

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Marcadores prognósticos e preditivos e sua importância na  
individualização do tratamento de pacientes com câncer de mama**

**Aluno: Evandro de Azambuja**

**Orientador: Prof. Sérgio Saldanha Menna Barreto**

**Tese de Doutorado**

**2007**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Marcadores prognósticos e preditivos e sua importância na  
individualização do tratamento de pacientes com câncer de mama**

**Aluno: Evandro de Azambuja**

**Orientador: Prof. Sérgio Saldanha Menna Barreto**

**Tese de Doutorado**

**2007**

## Ficha Catalográfica

A991m **Azambuja, Evandro de**

Marcadores prognósticos e preditivos e sua importância na individualização do tratamento de pacientes com câncer de mama / Evandro de Azambuja ; orient. Sérgio Saldanha Menna Barreto. – 2007.

304 f.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Neoplasias mamárias 2. Marcadores biológicos de tumor 3. Prognóstico 4. Antígeno Ki-67 5. Genes erbB-2 6. Amplificação de genes 7. Paclitaxel I. Menna Barreto, Sérgio Saldanha II. Título.

NLM: WP 870

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## Agradecimentos

---

Aos meus amigos, que sempre estiveram presentes em todos os momentos de minha vida;

À amiga Mônica Vinhas de Souza, por ter sempre incentivado-me em todas as minhas decisões;

À amiga Daniela Dornelles Rosa, por ter orientado a realização desta tese e pelas suas competências  
extraordinárias;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo  
interesse e empenho no desenvolvimento da pesquisa clínica, o que me proporcionou a oportunidade  
de ampliar meus horizontes;

Ao meu orientador, Dr. Sérgio Saldanha Menna Barreto, que sempre me motivou para a realização de  
pesquisa;

Ao Dr James Fleck, que foi uma imagem profissional durante a residência médica e sempre me  
incentivou à pesquisa clínica como uma forma de realização profissional;

À Dra. Martine Piccart, por ter proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho no Instituto  
Jules Bordet;

---

## Dedicatórias

---

Aos meus pais, João e Nilva, por acompanharem o meu progresso tão de perto, por terem sempre colocado os estudos entre as prioridades e por não pouparem esforços para que eu chegasse aqui;

Aos meus irmãos, Giovani e Sandro, por sempre estarem presentes e terem ajudado-me mesmo apesar da distância;

À todos da família van Holderbeke, na Bélgica, por terem me acolhido com tanto carinho, tornando-se a minha segunda família.

---

## Lista de Abreviaturas da Tese

---

A: doxorubicina

AML ou LMA: leucemia mielóide aguda

CHF ou ICC: insuficiência cardíaca

CI ou IC: intervalo de confiança

CISH: hibridização in situ cromogênica

CM: câncer de mama

CMF: ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil

RC ou CR: resposta clínica

D: docetaxel

DFS ou SLD: sobrevida livre de doença

EC: epirubicina e ciclofosfamida

EFS ou SLE: sobrevida livre de evento

EGFR: receptor do fator de crescimento epitelial

ER ou RE: receptor de estrogênio

FAC: doxorubicina, ciclofosfamida e 5-fluorouracil

FEC: epirubicina, ciclofosfamida e 5-fluorouracil

FISH: hibridização in situ fluorescente

HEC: epirubicina em altas doses e ciclofosfamida

HER-2: receptor epidérmico humano 2

HR: *hazard ratio*

HT: hormonoterapia

IHC ou IHQ: imuno-histoquímica

LABC ou CMLA: câncer de mama localmente avançado

LMC: leucemia mielóide crônica

MBC ou CMM: câncer da mama metastático

MF: metotrexato, 5-fluorouracil

OR: razão de chance

ORR ou TRG: taxa de resposta global

OS ou SG: sobrevida global

p value: valor p

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

pCR ou RCp: resposta patológica completa

PCR: reação em cadeia por polimerase

PFS ou SLP: sobrevida livre de progressão

QT: quimioterapia

RR ou TR: taxa de resposta

RT: radioterapia

RT-PCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real

TAC: docetaxel, doxorubicina e ciclofosfamida

TTP ou TPP: tempo para progressão

T2A: topoisomerase II- $\alpha$

## Lista de Tabelas da Tese

---

Tabela 1. Sobrevida de 5 anos aproximada para pacientes com câncer de mama, de acordo com o estágio clínico AJCC.....24

Tabela 2a. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (tumor primário).....25

Tabela 2b. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (linfonodos regionais).....26

Tabela 2c. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (linfonodos regionais–classificação patológica).....27

Tabela 2d. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (Metástases à distância).....28



## Sumário

---

Resumo.....	13
Abstract.....	16
1. Introdução.....	19
2. Revisão da literatura sobre o câncer de mama.....	22
2.1 Epidemiologia.....	22
2.2 Dados histológicos.....	22
2.3 Estadiamento e prognóstico.....	23
2.4 Tratamento adjuvante do câncer de mama.....	29
3. Justificativa dos estudos.....	30
3.1 Importância da identificação de marcadores biológicos no CM.....	30
3.2 Obstáculos a uma mais ampla utilização dos tratamentos oncológicos.....	32
3.2.1 Quimioterapia.....	32
3.2.2 Hormonoterapia.....	33
3.2.3 Custo associado aos diferentes tratamentos.....	33
3.3 Padrões de expressão de genes.....	34
3.4 A expressão do Ki-67 no câncer de mama.....	34
3.4.1 O papel prognóstico do Ki-67 no câncer de mama.....	35
3.4.2 O papel preditivo do Ki-67 no câncer de mama.....	36
3.5 A superexpressão ou amplificação do HER-2.....	37

4.Objetivos.....	38
4.1 Objetivos do primeiro artigo.....	38
4.2 Objetivos do segundo artigo.....	38
4.3 Objetivos do terceiro artigo.....	38
5. Referências.....	39
6. Artigos em inglês	
6.1 Artigo 1 em inglês.....	49
6.1.1 Abstract.....	51
6.1.2 Introduction.....	52
6.1.3 Materials and methods.....	53
6.1.4 Results.....	56
6.1.5 Discussion.....	58
6.1.6 References.....	64
6.1.7 Tables and figures.....	78
6.2 Artigo 2 em inglês.....	96
6.2.1 Summary.....	98
6.2.2 Introduction.....	99
6.2.3 Materials and methods.....	100
6.2.4 HER-2 overexpression and resistance to taxanes: in vitro studies.....	100
6.2.5 HER-2 as a predictive marker of response to taxanes: clinical data.....	103

6.2.6 HER-2 extracellular domain as predictive factor of response to taxanes.....	112
6.2.7 Discussion .....	115
6.28 References.....	120
6.2.9 Figures and Tables.....	137
6.3 Artigo 3 em inglês.....	145
6.3.1 Abstract.....	147
6.3.2 Introduction.....	148
6.3.3 Patients and methods.....	149
6.3.4 Results.....	151
6.3.5 Discussion.....	154
6.3.6 References.....	159
6.3.7 Figures and tables.....	162
7. Artigos em português	
7.1 Artigo 1 em português.....	172
7.1.1 Sumário.....	174
7.1.2 Introdução.....	175
7.1.3 Materiais e métodos.....	176
7.1.4 Resultados.....	179
7.1.5 Discussão.....	182
7.1.6 Referências.....	189
7.1.7 Tabelas e figuras.....	203

7.2 Artigo 2 em português.....	222
7.2.1 Resumo.....	224
7.2.2 Introdução.....	225
7.2.3 Materiais e métodos.....	226
7.2.4 Superexpressão do HER-2 e resistências aos taxanos: estudos <i>in vitro</i> .....	226
7.2.5 HER-2 como preditor de resposta aos taxanos: dados clínicos.....	229
7.2.6 Domínio extracelular do HER-2 como fator preditivo de resposta taxanos.....	239
7.2.7 Discussão.....	242
7.2.8 Referências.....	248
7.2.9 Figuras e Tabelas.....	265
7.3 Artigo 3 em português.....	273
7.3.1 Resumo.....	275
7.3.2 Introdução.....	276
7.3.3 Pacientes e métodos.....	277
7.3.4 Resultados.....	279
7.3.5 Discussão.....	282
7.3.6 Referências.....	288
7.3.7 Figuras e tabelas.....	291
8. Conclusões e perspectivas.....	300

## **Resumo**

### **Artigo 1:**

Introdução: o anticorpo Ki-67/MIB-1 reage com uma proteína nuclear exclusivamente presente em células proliferantes e tem sido um dos marcadores mais utilizados para avaliar a proliferação celular, apresentando valor prognóstico e preditivo no câncer de mama em estágio precoce.

Objetivos: investigar o valor prognóstico do Ki-67 no câncer de mama em estágio precoce através de uma meta-análise de dados de literatura avaliando mais de 12,000 pacientes.

Métodos: os dados foram identificados através de busca em bases de dados eletrônicas (medline) e uma meta-análise avaliando a sobrevida livre de doença e a sobrevida global foi realizada.

Resultados: sessenta e oito estudos foram identificados e 46 estudos avaliando 12,155 pacientes foram utilizados na presente meta-análise. A sobrevida livre de doença foi avaliada em 38 estudos e a sobrevida global, em 35 estudos. A positividade do Ki-67/MIB-1 foi associada a uma maior probabilidade de recidiva na população global [HR=1,93 (IC 95%: 1,74-2,14); P<0.001], nas pacientes com linfonodos negativos [HR= 2,31 (IC 95%: 1,83-2,92); P<0.001] e nas pacientes com linfonodos positivos [HR=1,59 (IC 95%: 1,35-1,87); P<0.001]. A positividade do Ki-67/MIB-1 também foi associada a uma pior sobrevida global na população geral [HR=1,95 (IC 95%: 1,70-2,24; P<0.001)], nas pacientes com linfonodos negativos [HR= 2,54 (IC 95%: 1,65-3,91); P<0.001] e nas pacientes com linfonodos positivos [HR= 2,33 (IC 95%: 1,83-2,95); P<0.001].

Conclusões: a presente meta-análise sugere que a positividade do Ki-67/MIB-1 confere um alto risco de recidiva e morte nas pacientes com câncer de mama em estágio precoce.

### **Artigo 2:**

Introdução: o receptor epidérmico humano 2 (HER-2) é um marcador biológico importante, apresentando valor prognóstico e preditivo potencial em pacientes com câncer de mama.

Objetivos: sintetizar o conhecimento atual sobre a interação do HER-2 na quimioterapia a base de taxanos (paclitaxel ou docetaxel).

Métodos: os dados foram identificados através de busca em bases de dados eletrônicas (pubmed), livros de resumos de congressos e referências de artigos de revisão e originais.

Resultados e conclusões: Apesar de mais de uma década de pesquisa, o valor preditivo do HER-2 na quimioterapia a base de taxano ainda não é validado e, portanto, não está pronto para uso na prática clínica diária. Infelizmente, essa é a mesma situação para outros marcadores de resposta a QT. Para obter o desejado nível 1 de evidência, meta-análises de dados individuais e/ou estudos prospectivos com hipóteses biológicas são necessários.

### **Artigo 3:**

Introdução: a quimioterapia adjuvante, principalmente com a utilização de uma antraciclina, tem se tornado um tratamento quase que padrão para as pacientes com câncer de mama e linfonodos positivos. No entanto, apesar de várias pacientes receberem tratamento, apenas uma parte delas beneficia-se do mesmo.

Objetivos: investigar o papel a longo prazo da quimioterapia adjuvante (CMF e duas doses diferentes de epirrubicina) nas pacientes com câncer de mama e linfonodos positivos incluídas num estudo randomizado de fase III.

Métodos: os dados de 777 pacientes randomizadas em um estudo de fase III foram atualizados e as curvas de sobrevidas foram analisadas.

Resultados: a sobrevida livre de evento em 15 anos foi de 45% para as pacientes tratadas com CMF, 39% para as pacientes tratadas com EC e 50% para as pacientes tratadas com HEC. As *Hazard Ratios* (HR) e os intervalos de confiança a 95% [IC 95%] foram 0,77 (0,60-0,98, P = ,03) para HEC *versus* EC, 0,90 (0,70-1,15, P = ,39) para HEC *versus* CMF e 0,90 (0,70-1,15, P = ,21) para EC *versus* CMF. Não foram detectadas diferenças na sobrevida global entre os três braços de tratamento. A toxicidade cardíaca foi mais frequente no braço HEC do que no braço CMF (P=0,006), mas semelhante a do braço EC (P=0,21).

Conclusões: o tratamento com altas doses de epirrubicina demonstrou SLE superior quando comparado com epirrubicina em baixa dose, embora esse benefício não tenha sido visto quando comparado com CMF. Além disso, altas doses de epirrubicina resultaram em mais cardiotoxicidade, o que pode inviabilizar seu uso na prática diária.

**Palavras-chave:** câncer de mama, Ki-67, MIB-1, HER-2, amplificação, superexpressão, paclitaxel, docetaxel, quimioterapia.

## **Abstract**

### **Article 1:**

Background: Ki-67 monoclonal antibody reacts with a nuclear protein only present in proliferative cells and has been one of the most used markers to evaluate the cellular proliferation, having a prognostic and predictive role in early breast cancer patients.

Objectives: to investigate the prognostic value of Ki-67 in early breast cancer through a meta-analysis of published data including more than 12,000 patients.

Methods: data was identified through an electronic search (medline) and a meta-analysis looking at disease free and overall survivals was performed.

Results: sixty-eight studies were identified and 46 studies including 12,155 patients were evaluable for our meta-analysis; 38 studies were evaluable for the aggregation of results for DFS, and 35 studies for OS. Patients were considered to present positive tumors for the expression of Ki-67/MIB-1 according to the cut-off points defined by the authors. Ki-67/MIB-1 positivity is associated with higher probability of relapse in all patients [HR=1.93 (95%CI: 1.74-2.14); P<0.001], in node-negative patients [HR= 2.31 (95%CI: 1.83-2.92); P<0.001], and in node-positive patients [HR=1.59 (95%CI: 1.35-1.87); P<0.001]. Furthermore, Ki-67/MIB-1 positivity is associated with worse survival in all patients [HR=1.95 (95%CI: 1.70-2.24; P<0.001)], node-negative patients [HR= 2.54 (95%CI: 1.65-3.91); P<0.001], and node-positive patients [HR= 2.33 (95%CI: 1.83-2.95); P<0.001].

Conclusions: our meta-analysis suggests that Ki-67/MIB-1 positivity confers a higher risk of relapse and a worse survival in patients with early BC.



## **Article 2:**

Background: The epidermal human receptor 2 (HER-2) is an important biologic marker with potential prognostic and predictive role in patients with breast cancer.

Objectives: to summarize the knowledge of the interaction between HER-2 and the chemotherapy including a taxane (paclitaxel ou docetaxel).

Methods: data was identified through an electronic search (medline), abstract books, and proceeding of important meetings as well as review and original articles.

Results and conclusions: In conclusion, despite more than a decade of research, the predictive value of HER-2 regarding taxane-based CT is not yet validated and hence not ready to use in current clinical practice. This is unfortunately, the same situation for all other predictive markers of response to CT. To obtain the desired level 1 evidence, a well-conducted patient-based meta-analysis and/or prospective biologically based trials are needed.

## **Article 3:**

Background: adjuvant chemotherapy, particularly anthracycline-based, has become the standard treatment in women with lymph node positive breast cancer. However, many patients will be treated and only some will have benefits from this given treatment.

Objectives: to investigate the long-term outcome of adjuvant chemotherapy (CMF versus two different doses of epirubicin) in patients with lymph node positive breast cancer enrolled in a randomized phase III trial.

Methods: data of 777 randomized patients enrolled in a phase III study was updated and survival curves were constructed and analysed.

Results: the 15-year event free survival (EFS) was 45% for patients who received CMF, 39% for EC patients, and 50% for HEC patients. The hazard ratios (HR) and 95% confidence interval (CI) were 0.77 (95% CI, 0.60-0.98,  $p= 0.03$ ) for HEC versus EC, 0.90 (95% CI, 0.70-1.15,  $p= 0.39$ ) for HEC versus CMF, and 0.90 (95% CI, 0.70-1.15,  $p= 0.21$ ) for EC versus CMF. No difference in overall survival (OS) was seen. Cardiac toxicity was more frequent with HEC than with CMF ( $p=0.006$ ) but no more than with EC ( $p=0.21$ ). No significant difference in the incidence of acute myeloid leukaemia was seen.

Conclusions: treatment with high-dose epirubicin demonstrated superior EFS when compared with lower-dose epirubicin, although this benefit was not seen when compared with CMF. In addition, high-dose epirubicin resulted in more cardiotoxicity which may preclude its use in daily practice.

**Key words:** breast cancer, Ki-67, MIB-1, HER-2, amplification, overexpression, paclitaxel, docetaxel, chemotherapy.

## **1. Introdução:**

O câncer de mama (CM) invasivo é o tipo mais comum de câncer e é a segunda causa de morte por doenças malignas entre as mulheres no mundo ocidental. Uma melhora em sobrevida livre de doença e em sobrevida global tem sido documentada com o amplo uso de terapias sistêmicas adjuvantes, as quais são muitas vezes empiricamente empregadas [1]. O conhecimento de fatores prognósticos e/ou preditivos é de extrema importância para identificar quais pacientes possuem um risco aumentado de recidiva e para selecionar qual a terapia sistêmica mais apropriada para uma paciente específica.

