management of locally advanced carcinoma of the breast. II. Inflammatory carcinoma. **Cancer** 1994; 74(suppl):476-88.

Perloff M, Lesnick GJ, Korzun A, Chu F, Holland JF, Thirlwell MP, et al. Combination chemotherapy with mastectomy or radiotherapy for stage III breast carcinoma : a cancer and leukemia B study. **J Clin Oncol** 1988; 6:261-9.

Pierga JY, Mouret E, Dieras V, Laurence V, Beuzeboc P, Dorval T. et al Prognostic value of persistent node involvement after neoadjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. **Eur J Cancer** 2000; 83:1480-7.

Pinedo HM, Giaccon G. P-glycoprotein-a marker of cancer-cell behavior. **N Engl J Med** 1995; 333:1417-9.

Sanfilippo O, Ronchi E, De Marco C, Di Fronzo G, Silvestrini R. Expression of P-glycoprotein in breast cancer tissue and in vitro resistance to doxorubicin and vincristine. **Eur J Cancer** 1991; 27:155-8.

Schneider J, Bak M, Efferth T, Kaufmann M, Mattern J, Volm M. P-glycoprotein expression in treated and untreated human breast cancer. **Br J Cancer** 1989; 60:815-8.

Semiglazov VF, Bojok AA, Arsumanov AS, Ivanova OA. et al. Neoadjuvant chemotherapy paclitaxel and doxorubicin (PD) versus fluorouracil and doxorubicin and cyclophosphamide (FAC) in locally advanced breast cancer clinical and pathological response. **Eur J Cancer** 2001; 37(Suppl 6):166-7.

Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, et al. Human multidrug resistant cell lines: increased mdrl expression can precede gene amplification. **Science** 1986; 232:643-5.

SMITH IE, A Hem RP, Howell A, Hiskish T, O'Brien M, Mansi J. et al. Preoperative continuous infusional ECF (epirubicin, cisplatin and infusional 5FU) vs conventional AC chemotherapy for early cancer. A phase III multicentric randomized trial by TOPIC Trial Group. **Proc Am Soc Clin Oncol** 2000; 19:84A, (abstr. 320).

Spoelstra EC, Dekker H, Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, Lankelma J. P-glycoprotein drug efflux pump involved in the mechanisms of intrinsic drug resistance in various colon cancer cell lines. Evidence for a saturation of active daunorubicin transport. **Biochem Pharmacol** 1991; 1:349-59.

Teeter LD. Drug resistance and chemotherapy a perspective. **Cancer Bull** 1989; 41:14-20.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:205-16.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug resistance gene in human tumors and tissues. **Proc Natl Acad Sci** 1987; 84:265-9.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. **J Histochem Cytochem** 1989; 37:159-64.

Thomas E, Holmes FA, Smith TL, Buzdar AU, Frye DK, Fraschini G, et al. The use of alternative, non-cross resistant adjuvant chemotherapy on the basis of pathologic response to a neoadjuvant doxorubicin-based regimen in women with operable breast cancer; Long-term results from a prospective randomized trial. **J Clin Oncol** 2004; 22:2294-302.

Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/ gp170 expression and its possible functional significance. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:917-31.

Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM, Pastan I. The human multidrug resistance (mdr1) gene. **J Biocommun** 1987; 262:505-8.

Van der Bliek AM, Baas F, Ten Houte de Lange T, Kooiman PM, Van der Velde-Koerts T, Borst P. The human mdr3 gene a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. **EMBO** 1987; 6:3325-31.

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; 19:4224-37.

Verrelle P, Meissonnier F, Fonck Y, Feillel V, Dionet C, Kwiatkowski F, et al. Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83:111-6.

Volm M, Efferth T, Bak M, Ho AD, Mattern J. Detection of the multidrug resistant phenotype in human by monoclonal antibodies and streptavidin-biotinylated phycoerythrin complex method. **Eur J Clin Oncol** 1989; 25:743-9.

Wang CS, La Rue HL, Fontini A, Gariepy G, Tetu B. MDR, mRNA expression by RT-PCR in patients with primary breast cancer submitted to neoadjuvant therapy. **Breast Cancer Res Treatm** 1997; 45:63-74.

Wolf AC, Davidson NE. Primary systemic therapy in operable breast cancer. **J Clin Oncol** 2000; 18:1558-69.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de
Ciências Médicas, Unicamp. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2005).

9. Anexos

9.1. Anexo 1 – Ficha de Coleta de Dados

1. No. da Ficha: |_|_|_|_|

2. Idade: |_|_|_|_|

3. Status Menstrual: 1. Pré _____ 2. Pós _____

4. DIAGNÓSTICO:

1. PAAF _____ 2. TRU-CUT _____ 3. INCISIONAL _____

No. EXAME _____ / _____ DATA _____ / _____ / _____

4. Carcinoma ductal invasivo |_|_|

5. Tamanho clínico do tumor: mama _____ x _____ mm Axila _____ x _____ mm
Soma maiores diâmetros _____ mm

6. Tamanho clínico do tumor após Qt neo:
mama _____ x _____ mm Axila _____ x _____ mm
Soma maiores diâmetros _____ x _____ -mm

7. Estádio Clínico: 1.IIIA _____ 2.IIIB _____

8. Grau histológico: 1. GI ____ 2. GII ____ 3. GIII ____ 9. Desc

9. Grau nuclear: 1. GI ____ 2. GII ____ 3. GIII ____ 9. Desc

10. CT:

1. T1 ____ 2. T2 ____ 3. T3 ____ 4. T4a ____ 5. T4b ____ 6. T4c ____

11. cN: 1. NO ____ 2. N1 ____ 3. N2 ____

12. Expressão P-gp: 1. Positivo ____ 2. Negativo ____

13. Tratamento antitumoral neo-adjuvante:

1. FAC ____ 2. AC ____

14. No de Ciclos: ____

15. Resposta Clínica: da mama:

1. RC ____ 2. RP ____ 3. DE ____ 4. PR ____ 5. N. Av ____

16. Resposta Clínica: da axila:

1. RC ____ 2. RP ____ 3. DE ____ 4. PR ____ 5. N. Av ____

17. Resposta Clínica Global: (mama + axila):

1. RC ____ 2. RP ____ 3. DE ____ 4. PR ____ 5. N. Av ____

HC _____

No. da ficha _____

9.2. Anexo 2 – Resultado Imunoistoquímico

1996

Nº Bloco	C219	C494
11762/96	Negativo	Positivo
5845/96	Negativo	Negativo
6587/96	Negativo	Negativo
13010/96	Negativo	Negativo

1997

Nº Bloco	C219	C494
7634/97	Negativo	Insuficiente
6502/97	Negativo	Insuficiente
5657/97	Negativo	Negativo
4838/97	Negativo	Negativo
7883/97	Negativo	Positivo
382/97	Negativo	Negativo
3541/97	Negativo	Negativo
328/97	Negativo	Positivo
2996/97	Negativo	Negativo
11650/97	Negativo	Negativo
4245/97	Negativo	Negativo

