Luis Antonio Pires

Efeitos da quimioterapia neoadjuvante sobre os receptores de lipoproteínas no tecido tumoral em pacientes com carcinoma da mama localmente avançado

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Hegg

Co-orientador: Prof. Dr. Raul C. Maranhão

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pires, Luis Antonio

Efeitos da quimioterapia neoadjuvante sobre os receptores de lipoproteínas no tecido tumoral em pacientes com carcinoma da mama localmente avançado / Luis Antonio Pires. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Roberto Hegg.

Co-orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Receptores de LDL 3.Receptores de lipoproteínas 4.Proteínas relacionadas a receptor de LDL 5.Terapia neoadjuvante

USP/FM/DBD-231/10

DEDICATÓRIA

Dedico a ...

À Deus, por ter permitido que alcançasse e concluísse mais esta etapa da minha vida.

Ao meu pai Manuel (*in memorian*), que sempre foi um exemplo de determinação, coragem e responsabilidade, cujo comprometimento e apoio constantes foram responsáveis pela minha formação e evolução.

Ao meu sogro Luiz (*in memorian*), exemplo de caráter e dedicação, que me ensinou a persistir e vencer obstáculos.

À minha mãe Laura, pela educação, amor e dedicação.

Aos meus irmãos, Marcelo e Christiane pelo apoio, carinho e conselhos.

À minha sogra Ana Maria, que tenho como segunda mãe, sempre disposta a ajudar no que for preciso.

À minha esposa Ana Luiza, fiel e companheira, que me incentivou e ajudou em todos os momentos, partilhando tristezas e alegrias em todo o tempo e sobretudo, pelo amor que norteia meus passos, ao qual procuro ser merecedor,

De modo especial, às nossas filhas Luana e Manuella, que todos os dias iluminam a minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Roberto Hegg, orientador desta tese, pela amizade, incentivo, confiança, dedicação e apoio recebido durante todas as fases deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, co-orientador desta tese, pela dedicação e pelo constante estímulo recebido durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, pelo apoio e auxílio recebido durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilson Luchesi Delgado, meu mestre e amigo, que sempre se mostrou disponível quando na necessidade de qualquer ajuda.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrin, diretor do Centro de Referência da Saúde da Mulher, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação, em especial a Claudia, pela sua dedicação e presteza.

À enfermeira Silvia Mancini, pelo apoio, ajuda e palavras de incentivo sempre oferecidas.

Às amigas Elaine e Fátima, pelo trabalho, dedicação, profissionalismo, sem a ajuda das quais este trabalho não teria se concretizado.

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR, pelo apoio e incentivo.

Aos docentes da clínica de Ginecologia da Faculdade de Medicina da USP, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao serviço de Patologia do Centro de Referência da Saúde da Mulher, pela colaboração no estudo.

À todos os demais colaboradores do Centro de Referência da Saúde da Mulher pela ajuda oferecida.

Às mulheres participantes desta pesquisa, por terem contribuído de forma tão carinhosa, sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	OBJETIVOS.....	19
III.	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
	1. Casuística.....	20
	1.1. Critérios de Inclusão.....	21
	1.2. Critérios de Exclusão.....	22
	2. Características das pacientes.....	23
	2.1. Métodos.....	24
	2.1.1. Determinações bioquímicas séricas.....	24
	2.1.2. Obtenção dos fragmentos de mama antes da quimioterapia.....	25
	2.1.3. Preparo para análise imunoistoquímica.....	26
	2.1.4. Análise imunoistoquímica.....	27
IV.	RESULTADOS.....	28
	1. Avaliação das características das pacientes.....	28
	2. Esquemas quimioterápicos.....	29
	3. Avaliação de resposta ao tratamento.....	31
	4. Perfil lipídico das pacientes.....	32
	5. Avaliação da expressão protéica de LDL-R.....	33
	6. Avaliação da expressão protéica de LRP-1.....	38
V.	DISCUSSÃO.....	42
VI.	CONCLUSÕES.....	53
VII.	ANEXOS.....	54
VIII.	REFERÊNCIAS.....	59

Lista de Siglas

LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-R	receptor de lipoproteína de baixa densidade
HDL	lipoproteína de alta densidade
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
ApoB100	apolipoproteína B100
ApoE	apolipoproteína E
LRP	receptor de lipoproteína relacionada ao receptor de LDL
LMA	leucemia mielóide aguda
HIV	vírus da imunodeficiência humana
DAB	3,3'-diaminobenzina
RE	receptor de estrógeno
RP	receptor de progesterona
Cerb-B2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
EC	estadiamento clínico
EP	estadiamento patológico
BRCA1	<i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BRCA2	<i>breast cancer type 2 susceptibility protein</i>
RP	resposta parcial
RC	resposta completa
LSN	limite superior da normalidade

Lista de tabelas

Tabela 1	Idade, exame anatomopatológico e estadiamento clínico das pacientes.....	23
Tabela 2	Perfil dos receptores hormonais e Cerb-B2.....	29
Tabela 3	Esquemas quimioterápicos e número de ciclos utilizados.....	30
Tabela 4	Resposta à quimioterapia neoadjuvante.....	32
Tabela 5	Expressão protéica de LDL-R em tecido normal e em tecido neoplásico antes e após quimioterapia.....	35
Tabela 6	Expressão protéica de LRP-1 em tecido normal e em tecido neoplásico antes e após quimioterapia.....	39

Lista de Figuras

Figura 1	Imunoistoquímica para LDL-R nos tecidos normais e tumorais antes e depois quimioterapia das 12 pacientes.....	36
Figura 2	Imunoistoquímica para LRP-1 nos tecidos normais e tumorais antes e depois quimioterapia das 12 pacientes.....	40

Resumo

PIRES, L. A. **Efeitos da quimioterapia neoadjuvante sobre os receptores de lipoproteínas no tecido tumoral em pacientes com carcinoma da mama localmente avançado.** (Tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010, 74p.

Os tumores malignos apresentam um aumento da expressão dos receptores de lipoproteínas, devido ao aceleração da proliferação celular com consequente aumento da necessidade de lípidos para a síntese das membranas celulares. Esse aumento da expressão dos receptores de LDL no câncer pode ser utilizado para concentrar fármacos de ação antineoplásica em tecido tumoral, utilizando lipoproteínas ou nanoemulsões semelhantes a lipoproteínas como veículo. No presente estudo, foram investigados os efeitos da quimioterapia convencional na expressão dos receptores de LDL e LRP-1 em 16 pacientes com carcinoma de mama estádios II ou III, não candidatas à cirurgia conservadora e com indicação de tratamento quimioterápico neoadjuvante. A expressão dos receptores LDLR e LRP-1 foi avaliada por imunoistoquímica em tecido mamário normal e em tecido neoplásico antes e depois da quimioterapia neoadjuvante. Quatro pacientes que apresentaram resposta completa à quimioterapia foram retiradas da análise da expressão de receptores por não existir tumor no fragmento cirúrgico. Em relação ao LDLR, a expressão desse receptor no tecido neoplásico foi maior em comparação ao tecido normal em 8 das 11 pacientes. Após a quimioterapia, a expressão do receptor de LDL diminuiu em 6, aumentou em 4 e não se alterou em 2 pacientes. Do mesmo modo, a expressão do receptor LRP-1 no tecido tumoral estava aumentada em relação ao tecido normal em 4 pacientes das 12 avaliadas. Em comparação com o tecido tumoral antes da quimioterapia, a expressão do receptor LRP-1 diminuiu em 6, aumentou em 4 e permaneceu inalterada em 2 pacientes após a quimioterapia. Esses dados mostram que o efeito da quimioterapia na expressão dos receptores de lipoproteínas foi heterogêneo. A redução da expressão dos receptores não foi o padrão observado, o que indica que o uso de sistemas de carreamento de fármacos via receptores de LDL para o tratamento do câncer pode ser de grande importância. Esses resultados podem contribuir para o desenho de futuros estudos clínicos.

Palavras Chave: Neoplasias da mama, Receptores de LDL, Receptores de lipoproteínas, Proteínas relacionadas a receptor de LDL, Terapia neoadjuvante

Summary

PIRES, LA. **Effects of neoadjuvant chemotherapy on lipoprotein receptors in tumor tissues of patients with locally advanced breast cancer.** [Thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil), 2010, 74p.

Proliferative tumor cells present a high expression of LDL receptors due to accelerated mitosis rates which takes to increased need of lipids internalization for building new membranes. Upregulation of LDL receptors may be used as a gate to deliver anticancer drugs to tumor tissues using lipoproteins or artificial nanoemulsions as vehicle. This study investigated the effects of conventional chemotherapy on the expression of LDL and LRP-1 receptors in 16 patients with breast cancer in stage II or III who were not candidates to conservative surgery and with indication of neo-adjuvant chemotherapy. Expression of LDL and LRP-1 receptor was evaluated by immunohistochemistry in normal and neoplastic breast tissue before and after chemotherapy. For absence of tumor in the surgical fragments, 4 patients who presented complete response to chemotherapy were excluded from this analysis. In relation of LDLR, the expression in neoplastic tissue was higher than in normal tissue in 8 of 11 patients. After chemotherapy, LDL receptor expression diminished in 6, increased in 4 and unchanged in 2 patients. Expression of LRP-1 in tumor tissue was higher in 4 of 12 patients when compared to normal tissue. After chemotherapy, the expression of LRP-1 diminished in 6, increased in 4 and showed no difference in 2 patients. These data show that the chemotherapy effects on the tumor expression of LDL receptors were very heterogeneous. The diminution of the receptor expression is not the post-chemotherapy pattern, allowing the use of drug carrier systems that target cancer cells via the LDL receptor pathway. These results may contribute for the design of future clinical assays.

Keywords: Breast cancer, LDL receptors, Lipoprotein receptors, Low-density lipoprotein receptor, Low-density lipoprotein receptor-related protein, Neoadjuvant treatment

I. INTRODUÇÃO

A incidência de câncer de mama nos países ocidentais vem decaindo de 2001 a 2004, após mais de duas décadas de aumento. É o câncer mais comum nas mulheres. A taxa de mortalidade manteve-se estável entre 1930 e 1990, mas de 1990 a 2004 ela vem diminuindo. Mesmo assim, ainda é responsável por 15% de todas as mortes por câncer (American Cancer Society, 2008).