Fatores prognósticos são aqueles que predizem o risco de recidiva ou de morte devido ao CM, independentemente do tratamento empregado. Fatores preditivos são aqueles que distinguem entre os pacientes que responderão a determinado tipo de tratamento. No entanto, a distinção entre o valor prognóstico ou preditivo de cada marcador nem sempre é evidente e os resultados dos estudos podem ser prejudicados devido ao grande número de estudos retrospectivos. Vários artigos avaliando diferentes fatores prognósticos e preditivos no CM foram publicados nos últimos 30 anos; entretanto, os únicos fatores prognósticos validados são o tamanho do tumor, a presença de linfonodos acometidos pelo tumor, a presença de receptores hormonais, o grau histológico e a idade no momento do diagnóstico [2]. Como fatores preditivos estabelecidos temos a presença de receptores hormonais e do receptor epidérmico humano 2 (HER-2) para a terapia endócrina e trastuzumab, respectivamente [3].

Devido à baixa especificidade da maioria dos tratamentos anti-neoplásicos, especialmente da quimioterapia, uma porção dos pacientes tratados não apresentam qualquer benefício, muito pelo contrário, sofrem com os efeitos tóxicos frequentemente associados à utilização destas drogas. A identificação de alvos moleculares relevantes para as drogas anti-neoplásicas ajudaria a identificar as pacientes com maior probabilidade de beneficiarem-se de um certo tratamento. Este benefício tem sido observado no caso dos novos agentes biológicos antineoplásicos para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias [4-11].

Mais recentemente, a avaliação do padrão de expressão de genes tem sido utilizada na tentativa de identificar os fatores preditivos de resposta a um tratamento específico [12-15]. Entretanto, essa técnica é relativamente complexa, onerosa e necessita ser validada para sua utilização na prática clínica diária.

Um exemplo de um marcador utilizado como rotina, mas que não é totalmente validado, é o Ki-67, o qual está presente em células proliferativas. Esse antígeno reage com uma proteína nuclear não-histona de 395 KD, presente nas fases ativas do ciclo celular, mas não na fase G0 [16-17].

Outro marcador biológico, de realização mais simples e que tem sido largamente utilizado como fator preditivo de resposta à quimioterapia e como fator prognóstico, é o gene HER-2 e a sua respectiva proteína [4]. Embora, atualmente, a superexpressão e/ou amplificação do HER-2 sejam amplamente aceitas como fatores prognósticos no CM, o seu papel como fator preditivo de resposta à quimioterapia citotóxica não está bem estabelecido.

Em resumo, o estudo dos fatores prognósticos e preditivos e a relação entre estes e outros parâmetros clínico-biológicos, bem como a escolha da melhor quimioterapia adjuvante, no CM não-metastático, tem sido uma das linhas de pesquisa no Instituto Jules Bordet. Isto justifica, portanto, a escolha deste tema para desenvolvimento da presente tese.

## 2. Revisão da literatura sobre o câncer de mama

### 2.1 Epidemiologia

Os tumores malignos de mama constituem a doença maligna mais frequente em mulheres na maior parte dos países desenvolvidos, assim como em algumas regiões da América do Sul. Dados recentes apresentados pelo programa de seguimento, epidemiologia e resultados finais dos Estados Unidos (SEER), mostraram que a incidência anual do CM apresentou um aumento importante entre os anos de 1980 e 1987 (3,7% por ano), seguido de um menor aumento (0,5% ao ano) entre os anos de 1987 e 2001, após o qual houve uma estabilização entre os anos de 2001 e 2003 [18]. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para 2006 é de aproximadamente 48,000 novos casos; a maior incidência é observada nas regiões Sul e Sudeste. As maiores taxas médias de incidência anuais ajustadas por idade por 100 mil mulheres foram vistas em São Paulo (1997-1998: 94,0), no Distrito Federal (1996-1998: 86,1) e em Porto Alegre (1993-1997: 66,5) [19]. As taxas de incidência do CM aumentam com a idade, alcançando seu pico na faixa etária de 65 a 70 anos.

### 2.2 Dados histológicos

A grande maioria dos tumores malignos da mama é do tipo epitelial (70-80% carcinomas ductais, 10-20% carcinomas lobulares, além de outros tipos histológicos mais raros) [20]. Tipos raros de tumores que acometem a mama são: tumor filóides, angiossarcoma e linfoma primário da mama.

### 2.3 Estadiamento e prognóstico

O CM é associado a um prognóstico favorável, quando diagnosticado em estágios iniciais. A taxa de sobrevida em 5 anos para o CM é de 89%, independentemente do estágio. Essa taxa corresponde a 100% para os estágios I, 89% para os estágios II, 60% para os estágios III e apenas 21% para os estágios IV, como demonstrado na tabela 1 [18].

Segundo o último consenso de St. Gallen em 2005, algumas pacientes constituem um grupo de alto risco de recidiva e óbito e, em geral, devem ser tratadas de maneira mais agressiva. Os principais fatores associados ao alto risco são: idade inferior a 35 anos, tumores com mais de 2 cm, invasão de linfonodos axilares, invasão linfo-vascular, alto grau histológico, ausência de receptores hormonais e superexpressão do HER-2 [21]. Já o CM metastático deve ser visto como uma doença incurável, apesar de ter apresentado um aumento de sobrevida nas últimas décadas, variando de 438 dias nos anos 1991-1992 a 667 dias nos anos 1999-2001 [22]. Detalhes sobre o estadiamento do CM podem ser encontrados nas tabelas 2A, 2B, 2C e 2D.

**Tabela 1.** Sobrevida de 5 anos aproximada para pacientes com câncer de mama, de acordo com o estágio clínico AJCC (Fonte: Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program 2007)

<b>Estágio</b>	<b>Sobrevida relativa a 5 anos</b>
<b>0</b>	100%
<b>I</b>	100%
<b>II</b>	89%
<b>III</b>	60%
<b>IV</b>	21%



**Table 2A.** Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (tumor primário)

<b>Tumor primário (T)</b>	
Categoria TNM	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	CDIS, CLIS, ou doença de Paget do mamilo sem invasão do tecido mamário normal  Tis (CDIS): carcinoma ductal in situ  Tis (CLIS): carcinoma lobular in situ  Tis (Paget's): doença de Paget do mamilo sem tumor [doença de Paget do mamilo com tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor]  CDIS= carcinoma ductal in situ; CLIS= carcinoma lobular in situ
T1	Tumor ≤2.0 cm em sua maior dimensão
T1mic	Microinvasão ≤0.1 cm em sua maior dimensão
T1a	Tumor >0.1 cm mas ≤0.5 cm em sua maior dimensão
T1b	Tumor >0.5 cm mas ≤1.0 cm em sua maior dimensão
T1c	Tumor >1.0 cm mas ≤2.0 cm em sua maior dimensão
T2	Tumor >2.0 cm mas ≤5.0 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor >5.0 cm em sua maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta para (a) parede torácica ou (b) pele, somente como descrito abaixo
T4a	Extensão para a parede torácica, não incluindo o músculo peitoral
T4b	Edema (incluindo “peau d’orange”) ou ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites na mesma mama
T4c	Ambos T4a and T4b
T4d	Carcinoma inflamatório

**Tabela 2B.** Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (linfonodos regionais)

Linfonodos regionais (N)	
Categoria TNM	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados (por exemplo, previamente removidos)
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástase(s) para linfonodo(s) axilar(es) ipsilateral(is) móvel(is)
N2	Metástase(s) para linfonodo(s) axilar(es) ipsilateral(is) fixo(s) uns aos outros, ou para linfonodos mamários internos (cl clinicamente suspeitos*) na ausência de metástases linfonodais clinicamente evidentes
N2a	Metástase(s) para linfonodo(s) axilar(es) ipsilateral(is) fixo(s) uns aos outros ou em outras estruturas
N2b	Metástases somente em linfonodos mamários internos clinicamente suspeitos* e na ausência de metástases linfonodais clinicamente evidentes
N3	Metástases para linfonodo(s) infraclavicular(es) ipsilateral(is) com ou sem envolvimento axilar, ou para linfonodo(s) mamário(s) interno(s) ipsilateral(is) clinicamente suspeito(s)* e na presença de metástases linfonodais clinicamente evidentes; ou metástase(s) para linfonodo(s) supraclavicular(es) ipsilateral(is) com ou sem envolvimento axilar ou mamário interno
N3a	Metástase(s) para linfonodo(s) infraclavicular(es) ipsilateral(is)
N3b	Metástase(s) para linfonodo(s) mamário(s) interno(s) ipsilateral(is) e envolvimento linfonodal axilar
N3c	Metástase(s) para linfonodo(s) supraclavicular(es) ipsilateral(is)

\* Clinicamente suspeito é definido como detectado por exames de imagem (excluindo linfocintilografia) ou por exame clínico ou grosseiramente visível no exame anatomopatológico

**Tabela 2C.** Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (linfonodos regionais - classificação patológica)

Linfonodos regionais (N) – classificação patológica (pN)*	
Categoria TNM	
pNX	Linfonodo(s) regional(is) não pode(m) ser avaliado(s) (por exemplo, não ressecados ou previamente removidos)
pN0	pN0: Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), sem exame adicional para células tumorais isoladas (CTI**)
pN1	Metástases para 1–3 linfonodo(s) axilar(es), e/ou mamário(s) interno(s) com doença microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela mas não clinicamente suspeito****
pN1mi	Micrometástases (>0.2 mm mas ≤2.0 mm)
pN1a	Metástases para 1–3 linfonodos axilares
pN1b	Metástases para linfonodos mamários internos com doença microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela mas não clinicamente suspeito****
pN1c	Metástases para 1–3 linfonodos axilares e mamários internos com doença microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela mas não clinicamente suspeitos**** (se associado com >3 linfonodos axilares positivos, os linfonodos mamários internos são classificados como pN3b, para melhor refletir a extensão tumoral)
pN2	Metástases para 4–9 linfonodos axilares, ou para linfonodos mamários internos clinicamente suspeitos**** na ausência de metástases linfonodais axilares ipsilaterais fixas umas as outras ou a outras estruturas vizinhas
pN2a	Metástases para 4–9 linfonodos axilares (ao menos 1 depósito tumoral >2.0 mm)
pN2b	Metástases para linfonodos mamários internos clinicamente suspeitos**** na ausência de metástases para linfonodos axilares
pN3	Metástases para 10 ou mais linfonodos axilares, ou para linfonodos infraclaviculares, ou para linfonodos mamários internos ipsilaterais clinicamente suspeitos**** na presença de 1 ou mais linfonodo(s) axilar(es) positivo(s); ou para mais de 3 linfonodos axilares com metástases microscópicas (cl clinicamente negativas) nos linfonodos mamários internos; ou linfonodos supraclaviculares ipsilaterais
pN3a	Metástases para 10 ou mais linfonodos axilares (ao menos 1 depósito tumoral >2.0 mm), ou metástases para linfonodos infraclaviculares
pN3b	Metástases para linfonodos mamários internos clinicamente suspeitos**** na presença de 1 ou mais linfonodo(s) axilar(es); ou em mais de 3 linfonodos axilares e em linfonodos mamários internos com doença microscópica detectada por dissecação do linfonodo sentinela mas não clinicamente suspeito****
pN3c	Metástases para linfonodos supraclaviculares ipsilaterais

Notas: \* Essa classificação é baseada na dissecação de linfonodos axilares com ou sem dissecação de linfonodo sentinela. A classificação baseada somente na dissecação de linfonodo sentinela sem dissecação axilar subsequente é designada "sn" (de linfonodo sentinela, por exemplo, pN0(I+) (sn)).

\*\* Células tumorais isoladas (CTI) são definidas como células únicas ou pequeno grupo de células (cluster) (≤0.2 mm), geralmente detectadas por imunohistoquímica (IHC) ou métodos moleculares

*mas que podem ser verificadas por coloração de H&E. Em geral, CTIs não apresentam evidência de atividade maligna, como proliferação ou reação estromal.*

- pN0(I-): Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), IHC negativa
- pN0(I+): Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), IHC positiva, ausência de cluster >0.2 mm
- pN0(mol-): Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), marcadores moleculares negativos (RT-PCR)\*\*\*
- pN0(mol+): Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), marcadores moleculares positivos (RT-PCR)\*\*\*

\*\*\* RT-PCR: transcriptase reversa -reação em cadeia de polimerase.

\*\*\*\* Clinicamente suspeito é definido como detectado por exames de imagem (excluindo linfocintilografia) ou por exame clínico

**Tabela 2D.** Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (Metástases à distância)

<b>Metástases à distância (M)</b>	
Categoria TNM	
MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância

## 2.4 Tratamento adjuvante do câncer de mama

O tratamento do CM não-metastático deve ser sempre considerado como potencialmente curativo. A ressecção cirúrgica deve ser sempre considerada parte fundamental do tratamento do CM e ela pode ser realizada como primeiro tratamento ou após um período de tratamento sistêmico (quimioterapia ou hormonoterapia).

A hipótese de que um tratamento sistêmico adjuvante (após a cirurgia) poderia aumentar as chances de sobrevida em mulheres com CM não-metastático foi formulada no final dos anos 1960 e início dos anos 1970. A partir desse momento, avanços importantes têm sido descritos graças à realização de grandes estudos prospectivos e randomizados [23].

A meta-análise realizada pelo grupo cooperativo do câncer de mama inicial (EBCTCG) demonstrou que a quimioterapia adjuvante reduz o risco de recidiva e morte em pacientes com CM operável, independente da idade, do acometimento de linfonodos, dos receptores hormonais e do estado menopausal. Em pacientes com CM e linfonodos positivos, o uso de quimioterapia adjuvante à base de antraciclina (epirrubicina ou doxorubicina) é associado com uma redução de risco absoluto de recidiva e morte em torno de 4% quando comparada ao esquema utilizando CMF; esse benefício persiste após 15 anos de seguimento, com uma redução do risco de morte pelo CM em pacientes jovens em torno de 26% [24-25]. Mais recentemente, vários estudos têm demonstrado um benefício com a adição de um taxano (concomitante ou em sequência a uma antraciclina), particularmente, no grupo de pacientes com linfonodos positivos [26-32].

Outros tratamentos adjuvantes consistem, em alguns casos, de radioterapia (RT) e de tratamento hormonal (HT) no caso de pacientes com tumores responsivos a manipulações hormonais (isto é, com expressão de receptores hormonais) [25]. Mais recentemente, o anticorpo monoclonal trastuzumab tem sido também empregado em pacientes com tumores que apresentam superexpressão e/ou amplificação do HER-2 [33-36]. Este tratamento demonstrou uma redução importante no risco de recidiva nas pacientes com CM e superexpressão ou amplificação do HER-2, quando utilizado concomitante com quimioterapia (taxano) ou após o término da quimioterapia (QT).

Apesar do grande avanço no uso de tratamento sistêmicos, o CM metastático ainda continua sendo uma doença letal. Em geral, as pacientes são tratadas de maneira paliativa, com a utilização sequencial de tratamentos do tipo HT, QT e RT, além de um número crescente de tratamentos biológicos [5-6,37].

### **3. Justificativa dos estudos**

#### **3.1 Importância da identificação de marcadores preditivos e prognósticos no CM**

Em uma recente revisão realizada pelo nosso grupo sobre os marcadores prognósticos e preditivos no CM não-metastático, mais de 150,000 pacientes foram incluídas entre todos os estudos, demonstrando o importante esforço na tentativa de melhor classificar tais pacientes em função do risco e melhor selecionar um tratamento individual. A grande maioria dos marcadores examinados foi obtida a

partir de estudos com nível de evidência III ou IV, portanto, sem valor prognóstico ou preditivo ainda definido [1].

Exemplos de marcadores estudados como fatores prognósticos ou preditivos no CM são: 3H-índice de timidina marcada (TLI), citometria de fluxo, tirosina quinase, Ki-67, ciclinas (A, D, E), p27, p21, superexpressão do HER-2 e topoisomerase II alfa (T2A) [1].

As razões para críticas a esses estudos são: a) a sua grande maioria é de origem retrospectiva; b) os blocos de tumores analisados costuma ser arquivados e manejados em diferentes condições; c) a maioria dos pacientes incluídas nos estudos clínicos não é incluída nos estudos translacionais; d) a heterogeneidade das pacientes estudadas; 5) os diferentes métodos para avaliar a expressão desses marcadores bem como os diferentes valores de referência; 6) falta de padronização e controle de qualidade entre os diferentes métodos; e, às vezes, 7) o relativo curto tempo de seguimento dessas pacientes.

No entanto, conclusões importantes podem ser retiradas desses estudos, mesmo que eles apresentem alguns vieses. Primeiramente, a atividade proliferativa parece ter um papel importante no comportamento do CM, com possíveis implicações na seleção de tratamento (por exemplo, a terapia de dose intensificada). Segundo, a padronização dos métodos de avaliação, com controle de qualidade intralaboratorial e interlaboratorial são os primeiros requisitos para a avaliação de um marcador. Terceiro, o planejamento de estudos prospectivos e randomizados avaliando um ou mais marcador proliferativo é de importância crucial.