1998

Nº Bloco	C219	C494
5338/98	Negativo	Negativo
8232/98	Negativo	Negativo
8036/98	Negativo	Positivo
7360/98	Negativo	Negativo
6995/98	Negativo	Negativo
6909/98	Negativo	Negativo
6245/98	Positivo	Negativo
5826/98	Negativo	Positivo
4588/98	Negativo	Negativo
1256/98	Negativo	Negativo
11260/98	Negativo	Negativo
9576/98	Negativo	Negativo

1999

Nº Bloco	C219	C494
9245/99	Negativo	Positivo
9186/99	Negativo	Negativo
8450/99	Negativo	Positivo
7294/99	Negativo	Negativo
7121/99	Negativo	Negativo
5960/99	Negativo	Positivo
11713/99	Negativo	Negativo
11581/99	Negativo	Negativo
10493/99	Negativo	Negativo

2000

Nº Bloco	C219	C494
8939/00	Negativo	Negativo
7672/00	Positivo	Negativo
6399/00	Negativo	Negativo
4990/00	Positivo	Positivo
2114/00	Negativo	Negativo
1760/00	Negativo	Negativo
1622/00	Negativo	Negativo
1396/00	Positivo	Negativo
1039/00	Negativo	Negativo

2001

Nº Bloco	C219	C494
7487/01	Negativo	Negativo
6215/01	Negativo	Positivo
11132/01	Negativo	Negativo
10169/01	Negativo	Negativo
11318/01	Negativo	Negativo
8843/01	Negativo	Negativo
11301/01	Negativo	Positivo
8917/01	Negativo	Negativo
7814/01	Negativo	Negativo
1226/01	Negativo	Negativo
396/01	Negativo	Negativo
2018/01	Positivo	Negativo
1585/01	Negativo	Negativo
3174/01	Negativo	Negativo
4576/01	Negativo	Negativo
7488/01	Positivo	Positivo
10639/01	Negativo	Negativo
1803/01	Positivo	Negativo

2002

Nº Bloco	C219	C494
11592/02	Positivo	Positivo
12342/02	Negativo	Negativo
4564/02	Negativo	Negativo
6310/02	Negativo	Negativo
6049/02	Negativo	Positivo
4610/02	Negativo	Negativo
3105/02	Negativo	Positivo
2689/02	Negativo	Positivo
1253/02	Negativo	Negativo
11829/02	Negativo	Negativo
9586/02	Negativo	Negativo
11562/02	Positivo	Positivo
10779/02	Negativo	Negativo
10108/02	Negativo	Insuficiente
7621/02	Negativo	Insuficiente
1407/02	Negativo	Negativo
1878/02	Negativo	Negativo
2474/02	Negativo	Negativo
2703/02	Negativo	Negativo
4889/02	Negativo	Negativo
6586/02	Negativo	Negativo
11952/02	Negativo	Negativo
9936/02	Negativo	Insuficiente

2003

Nº Bloco	C219	C494
842/03	Negativo	Negativo
675/03	Negativo	Negativo

RESUMO DOS RESULTADOS

	C219	C494
Negativos	79	71
Positivos	9	17

9.3. Anexo 3 – Banco de Dados

numero	HC	idade	Status_menstrual	diagnostico	num_Exame	data_diagnostico	ttc_mama	ttc_Axila	soma_ttc	histologico	nuclear	Tumor	Linfonodo	Estadio	170 Pgp	quimioterapia	data_quimio	num_Ciclos	ttcaqt_mama	ttcaqt_axila	soma_ttcaqt	resposta_clinica	RCM	RCAX
1	604588-4	53	2	3	07883/97	18/8/1997	80	20	100	3	2	5	3	2	positivo	1	25/8/1997	3	0	20	20	2	1	3
2	496130-1	52	2	2	04588/98	20/5/1998	50	30	80	3	2	5	3	2	negativo	1	8/6/1998	4	30	20	50	2	2	2
3	641774-6	58	2	2	05826/98	26/6/1998	120	50	170	3	2	5	3	2	positivo	2	27/7/1998	3	80	30	110	2	2	2
4	642367-6	39	1	3	06245/98	2/7/1998	40	0	40	3	2	5	1	2	negativo	1	17/7/1998	5	25	0	25	2	2	sem tu
5	646973-9	69	2	2	07360/98	3/8/1998	110	30	140	3	3	5	3	2	negativo	2	14/8/1998	3	120	40	160	3	3	4
6	659089-3	50	1	2	11260/98	17/11/1998	130	30	160	3	3	5	3	2	negativo	2	11/12/1998	3	60	10	70	2	2	2
7	312369-3	36	2	2	06909/98	23/7/1998	140	40	180	3	3	5	3	2	negativo	2	11/8/1998	3	50	20	70	2	2	2
8	689027-7	60	2	2	07294/99	6/8/1999	80	0	80	3	2	5	1	2	negativo	2	23/8/1999	3	50	0	50	2	2	sem tu
9	699848-9	51	1	2	10493/99	17/11/1999	70	30	100	9	9	3	3	1	negativo	2	6/12/1999	3	20	0	20	2	2	1
10	693673-0	50	2	2	09186/99	29/9/1999	80	0	80	3	3	5	1	2	negativo	2	16/11/1999	4	15	0	15	2	2	sem tu
11	74446-7	66	2	3	11581/99	13/12/1999	55	20	75	3	3	5	2	2	negativo	2	17/12/1999	3	50	15	65	3	3	3
12	424914-5	36	1	3	07121/99	5/8/1999	140	20	160	3	3	5	2	2	negativo	2	17/8/1999	3	40	0	40	2	2	1
13	693033-4	54	2	2	08450/99	13/9/1999	70	20	90	9	9	5	3	2	positivo	2	4/10/1999	3	70	20	90	3	3	3
14	709463-2	39	1	2	01039/00	8/2/2000	80	20	100	3	2	3	3	1	negativo	2	15/3/2000	3	50	0	50	2	2	1
15	713301-4	60	2	2	2114/00	13/3/2000	100	20	120	3	3	5	2	2	negativo	2	17/4/2000	4	60	0	60	2	2	1
16	675866-7	64	2	2	11713/99	15/12/1999	100	35	135	3	3	5	3	2	negativo	2	14/1/2000	4	40	0	40	2	2	1
17	112121-1	35	1	2	09245/99	14/10/1999	80	20	100	3	2	3	2	1	positivo	2	25/10/1999	5	70	20	90	3	3	3
18	500571-4	49	1	2	05960/99	29/6/1999	100	30	130	9	9	5	3	2	positivo	2	21/7/1999	3	50	10	60	2	2	2
19	725991-7	39	1	2	06399/00	15/8/2000	75	0	75	3	2	5	1	2	negativo	2	15/9/2000	3	50	0	50	2	2	sem tu
20	707785-4	40	1	2	01760/00	28/2/2000	100	30	130	3	3	5	3	2	negativo	2	1/3/2000	3	80	15	95	3	3	2

