UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO

TATIANE MENDES GONÇALVES DE OLIVEIRA

Associação entre os valores do coeficiente de difusão aparente nas imagens de ressonância magnética ponderadas em difusão e marcadores prognósticos e de células tronco tumorais no câncer de mama em pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante.

Ribeirão Preto

2016

Tatiane Mendes Gonçalves de Oliveira

Associação entre os valores do coeficiente de difusão aparente nas imagens de ressonância magnética ponderadas em difusão e marcadores prognósticos e de células tronco tumorais no câncer de mama em pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor pelo Curso de Pós-graduação em Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

v.1

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Oliveira, Tatiane Mendes Gonçalves

Associação entre os valores do coeficiente de difusão aparente nas imagens de ressonância magnética ponderadas em difusão e marcadores prognósticos e de células tronco tumorais no câncer de mama em pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante/Tatiane Mendes Gonçalves Oliveira; orientador Daniel Guimarães Tiezzi. --Ribeirão Preto, 2016.

___ p; 30 cm

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Medicina. Área de concentração: Tocoginecologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

1. Célula tronco tumoral no câncer de mama. 2. Marcadores prognósticos. 3. Difusão em ressonância magnética. 4. Quimioterapia neoadjuvante.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tatiane Mendes Gonçalves de Oliveira

Associação entre os valores do coeficiente de difusão aparente nas imagens de ressonância magnética ponderadas em difusão e marcadores prognósticos e de células tronco tumorais no câncer de mama em pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor pelo Curso
de Pós-graduação em Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao Mario, meu marido, com amor, pelo seu apoio incondicional e sua compreensão às
minhas noites de estudo e dedicação para elaboração desse trabalho.

À Maria da Graça, minha mãe, com todo carinho e reconhecimento pelo seu empenho em
zelar pela minha educação e motivação ao estudo e à pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi, pela sua atenção e orientação na elaboração desta tese.

Aos Profs. e Drs. Jorge Elias Júnior, Valdair Francisco Muglia, Antônio Carlos dos Santos e Marcello Nogueira que, nos anos de convivência e de minha formação, muito me ensinaram, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Aos inúmeros colegas de trabalho que me ajudaram diariamente nas dificuldades enfrentadas e que participaram diretamente da realização de minha pesquisa, em especial à Larissa Raquel Mouro Mandarano, Renata Danielle Sicchieri e Willian Abraham da Silveira.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Centro de Ciências das Imagens e Física Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela colaboração imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

RESUMO

OLIVEIRA, T. M. G. Associação entre os valores do coeficiente de difusão aparente nas imagens de ressonância magnética ponderadas em difusão e marcadores prognósticos e de células tronco tumorais no câncer de mama em pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante. 2016. 52 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As imagens de ressonância magnética (RM) ponderadas em Difusão são conhecidas como uma técnica funcional capaz de refletir alterações estruturais e celulares de neoplasias. No câncer de mama, a difusão e sua quantificação através dos valores do coeficiente de difusão aparente (CDA) têm sido utilizados para avaliar resposta tumoral após quimioterapia neoadjuvante (QTN). Os variados desfechos clínicos do câncer de mama, incluindo as diferentes respostas ao tratamento quimioterápico podem estar relacionados à heterogeneidade da doença. A presença das células tronco tumorais (CTT) é uma das hipóteses aceitas para explicar os diferentes comportamentos biológicos dos tumores. Este estudo buscou avaliar uma possível associação entre os valores de CDA nas neoplasias invasivas da mama e a presença de marcadores de CTT e os principais marcadores prognósticos da doença em pacientes tratadas com QTN.

Foram avaliadas prospectiva e consecutivamente as imagens de RM pré-tratamento de 27 pacientes com câncer da mama que realizaram QTN seguida de cirurgia. Os valores de CDA média, p10, p25 e p50 foram obtidos através de duas mensurações, uma com único ROI e outra com múltiplos ROIs envolvendo toda extensão tumoral. Esses valores de CDA foram correlacionados: à quantificação por citometria de fluxo de CTT com fenótipos ESA+/CD44+/CD24-, células ESA+ com alta atividade ALDH1 e células ESA+/ABCG2+, à capacidade de formação de mamoesferas, e aos principais fatores prognósticos do câncer de mama, incluindo estágio clínico, doença axilar linfonodal, grau tumoral, receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e superexpressão do HER2. Também foi realizada correlação dos valores de CDA com a resposta patológica completa após QTN.

A presença de CTT, a capacidade de formação de mamoesferas e a resposta patológica completa não se correlacionaram aos valores de CDA. Para ambas as medidas e todos os parâmetros avaliados de CDA ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$), os valores foram significativamente menores nos tumores com estágio clínico III e IV vs II ($0,90 \pm 0,16$; $1,02 \pm 0,18$); com doença linfonodal após QTN vs axila livre ($0,89 \pm 0,16$; $1,01 \pm 0,17$); RE+ vs RE- ($0,90 \pm 0,16$; $1,00 \pm 0,18$); RP+ vs RP- ($0,91 \pm 0,16$; $0,98 \pm 0,18$) e HER2+ vs HER2- ($0,92 \pm 0,17$; $0,97 \pm 0,18$).

Tumores grau 1 apresentaram CDA com valores significativamente maiores em relação aos tumores grau 2 (diferença 0,18; CI: 0,03-0,33, $p=0,02$).

Os valores de CDA dos tumores de mama pré-QTN não predizem a presença de CTT, a capacidade de formação de mamoesferas ou a resposta patológica completa, porém se correlacionam com o estágio clínico da doença, doença linfonodal axilar após QTN, grau tumoral e expressão das proteínas RE, RP e HER2, sendo um promissor marcador de agressividade tumoral.

Palavras chave: Câncer de mama, Célula tronco tumoral, Quimioterapia neoadjuvante, Fatores Prognósticos, Difusão em Ressonância Magnética, Coeficiente de difusão aparente.

ABSTRACT

OLIVEIRA, T. M. G. Correlation among the values of apparent diffusion coefficient provided by diffusion-weighted magnetic resonance imaging, the cancer stem cells markers and the major prognostic factors in patients with invasive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. 2016. 52 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DWMRI) is a functional technique able to reflect structural and cellular changes in the tumors. In the breast cancer, the diffusion-weighted images and its numeric value known as the apparent diffusion coefficient (ADC) has been applied to evaluate pathologic response in patients treated with neoadjuvant chemotherapy (NC). The difference in the clinical results after breast cancer treatment, including different rates of responses to the NC has been associated to the heterogeneity of the disease. The presence of the breast cancer stem cells (BCSC) is an accepted hypothesis to explain the different biologic breast cancers behaviors. The aim of this study was to correlate the ADC value of invasive breast cancer with the presence of cancer stem cells markers and the major prognostic factors in patients treated with neoadjuvant chemotherapy.

Prospectively, the MRI pre-treatment of twenty-seven consecutive patients with invasive breast cancer posteriorly treated with NC followed by surgery were evaluated. The ADC values mean, 10th percentile, 25th percentile, 50th percentile were obtained from two measurements, one of them with a unique ROI and the other with multiple ROIs encompassing the entire lesion. The ADC values were correlated to: presence of BCSCs (cell surface markers CD44⁺/CD24⁻, ABCG2 and ALDH1) identified by flow cytometric analysis, tumor grade, breast cancer staging, lymph nodal involvement, expression of estrogen receptors (ER), expression of progesterone receptors (PR) and expression of HER2. The assay mammospheres (Mammocult ®) were analyzed in 18 samples. Additionally, the ADC values were correlated to the pathologic complete response after QN treatment.

There were no correlations between ADC values and breast cancer stem cells markers or mammospheres formation efficiency. For all parameters calculated, the ADC values ($\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$) were lower in: breast cancer stage III and IV than stage II ($0,90 \pm 0,16$; $1,02 \pm 0,18$), tumors with lymph node metastasis than without lymph node metastasis ($0,89 \pm 0,16$; $1,01 \pm 0,17$), ER expression than ER negative ($0,90 \pm 0,16$; $1,00 \pm 0,18$), PR expression than PR

negative ($0,91\pm0,16$; $0,98\pm0,18$) and HER2 expression than HER2 negative ($0,92\pm0,17$; $0,97\pm0,18$). The ADC values were significantly higher in grade-1 tumors (difference $0,18$; CI: $0,03-0,33$) compared to grade-2 tumors ($p=0,02$). The tumors values of ADC pre-treatment were not correlated to the pathologic complete response after NC.

The ADC values in pre-treatment invasive breast cancers are not a predictor of BCSC presence, mammospheres formation efficiency or pathologic complete response to QN. However it is correlated to the tumor grade, breast cancer staging, lymph nodal involvement, expression of ER, PR and HER2 and may represent a promising marker of tumor aggressiveness.