No Brasil, o câncer de mama é o mais freqüente entre as mulheres, sendo esperados 49.240 novos casos para o ano de 2010, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde, 2010).

Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e reposição hormonal) estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama (Ministério da Saúde, 2010).

Fatores genéticos também estão associados ao maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. Mulheres que apresentam mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade.

A prevenção primária dessa neoplasia ainda não é totalmente

possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. No Brasil, o rastreamento mamográfico para mulheres entre 50 e 69 anos é a estratégia recomendada. As recomendações do Ministério da Saúde são baseadas no Documento de Consenso para Controle do Câncer de Mama, de 2004, que considera como principais estratégias de rastreamento um exame mamográfico, pelo menos a cada 2 anos, para mulheres de 50 a 69 anos, e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado (história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau), recomendam-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos (Ministério da Saúde, 2010).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico quando diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. (Ministério da Saúde, 2010). Em muitos países ocidentais, tem-se verificado uma redução da taxa de mortalidade, o que ocorre principalmente devido ao surgimento de novas técnicas diagnósticas e desenvolvimento de melhores regimes terapêuticos (Kaplan e Wingard, 2000; Sant et al., 2001).

O diagnóstico precoce e o uso da quimioterapia neoadjuvante em tumores mais avançados têm proporcionado um maior número de cirurgias conservadoras da mama (Teixeira e Pinotti, 2000). Além disso, o surgimento de novas modalidades terapêuticas, como novos medicamentos e novas técnicas de radioterapia, tem levado a uma melhoria na qualidade de vida das mulheres portadoras de câncer de mama.

1. Quimioterapia Neoadjuvante em Câncer da Mama

A quimioterapia neoadjuvante (tratamento primário) consiste na aplicação de procedimentos sistêmicos (quimioterapia) em pacientes portadoras de carcinoma localmente avançado da mama (Buzdar, 2007; Mathew et al., 2009).

Essa estratégia de tratamento tem como objetivos: i) obter respostas completas histopatológicas, já que o prognóstico de sobrevida é dependente dessa remissão; ii) obter remissões clínicas, mesmo que parciais, permitindo técnicas de cirurgias conservadoras; e iii) avaliar a quimiossensibilidade da neoplasia (Buzdar, 2007; Mathew et al., 2009).

Com o uso de esquemas combinados de quimioterapia, os resultados para respostas clínicas permanecem próximos a 70%, com índices de conservação da mama em torno de 70% e com respostas patológicas completas ao redor de 15% (Bonadonna et al., 1998; Costa et al., 1999; Von Minckwitz et al., 2003; Buzdar, 2007; Rastogi et al., 2008; Mathew et al., 2009).

Entretanto, os efeitos tóxicos da quimioterapia são bem conhecidos, representando um fator limitante ao seu uso e muitas vezes comprometendo a função de diversos órgãos (Teixeira e Pinotti, 2000). Dessa forma, a procura de veículos que direcionem as drogas antineoplásicas ao tumor, evitando o aporte delas aos tecidos normais, tem sido uma das grandes metas nas últimas décadas.

É importante analisar e identificar diferenças qualitativas e quantitativas nos processos metabólicos, entre outras características, das células tumorais em comparação às células normais. Estas diferenças podem ser aproveitadas para aumentar a eficiência na destruição das células tumorais, preservando assim as células normais. Entre as estratégias que têm sido testadas, encontra-se o uso de lipoproteínas como transportadoras plasmáticas de quimioterápicos (Filipowska., et al., 1992; Versluis et al., 1996). As lipoproteínas constituem complexos formados por proteínas e lípidos e são responsáveis pelo transporte de lípidos insolúveis na circulação

sangüínea.

2. Lipoproteínas e Lipoproteínas de Baixa Densidade

A estrutura básica das lipoproteínas é composta por um centro lipídico apolar de triglicérides e éster de colesterol, revestido por fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas (Jackson et al., 1976).

As lipoproteínas, de acordo com as suas características físicas e composição química são classificadas em quatro grandes grupos: i) quilomícrons; as maiores partículas lipoprotéicas e as menos densas, devido à alta proporção de lípidos (até 99%); ii) lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), com maior proporção de proteína; iii) lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ricas em ésteres de colesterol, e iv) lipoproteínas de alta densidade (HDL) que são as menores e mais densas lipoproteínas (Goodman e Gilman, 2003).

A LDL é uma lipoproteína formada por um núcleo apolar de ésteres de colesterol, que constitui aproximadamente 45-50% do peso lipídico, e um resíduo de 3-9% de triglicérides, estabilizado por uma monocamada de fosfolípidos (16-25%) que também contém colesterol livre (5-8%). É o produto final de degradação da VLDL e

tem meia vida de 2 a 3 dias, sendo carreadora de 2/3 do colesterol plasmático total em indivíduos normais. Tem como principal função fisiológica o transporte do colesterol necessário para a síntese de membranas de células em divisão e para a produção de hormônios esteróides no córtex da supra-renal e nas gônadas (Goodman e Gilman, 2003).

3. Receptor de LDL

A depuração plasmática de partículas de LDL é mediada essencialmente pelos receptores de LDL (LDL-R). O LDL-R é um receptor de superfície celular que remove as partículas de LDL da circulação por meio do processo de endocitose. Esse receptor é expresso principalmente nas membranas dos hepatócitos e também nas membranas de outras células, como as esteroidogênicas. (Chacra et al., 2004)

O receptor de LDL é uma glicoproteína de membrana, descoberta em 1976 por Brown e Goldstein, composta por duas cadeias de oligossacarídeos complexos ligados à aspargina (ligações N) e 18 cadeias de oligossacarídeos ligados à serina/treonina (ligações O).

O gene para o receptor localiza-se no braço menor do cromossoma 19, consiste em 18 éxons e 17 íntrons e codifica os 839 aminoácidos do receptor.

O LDL-R é sintetizado no retículo endoplasmático rugoso e passa para o complexo de Golgi, onde aumenta de peso molecular. Após aproximadamente 45 minutos do início do processo de síntese, o mesmo já se encontra expresso na superfície da célula. (Chacra et al., 2004)

Esse receptor liga-se a duas apolipoproteínas: à apoB-100, que é a apolipoproteína presente nas partículas de LDL, e à apo E, presente nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e nos quilomícrons.

Esses receptores encontram-se em regiões específicas, depressões da membrana celular denominados *coated pits*, revestidas por proteínas chamadas de clatrin. Após a interação das lipoproteínas com os receptores, essa região sofre invaginação, formando as vesículas endocíticas. O envoltório de clatrina, então, dissocia-se e ocorre fusão de várias vesículas formando os endossomos. A diminuição do pH nos endossomos promove o desligamento do complexo receptor-LDL com o retorno do receptor à superfície celular. Em seguida, ocorre a fusão de lisossomos com a vesícula e a degradação dos seus componentes (Goldstein et al.,

1979).

4. LRP

O receptor LRP (proteína relacionada ao receptor de LDL) é um dos membros da família dos receptores LDL. Estão também incluídos nesta classificação os receptores de VLDL, e a glicoproteína 330 (Strickland et al., 1995).

O LRP-1 é uma proteína de superfície celular com 4.544 aminoácidos e peso molecular de 503 kDa, o que a caracteriza como uma das maiores estruturas protéicas entre os receptores de superfície celular já conhecidos. A designação LRP-1 deve-se à homologia estrutural, da sequência de domínios rica em cisteína, com a molécula do receptor de LDL (Herz et al., 1988).

Este receptor é expresso principalmente no fígado, mas também foi detectado em outros tecidos humanos, como em células musculares lisas, fibroblastos, neurônios e astrócitos, epitélio do trato gastrointestinal, células gonadais, placentárias e até mesmo na medula óssea (Moestrup et al., 1992).

O LRP-1 é um receptor endocítico do mais amplo espectro conhecido, uma vez que medeia o catabolismo de múltiplos ligantes, como lipoproteínas, proteinases, além de toxinas bacterianas e, alguns tipos de vírus (Strickland et al., 1995).

O gene codificador desse receptor localiza-se no locus 12q13-q14, compreende aproximadamente 92Kb de DNA genômico e é formado por 89 éxons com tamanho variando entre 65 a 925 pares de bases (pb) . Os íntrons apresentam entre 82 pb a 8Kb (Van Leuven et al., 1994).

Inúmeros polimorfismos foram descritos neste gene (Van Leuven et al., 1998; Van Leuven et al., 2001), mostrando relação com certas doenças. É o caso do polimorfismo C766T, no éxon 3, associado ao câncer de mama entre mulheres caucasianas (Benes et al., 2003), e também com a doença de Alzheimer (Hollenbach et al., 1998).

O receptor LRP-1 assume funções importantes na biologia vascular, removendo da circulação os ativadores do plasminogênio e, deste modo regula a atividade fibrinolítica do organismo (Strickland et al., 1995). Associado a isso, o LRP-1 cataboliza a trombospondina, molécula envolvida na agregação plaquetária, crescimento de tecido muscular liso e angiogênese (Mikhailenko et al., 1995).

5. LDL e Câncer

Nos tumores malignos, onde há proliferação celular acelerada, a necessidade aumentada de colesterol e de outros lípides para a síntese de membranas celulares pode resultar em expressão aumentada de LDL-R. Isso permite maior captação de LDL pelas células neoplásicas, fornecendo os lípides necessários à duplicação celular. O incremento do número de receptores é um fenômeno intenso, podendo superar várias vezes o número de receptores das células normais, o que seria responsável pelas baixas concentrações de colesterol encontradas em várias doenças neoplásicas. Em 1978, Ho et al. observaram aumento da atividade do LDL-R nas células leucêmicas do sangue periférico de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA), em relação às células mononucleares de indivíduos sadios, de 3 a 100 vezes maior.