numero	HC	idade	Status_menstrual	diagnostico	num_Exame	data_diagnostico	ttc_mama	ttc_Axila	soma_ttc	histologico	nuclear	Tumor	Linfonodo	Estadio	170 Pgp	quimioterapia	data_quimio	num_Ciclos	ttcaqt_mama	ttcaqt_axila	soma_ttcaqt	resposta_clinica	RCM	RCAX
23	599539-1	66	2	2	06502/97	16/7/1997	50	0	50	3	3	5	1	2	negativo	2	22/8/1997	5	50	0	50	3	3	sem tu
24	589615-3	41	1	2	04245/97	9/5/1997	80	20	100	3	2	3	3	1	negativo	1	26/5/1997	3	65	15	80	3	3	3
25	597420-0	45	1	2	05657/97		30	30	60	3	2	2	3	1	negativo	1	14/7/1997	3	23	0	23	2	3	1
26	618394-7	41	1	2	11650/97	20/11/1997	60	30	90	3	2	3	3	1	negativo	1	19/1/1998	3	40	0	40	2	2	1
27	711560-8	44	1	2	1622/00	25/2/2000	105	70	175	3	3	5	3	2	negativo	2	27/3/2000	4	70	15	85	2	2	2
28	569233-5	57	2	2	13010/96	27/12/1996	50	30	80	2	2	5	2	2	negativo	1	15/1/1997	3	50	30	80	3	3	3
29	653842-1	49	1	2	09576/98	30/9/1998	130	50	180	3	3	5	3	2	negativo	2	27/9/1999	3	100	35	135	3	3	2
30	576610-4	58	2	2	00382/97	21/1/1997	70	30	100	9	9	3	3	1	negativo	1	15/1/1997	3	35	0	35	2	2	1
31	719022-2	38	1	3	04990/00	6/6/2000	100	20	120	3	3	3	2	1	positivo	2	26/6/2000	4	100	10	110	3	3	2
32	586572-4	43	1	3	04838/97	2/6/1997	60	0	60	2	3	5	1	2	negativo	1	17/6/1997	6	70	0	70	3	3	sem tu
33	649433-0	49	1	3	08232/98	24/8/1998	80	40	120	3	2	5	3	2	negativo	2	2/9/1998	4	60	20	80	2	3	2
34	645055-6	56	2	3	06995/98	13/8/1998	20	0	20	3	3	5	1	2	negativo	1	11/9/1998	3	20	0	20	3	3	sem tu
35	5856624-6	41	1	3	02996/97	4/4/1997	55	20	75	2	2	5	2	2	negativo	2	26/5/1997	3	30	10	40	2	2	2
36	645000-1	62	2	2	08036/98	20/8/1998	60	0	60	3	3	5	1	2	positivo	1	4/9/1998	2	75	0	75	3	3	sem tu
37	625784-3	38	1	3	01256/98	16/2/1998	100	20	120	3	2	3	3	2	negativo	1	20/3/1998	3	80	20	100	3	3	3
38	585576-3	41	1	3	3541/97		80	40	120	3	2	3	3	2	negativo	1	7/4/1997	3	65	25	90	3	3	2
39	735070-7	47	1	2	08939/00	5/10/2000	70	0	70	3	2	5	1	2	negativo	2	1/11/2000	3	50	0	50	3	3	sem tu
40	729977-9	43	1	3	07672/00	24/8/2000	120	40	160	3	2	5	3	2	positivo	2	4/9/2000	4	120	30	150	3	3	3
41	549283-4	50	1	3	05845/96	5/6/1996	80	45	125	3	2	3	3	1	negativo	1	10/6/1996	3	45	30	75	2	2	2
42	553085-6	65	2	3	06587/96	7/7/1996	120	40	160	3	3	5	3	2	negativo	1	10/7/1996	5	80	40	120	3	2	3
43	570708-5	49	2	2	11762/96	14/11/1996	50	30	80	3	3	5	3	2	positivo	1	26/11/1996	4	10	0	10	2	2	1
44	602757-3	54	2	2	07634/97		40	0	40	9	9	5	1	2	negativo	1	18/8/1997	3	35	0	35	3	3	sem tu
45	608417-7	34	1	3	05338/98	1/6/1998	120	10	130	3	2	4	3	2	negativo	1	7/8/1998	3	100	0	100	2	3	1

numero	HC	idade	Status_menstrual	diagnostico	num_Exame	data_diagnostico	ttc_mama	ttc_Axila	soma_ttc	histologico	nuclear	Tumor	Linfonodo	Estadio	170 Pgp	quimioterapia	data_quimio	num_Ciclos	ttcaqt_mama	ttcaqt_axila	soma_ttcaqt	resposta_clinica	RCM	RCAX
46	793134-3	57	2	2	1253/02	14/2/2002	120	60	180	3	3	5	3	2	negativo	2	10/4/2000	3	100	30	130	3	3	2
47	751150-1	44	1	2	01585/01	6/2/2001	60	0	60	3	2	3	2	1	negativo	2	6/4/2001	3	10	20	30	2	2	4
48	751943-6	38	1	2	01803/01	5/3/2001	80	0	80	3	3	5	1	2	positivo	2	6/4/2001	3	90	0	90	3	3	sem tu
49	746266-3	40	1	2	00396/01	8/1/2001	40	20	60	3	2	5	2	2	negativo	2	20/3/2001	3	40	15	55	3	3	3
50	747337-5	62	2	3	02018/01	15/3/2001	130	30	160	3	3	5	3	2	positivo	2	11/4/2001	4	65	10	75	2	2	2
51	756255-2	57	2	2	03174/01	3/4/2001	60	25	85	3	2	3	2	1	negativo	2	9/5/2001	3	60	0	60	3	3	1
52	765966-4	42	1	2	06215/01	25/6/2001	120	50	170	3	2	3	3	2	positivo	2	20/7/2001	4	50	0	50	2	2	1
53	760928-7	45	1	2	04576/01	11/5/2001	100	0	100	3	3	5	1	2	negativo	2	25/5/2001	3	80	0	80	3	3	sem tu
54	770171-4	52	1	2	07488/01	1/8/2001	50	60	110	3	3	3	3	2	positivo	2	3/8/2001	3	30	10	40	2	2	2
55	769367-0	58	2	2	07814/01	7/8/2001	30	30	60	2	2	5	3	2	negativo	2	5/9/2001	3	20	10	30	2	2	2
56	775015-9	47	1	2	08843/01	5/9/2001	70	0	70	3	2	5	1	2	negativo	2	5/9/2001	5	60	0	60	3	3	sem tu
57	680153-1	49	1	2	08917/01	10/9/2001	90	20	110	3	2	3	3	1	negativo	2	26/9/2001	3	50	0	50	2	2	1
58	770385-7	40	1	2	07487/01	1/8/2001	20	0	20	2	2	5	1	2	negativo	2	12/9/2001	2	0	0	0	1	1	sem tu
59	782569-7	40	1	2	11132/01	5/11/2001	90	40	130	3	3	2	3	1	negativo	2	23/11/2001	5	55	25	80	2	2	2
60	331874-7	37	1	2	10169/01	11/10/2001	25	30	55	3	3	2	3	1	negativo	2	30/11/2001	3	0	0	0	1	1	1
61	783509-4	38	1	2	11318/01	14/11/2001	150	20	170	3	3	5	2	2	negativo	2	6/12/2001	3	80	0	80	2	2	1
62	780747-7	59	2	3	10639/01	29/10/2001	20	0	20	3	2	5	1	2	negativo	2	7/12/2001	3	0	0	0	1	1	sem tu
63	546870-2	62	2	2	11301/01	14/11/2001	20	40	60	3	2	2	3	1	positivo	2	21/12/2001	3	15	20	35	2	3	2
64	797022-2	48	1	3	02474/02	20/3/2002	50	25	75	3	3	2	3	1	negativo	2	8/4/2002	3	20	15	35	2	2	2
65	797687-8	55	2	2	02703/02	2/4/2002	100	21	121	3	2	3	3	1	negativo	2	9/4/2002	3	80	0	80	2	3	1
66	156053-8	35	1	2	07621/02	16/8/2002	130	20	150	9	9	5	2	2	negativo	2	13/4/2002	3	50	20	70	2	2	3
67	794186-3	40	1	3	01878/02	7/3/2002	50	40	90	3	3	5	2	2	negativo	2	2/4/2002	3	0	0	0	1	1	1
68	789951-3	36	1	2	01407/02	20/2/2002	70	0	70	3	2	5	1	2	negativo	2	16/4/2002	3	0	0	0	1	1	sem tu