### 3.2 Obstáculos a uma mais ampla utilização dos tratamentos oncológicos

Apesar destes dados encorajantes, a quimioterapia adjuvante tem sido administrada em várias pacientes, embora uma porção destas não obterá benefício algum, muito pelo contrário, estará sujeita aos efeitos adversos desses tratamentos.

#### 3.2.1 Quimioterapia

A quimioterapia, amplamente utilizada no tratamento adjuvante do CM, muitas vezes oferece um ganho de sobrevida relativamente modesto. Por exemplo, o ganho absoluto de sobrevida é de apenas 2-3% em pacientes pós-menopáusicas e de 8-12% em pacientes pré-menopáusicas [25]. Separando esse benefício por classe de drogas, podemos ver que a administração de antraciclinas resulta num ganho absoluto de sobrevida de apenas 4% em relação aos regimes sem antraciclinas (em geral, ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil [CMF] ou variações deste esquema) [25]. Da mesma forma, a adição de taxanos parece resultar num ganho absoluto de menos de 5% (em termos de redução do risco de recidiva), com um impacto ainda incerto sobre a sobrevida a longo prazo e para um subgrupo de pacientes ainda não bem definido [26-32].

Devemos levar em consideração que vários efeitos adversos imediatos da quimioterapia são bem conhecidos, tais como alopecia, mielotoxicidade (neutropenia/infecção, anemia e trombocitopenia), fadiga, mucosite, vômitos, flebite periférica, eventos tromboembólicos [38], e menopausa precoce [39], além de problemas psicológicos e cognitivos diversos [40]. Para pacientes tratadas com taxanos, existe ainda um risco de neuropatia periférica sensitiva e dores ósteo-



articulares [26-32]. Para as pacientes tratadas com antraciclina, apesar de baixo, ainda existe um risco de efeitos adversos tardios potencialmente graves, tais como a cardiomiopatia (insuficiência cardíaca) que ocorre em 0,3-1,5% das pacientes [41-42] e a leucemia mieloide aguda, que ocorre em 0,2-1,7% dos casos [43-45]

### 3.2.2 Hormonoterapia

Durante várias décadas, o uso de tamoxifeno por um período de 5 anos foi o agente hormonal mais importante no tratamento adjuvante do CM em pacientes com tumores que possuem receptores hormonais [23]. A partir de 2002, uma revolucionária mudança no tratamento adjuvante das pacientes pós-menopáusicas com CM aconteceu com o uso dos inibidores de aromatase, quando utilizados em sequência ou em substituição ao tamoxifeno [46-52].

Apesar do uso dos inibidores de aromatase estar sendo incorporado na prática clínica, os efeitos adversos tardios ainda não são bem conhecidos. Sabe-se que têm sido associados a um risco maior de osteoporose [53-55], sintomas osteoarticulares [46-52] e dislipidemia [56]. Na maior parte dos estudos, o efeito destas drogas (em termos de redução do risco de recidiva) foi relativamente modesto (13-40%), e o impacto sobre a sobrevida ainda é discutível.

### 3.2.3 Custo associado aos diferentes tratamentos

Um aspecto muito importante a ser considerado na decisão terapêutica é o custo dos tratamentos oncológicos, uma questão particularmente importante para países em desenvolvimento, mas também para países desenvolvidos com sistemas

de saúde essencialmente financiados por fundos públicos [57]. Como exemplos de que o custo tem-se tornado um dos fatores limitante à utilização de certos tratamentos a nível populacional podemos citar o caso dos novos agentes hormonais utilizados no tratamento do CM [46-52] ou do trastuzumab, o qual é indicado para tratamento do CM apresentando a superexpressão do HER-2 [58-59].

### 3.3 Padrões de expressão de genes

Existe atualmente um grande interesse na investigação de padrões de expressão de genes como fatores prognósticos e preditivos em tumores sólidos, sobretudo no CM [12-15]. No entanto, estas técnicas têm-se mostrado complexas e caras, sendo dificilmente aplicáveis a todos os centros envolvidos no tratamento do câncer. Por essa razão, a identificação de testes mais simples e facilmente reproduzíveis é necessária.

### 3.4 A expressão do Ki-67 no CM

A proliferação celular pode ser analisada usando a técnica de imunohistoquímica para avaliar os antígenos associados à proliferação em tecidos tumorais. Esse é um método barato e facilmente realizado em todos os departamentos de anatomia patológica. No entanto, existem alguns problemas ligados à técnica, tais como a subjetividade da avaliação e os diferentes reagentes entre os diferentes anticorpos disponíveis para detectar um antígeno específico. Vários anticorpos que reagem com diferentes antígenos nucleares de proliferação têm sido descritos, tais como PCNA, Ki-67, MIB-1 e KS1, entre outros.

O anticorpo monoclonal Ki-67 foi identificado em 1983 e reage com uma proteína nuclear exclusivamente presente em células proliferantes e cuja função permanece desconhecida [17]. Uma detalhada análise do ciclo celular revela que este antígeno está presente no núcleo das células em quase todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0. Visto que essa proteína está presente em todas as células proliferantes (normais e tumorais), o Ki-67 tornou-se um importante marcador para avaliar a fração de crescimento de uma determinada população celular. Inicialmente, o anticorpo monoclonal Ki-67 só podia ser avaliado em tecido fresco ou congelado, uma vez que a fixação reduzia ou abolia a coloração. Entretanto, esse problema foi resolvido com a preparação de um outro anticorpo monoclonal equivalente, o MIB-1 (anticorpo que reconhece o antígeno Ki-67), o qual pode ser avaliado em tumores preservados em secções parafina após a exposição do antígeno [16]. Uma boa correlação entre esses dois anticorpos foi demonstrada [60-61], tornando possível a investigação do potencial prognóstico do Ki-67 em estudos retrospectivos utilizando blocos de tumor conservados em parafina e formalina.

#### 3.4.1. O papel prognóstico do Ki-67 no CM

Na última década, um grande número de estudos foi publicado e, mesmo após ter em consideração todos os vieses inevitáveis em favor dos estudos positivos, está claro que a proteína Ki-67/MIB-1 possui um papel prognóstico em diferentes tipos de tumores malignos. Em relação ao CM, a maioria dos estudos selecionados demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre a presença de expressão de Ki-67/MIB-1 e desfecho clínico (sobrevida livre de doença e/ou

sobrevida global), entretanto, quase todos os estudos são de origem retrospectiva [61-66]. Apesar da expressão da proteína Ki-67/MIB-1, expressa como um índice: percentagem de células marcadas positivamente, ser amplamente utilizada como ferramenta de rotina para acessar um o prognóstico do CM, ela não é considerada como exame um padrão [25, 67], devido à falta de uma padronização no método de exposição do antígeno, dos procedimentos de coloração e dos métodos de quantificação (semiquantitativo e quantitativo)

#### 3.4.2. O papel preditivo do Ki-67 no CM

O Ki-67 foi avaliado retrospectivamente e prospectivamente em poucos estudos de tratamento sistêmico primário (TSP) com o intuito de identificar marcadores biológicos de resposta que poderiam ser utilizados como meios de predição do desfecho a longo termo. O único estudo prospectivo realizado falhou em demonstrar uma correlação entre a alta atividade proliferativa e a resposta ao TSP, mas o Ki-67 foi determinado em tumores invasivos através de aspiração por agulha fina antes do início da quimioterapia e repetido antes do segundo ciclo de tratamento [68]. Nesse caso, o tratamento utilizado também não pode ser considerado como padrão (mitroxantrona, metotrexate ± mitomicina C), e o seguimento dos pacientes era relativamente curto.

### 3.5 A superexpressão ou amplificação do HER-2

O HER-2 é um gene localizado no braço longo do cromossomo 17, responsável pela síntese da proteína de mesmo nome que, por sua vez, pode ser detectada na superfície das células tumorais. O interesse maior deste gene é o seu valor prognóstico no CM, o qual classifica a paciente como alto risco de recidiva e morte, bem como o seu valor preditivo de resposta ao tratamento com compostos 'anti HER-2' (como o anticorpo monoclonal trastuzumab e o inibidor da tirosina quinase lapatinib). O valor preditivo desse gene no CM também tem sido observado no caso do tamoxifen ou das antraciclinas. O seu valor preditivo na resposta à quimioterapia a base de taxanos (paclitaxel ou docetaxel) ainda está em debate e é alvo de um dos estudos apresentados nesta tese. No caso das antraciclinas, existe uma explicação razoável, visto que o alvo desse grupo de drogas é a topoisomerase II alfa (T2A), que é um gene localizado à vizinhança do HER-2 [69], no mesmo braço longo do cromossomo 17.

## **4. Objetivos**

### 4.1 Artigo 1

Investigar o impacto da expressão do Ki-67 na sobrevida livre de doença e na sobrevida global em mais de 12,000 pacientes com câncer de mama em estágio precoce através de uma meta-análise de estudos publicados na literatura médica.

### 5.2 Artigo 2

Sintetizar o conhecimento atual sobre a interação entre a superexpressão do HER-2 e a quimioterapia a base de taxanos (paclitaxel ou docetaxel) no com câncer de mama através de uma revisão de estudos pré-clínicos e clínicos publicados na literatura médica.

### 4.3 Artigo 3

Investigar o impacto da quimioterapia adjuvante (CMF, EC ou HEC) na sobrevida livre de eventos e na sobrevida global de 777 pacientes com câncer de mama e linfonodos positivos incluídas num estudo randomizado de fase III e identificar subgrupos de pacientes que possam beneficiar-se mais de um dos três tratamentos administrados. Avaliar os efeitos tardios das antraciclinas, principalmente insuficiência cardíaca congestiva e leucemias agudas, nas pacientes tratadas com altas doses de epirrubicina.

## **5. Referências:**

- [1] Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, et al. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005; 16: 1723-1739.
- [2] Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, et al. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 2: 3357-3365.
- [3] Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1865-1878.
- [4] Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al.. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999 ; 17: 2639-2648.
- [5] Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002 ; 20: 719-726.
- [6] Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 2733-2743.
- [7] Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347: 472-480.

- [8]** Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353: 133-144.
- [9]** Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-655.
- [10]** Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500.
- [11]** Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 5900-5909.
- [12]** Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003 ; 362: 362-369.
- [13]** Ayers M, Symmans WF, Stec J, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2284-2293.
- [14]** Folgueira MA, Carraro DM, Brentani H, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7434-7443.



- [15] Thuerigen O, Schneeweiss A, Toedt G, et al. Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1839-1845.
- [16] Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168: 357-363.
- [17] Gerdes J, Schwab U, Lemke K, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
- [18] Hayat MJ, Howlader N, Reichman RE, et al. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12: 20-37.
- [19] <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=comentarios.asp&ID=13>.
- [20] Breast, In: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 6<sup>th</sup> ed. New York, NY: Springer, 2002, pp 171-180.
- [21] Goldhirsh A, Glick JH, Gelber RG et al. Panel Members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005; 16: 1569-1583.
- [22] Chia SKL, Speers C, Kang D'Yachkova Y, et al. The impact of new chemotherapeutic and hormonal agents on the survival of women with metastatic breast cancer (MBC) in a population based cohort. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 6 (abst 22)

- [23]** Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, et al. Breast cancer: achievements in adjuvant systemic therapies in the pre-genomic era. *Oncologist* 2006; 11: 115-125.
- [24]** Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998; 352: 930-942.
- [25]** Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005; 365 (9472): 1687-1717.
- [26]** Martin M, Pienkowski T, Mackey J, et al. Breast Cancer International Research Group 001 Investigators. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2302-2313.
- [27]** Roché H, Fumoleau P, Spielmann M, et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5664-5671.
- [28]** Mamounas EP, Bryant J, Lembersky BC, et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3686-3696.
- [29]** Henderson C., Berry D.A., Demetri G.D. et al., Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer, *J Clin Oncol* 2003; 21: 976-983.
- [30]** Martín M, Rodríguez-Lescure A, Ruiz A, et al. Multicenter, randomized phase III study of adjuvant chemotherapy for node positive breast cancer comparing 6 cycles

of FE<sub>90</sub>C versus 4 cycles of FE<sub>90</sub>C followed by 8 weekly paclitaxel administrations: interim efficacy analysis of GEICAM 9906 Trial. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94 (Suppl 1): S20 (abstract 39).

**[31]** Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2019-2027.

**[32]** Heys SD, Hutcheon AW, Sarkar TK, et al. Neoadjuvant docetaxel in breast cancer: 3-year survival results from the Aberdeen trial. *Clin Breast Cancer* 2002; 3 Suppl 2: S69-74.

**[33]** Piccart-Genhart MJ; Procter M, Leyland-Jones B et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-1672.

**[34]** Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1673-1684.

**[35]** Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. BCIRG 006: 2<sup>nd</sup> interim analysis phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC→TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2006: 100 (abstract 2).

- [36] Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354: 809-820.
- [37] Miller KD, Wang M, Gralow J, et al. A randomized phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel plus bevacizumab as first-line therapy for locally recurrent or metastatic breast cancer: a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2100). *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94 (Suppl 1): S6 (abstract 3).
- [38] Pritchard KI, Paterson AH, Paul NA, et al. Increased thromboembolic complications with concurrent tamoxifen and chemotherapy in a randomized trial of adjuvant therapy for women with breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Breast Cancer Site Group. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2731-2737.
- [39] Shapiro CL, Manola J, Leboff M. Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3306-3311.
- [40] Stewart A, Bielajew C, Collins, B, et al. A meta-analysis of the neuropsychological effects of adjuvant chemotherapy treatment in women treated for breast cancer. *Clin Neuropsychol* 2006; 20:76-89.
- [41] Fumoleau P, Roche H, Kerbrat P, et al. French Adjuvant Study Group. Long-term cardiac toxicity after adjuvant epirubicin-based chemotherapy in early breast cancer: French Adjuvant Study Group results. *Ann Oncol* 2006;17: 85-92.
- [42] Bonnetterre J, Roche H, Kerbrat P, et al. Long-term cardiac follow-up in relapse-free patients after six courses of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, with

either 50 or 100 mg of epirubicin, as adjuvant therapy for node-positive breast cancer: French adjuvant study group. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3070-3079.

**[43]** Smith RE, Bryant J, DeCillis A, et al. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1195-1204.

**[44]** Crump M, Tu D, Shepherd L, et al. Risk of acute leukemia following epirubicin-based adjuvant chemotherapy: a report from the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3066-3071.

**[45]** Campone M, Roche H, Kerbrat P, et al. Secondary leukemia after epirubicin-based adjuvant chemotherapy in operable breast cancer patients: 16 years experience of the French Adjuvant Study Group. *Ann Oncol* 2005; 16:1343-1351.

**[46]** Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, et al. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 2003 ; 21: 2101-2109.

**[47]** Paridaens R, Therasse P, Dirix L, et al. First line hormonal treatment (HT) for metastatic breast cancer (MBC) with exemestane (E) or tamoxifen (T) in postmenopausal patients (pts) – A randomized phase III trial of the EORTC Breast Group. *Journal of Clinical Oncology* 2004 ; 22 (14S): abstract 515.

**[48]** Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, et al. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group. A comparison of letrozole and tamoxifen in

postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 2747-2757.

**[49]** Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1262-1271.

**[50]** Howell A, Cuzik J, Baum M, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 60-62.

**[51]** Jakesz R, Jonat W, Gnant M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005; 366 (9484): 455-462.

**[52]** Coombes RC, Kilburn L, Snowdon C, Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen (Intergroup Exemestane Study). *Lancet* 2007; 369: 559-570.

**[53]** Coleman RE, Banks LM, Girgis SI, et al. Skeletal effect of exemestane on bone mineral density, bone biomarkers, and fracture incidence in postmenopausal women with early breast cancer participating in the Intergroup Exemestane Study (IES): a randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2007; 8: 119-127.

**[54]** Coleman RE, on behalf of the ATAC Trialists' Group. Effect of anastrozole on bone mineral density: 5-year results from the 'Arimidex', Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) trial. *J Clin Oncol* 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S: 511.

**[55]** Perez EA, Josse RG, Pritchard KI, et al. Effect of letrozole versus placebo on bone mineral density in women with primary breast cancer completing 5 or more years of adjuvant tamoxifen: a companion study to NCIC CTG MA.17. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3629-3635.

**[56]** McCloskey E, Hannon R, Lakner G, et al. The letrozole (L), exemestane (E), and anastrozole (A) pharmacodynamics (LEAP) trial: A direct comparison of bone biochemical measurements between aromatase inhibitors (AIs) in healthy postmenopausal women. *J Clin Oncol* 2006; 24 (18S): abstract 555.

**[57]** Mano M. The burden of scientific progress: growing inequalities in the delivery of cancer care. *Acta Oncol* 2006; 45:84-86.

**[58]** Barrett A, Roques T, Small M, et al. How much will Herceptin really cost? *BMJ* 2006; 333: 1118-1120.

**[59]** Kurian AW, Thompson RN, Gaw AF, et al. A cost-effectiveness analysis of adjuvant trastuzumab regimens in early HER2/neu-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 634-641.

**[60]** Veronese SM, Maisano C, Scibilia J. Comparative prognostic value of Ki-67 and MIB-1 proliferation indices in breast cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 2717-2722.

**[61]** Querzoli P, Albonico G, Ferretti S, et al. MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis. *J Clin Pathol* 1996; 49: 926-930.

**[62]** Railo M, Nordling S, von Boguslawsky K, et al. Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br J Cancer* 1993;68: 579-583.