Key words: Breast cancer, Cancer Stem Cell, Neoadjuvant chemotherapy, Prognostic factors; Diffusion-weighted magnetic resonance imaging, Apparent diffusion coefficient.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma para seleção das pacientes no estudo.....	24
Figura 2 - Representação de único ROI na área de maior restrição tumoral no mapa de CDA.....	28
Figura 3 - Representação de ROIs em toda a extensão tumoral no mapa de CDA.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de imagens utilizados na sequência ponderada em difusão.....	26
Tabela 2 - Características das pacientes do estudo.....	34
Tabela 3 - Diferença estimada entre os valores de CDA Uroi e Mroi para os parâmetros média, percentil 10, percentil 25 e percentil 50.....	35
Tabela 4 - Diferença estimada entre os valores de CDA dos tumores grau I e grau II para a medida Uroi percentil 10, percentil 25 e percentil 50.....	37
Tabela 5 - Valores de CDA Uroi e Mroi para os tumores expressores e não expressores de receptores hormonais.....	37
Tabela 6 - Valores de CDA Uroi e Mroi para os tumores com expressão e sem expressão de HER2.....	38
Tabela 7 - Valores de CDA Uroi e Mroi para o parâmetro estágio clínico ao diagnóstico.....	38
Tabela 8 - Valores de CDA Uroi e Mroi para o parâmetro doença linfonodal após quimioterapia neoadjuvante.....	39

LISTA DE SIGLAS

ABCG2	Membro número 2 da subfamília G dos ABC transportadores
ALDH	Aldeído-desidrogenase
CD24	Proteína de adesão
CD44	Glicoproteína transmembrana
CDA	Coeficiente de Difusão Aparente
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CTT	Células Tronco Tumorais
ESA	Epithelial Specific Antigen
HER2	Human Epidermal Grow Factor Receptor 2
MAMMOCULT ®	Meio de cultura para mamoesferas
QTN	Quimioterapia neoadjuvante
RE	Receptor de estrógeno
RH	Receptor hormonal
RM	Ressonância Magnética
ROI	<i>Region of interest</i>
RP	Receptor de progesterona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Células Tronco Tumorais no câncer de mama	16
1.2. Difusão em Ressonância Magnética	18
2. OBJETIVO	21
3. PACIENTES E MÉTODOS	22
3.1. Seleção de pacientes.....	22
3.2. Quimioterapia neoadjuvante.	25
3.3. Técnica de Ressonância Magnética.....	25
3.4. Imagens de RM ponderadas em difusão e análise do Coeficiente de Difusão Aparente	26
3.5. Avaliação histológica da amostra tumoral pré-quimioterapia.....	30
3.6. Avaliação pós-cirúrgica da resposta à quimioterapia neoadjuvante.....	32
3.7. Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Características das pacientes.	33
4.2. Valores de CDA obtidos através das diferentes mensurações.....	35
4.3. Marcadores de células tronco tumorais e valores de CDA.....	36
4.4. Fatores prognósticos do câncer de mama e valores de CDA.	36
4.5. Correlação entre os valores de CDA e resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante.	39
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A quimioterapia neoadjuvante (QTN) é o tratamento inicial para pacientes com tumores de mama localmente avançados e permite a realização de um maior número de cirurgias conservadoras. Além disso, a resposta patológica completa está relacionada a melhor prognóstico em relação às pacientes com neoplasia invasiva residual após tratamento quimioterápico primário. Apesar da taxa de resposta completa ser dependente do tipo de tratamento, do estágio clínico inicial e do subtipo histológico (BERIWAL et al., 2006; FISHER et al., 1997, 1998; ABRIAL et al., 2005), tumores histologicamente e clinicamente semelhantes podem apresentar história natural diferente com respostas terapêuticas distintas (PEROU et al., 2000; FERNÁNDEZ-MORALEZ et al., 2007).

O entendimento dos fatores e dos mecanismos envolvidos na falha da resposta à QTN, na recidiva local e na disseminação metastática é crucial para o desenvolvimento de esquemas quimioterápicos individualizados e de novas drogas alvo-específicas. A expressão de receptores hormonais (RH), da oncoproteína HER2, mais recentemente o perfil de expressão gênica das células neoplásicas e o papel das células tronco tumorais (CTT), vêm sendo estudados na tentativa de melhor definir os diferentes comportamentos biológicos dos tumores de mama e melhorar a acurácia do tratamento quimioterápico (CALZA et al., 2006; SORLIE et al., 2001, 2003, 2006; VELAZQUEZ-VELASCO et al., 2012).

Baseado na expressão de RH e de algumas proteínas específicas de membrana, o carcinoma de mama pode ser dividido em pelo menos quatro subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, HER2 e “*Basal-like*” (PEROU et al., 2000). Os tumores luminais possuem marcadores das células epiteliais luminais e expressam receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP). O Luminal A é o mais frequente, não apresenta superexpressão de HER2, e está relacionado a melhor prognóstico. Já o Luminal B pode ou

não expressar a oncoproteína HER2, apresentando prognóstico intermediário. Os carcinomas “*basal-like*” não expressam RH e HER2, possuindo algumas características genéticas encontradas nas células mioepiteliais. Os tumores do subtipo HER2 são os menos frequentes, caracterizados pela superexpressão da oncoproteína HER2 sem expressão de RH. Tumores “*basal-like*” e HER2 são biologicamente mais agressivos, responsáveis por menor taxa de sobrevida, porém, a despeito do pior prognóstico, apresentam melhor resposta à quimioterapia neoadjuvante do que os tumores RH positivos (RAZZAK et al, 2008; LAM et al, 2014). Em diferentes estudos, a taxa de resposta completa em pacientes com tumores RH negativos se mostrou superior a de pacientes com RH positivos, em até 4 vezes (ANDRE et al., 2008; VON MINCKWITZ et al., 2011).

Ainda assim, o desfecho clínico de pacientes com tumores semelhantes, em relação à expressão de RH e do HER2, pode ser bem diferente, mesmo considerando o emprego de terapias alvo-específicas (RAZZAK et al, 2008). Por exemplo, entre as pacientes com tumores de mama HER2+ tratadas com quimioterapia primária associada ao trastuzumabe, 61% não alcançam resposta patológica completa (VON MINCKWITZ et al., 2011). A heterogeneidade intrínseca do tumor com populações celulares distintas é uma hipótese complementar para explicar os diferentes comportamentos biológicos dos carcinomas de mama (SORLIE et al., 2001; RAZZAK et al., 2008).

1.1. Células Tronco Tumorais no câncer de mama.

Atualmente, postula-se que uma pequena subpopulação celular tumoral, as células tronco tumorais (CTT), apresentam propriedades de autorrenovação e, moduladas pelo microambiente através de diversas vias sinalizadoras, podem gerar novas células CTT ou ainda originar outras células tumorais fenotipicamente diferentes (VELAZQUEZ-VELASCO et al, 2012; CHARAFE-JAUFFRET et al, 2009).

As CTT podem ser responsáveis não somente pela iniciação mas também pela progressão e crescimento tumoral, sendo relacionadas à recorrência local do tumor primário, capacidade de disseminação metastática, bem como resistência à quimioterapia (NOWELL, 1976; REYA et al., 2001; AL-HAJJ et al., 2003; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2009).

A identificação das CTT pode ser feita por citometria de fluxo utilizando marcadores de membrana celular ou estimando a atividade da enzima aldeído-desidrogenase (ALDH). As células tumorais da linhagem CD44+/CD24- e as células tumorais com alta atividade da ALDH foram reconhecidas por sua capacidade de gerar tumor in vitro e em modelos xenográficos nos trabalhos de Al Hajj et al. (2003) e Ginestier et al. (2007), e vêm sendo consolidadas como CTT em outros estudos (VELAZQUEZ-VELASCO et al., 2012; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2010; TIEZZI et al., 2013; REYA et al., 2001). Ambas as subpopulações (CD44+/CD24- e ALDH) apresentam alta capacidade de gerar mamoesferas, que são pequenas colônias celulares cultivadas in vitro, em meio de cultura, a partir de uma célula tumoral, que avaliam indiretamente a capacidade de autorrenovação celular do tumor (PONTI et al., 2005).

O estudo de Li et al (2008) mostrou um aumento da população de células CD44+/CD24- e da capacidade de formação de mamoesferas em tumores de mama após 12 semanas de tratamento quimioterápico, apontando um possível papel dessa linhagem celular na resistência a quimioterapia e na recidiva tumoral. Além disso, a presença das células tumorais ALDH+ se correlacionou com menor taxa de resposta completa à quimioterapia neoadjuvante, à predição de disseminação metastática e a pior prognóstico nos trabalhos de Charafe-Jauffret et al. (2009, 2010).

A proteína ABCG2, também conhecida como proteína da resistência no câncer de mama, está envolvida no transporte ativo transmembrana de vários substratos, sendo expressada em vários tumores primários, principalmente adenocarcinomas, e é relacionada à

resistência a múltiplos agentes citotóxicos (DOYLE et al., 1998; SCHINKEL et al, 2003). Alguns estudos mostraram a associação deste marcador com CTT, e sua correlação com alguns fatores prognósticos como a superexpressão de HER2 e comprometimento linfonodal axilar (BENDERA et al, 2004; DIESTRA et al., 2002; XIANG et al., 2011), evidenciando que a presença do células ABCG2 também pode estar ligada à agressividade tumoral (SICCHIERI et al., 2015).

1.2. Difusão em Ressonância magnética

A imagem de RM ponderada em Difusão, clinicamente empregada a partir de 1990, utiliza um mecanismo de contraste tecidual diferente daquele utilizado nas imagens com ponderação T1 e T2, refletindo alterações celulares em tecidos patológicos, e por isso sendo conhecida como uma técnica funcional de RM. A ponderação em difusão é uma representação do movimento térmico e randômico das moléculas de água, chamado movimento browniano. O movimento browniano das moléculas de água *in vivo* é influenciado por variáveis biológicas: é maior em tecidos com baixa celularidade e matriz extracelular abundante e mais restrito em ambiente com alta celularidade, viscosidade e membranas celulares íntegras.

A restrição da difusão das moléculas de água se traduz, qualitativamente, nas imagens de RM ponderadas em difusão por um aumento da intensidade de sinal (BAMMER, 2003; WOODHAMS et al, 2011). Mas, além da avaliação qualitativa da difusibilidade das moléculas de água nos tecidos, é possível a obtenção de valores quantitativos através das medidas de intensidade do sinal da lesão no mapa de coeficiente de difusão aparente (CDA), que é derivado e calculado a partir das imagens adquiridas com ponderação em difusão (KOH et al, 2007).