numero	HC	idade	Status_menstrual	diagnostico	num_Exame	data_diagnostico	ttc_mama	ttc_Axila	soma_ttc	histologico	nuclear	Tumor	Linfonodo	Estadio	170 Pgp	quimioterapia	data_quimio	num_Ciclos	ttcaqt_mama	ttcaqt_axila	soma_ttcaqt	resposta_clinica	RCM	RCAX
69	799381-0	50	1	3	3105/02	9/4/2002	45	35	80	2	3	2	3	1	positivo	2	6/5/2002	3	16	10	26	2	2	2
70	805496-0	35	1	3	04889/02	5/6/2002	91	30	121	3	2	5	3	2	negativo	2	24/5/2002	4	90	20	110	2	3	2
71	705653-1	57	2	2	4610/02	27/5/2002	25	60	85	3	3	2	3	1	negativo	2	12/6/2002	3	25	50	75	3	3	3
72	809591-4	67	2	2	6049/02	28/6/2002	30	0	30	3	2	4	1	2	positivo	2	22/7/2002	3	17	15	32	3	2	4
73	804401-8	52	1	2	4564/02	16/5/2002	50	30	80	3	2	5	2	2	negativo	2	2/8/2002	3	30	0	30	2	2	1
74	810234-3	67	2	3	6310/02	22/7/2002	50	35	85	3	2	5	3	2	negativo	2	5/8/2002	3	30	0	30	2	2	1
75	809927-7	40	1	3	06586/02	22/7/2002	55	40	95	3	3	2	3	1	negativo	2	9/8/2002	3	10	5	15	2	2	2
76	659680-3	51	2	2	9586/02	10/10/2002	30	25	55	3	2	2	3	1	negativo	2	20/1/2003	3	25	15	40	3	3	2
77	822589-8	47	1	3	10108/02	25/10/2002	60	0	60	3	3	5	1	2	negativo	2	1/11/2002	3	70	0	70	3	3	sem tu
78	818831-3	49	1	3	09936/02	22/10/2002	80	0	80	3	3	5	1	2	negativo	2	4/11/2002	3	80	0	80	3	3	sem tu
79	824602-0	58	2	2	10779/02	14/11/2002	35	0	35	3	3	5	1	2	negativo	2	10/12/2002	3	10	0	10	2	2	sem tu
80	827401-5	31	1	2	11562/02	23/12/2002	100	30	130	3	3	3	3	2	positivo	2	20/12/2002	3	35	0	35	2	2	1
81	828372-5	63	2	2	11829/02	11/12/2002	50	30	80	3	3	5	2	2	negativo	2	10/1/2003	3	15	0	15	2	2	1
82	033216-6	38	1	2	01226/01	14/2/2001	110	0	110	3	2	5	1	2	negativo	2	28/3/2001	3	50	0	50	2	2	sem tu
83	828619-1	48	1	2	11952/02	16/12/2002	50	20	70	3	2	5	2	2	negativo	2	10/1/2003	3	30	0	30	2	2	1
84	832316-7	46	1	2	00675/03	3/2/2003	100	0	100	3	3	5	1	2	negativo	2	28/2/2003	3	60	0	60	2	2	sem tu
85	811627-1	65	2	2	00842/03	3/2/2003	50	0	50	3	3	5	1	2	negativo	2	18/3/2003	3	30	0	30	2	2	sem tu
86	829875-4	56	2	2	12342/02	2/1/2003	100	35	135	3	3	5	3	2	negativo	2	2/4/2003	3	80	0	80	2	3	1
87	798275-8	37	1	2	2689/02	2/4/2002	120	0	120	3	3	5	1	2	positivo	2	10/5/2002	3	100	0	100	3	3	sem tu
88	209533-8	45	1	2	11592/02	19/12/2002	80	0	80	3	3	5	1	2	positivo	2	13/1/2003	3	50	0	50	2	2	sem tu

9.4. Anexo 4 – Publicação

Data: 02/13/06 08:24:44

Assunto: En:Applied cancer research - recebimento de artigo

Prezada Grace,

Acusamos o recebimento do artigo IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE P-GLYCOPROTEIN AND ITS CORRELATION TO THE RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH STAGE III BREAST CARCINOMA.

Encaminharemos para avaliação do editor-chefe da Revista Applied Cancer Research. As solicitações a respeito do andamento de avaliação do artigo devem ser encaminhadas para erika@appliedcr.com, incluindo o título do arquivo e o número 0003/06.