- [63]** Railo M, Lundin J, Haglund C, et al. Ki-67, p53, Er-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol* 1997; 36: 369-374.
- [64]** Gaglia P, Bernardi A, Venesio T, et al. Cell proliferation of breast cancer evaluated by anti-BrdU and anti-Ki-67 antibodies: its prognostic value on short-term recurrences. *Eur J Cancer* 1993; 29A (11): 1509-1513.
- [65]** Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 42-49.
- [66]** Goodson WH, 3rd, Moore DH, Ljung BM, et al. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 113-123.
- [67]** Eifel P, Axelson JA, Costa J, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 979-989.
- [68]** Chang J, Powles TJ, Allred DC, et al. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3058-3063.
- [69]** Jarvinen TA, Liu ET. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78: 299-311.



## **7.1 Artigo 1 em português**

Br J Cancer; no prelo

*IF 2005 4.115*

**O Ki-67 como um marcador prognóstico no câncer de mama em estágio precoce: uma meta-análise de estudos publicados envolvendo 12,155 pacientes**

**O Ki-67 como um marcador prognóstico no câncer de mama em estágio precoce: uma meta-análise de estudos publicados envolvendo 12,155 pacientes**

Evandro de Azambuja<sup>1,2</sup>, Fatima Cardoso<sup>1</sup>, Gilberto de Castro Jr<sup>1</sup>, Mariantonietta Colozza<sup>3</sup>, Max S. Mano<sup>1</sup>, Virginie Durbecq<sup>1</sup>, Christos Sotiriou<sup>1</sup>, Denis Larsimont<sup>1</sup>, Martine J Piccart-Gebhart<sup>1</sup>, Marianne Paesmans<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Clínica de Oncologia Médica, Instituto Jules Bordet, 125 Boulevard de Waterloo, 1000, Bruxelas, Bélgica

<sup>2</sup> Estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2400 Ramiro Barcelos, 90035-003, Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> S.C. Oncologia Médica, Azienda Ospedaliera, Via Brunamonti, 51-06122, Perugia, Itália

<sup>4</sup> Centro de Dados, Instituto Jules Bordet, 125 Boulevard de Waterloo, 1000, Bruxelas, Bélgica

Correspondência para:

Marianne Paesmans, MSc

Instituto Jules Bordet

Boulevard de Waterloo, 125

1000 Bruxelas, Bélgica

Telefone: +32 2 541 33 99; Fax: +32 2 541 33 98

e-mail: [marianne.paesmans@bordet.be](mailto:marianne.paesmans@bordet.be)

## **Sumário:**

**Introdução:** O antígeno Ki-67 é utilizado para avaliar a atividade proliferativa no câncer de mama (CM); no entanto, o seu papel como marcador prognóstico no CM não está bem definido.

**Métodos:** Investigar o valor prognóstico do antígeno Ki-67/MIB-1 no câncer de mama em estágio precoce através de uma meta-análise dos dados da literatura. Utilizou-se os dados existentes na literatura sobre este marcador relacionados com os seguintes desfechos: sobrevida livre de doença (SLD) e a sobrevida global (SG).

**Resultados:** Sessenta e oito estudos foram identificados, destes 46 estudos, incluindo 12,155 pacientes foram avaliados na presente meta-análise. A sobrevida livre de doença foi avaliada em 38 estudos e a sobrevida global em 35 estudos. A positividade do Ki-67/MIB-1 foi associada a uma maior probabilidade de recidiva na população global [HR=1,93 (IC95%: 1,74-2,14); P<0,001], nas pacientes com linfonodos negativos [HR= 2,31 (IC95%: 1,83-2,92); P<0,001] e nas pacientes com linfonodos positivos [HR=1,59 (IC95%: 1,35-1,87); P<0,001]. A positividade do Ki-67/MIB-1 também foi associada a uma menor sobrevida global na população geral [HR=1,95 (IC95%: 1,70-2,24; P<0,001)], nas pacientes com linfonodos negativos [HR= 2,54 (IC95%: 1,65-3,91); P<0,001] e nas pacientes com linfonodos positivos [HR= 2.33 (IC95%CI: 1,83-2,95); P<0,001].

**Conclusão:** A presente meta-análise sugere que a positividade do Ki-67/MIB-1 confere um maior risco de recidiva e morte nas pacientes com câncer de mama em estágio precoce.

**Palavras-chave:** câncer de mama, Ki-67, prognóstico, meta-análise

## **Introdução:**

A incidência de câncer de mama (CM) na Europa é de 109,8/100,000 mulheres por ano e é responsável por 38,4/100,000 mortes em mulheres/ano [1]. Uma melhora importante na sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) foi obtida com o amplo uso das terapias sistêmicas adjuvantes [2].

Nas últimas décadas, os chamados marcadores de proliferação foram amplamente avaliados como fatores prognósticos no CM. No entanto, os únicos fatores prognósticos utilizados no processo de decisão terapêutica são: o tamanho do tumor, o envolvimento dos linfonodos, a presença ou ausência dos receptores hormonais, a superexpressão ou amplificação do HER-2, o grau histológico e a idade da paciente no momento do diagnóstico [3, 4].

O Ki-67 está presente em todas as células proliferativas e é de grande interesse como marcador de proliferação [5], o anticorpo anti-Ki-67 reage com uma proteína não-histona de 395 KD presente em todas as fases ativas do ciclo celular, exceto na fase G0 [6]. O anti-MIB-1 é um anticorpo monoclonal contra a parte recombinante do antígeno Ki-67 e existe uma boa correlação entre os anticorpos Ki-67 e MIB-1 [6].

Mais recentemente, as técnicas de expressão de genes têm demonstrado que o gene do Ki-67 possui um papel em várias “assinaturas de proliferação”, demonstrando que uma parte dos genes reflete uma expressão aumentada da taxa de proliferação celular maligna [7, 8]. Corroborando com estes achados, o Ki-67 é um dos 21 genes selecionados de forma prospectiva no teste Oncotype DX™, o qual

é usado para prever o risco de recidiva em pacientes com CM e linfonodos negativos tratadas com tamoxifeno no 'Projeto Nacional Cirúrgico Adjuvante da Mama e Cólon B-14' (NSABP B-14), bem como para prever a magnitude do benefício da quimioterapia em mulheres com CM linfonodos negativos e receptor de estrogênio positivo incluídas no estudo NSABP B20 [9, 10].

Apesar do grande número de estudos publicados analisando o papel prognóstico do Ki-67 no CM em estágio precoce, o mesmo ainda não é considerado como um fator prognóstico nesta doença. Assim, devido aos resultados conflitantes dos estudos avaliando o valor prognóstico da expressão do Ki-67 no CM precoce, nós realizamos uma meta-análise dos estudos publicados, na tentativa de esclarecer o seu papel e melhor avaliar o valor da expressão do Ki-67.

## **Materiais e métodos**

### **Seleção das publicações**

Para essa meta-análise, selecionamos os artigos avaliando a relação entre a expressão do Ki-67/MIB-1 e o prognóstico no CM de mama precoce publicados até maio de 2006. Os principais critérios de seleção dos estudos foram: terem sido publicados na forma integral e serem escritos em língua inglesa.

Os artigos foram identificados através de uma busca eletrônica utilizando o Pubmed com as seguintes palavras-chave: câncer de mama, Ki-67, MIB-1, índice proliferativo, marcador de proliferação, sobrevida e prognóstico. Os artigos também

foram selecionados através de referências importantes tais como artigos de revisão. Na tentativa de evitar a duplicidade de dados, no caso de artigos que incluíam a mesma população de pacientes, identificados através de similaridades presentes nos estudos tais como país de origem, investigadores principais, origem dos pacientes, período de recrutamento e critérios de inclusão, somente foi incluído o mais recente ou o mais completo.

### **Coleta dos dados**

Três autores extraíram cuidadosamente toda a informação de todas as publicações (EA, GC, MP), utilizando-se de um protocolo comum. Os seguintes dados foram extraídos de cada estudo: data de publicação, sobrenome do primeiro autor, o anticorpo e o limite de corte para acessar a positividade do Ki-67, a distribuição da expressão do Ki-67, período de seguimento, tipo de tratamento, envolvimento de linfonodos e dados que permitissem avaliar o impacto da expressão do Ki-67 na SLD e/ou SG.

Nós não definimos um número mínimo de pacientes incluídos em cada estudo ou uma duração do seguimento. Os critérios de exclusão são descritos em outra seção, mas o resultado final do estudo final de cada estudo não foi levado em consideração para a exclusão.

## Métodos estatísticos

A expressão do Ki-67 foi considerada como positiva ou negativa segundo os critérios utilizados pelos autores de cada estudo. Para a agregação quantitativa dos resultados de sobrevida, o impacto da expressão do Ki-67 no prognóstico foi medido através de *Hazard Ratio* (HR). Para cada estudo, essa HR foi estimada através de um método dependente dos resultados fornecidos na publicação original. O método mais acurado era extrair a HR estimada e a sua variância usando 2 dos seguintes parâmetros: HR estimada, teste estatístico de log-rank ou o seu valor de p, e a ainda chamada diferença O-E estatística (diferença entre o número de eventos observados e esperados) ou a sua variância. Quando esses dados não estavam disponíveis, nós procuramos identificar o número total de eventos, o número de pacientes em risco em cada grupo e o teste estatístico do log-rank ou o seu valor de p para estimar a HR. Finalmente, se o único dado disponível eram as representações gráficas das curvas de sobrevida, nós extraímos a taxa de sobrevida em tempo-ponto específico, na tentativa de reconstruir a HR estimada e sua variância, assumindo que a taxa de pacientes censurados ao longo do tempo era constante durante todo o período de seguimento do estudo [11].

Três autores avaliaram as curvas de sobrevida, de forma independente, para reduzir a variabilidade durante a obtenção destes dados. Se os autores reportaram a sobrevida agrupada em três ou mais grupos, os resultados foram agrupados na tentativa de realizar uma comparação mais confiável entre os dois grupos (Ki-67 positivo e negativo).

Quando possível, a HR estimada de subgrupos foi calculada, como por exemplo, no subgrupo de linfonodos positivos, linfonodos negativos e nas pacientes sem tratamento sistêmico adjuvante (não tratadas). Os resultados foram conferidos com os dados da publicação original para termos a certeza que eles não eram discordantes, particularmente, naqueles casos nos quais a obtenção destes foi a partir da leitura de curvas de sobrevida.

As HR estimadas foram combinadas em uma HR global utilizando-se o método publicado por Peto e colegas [12]. Nós realizamos testes do qui-quadrado de heterogeneidade e, se a homogeneidade tivesse de ser rejeitada, o modelo efeito randômico era utilizado no lugar do modelo de efeito fixo.

Por convenção, uma HR observada  $>1$  significa um pior prognóstico para o grupo com a expressão do Ki-67 positiva. O impacto do Ki-67 na sobrevida era considerado estatisticamente significativo se o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para a HR global não ultrapassava o valor 1. Nós utilizamos as definições dos autores para SLD e SG.

Todos os cálculos estatísticos para esta meta-análise foram realizados utilizando um computador pessoal.

## **Resultados**

### **Características dos estudos**



De 68 estudos publicados entre os anos de 1989 e 2006, 46 possuíam informação suficiente para a extração da HR, incluindo 38 estudos com dados referentes a SLD e 35 com dados de SG. Alguns destes continham dados sobre os dois desfechos escolhidos, enquanto que outros foram utilizados para somente um dos desfechos. As tabelas 1 e 2 sumarizam os estudos avaliáveis e suas principais características e a tabela 3 apresenta os principais resultados desta meta-análise.

As razões para considerar um estudo como 'não-avaliável' foram: a) ausência de análise univariada descrita; b) a impossibilidade de calcular HR através de um dos três métodos previamente descritos; c) a duplicação de dados em diferentes revistas; e d) a inclusão de pacientes com câncer de mama metastático. A tabela 4 descreve os artigos que foram considerados não-avaliáveis para esta meta-análise, mas que foram incluídos na análise de sensibilidade.

O número de pacientes incluídos nos estudos avaliados variou de 42 a 863, o período de seguimento variou de 23,6 meses (média) a 16,3 anos (mediana). Diferentes anticorpos foram utilizados nos estudos: anti-Ki-67 foi utilizado em 24 estudos (52,1%), anti-MIB-1 em 24 estudos (52,1%) e ambos em anticorpos foram utilizados em 5 estudos [13-17], anti-Ki-S5 em 2 estudos [18, 19], e anti-Ki-S11 em 1 estudo [20]. Diferentes pontos de corte foram utilizados pelos autores (variação: 3,5%-34%) e as definições dos valores utilizados para corte foram, média ou mediana, 'o melhor nível de corte' ou um 'valor arbitrário' escolhido pelos autores.

No total foram 38 os estudos com dados de SLD, com um total de 10,954 pacientes. Análises de subgrupos foram também realizadas, quando possível: a partir de 15 estudos (total de 3,370 pacientes) em pacientes com linfonodos

negativos [13, 16, 19, 21-32]; em pacientes com linfonodos positivos utilizando 8 estudos (total de 1,430 pacientes) [16, 18, 23, 25, 26, 29-31] e por fim, em pacientes com linfonodos negativos e sem tratamento sistêmico a partir de 6 estudos, num total de 736 pacientes [13, 24, 25, 27, 28, 30]. Em relação a SG foram avaliados 9,472 pacientes, de 35 estudos; análise de subgrupo foi possível em 9 estudos incluindo pacientes com linfonodos negativos (total de 1,996 pacientes) [13, 19, 21, 29, 31-35]; em 4 com pacientes com linfonodos positivos (total de 857 pacientes) [29, 31, 33, 36] e, em 2 estudos que incluíram somente pacientes não-tratadas (linfonodos negativos e positivos) com um total de 284 pacientes [13, 37].

### **Meta-análise**

Os resultados principais desta meta-análise (população global e SLD/SG) são apresentados nas figuras 1 e 2. Para a população global, uma menor SLD [HR 1,93 (IC95% 1,74-2,14; P<0,001)] e uma pior SG [HR 1,95 (IC95% 1,70-2,24; P<0,001)] foram observadas entre as pacientes consideradas como Ki-67 positivas. Um pior prognóstico naquelas com Ki-67 positivo, foi observado, independentemente do acometimento dos linfonodos; no subgrupo com linfonodos negativos os resultados obtidos foram: SLD [HR 2,31 (IC95% 1,83-2,92; P<0,001)] e SG [(HR 2,4, IC 95% 1,65-3,91; P<0,001)]; naquelas com linfonodos positivos obteve-se os seguintes valores: SLD [HR 1,59 (IC95% 1,35-1,87; P<0,001)] e SG [HR 2,33 (IC95% 1,83-2,95; P<0,001)]. Nas pacientes incluídas na análise do subgrupo 'não-tratado', uma pior SLD foi observada naquelas com linfonodos negativos [HR 2,72 (IC95% 1,97-

3,75;  $P < 0,001$ )], bem como uma pior SG nas pacientes com linfonodos negativos e positivos, analisadas conjuntamente [HR 1,79 (IC95% 1,22-2,63;  $P = 0,001$ )].

Para acessar o impacto do viés relacionado aos estudos não incluídos, realizamos uma análise para a população global incluindo todos os estudos encontrados, incluindo aqueles com dados considerados incompletos. Para os estudos descrevendo somente HR estimada obtida através de uma análise multivariada, utilizamos a HR estimada e a sua variância. Para aqueles com imprecisões em relação ao número de eventos e a variância da HR estimada, utilizamos uma aproximação da variância. Finalmente, para os estudos em que essas informações importantes não estavam disponíveis, consideramos a HR estimada de 1 (isto é, ausência de impacto para o Ki-67) e usamos a variância mínima comparada com as dos estudos incluídos do mesmo tamanho de amostra. Mesmo após essa análise de sensibilidade, podemos ainda observar o importante impacto negativo da expressão do Ki-67 na SLD [HR 1,74 (IC95% 1,56-1,95;  $P < 0,001$ ; teste de heterogeneidade  $P < 0,001$ )] e SG [HR 1,76 (IC95% 1,54-2,00;  $P < 0,001$ ; teste de heterogeneidade  $P < 0,001$ )].

## **Discussão**

A presente meta-análise demonstra que a expressão do Ki-67 em pacientes com câncer de mama (estágios precoces) determina um pior desfecho quer em relação a SLD e a SG, tanto quando consideramos na população global e nos subgrupos de pacientes linfonodos negativos, linfonodos positivos e não-tratadas.

Esta é a única meta-análise de estudos publicados avaliando a associação entre a expressão do Ki-67/MIB-1 e o prognóstico no câncer de mama em estágios precoces. Os marcadores prognósticos podem ser definidos como aqueles que estão associados ao desfecho clínico como SLD ou SG, independentemente de qualquer tratamento ou intervenção. O melhor cenário para aplicar essa definição é a população de pacientes não tratadas, o que ajuda a definir o chamado marcador prognóstico puro. Os marcadores prognósticos podem, também, ser utilizados no processo de decisão terapêutica, por exemplo, alterando a indicação de um tratamento sistêmico agressivo [38, 39].

A expressão do Ki-67 tem sido avaliada em vários estudos como um marcador prognóstico e/ou preditivo no câncer de mama em estágios precoces. Como um marcador preditivo, poucos estudos utilizando uma terapia sistêmica primária, muitas vezes, retrospectivos e com resultados conflitantes, foram publicados [3], portanto, o valor preditivo do Ki-67 não foi avaliado nesta meta-análise.