Graças à habilidade em avaliar indiretamente a celularidade, o emprego das imagens ponderadas em difusão em conjunto com as imagens contrastadas na RM da mama, aumentou a especificidade do exame e tem sido utilizado na avaliação precoce de resposta à QTN, após os primeiros ciclos do tratamento, bem como na avaliação da presença de lesão residual após o término da neoadjuvância (KUHL, 2007).

As diferenças nos valores de CDA após os primeiros ciclos da quimioterapia primária podem preceder as alterações do diâmetro e do volume tumoral (PICKLES, et al., 2011; SHARMA et al, 2009). Belli et al. (2011), Jensen et al. (2011) e Li,Xiu-Hu et al. (2012) também encontraram que o aumento nos valores de CDA tumoral após os ciclos iniciais de quimioterapia foi proporcional à redução do volume tumoral ao final do tratamento citotóxico.

A vantagem de uma ferramenta que diferencie tumores sem potencial de resposta à QTN, evitando os efeitos adversos das drogas citotóxicas tem levado a muitos esforços para avaliar a acurácia da Difusão em prever a resposta patológica dos carcinomas de mama à quimioterapia primária, porém os resultados são muito controversos e os estudos apresentam diferentes metodologias. Alguns trabalhos demonstraram que os tumores com resposta patológica completa apresentam um valor de CDA menor do que aqueles tumores que não responderam completamente (IACCONI et al., 2010; LI,Xiu-Ru et al., 2012; SHIN et al., 2012). Outros estudos não encontraram diferença estatística entre os valores de CDA para o grupo de tumores respondedores e não-respondedores à QTN (MANTON et al., 2006; NILSEN et al., 2010; WOODHAMS et al., 2010; FANGBERGET et al., 2011).

Grau histológico, expressão de RH e da oncoproteína HER2, bem como os subtipos moleculares luminais, basal-like e HER2 também parecem influenciar as características de imagem na RM. Alguns estudos têm correlacionado esses marcadores biológicos com características morfológicas, de captação de contraste e de restrição à difusão na RM de

mama. Tumores com alto grau e expressão de RH apresentaram um valor médio de CDA menor, enquanto os tumores HER2+ foram correlacionados aos maiores valores médios de CDA (RAZEK et al., 2010; PARK et al., 2015; JEH et al., 2011; KIM et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por Martincich et al. (2012) que encontraram valores de CDA maiores em tumores receptores hormonais negativos e, os tumores do subtipo molecular HER2 apresentando a maior média de CDA em relação aos demais subtipos.

A heterogeneidade do carcinoma de mama vem mostrando que pode ser refletida nas imagens de RM e o potencial papel da difusão na avaliação e manejo dos tumores de mama ainda é apenas parcialmente conhecido. Além da predição e avaliação de resposta à quimioterapia neoadjuvante e da correlação com marcadores prognósticos e moleculares, a correlação entre os valores de CDA tumoral e a presença de células tronco tumorais CD44+/CD24-, ALDH1+ e com expressão da proteína ABCG2 pode constituir mais um método rápido e não invasivo para avaliação do comportamento e agressividade tumorais.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar a possível correlação entre a porcentagem de células ESA+/CD44+/CD24-, células ESA+ com alta atividade ALDH e células ESA+/ABCG2+ estimada por citometria de fluxo amostradas em tumores de mama e os parâmetros quantitativos derivados da técnica difusão (CDA), em imagens de RM;
2. Analisar se existe a correlação entre marcadores prognósticos do câncer de mama e os parâmetros quantitativos derivados da técnica difusão (CDA), em imagens de RM;
3. Avaliar a possível associação entre os valores do CDA e a resposta patológica completa em pacientes com neoplasia de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante;

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Seleção de pacientes.

Este estudo prospectivo, foi realizado em apenas uma instituição entre setembro de 2010 e maio de 2013, incluindo consecutivamente pacientes que foram encaminhadas com suspeita de neoplasia invasiva de mama, selecionadas de acordo com as características clínicas e de imagem (mamografia e/ou ultrassonografia), cuja proposta inicial de tratamento seria a quimioterapia neoadjuvante de acordo com o protocolo da Divisão de Mastologia e Oncologia Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). As pacientes foram informadas e orientadas sobre o estudo, acordando com sua inclusão através do Termo de Consentimento Informado e Esclarecido aprovado pelo Conselho de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Após a seleção inicial, as 59 pacientes realizaram RM das mamas seguida de amostra tecidual do tumor para diagnóstico histopatológico. Ao todo foram excluídas do estudo 32 pacientes: 7 pacientes não puderam realizar RM (claustrofobia, limite de peso do aparelho, dificuldades de agendamento, equipamento avariado); em 5 pacientes as imagens de RM apresentaram artefatos que tornaram a qualidade de algumas sequências inapropriada para o estudo; 2 pacientes interromperam a quimioterapia neoadjuvante (neutropenia persistente; progressão de doença após o 5º ciclo de quimioterapia); 4 pacientes realizaram apenas hormonioterapia; 2 pacientes optaram por tratamento em outro serviço; 2 pacientes foram a óbito; em 3 pacientes o resultado histopatológico foi CDIS; em 1 paciente o diagnóstico foi Tumor Phyllodes; 1 paciente apresentava um CLI inflamatório de caráter infiltrativo impossibilitando a mensuração dos valores quantitativos da RM; em 3 pacientes o material histológico foi insuficiente para análise no citômetro de fluxo; 2 pacientes tinham tumores bilaterais com avaliação apenas de um dos tumores pela citometria de fluxo (sem

especificação da lateralidade). O fluxograma e o desenho do estudo são resumidos na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma para seleção das pacientes no estudo.

3.2. Quimioterapia neoadjuvante .

O tratamento quimioterápico neoadjuvante empregado foi: pacientes estágio clínico II e IV receberam 6 ciclos de FEC (5-Fluoracil 600mg/m^2 + Epirrubicina 75 mg/m^2 + Ciclofosfamida 600 mg/m^2) e pacientes estágio clínico III receberam 8 ciclos de EC-T (4 ciclos de Epirrubicina 75 mg/m^2 + Ciclofosfamida 600 mg/m^2 seguidos de 4 ciclos de Docetaxel 100 mg/m^2). Todas as pacientes com superexpressão de HER2 receberam Trastuzumabe 6mg/kg concomitante com os últimos 4 ciclos da quimioterapia. Uma segunda linha de quimioterápicos foi utilizada em 4 pacientes (4 ciclos de Docetaxel 75mg/m^2 + Epirrubicina 50 mg/m^2). O intervalo de tempo entre a RM e o início do tratamento quimioterápico foi em média 25,5 dias (± 4 dias).

3.3. Técnica de Ressonância Magnética.

As pacientes estudadas realizaram RM das mamas previamente à QTN em um aparelho 1.5T Achieva (Philips, Best, The Netherlands) com bobina de superfície dedicada à mama, *phased array* de oito canais e em decúbito ventral. Os exames foram realizados no Centro de Ciências das Imagens e Física Médica – HCFMRP, utilizando o protocolo de rotina da instituição para o estadiamento do câncer de mama.

O protocolo consiste nas sequências pré-contraste T1 2D axial, T2 2D axial, STIR 2D axial, Difusão 2D axial, T1 com supressão de sinal da gordura (*fat sat*) axial 3D e 5 sequências dinâmicas após a administração intravenosa do contraste paramagnético T1 *fat sat* axial 3D adquiridas até o 6º minuto. Foram obtidas imagens pós-contraste com subtração da fase pré-contraste através do processamento na estação de trabalho *Extended MR Workspace 2.6.3.5. 2013 (Phillips Medical Systems Nederland B.V.)*. Utilizou-se espessura de corte 4.0 mm para sequências 2D e 1.0 mm para sequências 3D. O contraste paramagnético utilizado foi o gadopentato de dimeglumina (0.1 mmol/L/kg) seguido de injeção de 20 mL de solução salina.

3.4. Imagens de RM ponderadas em Difusão e análise do Coeficiente de Difusão

Aparente.

O protocolo para aquisição da Difusão incluiu imagens pré-contraste *spin echo single shot echo planar* com gradientes aplicados ao longo dos três planos x, y e z (imagens isotrópicas) com valores de b iguais a 0, 200, 500 e 800. Os parâmetros das imagens ponderadas em difusão são pormenorizados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de Imagem utilizados na sequência com ponderação em Difusão.

Imagens ponderadas em Difusão	
Saturação de gordura	SPIR
TE (ms)	72
TR (ms)	3279
FOV(mm)	330 x 266
Matrix (píxeis)	132 x 106
Orientação	axial
Espessura (mm)	5
Espaçamento (mm)	1
Num. Excitações	5
Largura da banda (Hz/pixel)	1891

O mapa de CDA foi calculado utilizando-se o software *Extended MR WorkSpace 2.6.3.5. 2013 (Phillips Medical Systems Nederland B.V.* dedicado, a partir dos valores de obtidos com a equação:

$$CDA = - \ln (S_b/S_{b=0})/ b$$

onde S_b e $S_{b=0}$ representam a intensidade de sinal de dois gradientes de ponderação em difusão, sendo a imagem com valor de $b=0$ a referência de ponderação mínima em difusão e máxima em T2.

As imagens foram avaliadas, através do programa OsiriX versão 6.0.2, por um radiologista com 7 anos de experiências em imagem da mama. Durante as avaliações, não estavam disponíveis as informações clínicas sobre as pacientes, nem a respeito das características biológicas tumorais (como grau histológico e receptores hormonais), da quantificação das CTT e sobre a resposta à QTN.