Gal et al. (1981a) mostraram que células da linhagem neoplásica (carcinomas de vagina e cervical e adenocarcinoma de endométrio) expressavam cerca de 15 a 30 vezes mais LDL-R do que as células da linhagem normal (células fibroblásticas cervicais e células epiteliais da glândula endometrial).

Em 1992, foi comparada a captação de LDL entre células de

tumores pulmonares e de tecido pulmonar normal adjacente, com LDL marcada radioativamente, onde verificou-se uma elevação da captação pelo tecido tumoral em até três vezes, comparativamente ao pulmão normal (Vitols et al., 1992).

O aumento de expressão de LDL-R poderia ser explicado pelo fato de que as células neoplásicas, por apresentarem rápida proliferação, exigiriam demanda maior de colesterol e de fosfolípidos para a síntese de novas membranas celulares. Em tese, essa necessidade seria suprida por síntese endógena ou pela degradação de lipoproteínas de baixa densidade do plasma, o que explicaria o aumento de LDL-R e a hipocolesterolemia encontrada em algumas neoplasias (Henrikson et al., 1989; Budd e Ginsberg, 1986).

Vários estudos revelaram haver alterações no metabolismo lipídico de pacientes com câncer. Alguns mostraram relação entre a diminuição nos níveis de colesterol plasmático e a evolução da doença (Pekkanen et al., 1999; Iribarren et al., 1995). Outros estudos compararam a hipocolesterolemia observada em pacientes com câncer com indivíduos normais (Barclay et al., 1995; Bases e Krakoff, 1965; Nydegger e Butter, 1972). Ainda, demonstrou-se normalização dos níveis plasmáticos de colesterol em pacientes com câncer após tratamento e remissão da doença (Niendorf et al., 1995).

5.1. LDL como agente direcionador de Fármacos

A possibilidade de se utilizar a LDL como agente direcionador de fármacos para as células neoplásicas foi estudada por vários pesquisadores (Rudling et al., 1983; Lundberg, 1987; Samadi-Baboli et al., 1993; Xiao et al., 1999). Seu uso baseia-se em três hipóteses que envolvem propriedades inerentes da partícula de LDL e do seu receptor: a LDL seria capaz de transportar fármacos lipofílicos que podem ter efeito citotóxico; a internalização do fármaco na LDL o protegeria contra o ataque de biomoléculas plasmáticas e água e, o fármaco incorporado à LDL teria maior concentração nas células neoplásicas que apresentam aumento de expressão de LDL-R em relação às células normais.

Apesar dos bons resultados obtidos com a LDL, sua utilização parece restrita às experiências de laboratório, pois sua obtenção a partir do plasma humano, os procedimentos de incorporação dos fármacos e o armazenamento dos complexos dificultam sua utilização na prática clínica. Além disso, por ser um hemoderivado, ele pode provocar respostas imunológicas e contaminação por vírus da hepatite ou do HIV.

Além disso, a incorporação de um fármaco na partícula de LDL

pode resultar na perda da apoB-100 e, conseqüentemente, da capacidade de ligação aos LDL-R, além de poder alterar ou até mesmo quebrar a sua estrutura (Rensen et al., 1997).

O primeiro relato de incorporação bem sucedida de um agente antineoplásico à LDL data de 1984. Nele, Iwanick et al. prepararam um complexo de LDL com o antibiótico daunomicina. Neste estudo ficou comprovado que o procedimento de associação não modificava estruturalmente o fármaco, mantendo as propriedades inerentes da partícula.

Em 1990, Vitols et al. associaram um derivado insolúvel da mitoclomina à LDL. Esse estudo mostrou que a entrada do complexo LDL-fármaco em células de ovário de hamster normais e mutantes para LDL-R foi mediada via receptor. Além disso, o complexo teve o mesmo comportamento plasmático que a LDL humana em camundongos.

Uma alternativa ao uso da LDL foi proposta inicialmente por alguns autores. Nesses modelos fazia-se uso de emulsões artificiais com características semelhantes à LDL sem a porção protéica (Ginsburg et al., 1982; Halbert et al., 1984; Owens et al., 1995). Contudo, o uso desses sistemas se restringiu, em sua maioria, apenas aos estudos das interações lipídicas, uma vez que eles não possuíam a apolipoproteína que se liga aos LDL-R.

Em 1993, Maranhão et al. demonstraram que uma nanoemulsão lipídica com composição semelhante à da LDL humana sem a parte protéica (LDE), ligava-se aos LDL-R e era captada pelas células. Apesar de a LDE não ter proteína, ao ser injetada na circulação plasmática, entra em contato com as lipoproteínas naturais e adquire, entre outras, a apo E, que é reconhecida pelo receptor da LDL, sendo depois captada pela célula (Maranhão et al., 1993).

Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com a LDE pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (Maranhão et al., 1997).

A LDE tem mais afinidade pelos receptores de LDL do que a própria LDL natural (Hirata et al., 1999), isto porque o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E, que tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B-100 da LDL natural.

Do que se conhecia sobre o comportamento da LDE, levantou-se a hipótese de que a LDE pudesse substituir a LDL natural como veículo para direcionar fármacos antineoplásicos para os tecidos malignos, evitando atingir órgãos e tecidos normais (Maranhão et al., 1992; Maranhão et al., 1994). Desse modo, os agentes antineoplásicos seriam incorporados à LDE, a nanoemulsão seria injetada na

circulação, onde iria adquirir a apo E e ligar-se preferencialmente aos LDL-R das células neoplásicas, onde estes receptores encontram-se em número muito maior do que nas células normais.

Esta hipótese foi primeiramente comprovada em pacientes com leucemia mielocítica aguda (LMA). Verificou-se que a LDE era removida com velocidade muito maior nos pacientes com LMA do que nos controles. Em contrapartida, após serem tratados com esquemas quimioterápicos convencionais e terem remissão completa da doença, a remoção plasmática da LDE tornava-se mais lenta, normalizando-se. Esses achados mostravam que as células de LMA, com receptores em número muito maior, provocavam remoção acelerada da nanoemulsão. Quando estas foram destruídas pela quimioterapia, a remoção se normalizava. Neste trabalho também demonstrou-se a captação da LDE pela medula óssea infiltrada de células de LMA de maneira direta, por meio de imagens de Medicina Nuclear obtidas com LDE marcada com Tecnécio^{99m}. Neste experimento comprovou-se que 70% da LDE injetada foi captada pelas células leucêmicas (Maranhão et al., 1994).

Recentemente, confirmou-se a captação e concentração da LDE em tumores sólidos. Estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e de mama revelaram que a LDE se concentrava mais nos tecidos neoplásicos (Ades et al., 2001; Graziani et al., 2002). Estes

experimentos comprovam, portanto, que é possível direcionar um veículo feito artificialmente para o tecido neoplásico.

Em seguida, pode-se caracterizar a incorporação à LDE de um quimioterápico de ação antineoplásica, de natureza lipofílica, a carmustina. Estudou-se a estabilidade do complexo e a integridade química do fármaco após a incorporação, determinando a sua biodistribuição e toxicidade em camundongos (Maranhão et al., 2002). A associação com a carmustina não alterou o direcionamento da LDE para os seus sítios de ligação específicos e, por estudos de incubação com células normais e de linhagens neoplásicas, demonstrou-se que ela não perdia a sua ação citotóxica (Maranhão et al., 2002).

Estudos clínicos de fase I com a preparação de LDE-carmustina demonstraram efeito antitumoral com melhora importante na qualidade de vida de pacientes com mieloma múltiplo e em outros tipos de tumores avançados, como de ovário e de mama, além da diminuição de efeitos colaterais, onde quantidades acima de 150% da dose máxima convencional (200 mg/m²), resultaram em toxicidade mínima (Maranhão, dados não publicados).

Em pacientes com mieloma múltiplo ainda não tratados foi possível avaliar a ação terapêutica do complexo LDE-Carmustina,

na dose de 180 mg/m² de superfície corpórea. Além da nítida melhora clínica dos seis pacientes, os níveis de imunoglobulina M, secretada pelas células do mieloma, decresceram em mais de 60%, sem que tenham ocorrido efeitos colaterais importantes (Hungria et al., 2004).

Valduga et al., em 2003, avaliaram a associação de etoposide com a LDE, em camundongos, quanto à estabilidade físico-química, à toxicidade e a atividade citotóxica contra uma linhagem de células neoplásicas específicas. Demonstraram que a associação é estável, com preservação da atividade citotóxica do fármaco, além de baixa toxicidade nesses animais.

A estabilidade da associação LDE-etoposide foi também avaliada em mulheres com carcinoma de ovário (Azevedo et al., 2005), mostrando que a maior parte do fármaco se mantém nas partículas da nanoemulsão até a remoção da circulação e internalização pelas células além de mostrar, também, maior concentração no tecido ovariano neoplásico do que no tecido normal.

A associação da nanoemulsão com o quimioterápico paclitaxel mostrou-se igualmente estável, com uma concentração maior no tecido neoplásico da mama em comparação com o tecido normal, além de melhorar os parâmetros farmacocinéticos do

paclitaxel (Pires et al., 2009). Além disso, em um estudo piloto, onde foi administrada a nanoemulsão associada ao paclitaxel para tratamento de algumas pacientes refratárias à quimioterapia convencional, mostrou um perfil de toxicidade extremamente baixo (Pires et al., 2009)

Como já demonstrado, o aumento da expressão dos receptores de LDL em processos proliferativos, como o câncer, pode ser utilizado para concentrar nanoemulsões associadas a fármacos de ação antineoplásica em tecido neoplásico. Muitos estudos mostraram que a associação de quimioterápicos à LDE resulta em preparações com maior atividade antineoplásica e com drástica redução da toxicidade (Azevedo et al., 2005; Pires et al., 2009).

A estrutura da nanoemulsão lipídica é semelhante a LDL, por isso a sua captação ocorre pelos mesmos receptores. Portanto, é de suma importância verificar o que ocorre com os receptores de LDL antes e depois do tratamento quimioterápico em tecidos tumorais e normais. Isso contribuirá para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de neoplasias.