Nossa meta-análise foi realizada utilizando resultados publicados na literatura médica e, portanto, existem algumas limitações em nossa técnica, a qual é menos onerosa que uma meta-análise de dados individuais de pacientes. A seleção da língua pode favorecer a ocorrência de um viés, visto que estudos com resultados positivos são mais freqüentemente publicados em revistas de língua inglesa, enquanto que estudos com resultados negativos têm a tendência de serem mais frequentemente publicados em revistas locais na língua nativa dos autores [40]. Porém nós não identificamos muitos artigos publicados em línguas nativas não inglesas (Italiano, Russo, Sérvio, Alemão) [41-44]. Este fenômeno pode ser chamado

de viés de torre de babel e pode ser responsável por resultados divergentes, em pelo menos uma dentre 36 meta-análises consecutivas, se esses artigos em outras línguas que não a Inglesa fossem hipoteticamente incluídos [45].

Outra possível fonte de confusão é o uso da mesma população de pacientes em diferentes publicações. No nosso trabalho esta possibilidade existe, mas de forma reduzida, pois os estudos com possibilidade de duplicidade foram excluídos.

Alguns autores consideram a meta-análise de dados individuais o padrão ouro de evidência [46, 47]. Esta última técnica é, normalmente, considerada um novo estudo que leva em consideração todos os estudos realizados num específico tópico, incluindo aqueles publicados ou não, o que requer uma atualização dos dados individuais pelo investigador; essa técnica é, também, muito mais complexa, lenta e onerosa. Comparando o tempo dispendido na meta-análise de dados individuais com a de dados publicados, a realização da primeira exige de 1 a 5 anos enquanto que a segunda, de 1 a 5 meses. Há ainda diferenças em termos de custo, para realizar uma meta-análise de dados individuais o custo em dólares é de \$50,000 a \$500,000, enquanto que para a meta-análise de dados publicados este varia de \$5,000 a \$30,000 [48]. Portanto, a meta-análise de dados publicados é de fundamental importância, especialmente numa situação, em que a obtenção de fundos para a realização de uma meta-análise de dados individuais é pouco provável.

O método utilizado para a extrapolação da HR pode, também, ser uma fonte de variabilidade para a estimativa da HR. Na ausência de dados diretos disponíveis, usamos a extrapolação da HR das curvas de sobrevida utilizando diferentes pontos no tempo durante o seguimento e assumindo que a ocorrência de casos censurados

foi uniformemente distribuída. No entanto, a estimativa das taxas de sobrevida baseada na representação gráfica das curvas de sobrevida foi realizada, independentemente, por três dos autores e a HR estimada e sua variância foi comparada com a dos resultados publicados em cada estudo individual. Não tendo sido identificadas disparidades de nota ao compararmos os nossos resultados e aqueles disponíveis nos artigos publicados.

O impacto adverso da positividade do Ki-67 na SLD e SG foi observado na população global bem como nos subgrupos de pacientes com linfonodos negativos e positivos. Um teste de heterogeneidade significativa foi detectada na população global e no subgrupo de pacientes com linfonodos negativos. No entanto, não é considerado apropriado definir uma simples medida, por exemplo, a HR associada com a positividade do Ki-67 neste caso, nos estudos com uma diferença intrínseca existente. A disparidade observada entre as conclusões dos diferentes estudos para esta heterogeneidade observada pode ser quantificada através da aplicação qualitativa de escores aos estudos selecionados para uma meta-análise. No entanto, esses escores nem sempre explicam os resultados obtidos [49]. Neste caso, as características metodológicas de cada estudo devem ser levadas em consideração.

Em 1992, Cattoretti e colegas descreveram bons resultados na coloração do Ki-67 utilizando tumores preservados em blocos de parafina com os novos anticorpos desenvolvidos anti-MIB-1 e anti-MIB-3 [6]. Apesar de vários anticorpos serem atualmente comercializados, o anticorpo anti-MIB-1 é o mais utilizado em estudos recentes [50]. Em nossa meta-análise, outros anticorpos que não os anti-MIB-1 e anti-Ki-67 foram incluídos, tais como o anti-Ki-S5 [18, 19] e anti-Ki-S11 [20],

mas eles constituem a minoria dos casos. Além disso, a expressão do Ki-67 é usualmente estimada como a percentagem de células do tumor apresentando uma coloração positiva pelo anticorpo, sendo a coloração nuclear o mais importante critério de positividade. O uso de diferentes anticorpos e protocolos de escores sem um número mínimo padronizado de células contadas, pode ser responsável por algumas diferenças entres os estudos.

Em nosso trabalho alguns estudos utilizaram 10% como ponto de corte para definir o valor da positividade do Ki-67 (valor arbitrário), enquanto que outros utilizaram a média, mediana, o melhor valor de corte; essas diferenças podem ser responsáveis pela dificuldade de determinar o valor mais adequado para o ponto de corte na prática diária. Entretanto, alguns autores descreveram que a escolha do ponto de corte para a IHQ pode depender do objetivo clínico: se o Ki-67 é usado para evitar a quimioterapia em pacientes com tumores com baixa taxa de proliferação, o valor de corte deveria ser 10%, no intuito de se evitar tratamentos excessivos. Do contrário, se o Ki-67 é utilizado para identificar os pacientes com maior sensibilidade à quimioterapia, um valor de corte de 25% seria preferido [51]. No contexto dessa meta-análise, podemos assumir que a expressão do Ki-67 é responsável pelo risco aumentado de recidiva e morte, apesar do risco de base (o risco no grupo considerado Ki-67 negativo) não ser o mesmo em todos os estudos.

Uma outra limitação desta meta-análise é que ela acessa somente o valor prognóstico univariado do Ki-67. Portanto, não podemos dizer que o Ki-67 é um fator independente; a resposta para esta questão deverá ser obtida com estudos prospectivos - certamente a meta-análise de dados individuais não resolveria essa

questão visto que a intersecção das co-variáveis disponíveis nos estudos individuais é, provavelmente, muito pequena.

Para melhor esclarecer o valor prognóstico da presença ou ausência do receptor de estrogênio (RE), Sotiriou e colegas utilizaram a expressão de genes para explorar as implicações da distribuição RE e do índice do grau genômico (GGI) para prever o desfecho. Eles observaram que quase todos os tumores RE negativos eram associados com altos GGI scores (alto grau), enquanto que os tumores RE positivos eram associados a uma mistura homogênea de valores de GGI. Isso significa que GGI adiciona uma informação prognóstica quando o estado do RE é conhecido, porém o contrário não é verdadeiro [52]. Infelizmente, devido à ausência de informação nos estudos publicados e utilizados no nosso trabalho, uma análise do impacto da expressão do Ki-67 nas subpopulações RE positivo e negativo, e, de acordo com o grau histológico não foi possível. A tabela 5 sumariza os principais resultados das recentes assinaturas genéticas para o prognóstico e predição no câncer de mama.

Apesar de anos de pesquisa e centenas de relatos existentes sobre marcadores tumorais em oncologia, o número de marcadores que possuem uma utilidade clínica ainda é muito pequeno. O manual do relato de estudos de marcadores tumorais (REMARK) foi a maior tarefa do primeiro encontro em diagnóstico em câncer do NCI-EORTC, representando um esforço colaborativo importante de estatísticos, oncologistas e cientistas. Esse manual possui 20 recomendações em relação ao desenho dos estudos, métodos de análise estatística, hipótese pré-planificadas, características das amostras e dos pacientes e métodos



para análise. O amplo uso desse manual para métodos analíticos e descrição dos resultados facilitaria muito o desenvolvimento de análises alternativas e meta-análises [38, 39, 53].

Apesar de algumas limitações, esta meta-análise suporta o papel prognóstico do Ki-67 no câncer de mama em estágios precoces, demonstrando uma significativa associação entre a sua expressão e risco de recidiva e morte em todas as populações consideradas para estes desfechos: sobrevida livre de doença e sobrevida global. Se o proposto manual REMARK tivesse sido utilizado em todos os estudos selecionados para esta meta-análise e todas as informações necessárias estivessem disponíveis, a nossa meta-análise de dados publicados poderia melhor caracterizar o papel do Ki-67 como um marcador prognóstico.

**Agradecimentos:**

Os autores agradecem a Sra Carolyn Straehle pela sua assistência editorial.

## **Referências:**

- [1] Pestalozzi BC, Luporsi-Gely E, Jost LM, Bergh J. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of primary breast cancer. *Ann Oncol* 2005;16 Suppl 1:i7-9.
- [2] Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365(9472):1687-717.
- [3] Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005;16(11):1723-39.
- [4] Hayes DF. Prognostic and predictive factors revisited. *Breast* 2005;14(6):493-9.
- [5] Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31(1):13-20.
- [6] Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168(4):357-63.
- [7] Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(16):9212-7.
- [8] Whitfield ML, George LK, Grant GD, Perou CM. Common markers of proliferation. *Nat Rev Cancer* 2006;6(2):99-106.

- [9] Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(27):2817-26.
- [10] Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2006.
- [11] Parmar MK, Torri V, Stewart L. Extracting summary statistics to perform meta-analyses of the published literature for survival endpoints. *Stat Med* 1998;17(24):2815-34.
- [12] Yusuf S, Peto R, Lewis J, Collins R, Sleight P. Beta blockade during and after myocardial infarction: an overview of the randomized trials. *Prog Cardiovasc Dis* 1985;27(5):335-71.
- [13] Bevilacqua P, Verderio P, Barbareschi M, Bonoldi E, Boracchi P, Dalla Palma P, et al. Lack of prognostic significance of the monoclonal antibody Ki-S1, a novel marker of proliferative activity, in node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1996;37(2):123-33.
- [14] Querzoli P, Albonico G, Ferretti S, Rinaldi R, Magri E, Indelli M, et al. MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis. *J Clin Pathol* 1996;49(11):926-30.
- [15] Veronese SM, Maisano C, Scibilia J. Comparative prognostic value of Ki-67 and MIB-1 proliferation indices in breast cancer. *Anticancer Res* 1995;15(6B):2717-22.

- [16]** Billgren AM, Tani E, Liedberg A, Skoog L, Rutqvist LE. Prognostic significance of tumor cell proliferation analyzed in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002;71(2):161-70.
- [17]** Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 1995;104(1):42-9.
- [18]** Esteva FJ, Sahin AA, Smith TL, Yang Y, Pusztai L, Nahta R, et al. Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma. *Cancer* 2004;100(3):499-506.
- [19]** Rudolph P, Alm P, Heidebrecht HJ, Bolte H, Ratjen V, Baldetorp B, et al. Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(3):271-8.
- [20]** Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm SO, de Mascarel I, Trojani M, et al. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999;55(1):61-71.
- [21]** Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2(3):585-92.
- [22]** Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, et al. The utility of mitotic index, oestrogen receptor and Ki-67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 1999;25(4):356-63.

- [23] Gaglia P, Bernardi A, Venesio T, Caldarola B, Lauro D, Cappa AP, et al. Cell proliferation of breast cancer evaluated by anti-BrdU and anti-Ki-67 antibodies: its prognostic value on short-term recurrences. *Eur J Cancer* 1993;29A(11):1509-13.
- [24] Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, et al. Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *Br J Cancer* 1999;80(3-4):419-26.
- [25] Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, et al. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998;78(4):460-5.
- [26] Pierga JY, Leroyer A, Viehl P, Mosseri V, Chevillard S, Magdelenat H. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996;37(1):57-64.
- [27] Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, von Boguslawsky K, Nordling S. Ki-67, p53, Er-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol* 1997;36(4):369-74.
- [28] Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, et al. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer* 1991;68(3):549-57.
- [29] Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? *Cancer* 2003;97(5):1321-31.

- [30]** Weikel W, Beck T, Mitze M, Knapstein PG. Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18(3):149-54.
- [31]** Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Beck T, Knapstein PG. Growth fractions (Ki-67) in primary breast cancers, with particular reference to node-negative tumors. *Cancer Detect Prev* 1995;19(5):446-50.
- [32]** Erdem O, Dursun A, Coskun U, Gunel N. The prognostic value of p53 and c-erbB-2 expression, proliferative activity and angiogenesis in node-negative breast carcinoma. *Tumori* 2005;91(1):46-52.
- [33]** Domagala W, Markiewski M, Harezga B, Dukowicz A, Osborn M. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. *Clin Cancer Res* 1996;2(1):147-54.
- [34]** Fresno M, Molina R, Perez del Rio MJ, Alvarez S, Diaz-Iglesias JM, Garcia I, et al. p53 expression is of independent predictive value in lymph node-negative breast carcinoma. *Eur J Cancer* 1997;33(8):1268-74.
- [35]** Jensen V, Ladekarl M, Holm-Nielsen P, Melsen F, Soerensen FB. The prognostic value of oncogenic antigen 519 (OA-519) expression and proliferative activity detected by antibody MIB-1 in node-negative breast cancer. *J Pathol* 1995;176(4):343-52.
- [36]** Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, Bird K, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(23):4306-13.

- [37] Pinder SE, Wencyk P, Sibbering DM, Bell JA, Elston CW, Nicholson R, et al. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br J Cancer* 1995;71(1):146-9.
- [38] McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol* 2005;23(36):9067-72.
- [39] McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer* 2005;93(4):387-91.
- [40] Egger M, Zellweger-Zahner T, Schneider M, Junker C, Lengeler C, Antes G. Language bias in randomised controlled trials published in English and German. *Lancet* 1997;350(9074):326-9.
- [41] Costarelli L, Piro FR, Fortunato L, Vitelli CE, Farina M, Taffuri M, et al. [Predictive variables of lymphatic metastasis in breast carcinoma with a diameter below 2 cm]. *Suppl Tumori* 2005;4(3):S172.
- [42] Kushlinskii NE, Orinovskii MB, Gurevich LE, Kazantseva IA, Talaeva S, Ermilova VD, et al. [The specificity of expression of molecular biological markers in tumors of the mammary gland]. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2004(5):32-6.
- [43] Lelle RJ. [In situ determination of the Ki-67 growth fraction (Ki-67 GF) in human tumors (studies in breast cancer)]. *Acta Histochem Suppl* 1990;39:109-24.

- [44] Topic B, Stankovic N, Savjak D, Grbic S. [Correlation of size of the primary tumor and axillary node status with the p53 tumor suppressor gene in carcinoma of the breast]. *Vojnosanit Pregl* 2002;59(1):29-32.
- [45] Gregoire G, Derderian F, Le Lorier J. Selecting the language of the publications included in a meta-analysis: is there a Tower of Babel bias? *J Clin Epidemiol* 1995;48(1):159-63.
- [46] Stewart LA, Parmar MK. Meta-analysis of the literature or of individual patient data: is there a difference? *Lancet* 1993;341(8842):418-22.
- [47] Oxman AD, Clarke MJ, Stewart LA. From science to practice. Meta-analyses using individual patient data are needed. *Jama* 1995;274(10):845-6.
- [48] Piedbois P, Buyse M. Meta-analyses based on abstracted data: a step in the right direction, but only a first step. *J Clin Oncol* 2004;22(19):3839-41.
- [49] Greenland S. Invited commentary: a critical look at some popular meta-analytic methods. *Am J Epidemiol* 1994;140(3):290-6.
- [50] Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(28):7212-20.
- [51] Spyrtos F, Ferrero-Pous M, Trassard M, Hacene K, Phillips E, Tubiana-Hulin M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer* 2002;94(8):2151-9.
- [52] Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Tutt A, et al. Comprehensive analysis integrating both clinicopathological and gene expression data in more than 1.500 samples: proliferation captured by gene expression grade



index appears to be the strongest prognostic factor in breast cancer (BC). *J Clin Oncol* 2006;24(18S):4S (abst 507).

**[53]** Alonzo TA. Standards for reporting prognostic tumor marker studies. *J Clin Oncol* 2005;23(36):9053-4.

**[54]** Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2003;97(6):1573-81.

**[55]** Caly M, Genin P, Ghuzlan AA, Elie C, Freneaux P, Klijanienko J, et al. Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer Res* 2004;24(5B):3283-8.

**[56]** Gasparini G, Boracchi P, Bevilacqua P, Mezzetti M, Pozza F, Weidner N. A multiparametric study on the prognostic value of epidermal growth factor receptor in operable breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29(1):59-71.

**[57]** Goodson WH, 3rd, Moore DH, 2nd, Ljung BM, Chew K, Mayall B, Smith HS, et al. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59(2):113-23.

**[58]** Heatley MK, Ewings P, Odling Smee W, Maxwell P, Toner PG. Vimentin expression does not assist in predicting survival in ductal carcinoma of the breast. *Pathology* 2002;34(3):230-2.

**[59]** Hlupic L, Jakic-Razumovic J, Bozikov J, Coric M, Belev B, Vrbanec D. Prognostic value of different factors in breast carcinoma. *Tumori* 2004;90(1):112-9.