Para cada paciente, o tumor primário foi inicialmente identificado nas imagens com ponderação em T1 *fat sat* pós-contraste no primeiro minuto, com subtração das fases pré e pós-contraste. Após, as imagens ponderadas em difusão foram utilizadas para correlação com as imagens contrastadas e com o mapa de CDA. Essa correlação da imagem tumoral nas três sequências (pós contraste, difusão e mapa de CDA) facilitou a melhor delimitação das margens do tumor, bem como de áreas possivelmente necróticas no interior da lesão, sem realce pelo meio de contraste.

Depois da identificação do tumor hipointenso nas imagens do mapa de CDA, uma área de interesse (ROI, do inglês *region of interest*) foi manualmente desenhada sobre a lesão, evitando a inclusão de parênquima fibroglandular normal, tecido adiposo e áreas necróticas.

A confecção dos ROIs para mensuração dos valores de CDA tumoral foi realizada sequencialmente de duas maneiras. Na primeira delas a lesão foi avaliada visualmente sendo identificada a área de maior hipointensidade (maior restrição do tumor). A partir daí apenas um único ROI foi desenhado no mapa de CDA circunscrevendo essa região, com uma área mínima de 1cm^2 (Figura 2).

Figura 2: RM pré-quimioterapia neoadjuvante. Imagens axiais da mama esquerda de uma paciente de 52 anos, com CDI grau II. **a:** Imagem ponderada em T1 após contraste com subtração 1º minuto demonstrando nódulo irregular com realce precoce e heterogêneo. **b:** Imagem ponderada em difusão ($b=800\text{s/mm}^2$) mostrando a área de maior restrição (hipersinal) identificada após avaliação de toda a lesão tumoral. **c:** Mapa de CDA correspondente evidenciando a área de acentuada restrição, com uma região de baixo sinal demarcada por um ROI manualmente desenhado (linha em verde).

Na segunda mensuração, ROIs foram desenhados de forma a englobar todo o tumor, em cada uma das imagens no mapa de CDA que continham a lesão estudada (Figura 3). Dessa forma, para cada paciente obtivemos dois bancos de dados com valores numéricos representando os valores de intensidade de sinal dos píxeis delimitados pelos ROIs, provenientes de cada método de medida.

Ao conjunto de valores, medidos através da seleção de uma única região de interesse no tumor, denominamos Uroi. Ao conjunto contendo os múltiplos valores obtidos de todo o volume tumoral, denominamos Mroi. Cada um desses dois bancos de dados numéricos, Uroi e Mroi, foi analisado através do programa *Numbers 3.2.2* (© 2008-2014 Apple Inc) para obtenção dos valores de CDA mínimo e máximo, a média aritmética, o percentil 10, o percentil 25 e o percentil 50.

Figura 3: RM pré-quimioterapia neoadjuvante da mesma paciente apresentada na figura 2

demonstrando linha por linha, de **a** até **e**, de cranial para caudal, todas as imagens da mama esquerda que contêm a lesão tumoral. Na coluna 1 estão representadas as imagens ponderadas em T1 após contraste 1º minuto com subtração. Na coluna 2 estão representadas as imagens ponderadas em difusão ($b=800\text{s/mm}^2$) e na coluna 3 o mapa de CDA equivalente.

O tumor pode ser identificado como o nódulo irregular com realce heterogêneo nas imagens da coluna 1, nódulo com hipersinal (restrição à difusão) na coluna 2 e nódulo com hipossinal na coluna 3. Nas imagens do mapa de CDA, ROIs (linha em verde) foram manualmente desenhados envolvendo todo o tumor, excluindo as áreas possivelmente necróticas.

3.5. Avaliação histológica da amostra tumoral pré-quimioterapia.

3.5.1. Obtenção das amostras tumorais:

As amostras teciduais para diagnóstico (pré-quimioterapia) dos nódulos mamários foram obtidas por biópsia percutânea. As biópsias percutâneas foram guiadas por ultrassonografia e realizadas com disparador semi-automático Bard®, utilizando-se agulhas de 12gauge x 10cm com avanço de 2,2cm, no Centro de Diagnóstico por Imagem do HCFMRP-USP.

Foram coletados uma média de 3 fragmentos por nódulo. Cerca de dois fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10% e posteriormente processados em parafina para confirmação do diagnóstico histológico, graduação histológica e avaliação imunohistoquímica (receptores hormonais e superexpressão de HER2).

Um fragmento foi colocado em frasco Falcon® (BD Biosciences®) estéril contendo meio para cultura celular MEM (Gibco®) e refrigerado em gelo. Esse fragmento foi utilizado para análise por citometria de fluxo.

3.5.2. Avaliação do grau histológico, receptores hormonais e superexpressão do HER2:

Os dados referentes ao grau histológico e à imunohistoquímica foram adquiridos dos laudos de patologia do Serviço de Patologia do HCFMRP-USP, que são revisados por equipe de patologistas com pelo menos 7 anos de experiência em patologia mamária. O grau histológico foi baseado na classificação de Nottingham do Sistema Bloom e Richardson

modificado por Elston e Ellis de 1 a 3. Os receptores hormonais de estrógeno e progesterona foram avaliados por imunohistoquímica segundo a escala de Allred (ALLRED et al.,1998), sendo considerado positivo qualquer marcação nuclear em pelo menos 1% das células tumorais. O HER2 foi analisado por imunohistoquímica segundo recomendação da *American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists* e nos casos inconclusivos (2+) foi realizada Chromogenic *in situ* hybridization (CISH), para identificação da amplificação gênica.

3.5.3. Identificação das células CD44+/CD4-, células com alta atividade ALDH e células ABCG2:

Os fragmentos obtidos foram triturados delicadamente com lâmina de bisturi e incubados em meio de cultura celular MEM com collagenase IV para digestão enzimática. Sequencialmente, o material foi filtrado e a collagenase inativada com soro fetal bovino. A suspensão foi centrifugada para eliminação do sobrenadante e o *pellet* de células ressuspendido em meio de cultura MEM. A contagem das células viáveis foi feita através hematocitômetro e solução de azul de tripan. A suspensão celular foi então utilizada na concentração de 1×10^6 células/ml.

Para fenotipagem da população celular do tumor foram utilizados anticorpos marcados com seus respectivos fluorocromos e analisados através da citometria de fluxo conforme previamente descrito por MANDARANO, 2013; SICCHIERI, 2013. Resumidamente, para identificação das células tumorais ESA+CD44+/CD24- foram utilizados os anticorpos anti-ESA (ESA - eBiosciences®), anti-CD44 (BD Biosciences®) e anti-CD24 (BD Biosciences®). Foram também utilizados os anticorpos anti-ABCG2 (Millipore®) para caracterização das células ABCG2 e o kit comercial Aldefluor® (Aldagen®) para a identificação das células tumorais com alta atividade ALDH. Os anticorpos anti-LIN (pool de anticorpos anti-linhagem hematopoiética) e anti-CD-31 foram utilizados para exclusão de células não tumorais.

As amostras foram lidas no citômetro de fluxo BD FACS CANTO II. A identificação e quantificação das subpopulações de células tumorais foi feita pela exclusão de células da linhagem hematopoiética e endotelial (LIN+ e CD31+, respectivamente) e pela positividade do ESA. Dentro da população ESA+ foi realizada a análise conjunta para identificar em cada amostra a porcentagem de células CD44+/CD24-, células com expressão de ABCG2 e células com alta atividade ALDH.

A quantificação de células ESA+/CD44+/CD24- foi obtida em 26 pacientes, ESA+/ALDH+ em 19 pacientes, ESA+/ABCG2 em 24 pacientes.

3.5.4. Cultura de esferas:

Um total de 10^5 células em suspensão foram colocadas para cultura em placas de 6 poços com meio MammoCult® para o ensaio de formação de mamoesferas seguindo as recomendações do fabricante. Após 7 dias o sobrenadante foi aspirado e colocado em um tubo Falcon, centrifugado e o sobrenadante desprezado. O *pellet* de esferas foi delicadamente ressuspenso em 500µl de meio de cultura. Então, 50µl desta suspensão celular foi colocada em um poço de uma placa de 96 poços para contagem do total de esferas utilizando um microscópio de luz invertido.

A cultura de mamoesferas foi realizada em 18 pacientes.

3.6. Avaliação pós-cirúrgica da resposta à quimioterapia neoadjuvante .

A peça cirúrgica proveniente de mastectomia ou de cirurgia conservadora e linfadenectomia axilar foi encaminhada e analisada pelo Serviço de Patologia Clínica do HCFMRP-USP. A resposta patológica foi considerada completa na ausência de neoplasia invasiva da mama, independente da presença de neoplasia in situ residual (HOUSSAMI et al, 2012; FISHER et al, 2002).

3.7. Análise estatística.

A média aritmética, percentil 10, percentil 25 e percentil 50 do CDA calculados pelos dois métodos de mensuração (Uroi e Mroi) foram comparados entre si pelo teste *t-Student* pareado.

Para a correlação entre as diferentes medidas de CDA e a porcentagem de células ESA+/CD44+/CD24-, células ESA+ com alta atividade ALDH e células ESA+/ABCG2 identificadas nas amostras teciduais dos tumores foi utilizado o coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ).

A análise da correlação entre as diferentes medidas de CDA e os fatores prognósticos do câncer de mama foi realizada pelo teste ANOVA (para o grau histológico) e o teste *t-Student* (para o estágio clínico, presença de receptores hormonais, superexpressão de HER2 e comprometimento axilar após tratamento quimioterápico).

Os valores de CDA foram correlacionados ao grupo de tumores respondedores e não respondedores à quimioterapia através do teste *t-Student*. O nível de significância (α) adotado no estudo foi de 0,05. Os cálculos estatísticos foram obtidos com o auxílio do software SAS® 9.2.