II. OBJETIVOS

1. Avaliar, em pacientes portadoras de carcinoma da mama, a expressão dos receptores envolvidos na captação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-R e LRP-1) em comparação com tecido normal;
2. Avaliar a influência da resposta à quimioterapia neoadjuvante na quantificação da expressão desses receptores em tecido tumoral.

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Casuística

Dezesseis pacientes voluntárias portadoras de carcinoma de mama estádios II ou III, não candidatas à cirurgia conservadora e com indicação de tratamento quimioterápico neoadjuvante, foram selecionadas no Setor de Oncologia do Centro de Referência da Saúde da Mulher em São Paulo (Anexo 1). O diagnóstico foi confirmado através de biópsia realizada previamente.

Todas as pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido antes de qualquer procedimento (Anexo 2).

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher (Anexo 3) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo 4).

1.1. Critérios de Inclusão

1. Pacientes portadoras de carcinoma da mama estágio II ou III, diagnosticado por biópsia ou citologia e não candidatas à cirurgia conservadora, segundo critérios clínicos;
2. Sexo feminino;
3. Sem tratamento prévio para câncer de mama;
4. Idade ≥ 18 anos;
5. Com indicação de tratamento quimioterápico neo-adjuvante;
6. *Performance Status* ≤ 2 ;
7. Perfil hematológico dentro dos valores de referência: Neutrófilos $\geq 1500/\text{mm}^3$; plaquetas $\geq 100.000/\text{mm}^3$ e hemoglobina $>10\text{g/dL}$;
8. TGO e TGP $\leq 2,5 \times \text{LSN}$; Fosfatase alcalina $\leq 1,5 \times \text{LSN}$; Creatinina $\leq 1,5 \times \text{LSN}$ e Bilirrubinas totais $< 1,5 \times \text{LSN}$;
9. Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

1.2. Critérios de Exclusão

1. Pacientes com carcinoma inflamatório da mama ou doença metastática;
2. Pacientes com doença multifocal;
3. Pacientes com tumores bilaterais;
4. Pacientes elegíveis para cirurgias conservadoras;
5. Pacientes que apresentam arritmia cardíaca grau 2 ou maior, neoplasia maligna invasiva prévia (exceto carcinoma de pele não melanoma ou carcinoma “in situ” do colo uterino) ou infecções ativas;
6. Pacientes em idade fértil que não praticam métodos de contracepção efetivos;
7. Pacientes grávidas;
8. Pacientes em aleitamento materno.

2. Características das pacientes

A idade das pacientes, o diagnóstico anatomopatológico e o estadiamento clínico estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Idade, exame anatomopatológico e estadiamento clínico das pacientes

Paciente	Idade (anos)	Anatomopatológico	G	Estadiamento Clínico		
				T	N	EC
1	58	Carcinoma ductal invasivo	2	4b	1	IIIB
2	53	Carcinoma lobular invasivo	1	3	1	IIIA
3	53	Carcinoma ductal invasivo	2	3	0	IIB
4	34	Carcinoma ductal invasivo	2	3	2	IIIA
5	64	Carcinoma ductal invasivo	2	2	2	IIIA
6	60	Carcinoma ductal invasivo	2	4b	1	IIIB
7	40	Carcinoma ductal invasivo	2	4b	1	IIIB
8	48	Carcinoma ductal invasivo	2	3	2	IIIA
9	49	Carcinoma ductal invasivo	1	3	2	IIIA
10	63	Carcinoma ductal invasivo	3	4b	2	IIIB
11	53	Carcinoma ductal invasivo	3	3	1	IIIA
12	41	Carcinoma ductal invasivo	2	3	1	IIIA
13	37	Carcinoma ductal invasivo	2	3	2	IIIB
14	51	Carcinoma ductal invasivo	2	3	3	IIIC
15	46	Carcinoma ductal invasivo	2	3	2	IIIB
16	48	Carcinoma ductal invasivo	2	2	1	IIB

G = Grau de diferenciação nuclear

3. Métodos

Antes do início da quimioterapia foram coletadas amostras de sangue para determinação do perfil lipídico e realizada nova biópsia por agulha.

Por ocasião do ato cirúrgico, após o termino da quimioterapia neoadjuvante, o tecido tumoral fixado em parafina, foi coletado e utilizado para análise.

3.1. Determinações bioquímicas séricas

Antes do início do tratamento quimioterápico foi determinado o perfil lipídico nas amostras de soro obtidas após jejum de 12 horas. Os triglicérides e o colesterol total foram determinados pelo método colorimétrico-enzimático, utilizando-se os kits comerciais (Labtest - São Paulo, Brasil). A concentração de HDL foi medida pelo mesmo método, após precipitação da LDL e VLDL. A concentração de LDL foi calculada pela fórmula de Friedewald et al (1972): $LDL = \text{Colesterol Total} - (VLDL + HDL)$ e a de VLDL pela fórmula $VLDL = TG/5$.

3.2. Obtenção dos fragmentos de mama antes da quimioterapia

Os procedimentos de biópsia foram realizados no Centro de Referência da Saúde da Mulher.

Antes do início da quimioterapia, todas as pacientes foram submetidas à biópsia percutânea por agulha (*core biopsy*) com anestesia local. Para biópsia foi utilizada agulha de 14G com avanço de 2,2 cm, acoplada a disparador automático. Foram retirados em média, dois fragmentos de tecido mamário neoplásico, evitando-se a periferia do tumor, em decorrência do processo inflamatório local que pode ocorrer ou áreas de necrose tumoral, e também de tecido mamário normal. Os tecidos foram fixados em formol 10% e enviados ao Laboratório de Metabolismo de Lípides no InCor, onde foram emblocados em parafina.

3.3. Obtenção dos fragmentos de mama depois da quimioterapia

Após o término da quimioterapia neoadjuvante, todas as pacientes foram encaminhadas para mastectomia. O material oriundo da cirurgia foi encaminhado ao setor de patologia do Centro

de Referência da Saúde da mulher, onde foi realizada a análise histopatológica.

Os blocos de parafina contendo tumor foram então encaminhados ao Laboratório de Metabolismo para posterior análise da expressão protéica por imunoistoquímica.

3.4. Preparo para análise imunoistoquímica

Para a técnica de imunoistoquímica, os fragmentos de tecidos tumorais e normal foram seccionados em cortes de 5µm. A desparafinização das lâminas foi feita com 3 banhos de xilol de 10 minutos cada, seguidos de 3 banhos de etanol absoluto, 2 banhos de etanol 95% e um banho de etanol 75%. As lâminas com os cortes histológicos foram então lavadas em água corrente.

A recuperação de antígenos foi realizada por calor úmido e pressão com tampão citrato 10 mM pH 6,0 apenas para o anticorpo anti-LRP. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%. O bloqueio de reações inespecíficas foi feito com soro fetal bovino diluído em solução salina tamponada com sais fosfato (PBS) durante 1 hora em estufa umidificada a 37°C.

Os anticorpos primários anti-LRP-1 (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) e anti-LDL-R (Lifespan, Seattle, WA, EUA), previamente padronizados, foram diluídos em PBS contendo 1% de albumina bovina. As lâminas foram incubadas por 18 horas a 4° C. O sistema de detecção foi o polímero SuperPicture (Dako, Carpinteria, CA, EUA), revelado com diaminobenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e contracorado com hematoxilina de Harris.

3.5. Análise imunoistoquímica

Imagens de vários campos (2-6 dependendo do tamanho do corte histológico) de cada corte foram capturadas no aumento de 200x em equipamento Image Analysis System Quantimet 500+ (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK). Para a análise quantitativa da expressão protéica dos receptores LDL-R e LRP-1, o limiar de detecção de cor foi determinado para cromógeno DAB tendo como base uma região do tecido marcada. Todos os campos foram então medidos e a área marcada foi calculada como porcentagem da área total de cada campo. A expressão dos receptores de cada paciente foi calculada como média de todos os campos medidos para cada corte histológico.

IV. RESULTADOS

1. Avaliação das características das pacientes

Foram estudadas 16 pacientes. A tabela 2 mostra o resultado do perfil imunoistoquímico das pacientes realizado no laboratório de patologia do Centro de Referência da Saúde da Mulher, demonstrando que, das 16 pacientes, 8 apresentavam positividade para expressão de receptores hormonais, 3 apresentavam superexpressão de Cerb-B2 e 5 foram caracterizadas como triplo negativo (RE, RP e Cerb-B2 negativos).

Tabela 2 – Perfil dos receptores hormonais e Cerb-B2

Paciente	RE	RP	Cerb-B2
1	pos > 75%	pos 25%	neg
2	pos 75%	neg	neg
3	neg	neg	3+/3+
4	pos 50-75%	neg	neg
5	pos 25-50%	neg	2+/3+
6	pos 25%	neg	neg
7	pos 10-25%	neg	neg
8	pos 50%	pos < 25%	neg
9	neg	neg	3+/3+
10	neg	neg	neg
11	neg	neg	neg
12	neg	neg	neg
13	neg	neg	neg
14	neg	neg	3+/3+
15	pos > 75%	neg	2+/3+
16	neg	neg	neg

RE, Receptor de estrogênio; RP, Receptor de progesterona, Cerb-B2, *Human epidermal growth factor receptor 2*.

2. Esquemas quimioterápicos

A tabela 3 mostra o esquema de quimioterapia utilizado em cada uma das pacientes, bem como o número de ciclos. O esquema

de quimioterapia e o momento do encaminhamento para cirurgia foram definidos pela equipe de oncologia clínica do Centro de Referência da Saúde da Mulher. As pacientes realizaram de 4 a 11 ciclos de quimioterapia.

Tabela 3 – Esquemas quimioterápicos e número de ciclos utilizados

Paciente	Esquema	
	Quimioterápico	Número de ciclos
1	AC	4
2	AC	4
3	AC + DCT	4 + 4 = 8
4	AC	4
5	GCT/DDP	6
6	ADM/DDP + GCT/DDP	5 + 6 = 11
7	ADM/DDP	6
8	PCT/ADM	8
9	PCT/ADM	6
10	GCT/DDP	6
11	AC	4
12	GCT/DDP	6
13	ADM/DDP	6
14	PCT/GCT	8
15	PCT/GCT	6
16	ADM/DDP	6

AC, Doxorrubicina + Ciclofosfamida; DCT, Docetaxel; GCT/DDP, Gemcitabina + Cisplatina; ADM/DDP, Doxorrubicina + Cisplatina; PCT/ADM, Paclitaxel + Doxorrubicina; PCT/GCT, Paclitaxel + Gemcitabina.