- [60]** Jacquemier JD, Penault-Llorca FM, Bertucci F, Sun ZZ, Houvenaeghel GF, Geneix JA, et al. Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy: a multiparametric and immunohistochemical analysis. *J Pathol* 1998;184(2):130-5.
- [61]** Liu S, Edgerton SM, Moore DH, 2nd, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(6):1716-23.
- [62]** Locker AP, Birrell K, Bell JA, Nicholson RI, Elston CW, Blamey RW, et al. Ki67 immunoreactivity in breast carcinoma: relationships to prognostic variables and short term survival. *Eur J Surg Oncol* 1992;18(3):224-9.
- [63]** Mottolese M, Benevolo M, Del Monte G, Buglioni S, Papaldo P, Nistico C, et al. Role of P53 and BCL-2 in high-risk breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126(12):722-9.
- [64]** Pellikainen MJ, Pekola TT, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, et al. p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. *J Clin Pathol* 2003;56(3):214-20.
- [65]** Pietilainen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjanen K. The important prognostic value of Ki-67 expression as determined by image analysis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122(11):687-92.
- [66]** Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J. Prognostic comparative study of S-phase fraction and Ki-67 index in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2001;54(7):543-9.

- [67]** Railo M, Nordling S, von Boguslawsky K, Leivonen M, Kyllonen L, von Smitten K. Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br J Cancer* 1993;68(3):579-83.
- [68]** Seshadri R, Leong AS, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ. Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis. *Int J Cancer* 1996;69(2):135-41.
- [69]** Thor AD, Liu S, Moore DH, 2nd, Edgerton SM. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(2):470-7.
- [70]** Tynninen O, von Boguslawski K, Aronen HJ, Paavonen T. Prognostic value of vascular density and cell proliferation in breast cancer patients. *Pathol Res Pract* 1999;195(1):31-7.
- [71]** Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Monting J, Hellerich U, von Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991;67(2):421-8.
- [72]** Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, Ellis IO, Elston CW, Robertson JF, et al. Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer* 1989;59(6):943-7.
- [73]** Lau R, Grimson R, Sansome C, Tornos C, Moll UM. Low levels of cell cycle inhibitor p27kip1 combined with high levels of Ki-67 predict shortened disease-free survival in T1 and T2 invasive breast carcinomas. *Int J Oncol* 2001;18(1):17-23.

- [74] Michalides R, van Tinteren H, Balkenende A, Vermorken JB, Benraadt J, Huldij J, et al. Cyclin A is a prognostic indicator in early stage breast cancer with and without tamoxifen treatment. *Br J Cancer* 2002;86(3):402-8.
- [75] Beck T, Weller EE, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Knapstein PG. Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of breast carcinomas: correlations with established prognosis parameters and with the proliferation marker, MIB-1. *Gynecol Oncol* 1995;57(1):96-104.
- [76] Biesterfeld S, Kluppel D, Koch R, Schneider S, Steinhagen G, Mihalcea AM, et al. Rapid and prognostically valid quantification of immunohistochemical reactions by immunohistometry of the most positive tumour focus. A prospective follow-up study on breast cancer using antibodies against MIB-1, PCNA, ER, and PR. *J Pathol* 1998;185(1):25-31.
- [77] Bukholm IR, Bukholm G, Holm R, Nesland JM. Association between histology grade, expression of HsMCM2, and cyclin A in human invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2003;56(5):368-73.
- [78] Ceccarelli C, Trere D, Santini D, Taffurelli M, Chieco P, Derenzini M. AgNORs in breast tumours. *Micron* 2000;31(2):143-9.
- [79] Galiegue S, Casellas P, Kramar A, Tinel N, Simony-Lafontaine J. Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival. *Clin Cancer Res* 2004;10(6):2058-64.
- [80] Gasparini G, Bevilacqua P, Pozza F, Meli S, Boracchi P, Marubini E, et al. Value of epidermal growth factor receptor status compared with growth fraction and other factors for prognosis in early breast cancer. *Br J Cancer* 1992;66(5):970-6.

- [81] Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1996;37(2):101-13.
- [82] Jalava PJ, Collan YU, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kronqvist P. Bcl-2 immunostaining: a way to finding unresponsive postmenopausal N+ breast cancer patients. *Anticancer Res* 2000;20(2B):1213-9.
- [83] Kroger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, Schmoor C, Schumacher M, Zander AR, et al. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12(1):159-68.
- [84] Kronblad A, Jirstrom K, Ryden L, Nordenskjold B, Landberg G. Hypoxia inducible factor-1alpha is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. *Int J Cancer* 2006;118(10):2609-16.
- [85] Lampe B, Hantschmann P, Dimpfl T. Prognostic relevance of immunohistology, tumor size and vascular space involvement in axillary node negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 1998;261(3):139-46.
- [86] Liu D, Baltayan A, Naritoku WY, Barr NJ, Young LL, Chaiwun B, et al. LEA.135 expression: its comparison with other prognostic biomarkers for patients with primary breast carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20(3A):1451-61.
- [87] Michels JJ, Duigou F, Marnay J, Henry-Amar M, Delozier T, Denoux Y, et al. Flow cytometry and quantitative immunohistochemical study of cell cycle regulation

proteins in invasive breast carcinoma: prognostic significance. *Cancer* 2003;97(6):1376-86.

**[88]** Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A, et al. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer* 1997;74(4):433-7.

**[89]** Rudas M, Gnant MF, Mittlbock M, Neumayer R, Kummer A, Jakesz R, et al. Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in breast cancer: comparison and correlation with prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32(2):165-75.

**[90]** Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 2005;14(2):425-31.

**[91]** Yang Q, Sakurai T, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, Nakamura M, et al. Prognostic value of Bcl-2 in invasive breast cancer receiving chemotherapy and endocrine therapy. *Oncol Rep* 2003;10(1):121-5.

**[92]** van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-6.

**[93]** Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365(9460):671-9.

**[94]** Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(4):262-72.

**[95]** Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(38):13550-5.

**[96]** Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 2005;115(6):1503-21.

**[97]** Oh DS, Troester MA, Usary J, Hu Z, He X, Fan C, et al. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J Clin Oncol* 2006;24(11):1656-64.





**Tabela 1.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida global

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95% )</b>
Bevilacqua 1996 [13]	94/13 (107)	74	Não tratadas	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	10% (valor arbitrário)	2,75 (1,02-7,39)
Bos 2003 [54]	63/87 (150)	106 (média)	N ≥ 4: CMF ou TAM	Anti-Ki-67	10% (valor arbitrário)	2,47 (1,08-5,65)
Brown 1996 [21]	170/504 (674)	72	156 QT e/ou HT	Anti-Ki-67	5% (melhor ponto)	1,19 (0,79-1,80)
Caly 2004 [55]	122/122 (244)	72 (mínimo)	Não relatado	Anti-MIB-1	32% (proporção de células marcadas)	1,95 (0,92-4,14)
Domagala (N0) 1996 [33]	66/45 (111)	88	47 QT ou HT	Anti-MIB-1	10% (valor mediano)	3,04 (1,03-8,99)
Domagala (N+) 1996 [33]	40/35 (75)	88	47 QT ou HT	Anti-MIB-1	10% (valor mediano)	1,38 (0,66-2,86)
Erdem 2005 [32]	13/34 (47)	72,5	Todas com QT adjuvante (?)	Anti-Ki-67	10% (valor mediano)	17,23 (2,42-122,36)
Fresno 1997 [34]	84/62 (146)	75	13 CMF 80 TAM	Anti-MIB-1	10% (valor arbitrário)	1,81 (0,71-4,59)
Gasparini 1994 [56]	83/82 (165)	60	82 CMF e/ou HT	Anti-Ki-67	7,5% (valor médio)	2,58 (1,21-5,49)

**Tabela 1.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida global (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Gonzalez 2003 [36]	NR (221)	102,5	Não relatado	Anti- MIB-1	30% (valor arbitrário)	3,18 (1,52-6,65)
Goodson III 2000 [57]	56/56 (112)	5,1 anos	104 QT ou HT	Anti- MIB-1	24% (valor médio)	2,90 (1,18-7,15)
Heatley 2002 [58]	26/33 (59)	5 anos	Não relatado	Anti-Ki-67	10% (valor médio)	0,81 (0,36-1,81)
Hlupic 2004 [59]	117/75 (192)	180 (pacientes N+)	Vários regimes de QT (?)	Anti-Ki-67	10% (valor arbitrário)	1,30 (0,80-2,11)
Jacquemier 1998 [60]	74/78 (152)	60	(?) FAC, FEC, ou FMC	Anti- MIB-1	3,5% (valor mediano)	3,29 (1,49-7,22)
Jansen 1998 [25]	153/168 (321)	128	(?) FAC	Anti-MIB-1	7% (valor mediano)	1,35 (1,01-1,80)
Jensen 1995 [35]	54/64 (118)	104	3 QT ou HT	Anti-MIB-1	17% (valor mediano)	3,41 (1,44-8,06)
Liu 2001 [61]	389/384 (773)	16,3 anos	268 QT (17% DOX)	Anti-MIB-1	17,8% (valor mediano)	1,76 (1,41-2,20)
Locker 1992 [62]	23/44 (67)	27	Não relatado	Anti-Ki-67	9% (distribuição por terços)	4,19 (1,19-14,7)

**Tabela 1.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida global (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Mottolese 2000 [63]	87/70 (157)	60	Todas EC	Anti-Ki-67	10% (valor arbitrário)	1,82 (0,90-3,67)
Pellikainen 2003 [64]	184/230 (414)	57,2	(?) CMF e TAM ou toremifene	Anti-MIB-1	20% (valor arbitrário)	2,56 (1,46-4,50)
Pierga 1996 [26]	66/70 (136)	70	16 FAC / 39 TAM	Anti-Ki-67	8% (valor médio)	1,37 (0,64-2,91)
Pietiläinen 1996 [65]	100/88 (188)	8,6 anos (média)	64 QT (?)	Anti-MIB-1	20% (valor arbitrário)	1,88 (1,16-3,05)
Pinder 1995 [37]	74/103 (177)	NR	Não tratadas	Anti-MIB-1	34% (distribuição por terços)	1,66 (1,09-2,52)
Pinto 2001 [66]	136/159 (295)	39,6	201 QT / 131 HT	Anti-Ki-67	10% (valor arbitrário)	1,46 (0,74-2,87)
Querzoli 1996 [14]	43/127 (170)	66,5	Não relatado	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	13% (distribuição por terços)	2,05 (1,11-3,77)
Railo 1993 [67]	37/289 (326)	2,7 anos (média)	Não relatado	Anti-Ki-67	10% (coloração nuclear)	2,39 (0,77-7,38)

**Tabela 1.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida global (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Rudolph 1999 <b>[20]</b>	363/500 (863)	149,3	531 QT ou HT	Anti-Ki-S11	25% (valor mediano)	1,91 (1,50-2,44)
Rudolph 1999 <b>[19]</b>	137/234 (371)	95	86 TAM	Anti-Ki-S5	25% (valor mediano)	4,88 (2,98-7,99)
Seshadri 1996 <b>[68]</b>	235/472 (707)	66	(?) CMF ou TAM	Anti-MIB-1	10% (valor arbitrário)	2,60 (1,80-3,75)
Thor 1999 <b>[69]</b>	243/243 (486)	62	Não relatado	Anti-MIB-1	28,6% (valor mediano)	1,94 (1,04-3,61)
Trihia 2003 (N0) <b>[29]</b>	61/127 (188)	13,5 anos	125 CMF	Anti-MIB-1	16% (proporção de células marcadas)	1,90 (1,18-3,08)
Trihia 2003 (N+) <b>[29]</b>	82/164 (246)	13,5 anos	246 CMF	Anti-MIB-1	16% (proporção de células marcadas)	2,42 (1,71-3,41)
Tynninen 1999 <b>[70]</b>	42/42 (84)	10,3 anos (média)	13 QT (?)	Anti-MIB-1	9,8% (valor mediano)	1,05 (0,55-2,00)
Veronese 1995 <b>[15]</b>	64/63 (127)	61	Não relatado	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	14% (valor mediano)	0,42 (0,20-0,87)

**Tabela 1.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida global (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Weikel 1991 [30]	78/115 (193)	23,6 (média)	CMF e/ou TAM	Anti-Ki-67	20% (proporção de células marcadas)	3,42 (1,39-8,40)
Weikel 1995 (N0) [31]	93/141 (234)	3,4 anos (média)	Maioria TAM	Anti-Ki-67	20% (grupos)	1,66 (0,79-3,51)
Weikel 1995 (N+) [31]	138/177 (315)	3,4 anos (média)	315 CMF e/ou TAM	Anti-Ki-67	20% (grupos)	2,36 (1,55-3,60)
Wintzer 1991 [71]	32/31 (63)	37	Não relatado	Anti-Ki-67	12% (valor médio)	2,51 (1,00-6,34)

**Legenda tabela 1:** IC: intervalo de confiança; CMF: ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracil; DOX: doxorubicina; EC: epirubicina, ciclofosfamida; FAC: 5-Fluorouracil, doxorubicina, ciclofosfamida; FEC: 5-fluorouracil, epirubicina, ciclofosfamida; FMC: 5-fluorouracil, mitoxantrona, ciclofosfamida; HR: *Hazard ratio*; HT: hormonoterapia; N0: linfonodo negativo; linfonodo positivo; NR: não relatado; QT: quimioterapia; TAM: tamoxifeno; +: positivo; -: negativo

**Tabela 2.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida livre de doença

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Bevilacqua 1996 [13]	13/94 (107)	74	Não tratadas	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	10% (valor arbitrário)	3,95 (1,45-10,7)
Billgren (N0) 2002 [16]	189/241(430)	5,7 anos	149 CMF / 484 TAM*	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	15% (valor arbitrário)	2,18 (1,04-4,57)
Billgren (N+) 2002 [16]	168/134 (302)	5,7 anos	149 CMF / 484 TAM*	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	15% (valor arbitrário)	2,20 (1,28-3,78)
Bos 2003 [54]	63/87 (150)	106 (média)	N ≥ 4: CMF ou TAM	Anti-Ki-67	10% (valor arbitrário)	1,59 (0,83-3,04)
Bouzubar 1989 [72]	65/59 (124)	3 (mínimo)	Não relatado	Anti-Ki-67	20% (valor arbitrário)	2,07 (0,99-4,30)
Brown 1996 [21]	170/504 (674)	72	156 QT e/ou HT	Anti-Ki-67	5% (melhor ponto de corte)	1,71 (1,18-2,47)
Caly 2004 [55]	122/122 (244)	72 (mínimo)	Não relatado	Anti-MIB-1	32% (proporção de células marcadas)	1,61 (1,01-2,55)
Clahsen 1999 [22]	215/217 (430)	41	FAC (todas)/ CMF para os N+	Anti MIB-1	20% (valor arbitrário)	2,84 (1,80-4,47)

**Tabela 2.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida livre de doença (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Erdem 2005 [32]	13/34 (47)	72,5	Todas QT	Anti-Ki-67	10% (valor mediano)	6,96 (2,62-18,44)
Esteva 2004 [18]	29/61 (100)	11 anos	FAC	Anti-Ki-S5	12% (proporção de células marcadas)	1,42 (0,75-2,66)
Gaglia (N0) 1993 [23]	90/90 (180)	31 (média)	158 TAM	Anti-Ki-67	9% (valor mediano)	4,60 (1,58-13,38)
Gaglia (N+) 1993 [23]	87/86 (173)	31 (média)	70 CMF /138 TAM	Anti-Ki-67	9% (valor mediano)	1,87 (0,94-3,70)
Gasparini 1994 [56]	83/82 (165)	60	82 CMF e/ou HT	Anti-Ki-67	7,5% (valor mediano)	3,21 (1,53-6,75)
Goodson III 2000 [57]	56/56 (112)	5,1 anos	104 QT ou HT	Anti-MIB-1	24% (valor médio)	2,06 (0,95-4,45)
Harbeck 1999 [24]	20/96 (116)	76	Não tratadas	Anti-Ki-67	25% (valores ótimos)	2,69 (1,09-6,62)
Jacquemier 1998 [60]	74/78 (152)	60	(?) FAC, FEC, ou FMC	Anti-MIB-1	3,5% (valor mediano)	2,81 (1,53-5,17)

**Tabela 2.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida livre de doença (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Jansen (N0) 1998 [25]	72/111 (183)	128	Não tratadas	Anti-MIB-1	7% (valor mediano)	2,52 (1,50-4,22)
Jansen (N+) 1998 [25]	81/57 (138)	128	(?) FAC	Anti-MIB-1	7% (valor mediano)	1,34 (0,89-2,04)
Keshgegian 1995 [17]	66/65 (131)	Até 46 meses	Não relatado	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	10% (valor arbitrário)	1,44 (0,50-4,10)
Lau 2001 [73]	22/75 (97)	64 (média)	Várias QT adjuvantes (?)	Anti-MIB-1	25% (valor arbitrário)	4,10 (1,33-12,55)
Liu 2001 [61]	389/384 (773)	16,3 anos	268 QT (17% DOX)	Anti-MIB-1	17,8% (valor mediano)	1,69 (1,39-2,06)
Locker 1992 [62]	23/44 (67)	27	Não relatado	Anti-Ki-67	9% (distribuição por terços)	2,04 (0,83-5,03)
Michalides 2002 [74]	226/126 (352)	> 8 anos	Maioria TAM	Anti-MIB-1	5% (valor arbitrário)	2,06 (1,28-3,33)
Mottolese 2000 [63]	87/70 (157)	60	Todas EC	Anti-Ki-67	10% (valor arbitrário)	1,52 (0,82-2,81)