Atenciosamente,

Erika Santos

Managing Editor

Applied Cancer Research

**IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE P-GLYCOPROTEIN AND ITS
CORRELATION TO THE RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN
PATIENTS WITH STAGE III BREAST CARCINOMA**

Grace Imaculada Pereira Campos, MD; Marcelo Alvarenga, MD, PhD

Luiz Carlos Teixeira, MD; PhD, Tocogynecology Department,

CAISM-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

Address

Grace Imaculada Pereira Campos

Área de Oncologia-Caism-Unicamp

Rua Alexander Fleming 101

13100-000, Campinas, São Paulo, Brazil

telephone number: (55)-19-37889305

e-mail: oncologia@caism.unicamp.br

ABSTRACT

The main objective of the present work was to evaluate the immunohistochemical expression of P-glycoprotein and its correlation to the response to chemotherapy containing anthracyclin in female carriers of stage III breast cancer carcinoma. In the study of retrospective cohort, 88 files of patients who are carriers of locally advanced infiltrative ductal carcinoma were analyzed, and received neoadjuvant chemotherapy containing anthracyclin, excluding the inflammatory cases, from June 1996 to November 2003, in the Clinical Oncology Clinic of CAISM-Unicamp. The tumor was biopsied before treatment (core biopsy or incisional biopsy) and it was subjected to a immunohistochemical exam, system envision peroxidase, by utilizing monoclonal antibodies anti-P-glycoprotein, C494 (Signet) and C219 (Signet). It was considered as positive the cytoplasmatic coloring or trans-membrane of 10% or more of the cells. The external positive control used was human kidney normal tissue. The clinical response was evaluated before surgery, after the minimum of two chemotherapy cycles and the data was correlated with the expression of P-glycoprotein. The exact Fisher test or qui-square test was used to evaluate possible associations. Positive results of P-glycoprotein were 23,86% of the samples. The objective clinical response to chemotherapy obtained was similar in cases with and without the expression of P-glycoprotein, considering the primary tumor (57.1% vs 58.2%), arm pit (67.8% vs 78.8%) and total response (57.2% vs 65.7%, $p = 0.851$). A relation between the expression of P-glycoprotein and the clinical response to neoadjuvant chemotherapy was not found, what suggests that this marker should not be considered as a predictive factor to the response to chemotherapy with anthracyclin.

Key Words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, P-glycoprotein.

INTRODUCTION

The frequency of locally advanced breast cancer in underdeveloped countries is around 30% to 50% of the diagnosed cases, including the inflammatory carcinoma^(1,2). Chemotherapy is the initial treatment that is most used since it can reduce tumoral volume in about 60% to 80% of the cases; increase the survival, because it treats the systemic disease precociously^(3, 4); allow conservative surgeries; and evaluate tumoral cells chemosensitivity *in vivo*^(5, 6).

Partial or complete responses are associated with a longer survival^(7, 8) and the more effective antineoplastic association schemes are those which contain anthracyclins^(9,6). Schemes containing paclitaxel or docetaxel, associated to antineoplastic drugs increase responses, specially complete ones, up to 28%^(10,11). Anthracyclins are, therefore, the most used drugs. However, the observed responses are below the expected margin⁽¹²⁾, maybe because neoplastic cells developed drug resistance⁽¹²⁾.

The evaluation of the resistance to anthracyclins may define which tumors do not respond to the treatment and may allow the choice of more effective drugs. The intracellular resistance mechanism includes the alterations in the expression of the specific target of each cytotoxic agent by the amplification of the gene, which codifies it^(13, 14). Gene MDR (multi drug resistance) is associated with multi drug resistance, in special those which are originated from natural products such as vincristine e doxorubicine and may be responsible for the production of P-glycoprotein (P-gp), which diminishes intracellular concentration of these drugs^(15, 16). Two codifying genes of P-gp, denominated MDR1 and

MDR3, were isolated from human cells, being only the first gene associated with multiple drug resistance^(17, 18).

P-gp is a permanent component of the cell membrane and its role is transport and excretion. Its increased expression, as happens in some tumoral cells, results in an increased drug efflux and in a consequent reduction of its intracellular concentration^(19, 20). Immunoperoxidase techniques have demonstrated that the presence of P-gp in normal and tumoral cells and its overexpression is associated to chemotherapy drugs resistance^(21, 22, 23, 24, 25, 26, 27). Therefore, considering that P-gp is the marker that best characterizes the mechanism of resistance to drugs such as anthracyclins up to the present moment, considering that the neoadjuvant chemotherapy scheme which is more used contains adriamycin and that the stage III breast carcinoma occurs very often in our environment, the analysis of the expression of this protein is of the utmost importance to select patients whose tumors are sensitive to this drug.

MATERIAL AND METHODS

The files and the biological material of 88 women who were carriers of measurable stage IIIA and IIIB invasive ductal breast carcinoma, excluding inflammatory carcinomas were analyzed. Those women were enrolled at the Oncology Clinic of the Center of Whole Attention to Women Health at Unicamp, Campinas, São Paulo, and they were analyzed from June 1996 to November 2003. The patients received a minimum of two and a maximum of six chemotherapy cycles before surgery, with schemes containing adriamycin

(60mg/m²) and cyclofosfamide (600mg/m²), or fluorouracil (600mg/m²), adriamycin (60mg/m²), cyclofosfamide (600mg/m²).

Glycoprotein P-gp was evaluated prior to the chemotherapy by means of immunohistochemistry. The observation of cytoplasmatic coloring or trans-membrane in at least 10% of the cells was considered positive. Clinical response to the treatment was evaluated before surgery, according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors criteria (RECIST) (28). The biggest diameters specified in the files - in millimeters – were considered as an initial and final clinical measurement of the tumors and axillary lymph nodes. Global clinical response was established as the addition of the diametres of the breast and arm pit tumor.

Immunohistochemical technique, data collection and statistic analysis

Sections of 4µm were made in paraffin wax blocks and they were put in plates, that were then deparaffined and hydratated. Endogenous peroxidase inhibition was made in a 10% hydrogen peroxidase solution. Antigenic recuperation was made in citrate buffer 10mM, pH6.0, at 95°C in a steaming pan as a substitution method for an autoclave. The plates were incubated at a 4°C in a humid chamber, with the primary monoclonal antibodies C219 (dil1/25) Signet; C494 (dil1/40) Signet; that were produced in mice and diluted in PBS. Marking was made by using the envision peroxidase system and DAB coloring (3,3 diaminobenzidine, Sigma, D5637) until there could be seen a brownish color in the sections (illustrations 1 and 2). Positive control was human kidney normal tissue.