4. RESULTADOS

4.1. Características das pacientes.

As 27 pacientes estudadas tinham idades entre 34 e 66 anos, com média de 52 anos ($\pm 10,3$ anos), 51,8% estavam no climatério. Em relação ao estágio clínico no momento do diagnóstico, 11,1% apresentavam tumores em estágios iniciais, 66,7% apresentavam tumores localmente avançados e 22,2% foram diagnosticadas com doença metastática. Além disso, 81,5% das pacientes tinham comprometimento axilar. Os tumores primários tinham diâmetro médio de 4,4cm ($\pm 1,8$ cm), variando de 2,1 cm a 10,3 cm.

O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal invasivo, com apenas 1 caso de carcinoma lobular invasivo diagnosticado na peça cirúrgica. Dezoito pacientes (66,7%) apresentaram carcinomas grau histológico II (Classificação de Nottingham do Sistema Bloom e Richardson).

Receptores hormonais de estrógeno e progesterona estavam presentes em 62,9% das neoplasias, superexpressão de HER2 em 48,1% e 11,1% eram triplo negativos. A tabela 2 resume as características das pacientes do estudo.

Tabela 2. Características das pacientes do estudo.

	Total (N=27)	%
Idade (anos)		
<50	11	40,8
51-60	8	29,6
61-70	8	29,6
Menopausa		
Sim	14	51,8
Não	13	48,2
Tumor primário (T)^a		
2	4	14,8
3	10	37,1
4b	9	33,3
4d	4	14,8
Linfonodos regionais (N)^a		
0	5	18,5
1	7	25,9
2	11	40,7
3	4	14,8
Metástase a distância (M)^a		
0	21	77,8
1	6	22,2
Grau Histológico^b		
I	4	14,8
II	18	66,7
III	5	18,5
Receptor de Estrógeno (RE)		
Positivo	17	62,9
Negativo	10	37,1
Receptor de Progesterona (RP)		
Positivo	16	59,3
Negativo	11	40,7

HER2		
Positivo	13	48,1
Negativo	14	51,9

^a *Estadiamento TNM segundo Union International Cancer Control – 7^a. Edição 2011*

^b *Classificação de Nottingham do Sistema Bloom e Richardson*

4.2. Valores de CDA obtidos através das diferentes mensurações.

Para os 27 tumores analisados, a média das medidas de CDA (expressas na unidade $\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$) foram Uroi m $0,96 \pm 0,17$, Uroi p10 $0,76, \pm 0,14$, Uroi p25 $0,82 \pm 0,14$, Uroi p50 $0,90 \pm 0,15$, Mroi m $1,00 \pm 0,15$, Mroi p10 $0,78 \pm 0,13$, Mroi p25 $0,86, \pm 0,14$ e Mroi p50 $0,98 \pm 0,15$.

Os valores de CDA obtidos através das medidas com ROIs únicos (Urois) foram menores do que aqueles obtidos com ROIs múltiplos (Mrois), considerando-se a média, o percentil 25 e o percentil 50 ($p < 0,01$). A maior diferença foi encontrada entre o p50 de Uroi e Mroi com valor de $0,08 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ e intervalo de confiança (IC) de 95% $[0,12 ; 0,05 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}]$ (Tabela 3). Não houve diferença estatística entre os valores de Uroi e Mroi para o percentil 10.

Tabela 3 . Diferença estimada dos valores de CDA entre Uroi e Mroi para os parâmetros m, p10, p25 e p50 .

	Diferença estimada CDA ($\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$)	IC (95%)	valor p
Uroi m – Mroi m	-0,071	[-0,120 ; -0,023]	<0,01
Uroi p10 - Mroi p10	-0,015	[-0,044 ; 0,014]	0,29
Uroi p25- Mroi p25	-0,045	[-0,074 ; -0,016]	<0,01
Uroi p50 - Mroi p50	-0,087	[-0,124;-0,050]	<0,01

4.3. Marcadores de células tronco tumorais e valores de CDA.

Não se encontrou correlação estatística significativa entre a porcentagem de células ESA+/CD44+/CD24-, células ESA+ com alta atividade ALDH, células ESA+/ABCG2 e os valores de CDA obtidos dos diferentes parâmetros das medidas Uroi e Mroi (m, p10, p25 e p50).

Para a correlação entre porcentagem de células com fenótipo ESA+/CD44+/CD24- (n=26) e os valores de CDA obtidos de Uroi e Mroi, os índices de Spearman foram menores que 0,21 ($p>0,3$). Em relação à porcentagem de células com alta atividade aldeído-desidrogenase (n=19) e os valores de CDA dos parâmetros estudados, os índices de Spearman variaram entre -0,29 e 0,12 ($p>0,2$). Da mesma forma, para a correlação entre a quantidade de células ESA ABCG2 (n=24) e os valores de CDA analisados, o índice de correlação foi de -0,02 até 0,32 ($p>0,1$).

A análise entre a formação de mamoesferas (n=18) e os valores de CDA apresentou o melhor resultado para o parâmetro Uroi média, com índice de correlação 0,46, porém com valor de $p=0,06$.

4.4. Fatores prognósticos do câncer de mama e valores de CDA.

Os valores de CDA obtidos da média, p10, p25 e p50 das medidas de Uroi e Mroi foram correlacionados com o estágio clínico ao diagnóstico, grau tumoral, presença de RE e RP, superexpressão de HER2 e a presença de acometimento linfonodal axilar após quimioterapia neoadjuvante.

Em relação ao grau tumoral, o grupo de tumores grau I (n=4) apresentou valores de CDA Uroi p10, Uroi p 25 e Uroi p 50 maiores que os encontrados no grupo dos tumores grau II (n=18) com $p<0,05$, conforme representado na tabela 4. Não se encontrou diferença estatística significativa para os valores de CDA entre os grupos de tumores grau II e grau III e o grau I e grau III.

Tabela 4. Diferença estimada dos valores de CDA dos tumores grau I e grau II para medida Uroi nos percentis 10, 25 e 50.

	Diferença estimada CDA GI-GII ($\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$)	IC (95%)	valor p
Uroi p10	0,18	[0,03 ; 0,33]	0,02
Uroi p25	0,19	[0,04; 0,34]	0,02
Uroi p50	0,17	[0,01; 0,33]	0,04

Considerando-se os diferentes grupos tumorais a partir da expressão de RH, os tumores com receptores de estrógeno positivos (n=17) e os tumores com receptores de progesterona positivos (n=16) apresentaram valores menores de CDA para as medidas Uroi e Mroi do que nos grupos tumorais receptores negativos ($p < 0,01$). A Tabela 5 resume os dados obtidos.

Para os tumores com superexpressão do HER2 (n=13) os valores de CDA para as medidas Uroi e Mroi também foram menores do que os encontrados no grupo tumoral sem expressão do HER2 ($p < 0,01$), conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 5 . Valores de CDA ($\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$) obtidos através da medida Uroi e Mroi para os tumores expressores e não expressores de receptores hormonais ($p < 0,01$).

	RE (n=17)	RE – (n= 10)	RP + (n=16)	RP – (n=11)
Uroip10	0,74 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,10	0,75 $\pm$ 0,16	0,78 $\pm$ 0,10
Mroip10	0,75 $\pm$ 0,15	0,82 $\pm$ 0,11	0,76 $\pm$ 0,15	0,80 $\pm$ 0,12
Uroip25	0,81 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,11	0,82 $\pm$ 0,16	0,83 $\pm$ 0,11
Mroip25	0,84 $\pm$ 0,15	0,91 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,15	0,89 $\pm$ 0,12
Uroip50	0,87 $\pm$ 0,15	0,93 $\pm$ 0,14	0,88 $\pm$ 0,16	0,92 $\pm$ 0,14
Mroip50	0,94 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,14	0,95 $\pm$ 0,15	1,03 $\pm$ 0,15
Uroim	0,90 $\pm$ 0,16	1,00 $\pm$ 0,18	0,91 $\pm$ 0,16	0,98 $\pm$ 0,18
Mroim	0,96 $\pm$ 0,14	1,08 $\pm$ 0,14	0,97 $\pm$ 0,14	1,06 $\pm$ 0,15

Tabela 6 . Valores de CDA ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) obtidos através da medida Uroi e Mroi para os tumores com e sem expressão de HER2 ($p < 0,01$).

	HER2 + (n=13)	HER2 – (n= 14)
Uroip10	0,75 $\pm$ 0,10	0,77 $\pm$ 0,18
Mroip10	0,77 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,16
Uroip25	0,81 $\pm$ 0,10	0,83 $\pm$ 0,17
Mroip25	0,86 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,16
Uroip50	0,89 $\pm$ 0,14	0,90 $\pm$ 0,16
Mroip50	0,98 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,15
Uroim	0,92 $\pm$ 0,17	0,97 $\pm$ 0,18
Mroim	1,00 $\pm$ 0,15	1,01 $\pm$ 0,15

Pacientes com estágio clínico III e IV (n=20) apresentaram valores de CDA tumorais significativamente menores que os valores de CDA dos tumores das pacientes com estágio II (n=7) para todos os parâmetros obtidos das medidas Uroi e Mroi ($p < 0,01$). Os tumores das pacientes que apresentaram comprometimento linfonodal axilar após a quimioterapia neoadjuvante (n=17) também apresentaram valores de CDA Uroi e Mroi significantemente menores do que o grupo de tumores das pacientes sem acometimento linfonodal axilar após a neoadjuvância ($p < 0,01$). Os valores médios de cada medida de CDA dos grupos tumorais descritos acima são detalhados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Valores de CDA ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) obtidos através da medida Mroi e Uroi para o parâmetro estágio clínico^a ao diagnóstico ($p < 0,01$).