**Tabela 2.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida livre de doença (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Pellikainen 2003 [64]	184/230 (414)	57,2	(?) CMF e TAM ou toremifene	Anti-MIB-1	20% (valor arbitrário)	2,14 (1,36-3,38)
Pierga (N0) 1996 [26]	30/48 (78)	70	Não relatado	Anti-Ki-67	8% (valor mediano)	1,89 (0,78-4,54)
Pierga (N+) 1996 [26]	36/22 (58)	70	16 FAC / 39 TAM	Anti-Ki-67	8% (valor mediano)	0,95 (0,37-2,43)
Pietiläinen 1996 [65]	97/82 (179)	8,6 (média)	64 QT (?)	Anti-MIB-1	20% (valor arbitrário)	1,60 (1,01-2,53)
Pinto 2001 [66]	136/159 (295)	39,6	201 QT / 131 HT	Anti-Ki-67	10% (valor arbitrário)	1,61 (0,93-2,80)
Querzoli 1996 [14]	43/127 (170)	66,5	Não relatado	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	13% (distribuição por terços)	2,20 (1,25-3,87)
Railo 1993 [67]	37/289 (326)	2,7 anos (média)	Não relatado	Anti-Ki-67	10% (proporção de células marcadas)	3,38 (1,61-7,12)
Railo 1997 [27]	89/123 (212)	8,3 anos (média)	Não tratadas	Anti-Ki-67	10% (valor arbitrário)	2,46 (1,33-4,56)

**Tabela 2.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida livre de doença (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Rudolph 1999 [20]	363/500 (863)	149,3	531 QT ou HT	Anti-Ki-S11	25% (valor mediano)	1,98 (1,56-2,52)
Rudolph 1999 [19]	137/234 (371)	95	86 TAM	Anti-Ki-S5	25% (valor mediano)	2,96 (1,92-4,57)
Sahin 1991 [28]	14/28 (42)	88	Não tratadas	Anti-Ki-67	12% (3 grupos)	4,54 (1,37-15,03)
Seshadri 1996 [68]	235/472 (707)	66	(?) CMF ou TAM	Anti-MIB-1	10% (valor arbitrário)	2,10 (1,50-2,93)
Thor 1999 [69]	243/243 (486)	62	Não relatado	Anti-MIB-1	28,6% (valor mediano)	2,19 (1,45-3,30)
Trihia (N0) 2003 [29]	61/127 (187)	13,5 anos	125 CMF	Anti-MIB-1	16% (proporção de células marcadas)	1,20 (0,78-1,84)
Trihia (N+) 2003 [29]	82/164 (246)	13,5 anos	246 CMF	Anti-MIB-1	16% (proporção de células marcadas)	1,80 (1,31-2,47)
Veronese 1995 [15]	64/63 (127)	61	Não relatado	Anti-Ki-67 Anti-MIB-1	14% (valor mediano)	0,60 (0,33-1,10)

**Tabela 2.** Principais características de todos os estudos incluídos nesta meta-análise para a sobrevida livre de doença (cont)

<b>Autores</b>	<b>Pacientes Ki-67+/- (total)</b>	<b>Seguimento (meses)</b>	<b>Tratamento sistêmico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Valor de corte (escolha por)</b>	<b>HR (IC 95%)</b>
Weikel (N0) 1991 [30]	34/42 (76)	23,6 (média)	Não tratadas	Anti-Ki-67	20% (proporção de células marcadas)	1,75 (0,34-9,01)
Weikel (N+) 1991 [30]	43/65 (108)	23,6 (média)	CMF e/ou TAM	Anti-Ki-67	20% (proporção de células marcadas)	0,71 (0,09-5,36)
Weikel 1995 (N0) [31]	93/141 (234)	3,4 anos (média)	Maioria TAM	Anti-Ki-67	20% (grupos)	1,10 (0,53-2,28)
Weikel 1995 (N+) [31]	138/177 (315)	3,4 anos (média)	315 CMF e/ou TAM	Anti-Ki-67	20% (grupos)	1,51 (1,13-2,00)
Wintzer 1991 [71]	32/31 (63)	37	Não relatado	Anti-Ki-67	12% (valor médio)	2,99 (1,30-6,92)

**Legenda tabela 2:** IC: intervalo de confiança; CMF: ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracil; DOX: doxorubicina; EC: epirubicina, ciclofosfamida; FAC: 5-fluorouracil, doxorubicina, ciclofosfamida; FEC: 5-fluorouracil, epirubicina, ciclofosfamida; FMC: 5-fluorouracil, mitoxantrona, ciclofosfamida; HR: *Hazard Ratio*; N0: linofodo negativo; N+: linfonodo positivo; NR: não relatado; QT: quimioterapia; TAM: tamoxifen; +: positivo; -: negativo; \* para a população global (n=732)



**Tabela 3.** Valores de HR e testes de heterogeneidade para todos os subgrupos analisados em pacientes com câncer de mama precoce

<b>Grupo</b>	<b>Número de estudos</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Efeito fixo HR (95% CI)</b>	<b>Teste de heterogeneidade de (valor de P)</b>	<b>Efeito randômico HR (IC 95%)</b>
<b>Sobrevida livre de doença</b>					
<b>Todos pts</b>	38	10,954	1,88 (1,75-2,02)	0,01	1,93 (1,74-2,14)
<b>N- pts</b>	15	3,370	2,20 (1,88-2,58)	0,03	2,31 (1,83-2,92)
<b>N+ pts</b>	8	1,430	1,59 (1,35-1,87)	0,68	
<b>N- não tratados pts</b>	6	736	2,72 (1,97-3,75)	0,89	
<b>Sobrevida global</b>					
<b>Todos pts</b>	35	9,472	1,89 (1,74-2,06)	<0,001	1,95 (1,70-2,24)
<b>N- pts</b>	9	1,996	2,19 (1,76-2,72)	0,001	2,54 (1,65-3,91)
<b>N+ pts</b>	4	857	2,33 (1,83-2,95)	0,44	
<b>N- / N+ não tratados pts</b>	2	284	1,79 (1,22-2,63)	0,36	

**Legendas:** IC: intervalo de confiança; HR: *Hazard Ratio*; N-: linfonodo negativo;

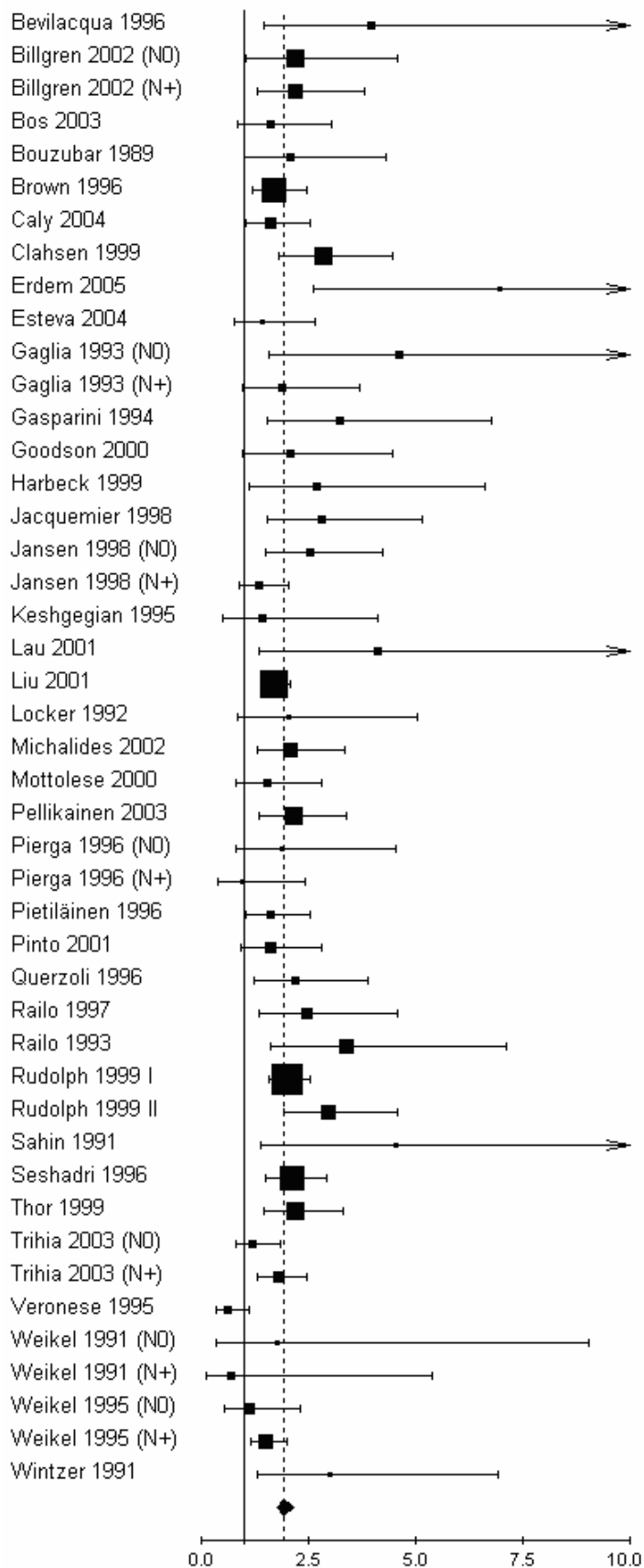
N+: linfonodo positivo; Pts: pacientes;

**Tabela 4.** Estudos que não foram incluídos na meta-análise principal, mas que foram incluídos no teste de sensibilidade

<b>Autor</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Valor prognóstico do Ki-67 (Sim / Não)</b>
Beck 1995 [75]	462	Sim
Biesterfeld 1998 [76]	103	Sim
Bukholm 2003 [77]	147	Não
Ceccarelli 2000 [78]	217	Sim
Galiègue 2004 [79]	117	Não
Gasparini 1992 [80]	164	Sim
Haerslev 1996 [81]	487	Sim
Jalava 2000 [82]	414	Não
Kroger 2006 [83]	157	Não
Kronblad 2006 [84]	377	Sim
Lampe 1998 [85]	142	Sim
Liu 2000 [86]	225	Sim
Michels 2003 [87]	104	Não
Molino 1997 [88]	322	Sim
Rudas 1994 [89]	184	Não
Tsutsui 2005 [90]	249	Sim
Yang 2003 [91]	147	Não

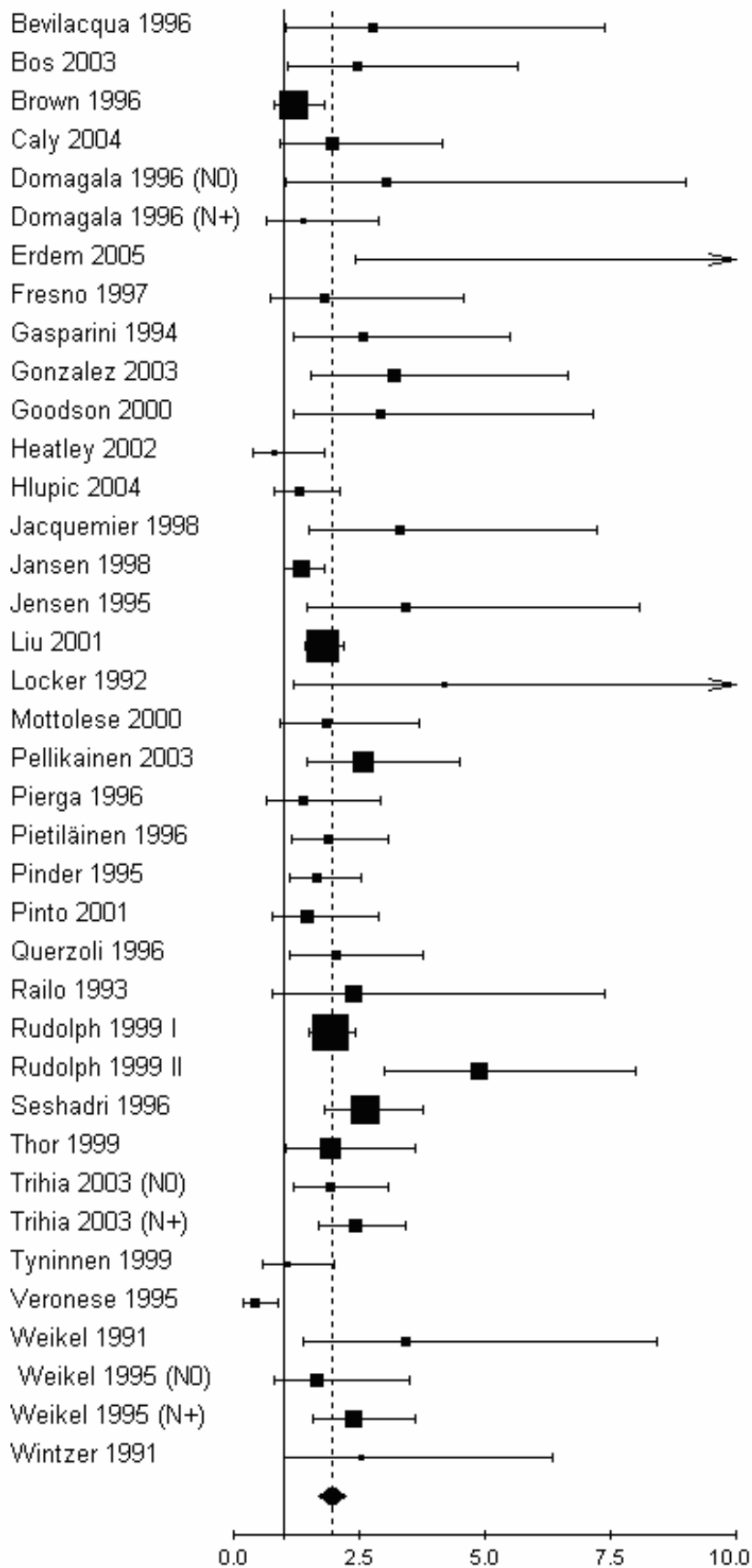
**Tabela 5.** Principais resultados das assinaturas de expressão genéticas recentes no câncer de mama

<b>Assinatura de expressão genética</b>	<b>Número de genes na assinatura</b>	<b>Descrição dos genes na assinatura</b>	<b>Referência</b>
<b>Assinatura 70-genes</b>	70	Ciclo celular, angiogênese, invasão e metástases	<b>[92]</b>
<b>Assinatura 76-genes</b>	76	Ciclo celular, proliferação, reparo do DNA, resposta imune e apoptose	<b>[93]</b>
<b>Escore de recidiva</b>	21	Proliferação, receptor de estrogênio e estado do HER-2, invasão e 5 genes de referência	<b>[9]</b>
<b>Índice de grau genômico</b>	97	Ciclo celular e genes de proliferação	<b>[94]</b>
<b>Assinatura P53</b>	32	Genes de proliferação e fatores de transcrição (não alvo do p53 )	<b>[95]</b>
<b>Assinatura morte por câncer</b>	11	Ciclo celular e genes de proliferação	<b>[96]</b>
<b>Assinatura expressão de gene regulada pelo estrogênio</b>	822	Genes de proliferação e anti-apoptose	<b>[97]</b>





**Figura 1.** Resultado da meta-análise com todos os estudos avaliáveis para sobrevida livre de doença (SLD) na população global. A *Hazard Ratio* (HR) > 1 significa uma menor SLD para o grupo com Ki-67 aumentado. O tamanho dos quadrados é proporcional ao número de pacientes incluídos em cada estudo. O centro do losango indica a HR combinada para a meta-análise e suas extremidades os intervalos de confiança a 95%.



**Figura 2.** Resultado da meta-análise com todos os estudos avaliáveis para sobrevida global (SG) na população global. A *Hazard Ratio* (HR) > 1 significa uma menor SG para o grupo com Ki-67 aumentado. O tamanho dos quadrados é proporcional ao número de pacientes incluídos em cada estudo. O centro do losango indica a HR combinada para a meta-análise e suas extremidades os intervalos de confiança a 95%

## **7.2 Artigo 2 em português**

Ann Oncol; submetido

IF 2005 4.319

**Superexpressão/amplificação do HER-2 e sua interação com a quimioterapia a  
base de taxanos no câncer de mama**

**Superexpressão/amplificação do HER-2 e sua interação com a quimioterapia a base de taxanos no câncer de mama**

Azambuja E<sup>1,2</sup>, Durbecq V<sup>1</sup>, Rosa DD<sup>1</sup>; Colozza M<sup>3</sup>, Larsimont D<sup>1</sup>, Piccart-Gebhart M<sup>1</sup>, Cardoso F<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamentos de Oncologia Médica & Unidade de Pesquisa Translacional – Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica

<sup>2</sup> Estudante do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> S.C. Oncologia Médica, Azienda Ospedaliera, San Sisto 06132 Perugia, Itália

**Correspondência para:**

Fatima Cardoso, MD

Instituto Jules Bordet

Boulevard de Waterloo, 125

1000 Bruxelas, Bélgica

Telefone: +32-2-541-3082

Fax : +32-2-541-0858

e-mail: fatima.cardoso@bordet.be

**Conflito de interesse:** FC e MP declaram conflito de interesse

**Resumo:**

O câncer de mama (CM) é o tipo mais comum de câncer em mulheres e é considerado incurável quando na presença de metástases. Os taxanos, tais como o docetaxel e paclitaxel, são agentes quimioterápicos efetivos quando utilizados como tratamento metastático, neoadjuvante ou adjuvante do CM. A superexpressão ou amplificação do HER-2 é detectada em 25-30% dos CM e é responsável por um comportamento tumoral mais agressivo, bem como pela resistência a determinados tratamentos sistêmicos; entretanto, sua associação com resposta à quimioterapia (QT) a base de taxanos permanece indefinida, com resultados conflitantes entre os estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*.