3. Avaliação da resposta ao tratamento

A tabela 4 mostra um comparativo do estadiamento clínico (antes do início da quimioterapia) e o estadiamento patológico (avaliação da peça cirúrgica). Do total de 16 pacientes, 6 pacientes apresentaram respostas objetivas, sendo que destas, 4 com respostas completas e 2 com respostas parciais.

Tabela 4 – Resposta à quimioterapia neoadjuvante

Paciente	Estadiamento Clínico			Estadiamento Patológico			Resposta Patológica
	T	N	EC	T	N	EP	
1	4b	1	IIIB	4b	1a	IIIB	
2	3	1	IIIA	4	1	IIIB	
3	3	0	IIB	4b	1a	IIIB	
4	3	2	IIIA	4	3a	IIIC	
5	2	2	IIIA	2	2a	IIIA	
6	4b	1	IIIB	4b	3	IIIC	
7	4b	1	IIIB	4b	2	IIIB	
8	3	2	IIIA	4	2	IIIB	
9	3	2	IIIA	2	3	IIIC	
10	4b	2	IIIB	4	0	IIIB	
11	3	1	IIIA	1c	1a	IIA	RP
12	3	1	IIIA	2	1	IIB	RP
13	3	2	IIIB	0	0	0	RC
14	3	3	IIIC	0	0	0	RC
15	3	2	IIIB	0	0	0	RC
16	2	1	IIB	0	0	0	RC

EC, Estadiamento clínico; EP, Estadiamento patológico; RP, Resposta parcial; RC, Resposta completa

4. Perfil lipídico

O perfil lipídico das pacientes foi dosado em soro coletado antes do início da quimioterapia. O colesterol total foi de 231 ± 68

mg/dL (média $\pm$ desvio padrão). A dosagem de triglicérides foi de 136 ± 65 mg/dL. O colesterol de HDL foi de 63 ± 20 mg/dL. O colesterol de LDL foi calculado em 141 ± 65 mg/dL e o colesterol de VLDL foi calculado em 27 ± 13 mg/dL.

5. Avaliação da expressão protéica de LDL-R

A tabela 5 e a figura 1 mostram a expressão do receptor de LDL (LDL-R) em tecido normal e em tecido neoplásico antes e depois da quimioterapia. Devido à ausência de tumor na peça cirúrgica, as pacientes que apresentaram resposta completa à quimioterapia foram excluídas dessa análise. Em uma paciente (paciente 6) houve perda de tecido durante o emblocamento em parafina, o que impediu a análise da expressão do receptor de LDL em tecido normal.

Dentre as 11 pacientes avaliadas, 8 apresentaram maior expressão do receptor de LDL em tecido neoplásico do que em tecido normal. Em 3 pacientes, entretanto, a expressão do receptor de LDL estava menor no tecido neoplásico do que no tecido normal.

A quimioterapia diminuiu a expressão do receptor de LDL no tecido tumoral de 6 pacientes. Entretanto, em 4 pacientes a expressão do receptor LDL aumentou e em 2 manteve-se estável.

Dentre as 8 pacientes que apresentavam expressão do LDL-R aumentada em tecido neoplásico antes da quimioterapia, em 2 houve um novo aumento na expressão do receptor e em uma a expressão manteve-se inalterada, enquanto que em 5 pacientes a expressão do receptor diminuiu após a quimioterapia. Dentre essas 5, em 3 pacientes a expressão apesar de diminuir, manteve-se em nível mais alto que no tecido normal.

Dentre as 3 pacientes que apresentavam a expressão do receptor de LDL diminuída no tecido tumoral em relação ao tecido normal antes da quimioterapia, houve diferentes respostas: em uma paciente a expressão do LDL-R aumentou, em outra diminuiu e na terceira manteve-se estável.

Tabela 5 – Expressão protéica de LDL-R em tecido normal e em tecido neoplásico antes e após quimioterapia

Paciente	Tecido Normal	Tumor Pré Quimioterapia	Tumor Pós Quimioterapia
	% área	% área	% área
1	14,86	8,99	8,48
2	0,46	6,03	10,30
3	13,53	1,86	2,41
4	18,20	6,37	2,04
5	10,04	22,31	2,11
6	-	15,47	50,70
7	2,50	13,70	15,90
8	16,64	22,99	4,04
9	4,09	6,99	11,37
10	6,96	15,77	12,04
11	2,37	18,56	5,78
12	3,55	33,66	14,27

Figura 1: Imunoistoquímica para LDL-R nos tecidos normais e tumorais antes e depois da quimioterapia das 12 pacientes avaliadas. 200x.

6. Avaliação da expressão protéica de LRP-1

A tabela 6 e a figura 2 mostram o resultado da expressão de receptores relacionados à proteína (LRP-1) em tecido normal em comparação com o tecido tumoral antes do início da quimioterapia e depois da quimioterapia. Devido à ausência de tumor na peça cirúrgica, as pacientes que apresentaram resposta completa à quimioterapia foram excluídas dessa análise.

Das 12 pacientes avaliadas, 4 apresentaram aumento e 3 diminuição da expressão no tecido tumoral quando comparado com o tecido normal correspondente. Em 5 pacientes a expressão do LRP-1 em tecido tumoral e normal era semelhante.

A quimioterapia reduziu a expressão de LRP-1 nos tecidos tumorais de 6 pacientes, aumentou em 4 e não alterou a expressão em 2 pacientes.

Dentre as 4 pacientes que apresentavam tecido tumoral com alta expressão de LRP-1 antes da quimioterapia, em 2 a expressão diminuiu após a quimioterapia e em 2 pacientes notou-se aumento da expressão.

Das 3 pacientes que apresentavam tecido tumoral com baixa expressão de LRP-1 antes da quimioterapia, em 2 a expressão diminuiu após quimioterapia e em uma paciente houve um aumento da expressão.

Das 5 pacientes que a expressão dos receptores era semelhante antes do início da quimioterapia, a quimioterapia mostrou diferentes respostas: em 1 a expressão de LRP-1 aumentou, em 2 diminuiu e em 3 manteve-se inalterada.

Tabela 6 – Expressão protéica de LRP-1 em tecido normal e em tecido neoplásico antes e após quimioterapia

Paciente	Tecido Normal	Tumor Pré Quimioterapia	Tumor Pós Quimioterapia
	% área	% área	% área
1	3,67	4,20	0,25
2	8,14	5,56	1,01
3	4,67	6,24	11,33
4	19,97	3,22	1,61
5	2,47	3,99	1,41
6	4,40	4,65	12,52
7	2,44	0,25	0,49
8	13,97	13,40	3,51
9	5,51	7,15	4,31
10	1,41	3,29	5,37
11	4,67	5,09	5,00
12	10,96	8,47	9,08

Figura 2: Imunoistoquímica para LRP-1 nos tecidos normais e tumorais antes e depois da quimioterapia das 12 pacientes avaliadas. 200x.

V. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada a expressão de dois receptores de lipoproteínas, o LDL-R e o LRP-1 em tecido normal de mama e tecido tumoral antes e após a quimioterapia de pacientes portadoras de carcinoma de mama estádios II ou III, não candidatas à cirurgia conservadora e com indicação de tratamento quimioterápico neoadjuvante. Oito pacientes das 11 avaliadas apresentaram aumento da expressão do receptor de LDL no tecido tumoral antes da quimioterapia em comparação com o tecido normal correspondente.

Outros estudos corroboram nossos dados. O aumento de receptores da LDL foi documentado em diversos tipos de neoplasias malignas, entre elas o carcinoma de mama (Rudling et al., 1986), o carcinoma de endométrio (Gal et al., 1981b), o câncer de pulmão (Gueddari et al., 1993), o câncer de próstata (Henriksson et al., 1989), gliomas (Leppala et al., 1995), além de outras doenças mieloproliferativas (Ginsberg et al., 1986).

Muitas evidências já foram acumuladas demonstrando que células tumorais em proliferação apresentam aumento de utilização

de colesterol. Assim, o aumento da expressão dos receptores da LDL resulta provavelmente da maior necessidade de colesterol e de outros lípidos para produção de membranas, devido à maior proliferação celular que ocorre nesses tecidos (Ho et al., 1978).

O aumento da expressão do receptor de LDL também pode ser devido às alterações no metabolismo celular de colesterol, pois já foi demonstrado que a concentração do colesterol plasmático é regulada principalmente pelos receptores de LDL. Além disso, Miller et al. (1981) demonstraram que pacientes portadores de câncer de cólon avançado apresentavam concentrações plasmáticas significativamente mais baixas de colesterol total do que os controles, independentemente da idade e sexo. Já em pacientes com doença em estágio inicial, essa diferença nos níveis de colesterol não foi observada (Miller et al., 1981). Do mesmo modo, Spiegel et al. (1982) mostraram que pacientes com leucemia aguda e linfoma não Hodgkin apresentavam uma menor concentração de HDL e um aumento dos níveis de triglicérides, e que, em ambos os grupos de pacientes, estes valores retornavam ao normal após a remissão obtida com o tratamento.

Outros estudos epidemiológicos mostraram um aumento da mortalidade por câncer em pacientes que apresentavam baixas

concentrações plasmáticas de colesterol (Pekkanen et al., 1999; Iribarren et al., 1995).

Gal et al. (1981a) estudaram o metabolismo de colesterol em diversos tipos de tumores ginecológicos, entre eles o carcinoma epidermóide do colo uterino, o carcinoma epidermóide da vagina e o adenocarcinoma de endométrio, correlacionando-os com o metabolismo de colesterol de grupos celulares não neoplásicos como os fibroblastos do cérvix e o epitélio glandular endometrial. Esses autores concluíram que há de fato um aumento substancial do metabolismo do colesterol em todos os tipos neoplásicos estudados, em comparação com o modelo não tumoral.