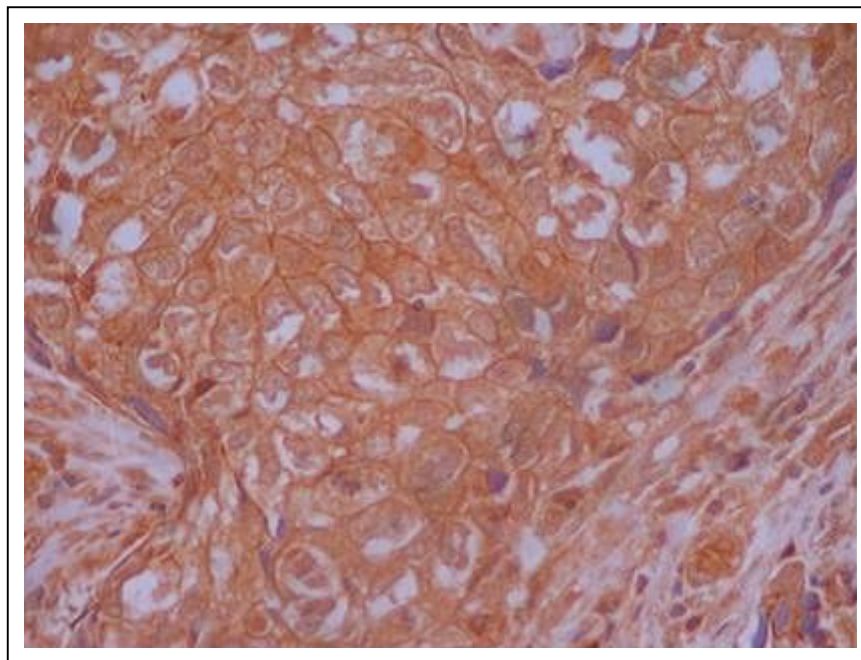


Illustration 1: Magnified 400 x showing P-gp expression in the cytoplasm of Ductal invasive carcinoma cells (C494).
(Source: Biological material, subject of the research, 2005).

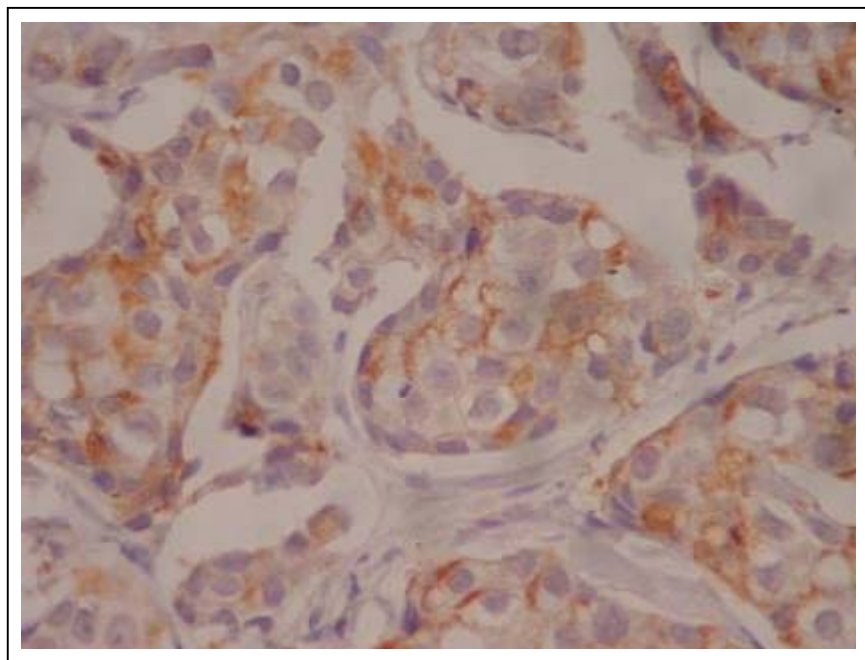


Illustration 2: Magnified 400 x showing P-gp expression in transmembrane of Ductal invasive carcinoma cells (C219).
(Source: Biological material, subject of the research, 2005).

Data collected out of the files of the patients were transcribed to the Enrollment File which was elaborated by the researcher. In order to realize data processing, a pre-codified file was prepared. A data bank was created in where the information was stored by using the software Microsoft Windows Excel-Version 2000. Statistic analysis was made by using the software Statistica. The association test between categoric variables was made by using the qui-square test, with the Yates correction, whenever appropriate, or the Exact Fisher Test (29).

The principles established in the Helsinki Declaration (2000) and in the Decree nº 196/96 of the National Health Council (Brasil, 1996) were respected, and the identity of the patients was kept in secrecy. The project was approved by the Committee of Ethics in Research of the Medicine College from Unicamp.

RESULTS

The patients included in the research had their age median calculated in 49 years, and 52 of them were in the pre-menopause. The initial tumoral size was bigger in the breast than in the arm pit. Regarding the clinical stage, around 2/3 of the patients were stage IIIB tumor carriers, what corresponded to 75% of the lesions T4 a, b. Only 30,68% of the patients did not have clinical axillary metastasis and more than half of them had a lymph nodal axillary mass (Table1). P-gp expression was positive in 23,86% of the patients. The neoadjuvant chemotherapy schemes used were AC, 66 patients and FAC, 22 patients. The median of chemotherapy cycles administered was of three, being two the minimal number of cycles and six the maximum number. After the primary chemotherapy, the

tumoral size medians were of 50mm in the breast and 0mm in the arm pit. The sum of value of the diameters was 50mm.

The clinical responses evaluated prior to the surgery showed objective responses in 51 patients for breast tumor (57.95%), for 48 patients in axillary tumor (76.20%) and for 56 patients in global tumor (63.64%). The complete response was obtained in seven patients, in primary tumor; in 24 patients, in the axillary tumor; and in six patients in the sum of value (breast + arm pit). Partial clinical responses of the breast, arm pit and global were observed in 44, 24 e 50 patients, respectively. Concerning the stable breast disease, arm pit and global were observed in 37, 12 and 32 patients, respectively. The progression of the disease was only observed in the arm pit. At first, the axillary disease was measurable in 61 patients. After chemotherapy, there was progression in three cases, being two of the patients initially N0 and one of them N2. The evaluation of the association between P-gp expression and the clinical responses of the breast, arm pit and global were not significative in this research (Tables 2, 3, 4).

Table 1

Distribution of the patients according to the characteristics of the disease

Characteristics	Absolute frequency n (88)	Relative frequency (%)
Median tumoral size (mm)		
breast (extremities)	72.5 (20-150)	
Arm pit	20 (0-70)	
Stage		
IIIA	22	25
IIIB	66	75
Primary tumor		
T2	10	11.36
T3	17	19.32
T4a	2	2.27
T4b	59	67.05
Axillary lymph nodes		
N0	27	30.68
N1	16	18.18
N2	45	51.14

Table 2

Evaluation of the association between breast clinical response to neoadjuvant chemotherapy and P-gp expression

Response	P-gp				
	Positive		Negative		P
	n	(%)	n	(%)	
Complete	2	9.50	5	7.50	0.9413
Partial	10	47.60	34	50.70	
Stable	9	42.90	28	41.80	
Progression	0	0	0	0	

Table 3

Evaluation of the association between the arm pit clinical response to neoadjuvant chemotherapy and P-gp expression

Response	P-gp				
	Positive		Negative		P
	n	(%)	n	(%)	
Complete	4	25.00	20	42.60	0.568
Partial	7	42.80	17	36.20	
Stable	4	25.00	8	17.00	
Progression	1	6.30	2	4.30	

Table 4

Evaluation of the association between global clinical response to neoadjuvant chemotherapy and P-gp expression

Response	P-gp				
	Positive		Negative		P
	n	(%)	n	(%)	
Complete	1	4.80	5	7.50	0.851
Partial	11	52.40	39	58.20	
Stable	9	42.90	23	34.30	
Progression	0	0	0	0	

DISCUSSION

The research has showed that the frequency of P-gp in patients who were carriers of locally advanced breast carcinoma was 23.86%, and the P-gp positivity varied from 10% to 50% of the breast tumor cases and was related to the worst prognosis of the disease^(24, 30, 31).