	Estadio clínico II (n=7)	Estadio clínico III e IV (n= 20)
Uroip10	0,88 $\pm$ 0,16	0,72 $\pm$ 0,12
Mroip10	0,89 $\pm$ 0,14	0,74 $\pm$ 0,11
Uroip25	0,93 $\pm$ 0,16	0,78 $\pm$ 0,11
Mroip25	0,98 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,11
Uroip50	1,01 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,12
Mroip50	1,09 $\pm$ 0,15	0,94 $\pm$ 0,13
Uroim	1,02 $\pm$ 0,16	0,90 $\pm$ 0,16
Mroim	1,12 $\pm$ 0,16	0,97 $\pm$ 0,13

^a *Estadiamento TNM segundo Union International Cancer Control – 7^a. Edição 2011*

Tabela 8 . Valores de CDA ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) obtidos através da medida Mroi e Uroi para o parâmetro doença linfonodal axilar após quimioterapia neoadjuvante ($p < 0,01$).

	Doença linfonodal + (n=17)	Doença linfonodal - (n= 10)
Uroip10	0,74 $\pm$ 0,17	0,80 $\pm$ 0,07
Mroip10	0,74 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,10
Uroip25	0,80 $\pm$ 0,16	0,86 $\pm$ 0,09
Mroip25	0,83 $\pm$ 0,14	0,93 $\pm$ 0,10
Uroip50	0,87 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,13
Mroip50	0,94 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,13
Uroim	0,89 $\pm$ 0,16	1,01 $\pm$ 0,17
Mroim	0,97 $\pm$ 0,14	1,07 $\pm$ 0,14

4.5. Correlação entre os valores de CDA e resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante.

Das 27 pacientes estudadas, 29,6% (8/27) obtiveram resposta patológica completa após QTN e, em 70,4% (18/27) identificou-se lesão neoplásica invasiva residual, na avaliação histopatológica pós-cirúrgica. Não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de CDA Uroi e Mroi entre o grupo de tumores que responderam à quimioterapia neoadjuvante e o grupo de tumores sem resposta completa.

5. DISCUSSÃO

A heterogeneidade do câncer de mama e os diferentes desfechos clínicos da doença tornam desafiadora a busca por técnicas que permitam obter informações a respeito da composição biomolecular do tumor e inferir sobre seus principais fatores prognósticos, na tentativa de prever o comportamento biológico da doença. A ponderação em difusão na RM é conhecida como uma das técnicas funcionais que apresentam grande potencial para identificação e caracterização do câncer de mama, bem como avaliação de resposta e monitoramento do tratamento quimioterápico neoadjuvante (JENSEN et al., 2011; SHIN et al., 2012; PICKLES, et al., 2011; NILSEN et al., 2010; PREVOS et al., 2012; PARK et al.,

2012). A medida de difusibilidade das moléculas de água em uma lesão retrata indiretamente a celularidade e a microestrutura tumoral, podendo ser quantificada através dos valores de CDA (WOODHAMS et al., 2011).

As CTT vêm sendo relacionadas à pior prognóstico clínico, resistência à quimioterapia, recorrência local e sistêmica do câncer de mama (VELASCOS-VELAZQUEZ et al., 2012; AL-HAJJ et al., 2003; GINESTIER et al., 2007; CHARAFE-JAUFRET et al., 2009). Elas representam uma pequena subpopulação tumoral relacionada à capacidade de autorrenovação: podem realizar mitose de forma assimétrica originando outra célula tronco ou célula diferenciada, com diversos fenótipos. A eficiência para formação de mamoesferas (pequenas culturas celulares) é um método indireto de quantificar o potencial tumorigênico de um grupo celular, que já vem sendo aplicado em outros estudos (PONTI et al., 2005). No câncer de mama, a atividade da ALDH e a expressão de marcadores de membrana CD44+/CD24- e ABCG2 têm sido descritos como alternativas na identificação e seleção de populações celulares enriquecidas por CTT (GINESTIER et al., 2007; CHARAFE-JAUFRET et al., 2010; SICCHIERI, R. D. et al., 2015).

Os mecanismos e vias sinalizadoras que influenciam na manutenção, aumento ou redução dessa subpopulação dentro do tumor ainda permanecem controversos e incertos (VELASCOS-VELAZQUEZ et al., 2012; AL-HAJJ et al., 2003). Alguns estudos mostraram que a quimioterapia neoadjuvante pode induzir a um aumento da população de CTT e da capacidade de formação de mamoesferas (LI et al., 2008; CHARAFE-JAUFRET et al., 2009). Além disso, a presença de CTT pode ser influenciada por características e mudanças no microambiente tumoral (VELASCOS-VELAZQUEZ et al., 2012). Tiezzi et al. (2013) encontraram correlação entre o aumento de um marcador de hipóxia tumoral com a presença de CTT com alta atividade ALDH após tratamento quimioterápico, mostrando uma possível participação da hipóxia na proliferação ou manutenção da população de CTT. Até o presente momento, não encontramos na literatura estudos que avaliassem uma possível associação

entre as características de imagem ponderada em difusão na RM (que refletem indiretamente celularidade e integridade de membrana celular) com a presença de CTT.

Em nosso estudo, os diversos parâmetros obtidos das mensurações de CDA não foram capazes de prever a quantidade de CTT (fenótipos ESA+/CD44+/CD24-, ESA+ com alta atividade ALDH e ESA+/ABCG2+) estimada por citometria de fluxo. A formação de mamoesferas, avaliada em 18 tumores, também não apresentou correlação significativa com os valores de CDA (índice de Spearman de 0,46 e $p=0,06$). Uma limitação que deve ser considerada é nosso tamanho amostral ($n=27$) pode não ter sido capaz de demonstrar associação. Além disso, é possível que outras características tumorais (como o grau tumoral, presença de RH e HER2, estágio clínico) que apresentaram correlação com os valores de CDA mensurados possam interferir como fatores confusionais na correlação entre CTT e os valores de CDA.

Em relação aos principais marcadores prognósticos do câncer de mama, nós correlacionamos os valores de CDA com estágio clínico ao diagnóstico, presença de doença linfonodal axilar após o tratamento quimioterápico primário, grau tumoral, receptores hormonais e expressão HER2. Encontramos uma diferença significativa entre os valores de CDA para tumores estágio clínico III e IV em comparação com os tumores estágio clínico II para todos os parâmetros avaliados de Uroi e Mroi. Por exemplo, considerando apenas o parâmetro média para medida Uroi os tumores estágio III e IV apresentaram CDA de $0,90 \pm 0,16$ ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) e os tumores estágio II CDA de $1,02 \pm 0,16$ ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$). A maioria dos estudos da literatura utilizou apenas o tamanho tumoral para correlação com os valores de CDA e a maior parte destes trabalhos não encontrou correlação estatística entre esses dois parâmetros (MARTINCICH et al., 2012; KIM et al., 2009; JEH et al., 2011, BELLI et al., 2015). Porém, nosso resultado foi muito semelhante ao publicado por Razek et al (2009) que encontrou média de CDA de $0,95 \pm 0,25$ ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) para lesões entre 2-5cm e CDA de $1,01 \pm 0,15$ ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) para lesões maiores que 5cm.

Nós observamos valores de CDA menores entre os tumores das pacientes que apresentavam doença linfonodal axilar após QTN, $0,89 \pm 0,16$ ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) em relação aos tumores das pacientes com axila livre após a neoadjuvância, $1,01 \pm 0,17$ ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$). Essa associação também foi obtida pelo estudo de Belli et al. (2015), com resultados semelhantes, porém correlacionando os valores de CDA com o comprometimento axilar ao diagnóstico pré-tratamento.

Encontramos valores de CDA maiores para tumores grau 1 do que para os tumores grau 2, com uma diferença de até $0,19 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$. O grau tumoral 1 está associado a menor agressividade e maior diferenciação celular, com menor número de mitoses, pleomorfismo e relação núcleo citoplasmática, o que pode refletir em menor celularidade justificando menor restrição à difusão e maiores valores de CDA. No entanto, contraditoriamente, não obtivemos diferença estatística para os valores de CDA entre os tumores grau 1 e grau 3 ou entre grau 2 e grau 3. Em nossa amostra, 66,7% (18/27) dos tumores eram grau 2, com apenas 14,8% (4/27) de tumores grau 1 e 18,5% (5/27) grau 3, o pequeno valor amostral e pequena representatividade dos tumores grau 1 e 3 podem ter influenciado no resultado.

Cipolla et al. (2014) utilizando RM de 3.0 T observou diferença nos valores de CDA de tumores grau I e grau III, sem diferenças entre grau II e grau III ou grau I e grau II. Belli et al. (2015) e Razek et al. (2010) também encontraram valores de CDA maiores em tumores com grau nuclear menor. Porém Park et al. (2015), Kim et al. (2009) e Martincich et al. (2012) não obtiveram correlação estatística para os valores de CDA e grau tumoral. Todos esses estudos utilizaram séries de pacientes relativamente pequenas com até 110 lesões, exceto o estudo de Belli et al (2015) com 289 pacientes.