O aumento da captação de LDL via receptores e da sua consequente degradação, com diminuição do estoque intracelular de colesterol, reflete o consumo acelerado para síntese de membrana para divisão e proliferação celular. A principal fonte de colesterol de todos os modelos celulares neoplásicos estudados foi sua captação via receptor, estando o metabolismo de colesterol acelerado em até 20 vezes, como, por exemplo, no câncer cervical em relação aos fibroblastos do cérvix (Gal et al., 1981a).

Outro estudo que demonstrou a relação do aumento da expressão do receptor de LDL com alterações do metabolismo de colesterol em tumores avaliou um paciente do sexo masculino de 68

anos com hipercolesterolemia familiar não responsiva ao tratamento convencional (Ueyama et al., 1990). Este paciente apresentou câncer de vesícula biliar disseminado e durante a evolução da doença, começou a apresentar baixos níveis de colesterol. O paciente faleceu em decorrência da disseminação do tumor. Ao estudar as células tumorais em cultura, os autores demonstraram a existência de um fator tumoral capaz de aumentar a expressão de receptores de LDL em fibroblastos normais da pele e fibroblastos do próprio paciente. Demonstraram então que alguns tipos de tumores podem ser capazes de produzir determinados fatores que podem ser os responsáveis pelo aumento da expressão de receptores de LDL, com consequente diminuição dos níveis de colesterol. (Ueyama et al., 1990)

Em adição, Gal et al. (1981b) compararam o metabolismo de colesterol de dois modelos tumorais *in vivo*, através da implantação de células de carcinoma epidermóide cervical e de adenocarcinoma endometrial no dorso de camundongos *nude*, comparando com o metabolismo de outras células normais do animal. Foi demonstrado, então, que o metabolismo de colesterol nas células tumorais estava aumentado de 15 a 50 vezes em relação aos demais tecidos normais do camundongo.

Em estudos prévios no nosso laboratório (Graziani et al., 2002; Pires et al., 2009), foi avaliada a captação de LDL pelos receptores utilizando uma nanoemulsão artificial rica em colesterol marcada com material radioativo. Essas observações foram feitas tanto por imagens radiológicas como pela medida da radiação nos fragmentos de tumor retirados no procedimento cirúrgico após prévia infusão da nanoemulsão em 35 pacientes com câncer de mama. Em todas as pacientes, a concentração da nanoemulsão foi maior no tecido neoplásico de mama do que no tecido mamário normal.

A expressão dos receptores de LDL também foi relacionada com o prognóstico da doença. Rudling et al. (1986) determinaram a expressão de LDL-R em câncer de mama e analisaram-na como fator prognóstico em comparação com outros fatores prognósticos tumorais. As pacientes com câncer de mama que tinham aumento da expressão do LDL-R tiveram pior prognóstico, sugerindo que os tumores de mama ricos em receptores de LDL podem crescer mais rapidamente.

Apesar de evidências do aumento da expressão do LDL-R no câncer de mama, no presente estudo, em 3 pacientes das 11 avaliadas não foi observado aumento da expressão do LDL-R. Porém, estes resultados não implicam que não esteja ocorrendo um aumento da captação de lipoproteínas.

Embora a captação de lipoproteínas aconteça principalmente pelo aumento de receptores na superfície celular (Ho et al., 1978), outros mecanismos podem atuar para o aumento da captação sem o aumento do número de receptores. O aumento da velocidade de reciclagem dos receptores pode ser um dos mecanismos envolvidos, com consequente aumento da função do receptor sem elevar a sua densidade na superfície celular (Harwood et al., 1997).

Vários estudos têm demonstrado uma grande variação na expressão do receptor de LDL, mesmo quando a expressão desse receptor é maior no tecido tumoral do que no tecido normal correspondente (Ho et al., 1978, Rudling et al., 1986). Ho et al. (1978) mostraram que a expressão de LDLR variou de 3 a 100 vezes em células de leucemia mielóide crônica. É digno de nota que, em células monocíticas normais, a expressão do receptor de LDL apresenta uma grande variação de um paciente para outro (Ho et al., 1978). Essa variabilidade na expressão dos receptores também foi observada no presente estudo, com uma variação de expressão de 1,4 vezes (paciente 8) até 13 vezes (paciente 3).

Além disso, essa mesma variação já tem sido observada em estudos de captação de LDL. Em pacientes com câncer de mama, foi demonstrado que a captação da nanoemulsão variou de 1,4 a 8,8 vezes no tecido tumoral em comparação ao tecido normal.

(Graziani et al., 2002; Pires et al., 2009). Esses dados provavelmente refletem diferenças na saturação do colesterol intracelular e na demanda de lípidos pelas células.

No nosso estudo, o efeito da quimioterapia na expressão dos receptores de LDL no tecido tumoral foi muito heterogêneo. Assumindo que o aumento da expressão dos receptores é causado por um aumento da necessidade de lípidos para síntese de membranas, seria esperado que a expressão dos receptores diminuísse com a quimioterapia, já que a mitose estaria inibida com este procedimento. Demonstramos que em 4 pacientes a expressão foi maior após a quimioterapia e em 2 a expressão se manteve inalterada. Esses dados sugerem que a relação entre expressão de receptores e mitose não é tão definitiva ou eventualmente, esses achados podem estar relacionados à resistência à quimioterapia.

Outro receptor de lipoproteína estudado aqui foi o LRP-1. Esse receptor foi pensado como sendo primariamente um receptor de lipoproteína devido à sua semelhança ao LDL-R (Brown et al., 1991; Herz et al., 1988). Posteriormente, foi descoberto que o LRP-1 é idêntico ao receptor de α 2-macroglobulina (Strickland et al., 1990). Muitos autores mostraram diminuição da expressão do LRP-1 dependendo do estágio tumoral (Desrosiers et al., 2006; Kancha et al., 1994). Do mesmo modo, De Vries et al. (1996) descreveram um

declínio na expressão do LRP em estágios avançados de tumores melanocíticos. Outros autores mostraram aumento na expressão do LRP-1 em tumores malignos (Yamamoto et al., 1997). Essa contradição pode ser explicada pelos vários diferentes processos metabólicos dos quais o LRP-1 faz parte.

A captação celular e degradação de proteinases não são o único caminho no qual a LRP-1 pode influenciar o crescimento tumoral e metástases. LRP-1 é também responsável pela captação das lipoproteínas ricas em apoE. Fabrizi et al. (1997) mostraram uma redução na expressão de LRP-1 em células diferenciadas de neuroblastoma, devido à baixa demanda de colesterol e lípidos nas células diferenciadas por conta do baixo índice mitótico comparado as células indiferenciadas. Assim como para o LDL-R, é pressuposto que células em proliferação, como no câncer, expressam mais LRP-1 porque necessitam mais colesterol e lípidos para produção de membranas (Obermeyer et al., 2007).

Dedieu e Langlois (2008) postularam que o LRP-1 poderia controlar eventos críticos que influenciam a migração celular e especialmente o balanço entre as forças de tração e a adesão celular. Foi estabelecido também que a expressão de LRP-1 é necessária para a migração celular, e que o LRP-1 é um mediador essencial para adesão de células cancerosas. Portanto, o LRP-1 pode

controlar o fenótipo das células malignas, entretanto, o mecanismo pelo qual isso acontece permanece desconhecido.

Em contraste com essas observações, foi demonstrado que o bloqueio da atividade endocítica do LRP-1 promove um aumento da invasão e migração de células tumorais (Webb et al., 2000). Esses dados em conjunto indicam que o mecanismo pelo qual a LRP-1 promove a migração de células tumorais não está relacionado apenas a sua função endocítica, sendo esse um processo mais complexo.

Em nosso estudo, ao comparar a expressão do LRP-1 no tecido tumoral com o tecido mamário normal, o padrão de expressão desse receptor foi totalmente indefinido, considerando que a expressão estava aumentada em 4 pacientes, diminuída em 3 e semelhante em 5 pacientes. Em contraste com os achados sobre a expressão de receptor de LDL na maioria dos estudos já realizados com diferentes tipos de neoplasia, com poucas exceções, como em leucemia linfocítica aguda, a existência de uma relação com o LRP-1 é menos explorada e os resultados são muito controversos.

Os resultados da expressão de LRP-1 após a utilização de quimioterapia foram similares àqueles encontrados para LDL-R, com diminuição da expressão em 6 pacientes, aumento em 4 e em 2

manteve-se inalterada. Na literatura, há poucos estudos sobre o efeito da quimioterapia na expressão do LRP-1.

Em virtude da expressão dos receptores de lipoproteínas não ser a única determinante da endocitose mediada por receptores, estudos de captação de lipoproteínas ou nanoemulsões artificiais devem ser realizados em pacientes com câncer para confirmar a real influência da quimioterapia na captação celular de LDL.

A maioria das pacientes estudadas era portadora de carcinoma ductal da mama, que é o tipo mais incidente, respondendo por aproximadamente 85% do total de casos de câncer de mama. Em apenas uma paciente (paciente 2), a histologia era de carcinoma lobular. Os dados aqui apresentados em relação à expressão dos receptores de lipoproteínas nesse tipo de neoplasia são muito importantes no sentido de avaliar as possibilidades de uso do mecanismo de endocitose mediado pelos receptores de LDL das células para concentrar drogas antineoplásicas.

Em estudos anteriores do laboratório, demonstramos o uso de nanoemulsões lipídicas como veículo de vários fármacos antineoplásicos, que são incorporadas pelo receptor de LDL, aumentando a seletividade do quimioterápico com consequente aumento da sua concentração e diminuição da sua toxicidade. Isso

já foi demonstrado em ensaios clínicos com diferentes agentes terapêuticos como carmustina (Maranhão et al., 2002), etoposide (Pinheiro et al., 2006) e paclitaxel (Dias et al., 2007; Pires et al., 2009).