Complete response percentage depends upon the size of the primary tumor, being 21% for patients with T1 to T2 tumors and 7% for those with T3 e T4 tumors^(32,33,12). In the present research, the median of the primary tumor was 7cm and the complete clinical response was 7.95%. The presence or absence of impaired axillary lymph nodes is not a predictive factor of the local-regional response in the locally advanced and irresectable carcinomas⁽³⁴⁾. One observes in the present work that the axillary lymph nodal impairment was not a predictive factor of the clinical response to neoadjuvant chemotherapy either.

The identification of factors which are associated with chemotherapy response could help in the selection of patients with the highest probability of achieving an objective response and in the definition of better therapeutic strategies. Complete response was identified as a favorable prognostic factor in relation to the clinical evolution of the patients who were carriers of locally advanced breast neoplasia⁽³⁵⁾. Chemotherapy schemes that contain anthracyclins, specially doxorubicine, promote a complete clinical response rate between 10% and 51% and a pathologic rate between 3% and 30%. Such responses are similar in all sites involved by the primary tumor potentially operable, in other words, breast and arm pit^(5,36,37). In the present work, objective clinical response and complete

response of breast and arm pit and of both were 57.5%, 76.º%, 63.4% and 7.5%, 38.% and 6.2%, respectively, a inferior result than that described in the aforementioned research, maybe because of a bigger tumoral volume. Responses were better in the lymph nodes than in breast, maybe because tumoral cells present in the lymph nodes are more undifferentiated clones^(12, 38).

P-gp can be used as a marker clinically important in the evaluation of the treatment, prognosis and evolution of the tumor. Its easy evaluation by using the immunoperoxidase technique, even after the inclusion in paraffin wax and the possibility of the use of normal tissues as control allow its use in the diagnosis of tumors intrinsically resistant to multiple drugs^(39, 22). The prevalence of the expression of P-gp in breast cancer is arguable and varies from detectable by the Western Blot method with monoclonal antibody C219⁽⁴⁰⁾ to 85% of positivity when the antibody C494 is used⁽⁴¹⁾. The positivity of this protein usually varies from 10,6% to 19,1%, depending upon the antibody used ⁽⁴²⁾.

In the present research, the prevalence of P-gp was 10.% when the antibody C 219 was used; 19.% with the antibody C494 and 23.6% considering the positivity with at least one of the antibody used. The collected data was similar to that obtained by Wang (1997)⁽⁴²⁾, who found a positivity of 10.% with the monoclonal antibody JSB1; 12.% with the antibody C494 and in at least one of them, positivity was 25%.

In breast cancers the expression of P-gp is more common in tumors which are locally advanced^(43,44) and its positivity could be a response predictive factor to chemotherapy, however, such correlation has not been observed and P-gp may be more a marker of the tumor aggressivity than a marker of the

response to the treatment⁽⁴³⁾. Nonetheless, research has showed the significant relation between anthracyclin chemotherapy response and P-gp expression⁽²⁴⁾.

In the present work, the relation between P-gp and the response to neoadjuvant treatment was not found. Responses obtained when it was positive were similar to those obtained when the protein was negative. Therefore, one can not consider that the P-gp expression is correlated to the response to chemotherapy with anthracyclin, maybe because multiple drug resistance is multifactorial, involving many genes with isolated or associated action⁽²¹⁾, but further investigation is justified to identify the genes that are responsible for drug transport, evaluating their amplification and the over expression of proteins which could predict the sensibility of the tumor to the chemotherapy scheme^(45, 46).

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

1. Jardines L, Haffty BG, Royce M, Jaiyesimi I. Cancernetwork.com. Breast Cancer. Advanced Disease. Stages III and IV breast cancer, cap. 11, 2000. Available at: <http://www.cancernetwork.com/contents/breast.htm#_Disease>. Accessed on: 06.01.2006
2. Hortobagyi GN, Singletary E, Mcneese M. Treatment of locally advanced and inflammatory breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. (eds). Disease of the breast. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996. p. 585-99.
3. [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 Cancer trial 10902. J Clin Oncol 2001; 19(22):4224-37.
4. Perloff M, Lesnick GJ, Korzun A, Chu F, Holland JF, Thirlwell MP, et al. Combination chemotherapy with mastectomy or radiotherapy for stage III breast carcinoma: a cancer and leukemia B study. J Clin Oncol 1988; 6:261-9.
5. Dickson RB, Lippman ME. Cancer of the breast. In: De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer - Principles and practices of oncology. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.1633-717.
6. [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; 16:93-100.

7. Pierga JY, Mouret E, Dieras V, Laurence V, Beuzeboc P, Dorval T. *et al.* Prognostic value of persistent node involvement after neo-adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Eur J Cancer* 2000; 83:1480-7.
8. [Fisher B](#), [Bryant J](#), [Wolmark N](#), [Mamounas E](#), [Brown A](#), [Fisher ER](#), *et al.* Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:2672-85.
9. Hortobagyi GN, Singletary SE, Strom EA. Treatment of locally advanced and inflammatory breast cancer, In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast*. 2nd ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.645-60.
10. Evans T, Gloud A, Foster E, *et al.* Phase III randomized trial of adriamycin (A) and docetaxel (D) versus A and cyclophosphamide (C) as primary medical therapy (PMT) in woman with breast cancer. An ACCOG study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21:351, (abstr. 136).
11. Semiglazov VF, Bojok AA, Arsumanov AS, Ivanova OA, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy paclitaxel and doxorubicin (PD) versus fluorouracil and doxorubicin and cyclophosphamide (FAC) in locally advanced breast cancer clinical and pathological response. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl 6):166-7.
12. [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; 17:460-9.
13. Ferguson PJ, Cheng Y. Critical issues relating to clinical drug resistance. *Cancer Bull* 1989; 41:7-13.