Em relação à presença de receptores hormonais, os tumores com expressão positiva para estrógeno e progesterona apresentaram valores de CDA menores do que os tumores sem expressão de receptores hormonais, para ambas as medidas, Uroi e Mroi, e para todos os parâmetros mensurados. Esse resultado é concordante com as publicações recentes (JEH et al., 2011; MARTINCICH et al., 2012 ; PARK et al., 2015). Porém, nosso resultado

diverziu da literatura em relação aos valores de CDA em tumores HER2+. Os valores de CDA para todas as medidas e parâmetros aferidos foram menores em tumores com expressão da proteína HER2 (Uroi m $0,92 \pm 0,17 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) *versus* tumores sem expressão HER2 (Uroi m $0,97 \pm 0,18 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$). Nos estudos publicados, foram encontrados valores de CDA maiores para tumores HER2+, o que foi atribuído a maior microvascularização dessas lesões (PARK et al., 2015; JEH et al., 2011; CHOI et al., 2012; KIM et al., 2009). A maior angiogênese dos tumores HER2+ poderia levar a um aumento dos valores de CDA pela contribuição da difusão das moléculas de água intracapilar (perfusão). Entretanto, a contribuição da perfusão é menor quanto maior é o valor de b empregado na ponderação em difusão (WOODHANS et al., 2011). Baron et al. (2010) concluíram que para o parênquima fibroglandular e o tecido adiposo mamário quando o fator b é maior do que 600 s/mm^2 a contribuição da perfusão para a Difusão é insignificante. Os trabalhos acima citados utilizaram valores de b de 1000 s/mm^2 para RM 1.5T e de 750 s/mm^2 para RM de 3.0T, e ainda considerando que neoplasias malignas tenham vascularização superior ao parênquima fibroglandular, o valores de b utilizados minimizam a participação da perfusão na avaliação da difusão. Choi et al. (2012) avaliaram a microvascularização tumoral em uma série de 335 neoplasias através da marcação de CD31 e avaliação histopatológica, e encontraram valores de CDA menores em tumores com maior microvascularização, usando RM 1.5T e $b=1000 \text{ mm/s}^2$. É importante considerar que apenas a maior vascularização tumoral dos tumores HER2 positivos possa não ser o único fator a contribuir para o valor final do CDA, devendo-se levar em conta que uma série de outras características biológicas tumorais como grau tumoral, subtipos moleculares, estágio clínico, podem em conjunto contribuir e influenciar nas características de imagem ponderada em difusão e nos valores de CDA.

Entre as 27 pacientes estudadas, 29,6% obtiveram resposta patológica completa, resultado dentro das estimativas da literatura (BERIWAL et al., 2006; FISHER et al., 1997, 1998; ABRIAL et al., 2005). Nós não encontramos diferença nos valores de CDA entre os grupos de tumores respondedores e não respondedores à quimioterapia primária. Os

trabalhos publicados que avaliaram a capacidade dos valores de CDA pré-tratamento em prever a resposta a QTN apresentam resultados bem divergentes entre si. Em acordo com o nosso estudo, Woodhams et al. (2010), Nilsen et al. (2010), Belli et al. (2011) e Fangberget et al. (2011) também não encontraram diferenças nos valores de CDA entre pacientes com ou sem resposta completa à quimioterapia primária. Contudo, um menor valor de CDA pré quimioterapia para o grupo de tumores respondedores foi demonstrado por Park et al. (2010), Xi-ru Li et al. (2011), Shin et al. (2012) e Iaconi et al. (2010).

Em parte, os resultados conflitantes podem ser atribuídos às diversas metodologias empregadas pelos trabalhos. A principal diferença está representada na definição de resposta a quimioterapia primária. A maioria dos estudos utilizou para caracterizar como critério de resposta a redução do maior diâmetro da lesão baseado no RECIST ou a redução maior que 65% do volume tumoral, utilizando as imagens de RM pós-contraste para mensuração. Apenas os estudos de Shin et al. (2012), Woodhams et al. (2010) e Fangberget et al. (2011) utilizaram como parâmetro de resposta a avaliação histopatológica da peça cirúrgica. Primeiramente, nós consideramos que a análise histológica é o parâmetro de excelência para quantificação de doença residual e que a resposta patológica completa com ausência de neoplasia invasiva deve ser o resultado final esperado para caracterizar o grupo respondedor, uma vez que é a ausência de doença invasiva residual o fator prognóstico relacionado a maior sobrevida livre de doença (CORTAZAR et al., 2014; FISHER et al., 1998,1997). Em segundo lugar, o uso da RM de mama para quantificação de doença residual sem correlação histopatológica pressupõe a aceitação de vários vieses que podem interferir na acurácia do exame. A acurácia das imagens pós contraste de RM para definir resposta completa ou mensurar neoplasia residual pode ser influenciada pelo subtipo histológico (menor no carcinoma lobular invasivo), pelo subtipo molecular (menor nos tumores luminais), pela presença de processo inflamatório granulomatoso e fibrose, ou ainda pela presença de carcinoma intraductal *in situ* levando a superestimação de doença invasiva (WOODHAMS et al., 2010; ROMINGER et al., 2015). Além disso, o efeito anti-angiogênico dos

quimioterápicos da classe dos taxanos reduz significativamente o realce após gadolínio e pode levar a subestimação de neoplasia residual. Schrading et al. (2015) encontraram em seu estudo uma redução da porcentagem de realce mamário após regime quimioterápico utilizando taxanos e uma taxa de falso negativo para doença residual de 66,7%. Outras diferenças que também podem influenciar diretamente os valores de CDA são os diferentes protocolos de ressonância magnética de cada instituição, aparelhos de RM com campos magnéticos de 1.5T e 3.0T, diferentes valores de b empregados e diferenças nas formas de posicionamento dos ROI para aquisição do CDA.

Em relação ao posicionamento do ROI no mapa de CDA para a quantificação da restrição a difusão, nós realizamos duas formas de medida para cada paciente, primeiro posicionando um ROI único (Uroi) na maior área de restrição do tumor e depois desenhando múltiplos ROI (Mroi) de forma a conter toda a lesão, excluindo áreas císticas ou necróticas. Os estudos até hoje conduzidos apresentam uma grande variabilidade no modo em como esses valores foram obtidos através do mapa de CDA, alguns utilizando ROI único em determinadas áreas do tumor como áreas de maior restrição ou amostras nas regiões de maior diâmetro tumoral (JENSEN et al., 2011; KIM et al., 2009; BELLI et al., 2011; PARK et al., 2012, NILSEN et al., 2010) e outros múltiplos ROI contemplando toda ou parcialmente a lesão (SHIN et al., 2012, IACCOMINI et al., 2010; PICKLES et al., 2006).

Nossos valores de Uroi foram menores do que os de Mroi para os parâmetros média, percentil 25 e percentil 50, sem diferença estatística para o percentil 10, e ambas as medidas, Uroi ou Mroi, foram capazes de mostrar correlação estatística com estágio clínico, grau nuclear, expressão de receptores hormonais e do HER2.

Belli et al (2011) utilizaram simultaneamente duas formas de medidas, com ROI único no maior diâmetro da lesão e ROIs múltiplos em 5 diferentes planos do tumor. Eles encontraram um melhor desempenho diagnóstico com o ROI único para correlacionar aumento do CDA em pacientes com resposta patológica após quimioterapia neoadjuvante. O uso na prática clínica de um único ROI representa maior agilidade e rapidez na avaliação de

imagem e torna-se mais promissor que a avaliação de toda lesão. Porém, mais estudos ainda são necessários para determinar o melhor método de mensuração do CDA no mapa e a melhor medida estatística representativa desses valores.

Poucos trabalhos têm usado outras medidas estatísticas além da média aritmética para os valores de CDA. Jeh et al utilizaram CDA médio e mínimo em seu trabalho, e concluíram que o valor CDA médio foi menor em tumores RH+ e HER2-, porém o parâmetro CDA mínimo não apresentou correlação estatística. Nós utilizamos a média e os percentis 10, 25 e 50 para ambas medidas Uroi e Mroi, e encontramos que todos os parâmetros foram capazes de se correlacionar com os fatores prognósticos avaliados neste estudo.

Nosso estudo possui algumas limitações. Apenas 27 tumores foram avaliados e nem todos apresentam quantificação de todos os marcadores utilizados para identificar as CTT, com avaliação da formação de mamoesferas em apenas 18 deles. Além disso, sabemos que as amostras teciduais percutâneas podem apresentar viés devido a heterogeneidade do câncer de mama. Ainda, nós não avaliamos as características de imagem após QTN e não foi quantificada a presença das CTT na peça cirúrgica, o que poderia trazer informação adicional sobre os tumores menos sensíveis a QTN. Adicionalmente, o estudo teve apenas um observador analisando as imagens de difusão, o que limita a avaliação da reprodutibilidade da mensuração dos valores de CDA nas lesões. Porém, como essa técnica de medida já foi utilizada em vários outros estudos (BELLI et al., 2011; IACCOMINI et al., 2010; JENSEN et al., 2011; KIM et al., 2009; NILSEN et al., 2010; PARK et al., 2012; PICKLES et al., 2006; SHIN et al., 2012), assumimos que a reprodução dos dados seja factível. Entretanto, nosso estudo foi o primeiro a correlacionar alguns fenótipos de CTT às características de imagem de RM ponderada em Difusão, adicionalmente, utilizando diferentes mensurações de CDA, contribuindo com a literatura vigente para o entendimento sobre a correlação entre valores de CDA e os principais fatores prognósticos do câncer de mama.

6. CONCLUSÃO

No nosso estudo os valores de CDA pré-tratamento dos tumores invasivos de mama não foram capazes de prever a presença de células tronco tumorais ou a capacidade de formação de mamoesferas.

Os valores de CDA se correlacionaram com o estágio clínico da doença, doença linfonodal axilar após QTN, grau tumoral e expressão das proteínas RE, RP e HER2, funcionando como um promissor marcador de agressividade tumoral.

Não houve correlação entre os valores de CDA tumoral pré-quimioterapia primária e a resposta patológica completa.

Novos estudos controlados complementares com amostras maiores devem ser realizados para consolidação dos nossos resultados.