Um dos propósitos do presente estudo foi verificar se a quimioterapia convencional poderia interferir na diminuição da expressão dos receptores de LDL. Com isso, a utilização de nanoemulsão associada a quimioterápico poderia ser menos eficiente. Nossos resultados, entretanto, mostraram que esse não é o padrão da expressão dos receptores de lipoproteínas após a quimioterapia.

Os resultados do nosso estudo em relação à expressão dos receptores de lipoproteínas podem, portanto, ajudar a estabelecer mecanismos celulares básicos e contribuir para o planejamento de futuros ensaios clínicos.

VI. CONCLUSÕES

1. A expressão do receptor LDL mostrou-se aumentada no tecido neoplásico em relação ao tecido normal na maioria das pacientes;
2. A expressão do receptor LRP-1 foi heterogênea no tecido neoplásico em relação ao tecido normal, estando aumentada em apenas 4 pacientes;
3. Após a quimioterapia, a expressão de ambos os receptores foi heterogênea, com diminuição da expressão em metade das pacientes.

VII. ANEXOS

1. Anexo 1

Paciente	Nome	Registro
1	MAHM	597729
2	BD	593888
3	IJCR	596054
4	MHM	597814
5	MJN	601824
6	AMG	380412
7	RNSS	601234
8	LFS	599891
9	AMG	602314
10	CGM	602601
11	VSF	596095
12	IMV	602132
13	CQOS	601828
14	RMS	601341
15	MCSD	603380
16	DA	29103

2. Anexo 2

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

(Obrigatório Para Pesquisas em Seres Humanos–Resolução nº 1 de 13/06/1998-CNS)

I-Identificação do Paciente

Nome: _____
RGHC _____ Data Nascimento: ____/____/____
Endereço _____
Bairro _____
Cidade _____ Estado _____
CEP _____ Telefone _____

II-Responsável Grau de parentesco: _____

Nome: _____
RG _____ Data _____
Nascimento: ____/____/____
Endereço _____
Bairro _____
Cidade _____ Estado _____
CEP _____ Telefone _____

III -Dados Sobre o Protocolo de Pesquisa Científica

- 1- Título do Protocolo: **Efeitos da quimioterapia sobre os receptores de lipoproteínas no tecido tumoral de pacientes com carcinoma de mama.**
- 2- Unidades: Centro de Referência da Saúde da Mulher – Clínica de mastologia, Clínica de Ginecologia do HCFMUSP e Laboratório de Pesquisa do Instituto do Coração da FMUSP
- 3- Pesquisador:
 - a) Prof. Dr Roberto Hegg
Cargo: Médico Assistente
Inscrição no Conselho Regional de Medicina de São Paulo: 21824
 - b) Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Cargo: Diretor do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR-HCFMUSP
Inscrição no Conselho Regional de Medicina de São Paulo: 20122
 - c) Luis Antonio Pires
Cargo: Aluno de doutorado
Inscrição no Conselho Regional de Medicina de São Paulo: 73335
- 4- Avaliação do Risco da Pesquisa: Risco baixo

III- Objetivos da Pesquisa

No sangue existe uma substância, a LDL (lipoproteína de baixa densidade), que é uma lipoproteína que carrega 2/3 do colesterol do sangue em indivíduos

normais. A sua principal função é o transporte do colesterol que será utilizado para a produção das membranas das células e para produção de alguns hormônios.

Nas células do corpo existem receptores de LDL e ela é retirada da circulação por esses receptores. Quase todos os tecidos do corpo possuem receptores de LDL. Eles estão bastante aumentados nos tumores malignos.

Em laboratório foi desenvolvida uma substância artificial chamada de LDE e que é parecida com a LDL e é retirada da circulação pelos mesmos receptores.

É possível associar um medicamento à LDE e dessa forma a célula maligna captaria esse medicamento aumentando o seu efeito e diminuindo os efeitos colaterais.

O objetivo desta pesquisa é verificar o que ocorre com esses receptores antes e depois do tratamento com quimioterapia convencional, em células malignas e em células normais.

Dessa maneira, pode-se abrir um caminho para o desenvolvimento de tratamentos dirigidos a um novo alvo no tratamento do câncer.

IV- Esclarecimentos dados pelo pesquisador sobre as garantias do sujeito da Pesquisa:

O paciente terá acesso a qualquer tempo às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para diminuir eventuais dúvidas.

O paciente terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejudicar a continuidade da assistência.

O paciente terá a salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

O paciente terá disponibilidade de assistência no Centro de Referência da Saúde da Mulher, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Não há viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V- Informações de nomes, endereços e telefones dos responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa, para contato em caso de intercorrências clínicas e reações adversas:

Dr. Luis Antonio Pires – (11) 30695108 / 30695574

Prof. Dr. Roberto Hegg- (11) 3069-6647

Prof. Dr. Raul C. Maranhão – (11) 30695108 / 30695574

VI- Consentimento pós-esclarecido:

Declaro que após ter sido convenientemente esclarecida pelo pesquisador, conforme registro nos itens acima, consinto em participar, na qualidade de paciente, do projeto de pesquisa referido acima.

São Paulo, de de 200

Ass. do Paciente ou seu Responsável Legal

Ass. Pesquisador

3. Anexo 3

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 30 de outubro de 2008.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO: 29/10/08

TÍTULO DO ESTUDO: "Efeitos da quimioterapia sobre os receptores de lipoproteínas no tecido tumoral de pacientes com carcinoma de mama"

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Luis Antonio Pires

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher APROVOU o Protocolo de Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo sido a referida aprovação constado em ata.

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM

4. Anexo 4

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/06/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0296/09**, intitulado: **"EFEITOS DA QUIMIOTERAPIA SOBRE OS RECEPTORES DE LIPOPROTEINAS NO TECIDO TUMORAL DE PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA"**, apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme parecer anexo.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. ROBERTO HEGG**

Pesquisadores Executantes: **LUIS ANTONIO PIRES**

CAPPesq, 03 de junho de 2009.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

matc

VIII. REFERÊNCIAS

Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio RF, Souen JS, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a protein free lipid emulsion by normal and neoplastic ovarian tissue. *Gynecol. Oncol.* 2001;82:84-7.

American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2008. [on line]

http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0_2008.asp?sitearea=STT&level=1

Azevedo CH, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhão RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005;97:178-82.

Barklay M, Escher GC, Kaufman RJ, Kidder ED, Petrmann ML. Human plasma lipoproteins in normal women and in women advanced carcinoma of breast. *Cancer.* 1995;8:253-60.

Bases RE, Krakoff IH. Studies of serum cholesterol levels in leukemia. *J Reticuloendothel Soc.* 1965;85:8-14.

Benes P, Jurajda M, Zaloudik J, Izakovicova-Holla L, Vacha J. C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP) gene

polimorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003; 5(3):R77-81.

Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight year experience of the Milan cancer Institute. *J Clin Oncol*. 1998; 16:93-100

Brasil. Ministério da Saúde. Estimativas de câncer do INCA. Brasília, Instituto Nacional de Câncer, 2010

Brown MS, Herz J, Kowal RC, Goldstein JL: The lowdensity lipoprotein receptor-related protein: double agent or decoy? *Curr Opin Lipid*. 1991;2:65-72.

Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 1976;191:150-4

Budd D, Ginsberg H. Hypocholesterolemia and acute myelogenous leukemia. Association between disease activity and plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Cancer*. 1986;58:1361-5.

Buzdar AU. Preoperative chemotherapy treatment of breast cancer – a review. *Cancer*. 2007; 110:2394-407

Chacra APM, Santos RD, Martinez TLR. Hipercolesterolemia familiar. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2004; 14:462-72

Costa SD, Von Minckwitz O, Raab O. The role of docetaxel in neoadjuvant chemotherapy of breast câncer. *Semin Oncol*. 1999; 3:24-31.1

De Vries TJ, Verheijen JH, De Bart AWC, Weidle UH, Ruiter DJ, Muijen GNP: Decreased expression of both the lowdensity lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor and its receptor-associated protein in late stages of cutaneous melanocytic tumor progression. *Cancer Res*. 1996; 56:1432-39.

Dedieu S, Langlois B. LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells. *Cell Adh Migr*. 2008; 2:77-80.

Desrosiers RR, Rivard ME, Grundy PE, Annabi B: Decrease in LDL receptor-related protein expression and function correlates with advanced stages of Wilms tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:40-49.

Dias M.L., J.P. Carvalho, D.G. Rodrigues, S.R. Garziani, R.C. Maranhão. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007; 59:105-11

Fabrizi C, Businaro R, Persichini T, Fumagalli L, Lauro GM: The expression of the LDL receptor-related protein (LRP) correlates with the differentiation of human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1997; 776:154-161.

Filipowska D, Filipowski T, Morelowska B, Kazanowska W, Laudanski T, Lapinjoki S, Akerlund M, Breeze A. Treatment of cancer patients with a low-density-lipoprotein delivery vehicle containing a cytotoxic drug. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1992; 29:396-400.

Friedewald WT, Levy RI, Fredricson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultra centrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18:499-502.

Gal D, MacDonald PC, Porter JC, Simpson ER. Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. Low density lipoprotein metabolism. *Int. J. Cancer.* 1981a; 28:315-9.

Gal D, Ohashi M, Macdonald PC, Buchsbaum HJ, Simpson ER. Low-density lipoprotein as a potencial vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1981b;139:877-85

Ginsberg H, Gilbert HS, Gibson JC, Ngoc-Anh L, Virgil BW. Increased low-density-lipoprotein catabolism in myeloproliferative disorders. *Ann Inter Med.* 1986; 96:311-16

Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions os phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1982;57:8216-27.

Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature.* 1979;279:679-85.

Goodman, LS, Gilman, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 10a Ed. Rio de Janeiro: McGRAW-HILL, Interamericana Editores; 2003.

Graziani SR, Igreja FAF, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, Amancio RF, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol rich emulsion by breast cancer, *Gin Onc.* 2002; 85:493-7.

Gueddari N, Favre G, Hachem H, Marek E, Le Gaillard F, Soula G. Evidence for up-regulation low density lipoprotein receptor in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Biochemie*. 1993; 75:811-9

Halbert GW, Stuart JFB, Florence AT. The incorporation of lipide-soluble antineoplastic agents into microemulsions-protein-free analogues of low-density lipoprotein. *Int J. Pharm*. 1984; 21:219-32.