14. Teeter LD. Drug resistance and chemotherapy a perspective. *Cancer Bull* 1989; 41:14-20.
15. Bech-Hanson NT, Till JE, Ling V. Pleiotropic phenotype of colchicine – resistant CHO cells: cross resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol* 1976; 88:23-2.
16. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455:152-62.
17. [Ueda K](#), [Clark DP](#), [Chen CJ](#), [Roninson IB](#), [Gottesman MM](#), [Pastan I](#). The human multidrug resistance (mdr1) gene. *J Biocommun* 1987; 262:505-8.
18. [Van der Bliek AM](#), [Baas F](#), [Ten Houte de Lange T](#), [Kooiman PM](#), [Van der Velde-Koerts T](#), [Borst P](#). The human mdr3 gene a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO* 1987; 6:3325-31.
19. [Pusztai L](#), [Wagner P](#), [Ibrahim N](#), [Rivera E](#), [Theriault R](#), [Booser D](#), [Symmans FW](#), et al. Phase II Study of Tariquidar, a Selective P-Glycoprotein Inhibitor, in Patients Chemotherapy-Resistant, Advanced Breast Carcinoma. *Cancer* 2005; 104:682-91.
20. Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/ gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89:917-31.
21. Cordon-Cardo C, O'brien J. The multidrug resistance phenotype in human cancer. In: De Vita V, Hellam S, Rosenberg AS (eds). *Important Advances in Oncology*. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1991. pp.19-38.

22. [Goldstein LJ](#), [Galski H](#), [Fojo A](#), [Willingham M](#), [Lai SL](#), [Gazdar A](#), et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. J Natl Cancer Inst 1989; 81:116-24.
23. [Broxterman HJ](#), [Pinedo HM](#), [Kuiper CM](#), [van der Hoeven JJ](#), [de Lange P](#), [Quak JJ](#), et al. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein in human tumor cells with a low degree of drug resistance. Int J Cancer 1989; 43:340-3.
24. [Chintamani](#), [Singh JP](#), [Mittal MK](#), [Saxena S](#), [Bansal A](#), [Bhatia A](#), [Kulshreshtha P](#). Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer-a prospective clinical study. World J Surg Oncol 2005; 3:61.
25. De Vita VT. Principles of chemotherapy. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. (eds). Cancer: Principles and practice of oncology, 3rd . ed., Philadelphia: JB Lippincott; 1989. p.276-300.
26. Bodey B, Bodey Jr B, Groger AM, Luck JV, Siegel SE, Taylor CR, Kaiser HE. Immunocytochemical detection of the p170 multidrug resistance (MDR) and the p53 tumor suppressor gene proteins in human breast cancer cell: clinical and therapeutical significance. Anticancer Res 1997; 17:1311-8.
27. Liux Song S, Shi C. Clinical significance of expression of multidrug resistance gene in breast cancer tissue – Chung Hvan I Sueh ISA 1997; 7:488-90.
28. [Therasse P](#), [Arbuck SG](#), [Eisenhauer EA](#), [Wanders J](#), [Kaplan RS](#), [Rubinstein L](#), et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. J Natl Cancer Inst 2000; 92:205-16.
29. Fisher LD, Van Belle GB. Biostatistics: a methodology for the healthy sciences. New York: Jonh Wiley Sons; 1993. 91p.

30. Chung HC; Rha S.Y.; Kim, J.H.; Roh, J.K.; Minj S.; Kim, B. S.; Lee K. B. - p-Glycoprotein: the immediate end point of drug resistance to induction chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1997, 42:65-72.
31. Castagna M, Viacava P, Cianfriglia M, *et al.* Immunohistochemical localization of the P- glycoprotein by monoclonal antibody MAB 57 in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117(suppl 3):S92.
32. [Dieras V](#), [Fumoleau P](#), [Romieu G](#), [Tubiana-Hulin M](#), [Namer M](#), [Mauriac L](#), *et al.* Randomized parallel study of doxorubicin plus paclitaxel and doxorubicin plus cyclophosphamide as neoadjuvant treatment of patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:4958-65.
33. [Thomas E](#), [Holmes FA](#), [Smith TL](#), [Buzdar AU](#), [Frye DK](#), [Fraschini G](#), *et al.* The use of alternative, non-cross resistant adjuvant chemotherapy on the basis of pathologic response to a neoadjuvant doxorubicin-based regimen in women with operable breast cancer; Long-term results from a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 2004; 22:2294-302.
34. [McCready DR](#), [Hortobagyi GN](#), [Kau SW](#), [Smith TL](#), [Buzdar AU](#), [Balch CM](#). The prognosis significance of lymph node metastasis after preoperative chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Arch Surg* 1989; 124:21-5.
35. [Hortobagyi GN](#), [Buzdar AU](#), [Strom EA](#), [Ames FC](#), [Singletary SE](#). Primary chemotherapy for early and advanced breast cancer. *Cancer Lett* 1995; 90: 103-9.

36. Hortobagyi GN, Singletary SE, Strom EA. Locally advanced breast cancer, In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the breast. 3rd ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.952-69.
37. Smith IE, A Hem RP, Howell A, Hiskish T, O'brien M, Mansi J. et al. Preoperative continuons infusional E Cis F (epirubicin, cisplatin and infusional 5FU) vs conventional AC chemotherapy for early cancer. A phase III multicentric randomized trial by TOPIC Trail Group. Proc Am Soc Clin Oncol 2000; 19:84A, (abstr. 320).
38. [Kuukasjarvi T](#), [Karhu R](#), [Tanner M](#), [Kahkonen M](#), [Schaffer A](#), [Nupponen N](#), et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. Cancer Res 1997; 7:1597-604.
39. [Spoelstra EC](#), [Dekker H](#), [Schoorhuis GJ](#), [Broxterman HJ](#), [Lankelma J](#). P-glycoprotein drug efflux pump involved in the mechanisms of intrinsic drug resistance in various colon cancer cell lines. Evidence for a saturation of active daunorubicin transport. Biochem Pharmacol 1991; 1:349-59.
40. Merkel DE, Fuqua SAW, Tandon AK, Hill SM, Buzdar AU, McGuire WL. Electrophoretic analysis of 248 clinical breast cancer specimens for P-glycoprotein overexpression or gene amplification. J Clin Oncol 1989; 7:1129-36.
41. [Verrelle P](#), [Meissonnier F](#), [Fonck Y](#), [Feillel V](#), [Dionet C](#), [Kwiatkowski F](#), et al. Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast cancer. J Natl Cancer Inst 1991; 83:111-6.

42. Wang CS, La Rue HL, Fontini A, Gariepy G, Tetu B. MDR, mRNA expression by RT-PCR in patients with primary breast cancer submitted to neoadjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 45:63-74.
43. Pinedo HM, Giaccon G. P-glycoprotein-a marker of cancer-cell behavior. *N Engl J Med* 1995; 333:1417-9.
44. Giaccon G, Linn SC, Pinedo HM. Multidrug resistance in breast cancer: mechanisms, strategics. *Eur J Cancer* 1995; 31(suppl 7):S15-S17.
45. [Beck WT](#), [Grogan TM](#), [Willman CL](#), [Cordon-Cardo C](#), [Parham DM](#), [Kuttesch JF](#), et al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients tumors: Consensus recommendations. *Cancer Res* 1996; 56:3010-20.
46. Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer: A multifactorial problem. *Eur J Cancer* 1996; 32:912-30.