REFERÊNCIAS*

- ABRIAL, S. et al. **High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer.** Breast Cancer Res Treat . (2005) 94(3): 255-263.
- AL-HAJJ, M. et al. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** Proc Natl Acad Sci U S A (2003). 100 (7): 3983-3988.
- ALLRED, D. C. et al. **Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.** Mod Pathol. (1998) 11(2): 155-168.
- ANDRE, F. et al. **HER2 expression and efficacy of preoperative paclitaxel/FAC chemotherapy in breast cancer.** Breast Cancer Res Treat. (2008). 108(2): 183-190.
- BAMMER, R. **Basic principles of diffusion-weighted imaging.** European Journal of Radiology(2003) 45:169/184.
- BARON, P. et al. **Diffusion-weighted imaging of normal fibroglandular breast tissue: influence of microperfusion and fat suppression technique on the apparent diffusion coefficient.** NMR in Biomedicine. (2010) 23(4):399-405.
- BELLI, P. et al. **Diffusion magnetic resonance imaging in breast cancer characterisation: correlations between the apparent diffusion coefficient and major prognostic factors.** La radiologia medica. (2015) 120:268-276.
- BELLI, P. et al. **Diffusion-weighted imaging in evaluating the response to neoadjuvant breast cancer treatment.** The breast journal. (2011) 17 (6): 610-619.
- BENDERRA, Z. et al. **Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias.** Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. (2004) 10 (23):7896-902.
- BERIWAL, S. et al. **Breast-conserving therapy after neoadjuvant chemotherapy: long-term results.** Breast J (2006) 12(2): 159-164.
- CALZA, S., et al. **Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients.** Breast Cancer Res (2006). 8(4): R34.
- CHARAFE-JAUFFRET, E. et al. **Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer.** Clin Cancer Res (2010) 16(1): 45-55.
- CHARAFE-JAUFFRET, E. et al. **Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature.** Cancer Res (2009) 69(4): 1302-1313.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração.

- CHOI, S. et al. **Correlation of the apparent diffusion coefficient values on diffusion-weighted imaging with prognostic factors for breast cancer.** British Journal of Radiology. (2012) 85: 474-479.
- CORTAZAR, P. et al. **Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis.** Lancet (2014) 384(9938):164-72.
- DIESTRA, J. E. et al. **Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material.** The Journal of pathology. (2002). 198 (2): 213-9.
- DOYLE, L. A. et al. **A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (1998) 95 (26):15665-70.
- FANGBERGET, A. et al. **Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer-response evaluation and prediction of response to treatment using dynamic contrast-enhanced and diffusion-weighted MR imaging.** Eur Radiol (2011) 21:1188–1199.
- FERNÁNDEZ-MORALEZ, LA et al. **Analysis of the pathologic response to primary chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer grouped according to estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status.** Clin Breast Cancer. (2007) 7(7):559-64.
- FISHER, B., et al. **Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18.** J Clin Oncol (1997) 15(7): 2483-2493.
- FISHER, B., et al. **Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer.** J Clin Oncol. (1998) 16 (8): 2672-2685.
- FISHER, E.R. et al. **Pathobiology of Preoperative Chemotherapy.** Findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) Protocol B-18. Cancer (2002) 4 (95): 681-695.
- GINESTIER, C. et al. **ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.** Cell Stem Cell (2007) (5): 555-567.
- HOUSSAMI, N et al. **Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy.** European Journal Cancer. (2012) 18 (48): 3342-3354.
- IACCONI, C. et al. **The role of mean diffusivity (MD) as a predictive index of the response to chemotherapy in locally advanced breast cancer: A preliminary study.** Eur Radiol (2010) 20: 303–308.
- JEH, S. et al. **Correlation of the apparent diffusion coefficient value and dynamic magnetic resonance imaging findings with prognostic factors in invasive ductal carcinoma.** Journal of magnetic resonance imaging. (2011) 33:102-109.

- JENSEN, L.R. et al. **Diffusion-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI in evaluation of early treatment effects during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients.** Journal of Magnetic Resonance Imaging. (2011) 34:1099–1109.
- KIM, S.H. et al. **Diffusion-Weighted Imaging of Breast Cancer:** Correlation of the Apparent Diffusion Coefficient Value with Prognostic Factors. J. Magn. Reson. Imaging. (2009) 30:615–620.
- KOH, D.M. ; COLLINS, D.J. **Diffusion-weighted MRI in the body:** applications and challenges in oncology. AJR Am J Roentgenol (2007)188(6):1622–1635.
- KUHL, C. **Current Status of Breast MR Imaging Part 2.** Clinical Applications. Radiology. (2007) 244(3): 672-691.
- LAM, S.W. et al. **Breast cancer classification by proteomic technologies:** current state of knowlegde. Cancer Treat Rev (2014) Feb; 40 (1):129-38.
- LI, X. et al.. **Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy.** J Natl Cancer Inst. (2008) 100 (9): 672-679.
- LI, Xiu-ru et al . **DW-MRI ADC values can predict treatment response in patients with locally advanced breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy.** Med Oncol (2012) 29:425–431.
- MANDARANO, L. **Avaliação da porcentagem de células com alta atividade de aldeído-desidrogenase no tumor primário não prediz a resposta a quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama.** 2013. Dissertação (Mestardo em Tocoginecologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.
- MANTON, D. et al. **Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer:** early response prediction with quantitative MR imaging and spectroscopy. British Journal of Cancer (2006) 94, 427 – 435.
- MARTINCICH, V. et al. **Correlations between diffusion-weighted imaging and breast cancer biomarkers.** Eur Radiol (2012) 22:1519–1528.
- NILSEN, L. et al. **Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for pretreatment prediction and monitoring of treatment response of patients with locally advanced breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy.** Acta Oncologica (2010) 49: 354–360.
- NOWELL, P. C.. **The clonal evolution of tumor cell populations.** Science (1976) 194 (4260): 23-28.
- PARK, S. et al. **Comparison of diffusion-weighted MR imaging and FDG PET/CT to predict pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer.** European Radiology. (2012) 22: 18-15.
- PARK, S. et al. **Correlations between apparent diffusion coefficient values of invasive ductal carcinoma and pathologic factors on diffusion-weighted MRI at 3.0 tesla.** J Magn Reson Imaging. (2015) 41(1):175-82.

- PEROU, CM. et al. **Molecular Portraits of human breast tumour.** Nature. 2000; 406 (6797):747-52
- PICKLES, M.D. et al. **Diffusion changes precede size reduction in neoadjuvant treatment of breast cancer.** Magnetic Resonance Imaging (2006) 24; 843–847.
- PONTI, D., et al. **Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer stem cells with stem/progenitor cell properties.** Cancer Res. (2005) 1;65(13):5506-11
- PREVOS, R. et al. **Pre-treatment differences and early response monitoring of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients using magnetic resonance imaging: A systematic review.** European Radiology (2012) 22 : 2607-2616.
- RAZZAK, A. R. et al. **Heterogeneity of breast cancer and implications of adjuvant chemotherapy.** Breast Cancer (2008) 15 (1): 31-34.
- RAZEK, A. et al. **Invasive ductal carcinoma:** Correlation of apparent diffusion coefficient value with pathological prognostic factors. NMR in Biomedicine. (2010) 23: 619-623.
- REYA, T. et al.. **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** Nature (2001). 414(6859): 105-111.
- ROMINGER, M. et al.. **Which factors influence MRI-pathology concordance of tumour size measurements in breast cancer?** European Society of Radiology (2015)
- SICCHIERI, R. **Marcadores de células tronco tumorais no câncer de mama localmente avançado.** 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia da Reprodução) - Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.
- SICCHIERI, R. D. et al. **ABCG2 is a potential marker of tumor-initiating cells in breast cancer.** Tumour Biol. (2015). 36(12):9233-43.
- SCHINKEL, A. H. et al. **Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview.** Advanced drug delivery reviews. (2003) 55 (1): 3-29.
- SCHARADING, S. et al.. **Breast Cancer: Influence of Taxanes on Response Assessment with Dynamic Contrast-enhanced MR Imaging.** Radiology (2015) 277(3):687-96.
- SHARMA, U. et al. **Longitudinal study of the assessment by MRI and diffusion-weighted imaging of tumor response in patients with locally advanced breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy.** NMR Biomed. (2009) 22: 104–113.
- SHIN, H.J. et al. **Prediction of pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer using diffusion-weighted imaging and MRS.** NMR Biomed. (2012) 25: 1349–1359.
- SORLIE, T. et al. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** Proc Natl Acad Sci U S A .(2001) 98(19): 10869-10874.

- SORLIE, T. et al. **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** Proc Natl Acad Sci U S A (2003) 100(14): 8418-8423.
- SORLIE, T. et al. **Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer:** gene expression analyses across three different platforms. BMC Genomics (2006) 7: 127.
- TIEZZI, D. G., et al. **Expression of aldehyde dehydrogenase after neoadjuvant chemotherapy is associated with expression of hypoxia-inducible factors 1 and 2 alpha and predicts prognosis in locally advanced breast cancer.** Clinics, Sao Paulo (2013). 68(5): 592-598.
- TOZAKI, M. et al. **Preliminary study of early response to neoadjuvant chemotherapy after the first cycle in breast cancer:** Comparison of 1H magnetic resonance spectroscopy with diffusion magnetic resonance imaging. Jpn J Radiol (2010) 28:101–109.
- VELASCO-VELAZQUEZ, M. A. et al. **Breast cancer stem cells.** Int J Biochem Cell Biol (2012) 44(4): 573-577.
- VON MINCKWITZ, G. et al. **Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes:** pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. Breast Cancer Res Treat (2011) 125(1): 145-156.
- WOODHAMS, R. et al. **Identification of residual breast carcinoma following neoadjuvant chemotherapy: diffusion-weighted imaging--comparison with contrast-enhanced MR imaging and pathologic findings.** Radiology .(2010) 254(2):357-66.
- WOODHAMS, R. et al. **Diffusion-weighted Imaging of the Breast: Principles and Clinical Applications.** RadioGraphics. (2011) 31:1059–1084.
- XIANG, L. et al. **ABCG2 is associated with HER-2 expression, lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma.** Diagnostic pathology (2001). 6: 90.