Harwood HJ Jr, Pellarin LD. Kinetics of low-density lipoprotein receptor activity in Hep-G2 cells: derivation and validation of a Briggs-Haldane-based kinetic model for evaluating receptor-mediated endocytotic processes in wich receptors recycle. *Biochem J* 1997; 323:649-59

Henriksson P, Ericsson S, Stege R, Ericsson M, Rudling M, Berglund L, Angelin B. Hypocholesterolaemia and increased elimination of low-density lipoproteins in metastatic cancer of the prostate. *Lancet*. 1989; 2:1178-80.

Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-Kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J*. 1988; 7(13):4119-27.

Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion

model in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1437:53.

Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor Activity in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells, *Blood.* 1978;52: 1099-104.

Hollenbach E, Ackermann S, Hyman BT, Rebeck GW. Confirmation of an association between a polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor-related protein gene and Alzheimer disease. *Neurology.* 1998; 50:1905-7.

Hungria VT, Latrilha MC, Rodrigues DG, Bydlowski SP, Chiattoni CS, Maranhão RC. Metabolism of cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as drug vehicle for the treatment of the disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004; 53:51-60.

Iribarren C, Reed DM, Chen R, Yano K, Dwyer JH. Low serum cholesterol and mortality. Which is the cause and which is the effect? *Circulation* 1995;92:2396-405.

Iwanik MJ, Shaw KV, Ledwith BJ, Yanovich S, Shaw JM. Preparation and interaction of a low-density lipoprotein: Daunomycin complex with P388 leukemic cells. *Cancer Research.* 1984; 44:1206-15.

Jackson RL, Morrisett JD, Gotto Jr AM. Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol Rev*. 1976; 56:259-316.

Kancha RK, Stearns ME and Hussain MM: Decreased expression of the low-density lipoprotein receptor-related protein/2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derives from human prostate and breast tumor cells. *Oncol Res*. 1994; 6:365-72.

Kaplan RM, Wingard DL. Trends in breast cancer incidence, survival, and mortality. *Lancet*. 2000; 356:592-3.

Leppala J, Kallio M, Nikula T, Nikkinen P, Liewendahl K, Jaaskelainen J, savolainen S, Gylling H, Hiltunen J, Callaway J, Kahl S, Farkkila M. Accumulation of ^{99m}Tc-low-density lipoprotein in human malignant glioma. *Br J Cancer*. 1995; 71:383-7.

Lundberg B. Preparation of drug- low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. *Cancer Res*. 1987; 47:4105-8.

Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Llacer PD, Pileggi FJC, Chamone DAF. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. *Brazilian J. Med. Res*. 1992; 25:1003-7.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso MTB, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling LDL. *Lipids*. 1993; 28:691-6.

Maranhão RC, Garicochea B, Silve EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SMS, Coelho IJC, Meneghetti JC, Pileggi FJC, Chamone DAF. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res*. 1994; 54:4660-6.

Maranhão RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Gonçalves RP, Mesquita CH, Pileggi F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*. 1997; 32:627-33.

Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG, Couto RD, Schreier S, Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: *in vitro*, *in vivo* and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chem Pharmacol*. 2002; 49:487-98.

Mathew J, Asgeirsson KS, Cheung KL, Chan S, Dahda A, Robertson JFR. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer: a review of the literature and future directions. *EJSO*. 2009; 35:113-22.

Mikhailenko I, Kounnas MZ, Argraves WS, Strickland DK. Low density lipoprotein receptor-related protein/alfa2- macroglobulin receptor mediates the celular internalization and degradation of thrombospondin. *J Biol Chem* 1995; 270:9543-9.

Miller SR, Tartter PI, Papatestas AE, Slater G, Aufses AH. Serum cholesterol and human colon câncer. *J Natl cancer Inst* .1981; 67:297-300

Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alfa2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor- related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. 1992; 269:375-82.

Niendorf A, Nagele H, Gerding D, Meyer-Pannwitt U, Gebhardt A. Increased LDL receptor mRNA expression in colon cancer is correlated with a rise in plasma cholesterol levels after curative surgery. *Int J Cancer*. 1995; 61:461-4.

Nydegger UE, Butler RE. Serum lipoprotein levels in patients with cancer. *Cancer Res*. 1972; 32:1756-60.

Obermeyer K, Krueger S, Peters B, Falkenberg B, Roessner A, Rocken C. The expression of low density lipoprotein receptor-related protein in colorectal carcinoma. *Oncology reports*. 2007; 17:361-7

Owens MD, Baillie G, Halbert GW. Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphiphatic apoprotein B receptor sequences. *Int J. Pharm.* 1995; 228:109-17.

Pekkanen J, Nissinen A, Vartanen B, Salonen JL, Punsar S, Karnoven MJ. Changes in serum cholesterol levels and mortality, a 30-follow-up, the finish cohorts of seven countries study. *Am. J. Epidemiol.* 1999; 139:155-65.

Pinheiro KV, Hungria VT., Ficker ES, Valduga CJ, Mesquita CH, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006; 57:624-30

Pires LA, Hegg R, Valduga CJ, Graziani SR, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 63:281-7

Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008; 26:778-85

Rensen PC, Schiffelers RM, Versluis AJ, Bijstbosch MK, Van Kuijk-Meuwissen ME, Van Berkel TJ. Human recombinant apolipoprotein E-enriched liposomes can mimic low-density lipoproteins as carriers for the site-specific delivery of antitumor agents. *Mol Pharmacol*. 1997; 52:445-55.

Rudling MJ, Collins VP, Peterson CO . Delivery of Aclacinomycin A to human glioma cells in vitro by the low-density lipoprotein pathway. *Cancer Res*. 1983; 43:4600-5.

Rudling MJ, Stahle L, Peterson CO, Skogg L. Content of low density lipoprotein receptors in breast cancer tissue related to survival of patients. *Br. Med. J*. 1986; 292: 580-2.

Samadi-Baboli M, Favre G, Canal P, Soula G. Low density lipoprotein for cytotoxic drug targeting: improved activity of elliptinium derivative against B16 melanoma in mice. *Br. J. Cancer*. 1993; 68:319-26.

Sant M, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Gattta G, Micheli A, Verdecchia A, Faivre J, Hakulinen T, Coebergh JW, Martinez-Garcia C, Forman D, Zappone A. Cancer survival increases in Europe, but international differences remain wide. *Eur J Cancer*. 2001; 37:1659-67.

Spiegel RJ, Schaefer EJ, Magrath IT, Edwards BK. Plasma lipid alterations in leukemia and lymphoma. *Am J Med.* 1982; 72:775-82.

Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorni M and Argraves WS: Sequence identity between the α_2 -macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem.* 1990; 265:17401-04.

Strickland DK, Kounas MZ, Argraves WS. LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J* 1995; 9:890-8.

Teixeira LC, Pinotti JA. Câncer da mama: Quimioterapia. In: HALBE, H.W.: Tratado de Ginecologia. São Paulo: Roca; 2000.

Ueyama Y, Matsuzawa Y, Yamashita S, Funahashi T, Sakai N, Nakamura T, Kubo M, Tarui S. Hypocholesterolaemic factor from gallbladder cancer cells. *Lancet.* 1990; 336:707-9

Valdulga CJ, Fernandes DC, Lo Prete AC., Azevedo CHM, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a Cholesterol-Rich Microemulsion that Binds to Low-Density Lipoprotein Receptors as Vehicle for Etoposídeo, *J.*

Pharm. Pharmacol. 2003; 55:1615-22.

Van Leuven F, Stas L, Hilliker C, Lorent K, Umans L, Serneels L, Overbergh L, Torrekens S, Moechars D, De Strooper B, Van den Berghe H. Structure of the gene(LRP1) coding for the human alfa2-macroglobulin receptor-related protein. *Genomics*. 1994; 24:78-89.

Van Leuven F, Stas L, Thiry E, Nelissen B, Miyake Y. Strategy to sequence the 89 exons of the human LRP1 gene coding for the lipoprotein receptor related protein: identification of one expressed mutation among 48 polymorphisms. *Genomics*. 1998; 52:138-44.

Van Leuven F, Thiry E, Lambrechts M, Stas L, Boon T, Bruynseells K, Muls E, Descamps O. Sequencing of the coding exons of the LRP1 and LDLR genes on individual DNA samples reveals novel mutations in both genes. *Atherosclerosis*. 2001; 154:567-77.

Versluis AJ, Van Geel PJ, Oppelaar H, Van Berkel TJC, Bijsterbosch MK. Receptor mediated uptake of low density lipoprotein by b16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. *Br.J. Cancer*. 1996; 74:525-32.

Vitols S, Soderberg-Reid K, Masquelier M, Sjoström B, Peterson C. Low density lipoprotein for delivery of a water-insoluble alkylating agent to malignant cells. In vitro and in vivo studies of a drug-lipoprotein

complex. *Br. J. Cancer*. 1990; 62: 724-9.

Vitols S, Peterson C, Larsson O, Holm P, Aberg B. Elevated uptake of low density lipoproteins by human lung cancer tissue in vivo. *Cancer Res*. 1992; 52:6244-7.

Von Minckwitz G, Raab G, Bolhmer JU. Primary chemotherapy adapted on in-vivo chemosensitivity in patients with primary breast cancer. The pilot GEPARTRIO study. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2003; 22:85.

Webb DJ, Nguyen DH, Gonias SL. Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. *J Cell Sci*. 2000; 113:123-34.

Xiao W, Wang L, Ryan JM, Pater A, Liu H. Incorporation of na(125)I-labeled hexa-iodinated diglyceride analog into low-density lipoprotein and high specific uptake by cells of cervical carcinoma cell lines. *J. Drug Target*. 1999;152:250-6.

Yamamoto M, Ikeda K, Ohshima K, Tsugu H, Kimura H and Tomonaga M: Increased expression of low density lipoprotein receptor-related protein/ 2-macroglobulin receptor in human malignant astrocytomas. *Cancer Res*. 1997; 57:2799-805.