Essa revisão tem por objetivo avaliar o impacto da superexpressão/amplificação do HER-2 nas pacientes com CM tratadas com taxanos. Estudos prospectivos e randomizados incorporando hipóteses biológicas importantes estão em andamento ou foram recentemente fechados e os seus resultados deverão ajudar na elucidação dessa questão.

**Palavras-chave:** câncer de mama, domínio extracelular, superexpressão do HER-2, resistência aos taxanos, trastuzumab

## Introdução

Os taxanos são agentes que interferem na dinâmica dos microtúbulos, estabilizando-os e prevenindo sua despolimerização. O paclitaxel foi o primeiro taxano utilizado nos estudos clínicos e foi identificado como um extrato ativo da planta *Taxus brevifolia* [1]. O docetaxel foi subsequentemente gerado a partir das folhas da planta européia *Taxus baccata*, através de um processo semi-sintético [2, 3]. Estas duas drogas são consideradas uma das classes mais ativas no tratamento do CM metastático (CMM), com taxas de respostas variando entre 30% a 60% quando utilizadas como agentes únicos em pacientes sem ou com mínimo tratamento prévio, e entre 20% a 45% nas pacientes multi-tratadas [4]. O seu papel no tratamento adjuvante, principalmente para as pacientes com linfonodos negativos, ainda é controverso, visto que o benefício é muito pequeno e, provavelmente, confinado a um subgrupo de pacientes que ainda deve ser identificado. O custo desse tratamento também não pode ser negligenciado, especialmente o do docetaxel, o qual ainda não possui um substituto genérico.

A amplificação/superexpressão do HER-2, também conhecido como c-erbB2 ou *neu*, tem sido descrita em 25-30% dos CM e associa-se a um pior prognóstico, tanto nas pacientes com linfonodos negativos como nas com linfonodos positivos [5-8]. Nos estudos *in vitro*, a superexpressão do HER-2 confere uma resistência aumentada ao paclitaxel nas células de CM, enquanto que a degradação do HER-2 aumenta a apoptose induzida pelo docetaxel [9-11]. Esses resultados são corroborados pelos estudos clínicos de fase III, que demonstram que a resposta ao

paclitaxel foi significativamente aumentada nos pacientes com CM quando o HER-2 estava suprimido pelo anticorpo monoclonal anti-HER-2 (trastuzumab) [12].

O objetivo desta revisão é identificar os possíveis mecanismos de resistência aos taxanos nas pacientes com CM e superexpressão do HER-2. Estudos pré-clínicos e clínicos bem como o papel do trastuzumab para a reversão dessa resistência são discutidos.

## **Matérias e métodos**

Uma pesquisa na literatura utilizando o PubMed foi realizada. Os artigos foram selecionados utilizando-se as palavras-chave “HER-2/neu” e “resistência ao paclitaxel” ou “resistência ao docetaxel” e “trastuzumab mais taxanos”. Somente artigos publicados na língua inglesa até 1 de agosto de 2006 foram revisados. Resumos publicados ou apresentados em congressos internacionais importantes foram também incluídos.

## **Superexpressão do HER-2 e resistência aos taxanos: estudos *in vitro***

As células humanas do CM que possuem altos níveis de receptores do HER-2 demonstram resistência aumentada ao paclitaxel na ordem de 100 vezes, bem como altos níveis de glicoproteína P MDR1 (p170<sup>mdr-1</sup>). Essa proteína funciona como uma bomba de efluxo de droga, no intuito de reduzir o acúmulo de drogas específicas e



sua expressão tem sido altamente correlacionada com a resistência aos taxanos [13].

A adição de emodina, um inibidor da porção tirosina quinase do HER-2, ao paclitaxel induz uma inibição sinérgica da proliferação celular das células CM MDA-MB-361 em torno de 70%, a qual foi maior do que a inibição vista com a emodina ou o paclitaxel sozinhos (28% e 16%, respectivamente). Resultados similares foram também observados nas células BT-474, sugerindo que a atividade do receptor da tirosina quinase HER-2 contribui para a resistência ao paclitaxel nas células de CM que superexpressam o mesmo [14].

As linhagens celulares expressando ambos receptores HER-2 e HER-3 apresentam altos níveis de Akt fosforilada ativada, a qual pode suprimir a apoptose devido à interação ou à fosforilação de vários efetores importantes, e podem, portanto, contribuir para a resistência a várias drogas anti-câncer, incluindo os taxanos. Nas células MCF-7/HER-2 transfectadas, a ativação do Akt pode ser mediada pela via do PI-3K, levando à resistência a diferentes drogas, incluindo o paclitaxel [15].

Pegram e colegas descreveram que a presença do HER-2 não foi suficiente para induzir resistência a drogas e que a resposta ao paclitaxel não foi estatisticamente diferente entre as células superexpressando HER-2 e as células controles [16]. Por outro lado, Yu e colegas descreveram que as células MDA-MB-435 transfectadas com HER-2 eram mais resistentes ao paclitaxel do que as células parentais ( $p < 0,00012$ ), independentemente das características do ciclo celular, da transformação oncogênica ou do *mdr-1* [9]. Outro possível mecanismo de resistência

é a inibição da apoptose e da ativação da quinase p34<sup>Cdc2</sup> através da super regulação do p21<sup>Cip1</sup> [17] ou da fosforilação Cdc2 da tirosina Y15, a qual pode induzir resistência à apoptose induzida pelo paclitaxel [18].

As células MCF-10A Ha-ras apresentam uma sensibilidade aumentada aos taxanos, enquanto que as MCF-10A-HER-2 e MCF-10A-HE exibem uma resistência relativa ao paclitaxel e docetaxel, com uma IC<sub>50</sub> aumentada em 3,5 a 6,5 vezes, se comparada às células parentais. Além disso, a inibição da proteína quinase dependente de tipo I cAMP (PKAI) com oligonucleotídeos antisense reverte o efeito da superexpressão do HER-2 nas células MCF-10A [19].

Em células transfectadas com EGFR e HER-2 ativos, uma resistência na ordem de 2-3 vezes ao paclitaxel e uma supressão da polimerização da tubulina foram observadas quando comparadas com as células parentais. A inibição do EGFR ativo com uma mutação inativante da porção quinase parcialmente reverteu a resistência ao paclitaxel e demonstrou uma diminuição de 50% na resistência ao paclitaxel da  $\beta$ -tubulina de classe IVa. Esses resultados sugerem que a modulação da expressão da tubulina pelos receptores oncogênicos do fator de crescimento pode modular a resistência dos agentes ligantes da tubulina [20].

A ativação das proteínas quinases ativadas dos mitógenos (ERK and p38 MAPK) e da quinase Raf-1 pelo paclitaxel pode explicar um aumento no efeito citotóxico desta droga nas células com superexpressão do HER-2 [21]. Vários estudos claramente demonstraram o envolvimento da cascata do ERK na apoptose induzida pelo paclitaxel [22-29], bem como a cascata do JNK [30], p38 MAPK ou mesmo a via de indução do PKA [29]. Daly e colegas demonstraram que a apoptose

e a transição G2M induzidas pela NDF/Heregulina é dependente da ativação do p38 em células do CM com superexpressão do HER-2 e que a adição do paclitaxel tem um efeito aditivo na ativação do p38 [31, 32]. Então, a via do MAPK possui um papel essencial na morte celular induzida pelo paclitaxel e poderia ser um alvo de tratamento interessante a ser testado em estudos clínicos [21]. A tabela 1 sumariza os principais resultados dos artigos selecionados.

### **HER-2 como preditor de resposta aos taxanos: dados clínicos**

Em 2001, Yamauchi e colegas conduziram uma revisão extensa sobre o HER-2 como preditor de resposta às terapias para o CM e concluíram que o mesmo não poderia ser utilizado para determinar se uma paciente deveria receber quimioterapia ou tratamento hormonal adjuvante [33]. Desde então, vários outros artigos estudando a relação entre o HER-2 e o benefício aos taxanos no CM têm sido publicados. Esses estudos estão sumarizados nas tabelas 2, 3 e 4 e são discutidos a seguir.

#### **I- Taxano como agente único:**

Um estudo realizado pelo grupo do Memorial Sloan-Katterring Cancer Center incluiu 122 pacientes (102 tratadas com paclitaxel e 20 com docetaxel), de 212 pacientes com CMM envolvidas em 8 diferentes estudos de fase II. A taxa de

resposta global (TRG) aos taxanos foi de 46,7%, e a maior TRG foi observada em pacientes HER-2 positivos (65,2%;  $p= 0,002$ ) [1].

O HER-2 não foi um preditor de resposta ao docetaxel (D) nem ao metotrexato combinado com 5-fluorouracil (MF), administrados após falha das antraciclinas, em uma análise retrospectiva com 131 pacientes com CMM incluídas em um estudo randomizado [34]. A TRG foi de 53% no braço D e 24% no braço MF ( $p<0,01$ ), enquanto que a TRG foi similar entre as pacientes com tumores HER-2 positivos ou negativos (53% em ambos grupos) no braço com taxano. Infelizmente, as pacientes com HER-2 2+ pela imunohistoquímica (IHQ) e não confirmados por FISH também foram incluídas nessa análise, possivelmente, confundindo os resultados.

Em outro estudo, Di Leo e colegas retrospectivamente analisaram pacientes com CMM incluídas em um estudo de fase III e randomizadas para receber doxorubicina (A) ou docetaxel (D) (estudo TAX 303) [35]. A amplificação do FISH foi determinada como a razão do número de sinais do HER-2 no centrômero  $17 > 2$ . A TRG foi significativamente maior com D do que com A (161 pacientes: 47,8% *versus* 165 pacientes: 33,3%, respectivamente;  $p=0,008$ ) em todas as pacientes e no subgrupo com HER-2 positivo (67% *versus* 27%, respectivamente;  $p=0,04$ ), apesar dessa diferença não ter aumentado o tempo para progressão (TPP) ou a sobrevida global (SG). No braço do docetaxel, a ORR foi significativamente maior nas pacientes com amplificação do HER-2 do que nas pacientes sem amplificação. Interessante, a interação entre o estado do HER-2 e o tratamento foi o único fator significativo associado com um aumento na probabilidade de resposta ao D na análise multivariada (razão de chances, OR= 3,64, 95% CI 1,39-9,54;  $p=0,01$ ).

O estudo 10923 da Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC) foi um estudo de fase III desenhado para comparar a doxorrubicina com o paclitaxel (mudança de braço era possível no momento da progressão) em pacientes com CMM. No braço do paclitaxel (56 pacientes tratadas em primeira linha e 31 em segunda linha), uma TRG foi vista em 21 pacientes (24%), mas nenhuma correlação entre o estado do HER-2 e a resposta ao paclitaxel foi encontrada [36]. Similarmente, a expressão do HER-2 não foi preditora de resposta ao paclitaxel na análise univariada ou multivariada ( $p= 0,511$ ) em uma população de 144 pacientes com CMM incluídas em 9 diferentes estudos clínicos, utilizando diferentes doses de paclitaxel (TRG 42%) [4].

Nos estudos neoadjuvantes, o HER-2 foi associado a uma melhor resposta ao paclitaxel administrado em dose intensa em 15 de 21 pacientes com CM estágio T2-3; a resposta clínica (RC) foi mais do que o dobro nas pacientes com tumores HER-2 positivos e tratadas com paclitaxel ( $p<0,05$ ). Apesar desse estudo ser prospectivo, ele não era randomizado, possuía um pequeno número de pacientes e foi publicado somente como resumo [37]. Outro pequeno estudo randomizado falhou em demonstrar correlação entre a positividade do HER-2 e a resposta patológica completa (RCp) em 29 pacientes com CM localmente avançado (CMLA), T3 ou T4, tratadas com doxorrubicina seguida de paclitaxel ou paclitaxel seguido de doxorrubicina em esquema de dose intensa [38]. Esses resultados negativos foram confirmados utilizando FISH (HER-2/CEP17  $>2$ ) em 71 pacientes tratadas com paclitaxel ou docetaxel neoadjuvantes administrados a cada três semanas [39]. Estévez e colegas também falharam em demonstrar uma correlação entre a resposta

clínica ou patológica e a expressão do HER-2 ( $p=0,355$  e  $p=0,942$ , respectivamente) em 56 pacientes com CM estágios II-III tratadas com docetaxel semanal neoadjuvante (TRG 68% e RCp 16%) [40]. Entretanto, todos esses estudos não foram randomizados, tinham poucas pacientes e, em dois estudos, o estado do HER-2 não foi confirmado por FISH.

Achados interessantes de Modi e colegas demonstraram que a ativação ou a fosforilação do HER-2 associa-se a uma resistência clínica aos taxanos em 126 pacientes incluídas em diferentes estudos com taxanos como agente único para o CMM e, talvez, a avaliação funcional do estado do HER-2 possa fornecer uma informação preditiva única não vista com a avaliação convencional [41].

## **II – Taxanos em combinação:**

O papel do HER-2 também foi avaliado na QT combinada e os resultados dos principais estudos estão sumarizados na tabela 3. A epirrubicina e o docetaxel pré-operatórios resultaram em uma TRG de 74,3% em 97 CM primários; entretanto, nenhuma correlação entre a resposta à QT e o estado do HER-2 foi encontrada ( $p=0,876$ ) [42]. Em um pequeno estudo com 19 pacientes com CMLA e tratadas com doxorubicina e docetaxel (DD), o estado do HER-2 foi um preditor de resposta. As pacientes com tumores com alta expressão do HER-2 tiveram mais RCp ou doença mínima residual do que as pacientes com tumores HER-2 negativos [43]. Resultados similares foram vistos em 200 pacientes randomizadas para receber cisplatina,

epirrubicina e paclitaxel semanais ou epirrubicina e paclitaxel a cada três semanas [44].

Entretanto, o estado do HER-2, centralmente analisado por FISH (amplificado se > 5 cópias de genes), não foi um preditor de resposta nas primeiras 648 pacientes incluídas no estudo GeparTrio e tratadas com docetaxel, doxorubicina e ciclofosfamida (TAC) ou vinorelbina e capecitabina. Resposta patológica completa foi obtida em 51 pacientes (17,9%), mas nenhuma diferença foi observada entre as pacientes HER-2 positivo ou HER-2 negativo [45]. Em um estudo retrospectivo com 121 pacientes incluídas em um estudo randomizado comparando tratamento pré-operatório com doxorubicina e ciclofosfamida (AC) com ou sem docetaxel, nenhuma diferença em resposta clínica foi vista entre os dois braços de tratamento (55% *versus* 82%, respectivamente), apesar de uma maior TRG, mas não significativa, ser relatada, independentemente do estado do HER-2, no braço do docetaxel [46].

Resposta patológica foi observada em 12 de 36 pacientes com CMLA (33%) tratadas com paclitaxel semanal combinado com radioterapia, e um maior número de respostas patológicas (completas e parciais) foram descritas nas pacientes cujos tumores tinham uma baixa expressão do gene do HER-2 analisado por RT-PCR ( $p=0,009$ ); entretanto, essa diferença desapareceu quando a IHQ foi realizada ( $p=0,11$ ). Se a expressão do HER-2 no CM confere uma resistência ao paclitaxel, à radioterapia ou a ambos, ainda não está definido [47].

No tratamento adjuvante, o estudo BCIRG 001 comparou TAC contra 5-fluorouracil, doxorubicina e ciclofosfamida (FAC). Durante um seguimento médio de 55 meses, foi demonstrada redução relativa de 39% no risco de recidiva de câncer

no subgrupo de pacientes com 1-3 linfonodos positivos tratadas com TAC, comparadas àquelas tratadas com FAC ( $p < 0,001$ ). Nas pacientes com tumores HER-2 positivos, uma redução relativa de 40% no risco de recidiva do câncer foi relatada com uso de TAC, comparado a 24% para as pacientes tratadas com FAC ( $p = 0,046$ ) [48, 49]. Dados do estudo CALGB 9344 (paclitaxel adjuvante seguido de AC nas pacientes com CM e linfonodos positivos), apresentados no encontro da ASCO em 2006, demonstraram que o tratamento com paclitaxel resultou num maior benefício em OS ( $p = 0,0056$ ) e sobrevida livre de doença (SLD;  $p = 0,0093$ ) nas pacientes com tumores HER-2 positivos. Os subgrupos de pacientes com tumores receptores de estrogênio (RE) negativos e/ou HER-2 positivos foram os que mais se beneficiaram do paclitaxel [50].

Konecny e colegas descreveram uma análise retrospectiva do estudo AGO em 516 pacientes com CMM, o qual comparou epirrubicina e ciclofosfamida (EC) com epirrubicina e paclitaxel (ET). Uma TRG similar foi vista em ambos braços de tratamento no estudo clínico (46% e 41%, respectivamente) [51]. O estado do HER-2 foi avaliado por FISH (razão  $> 2$ ) em 275 pacientes que possuíam blocos de tumores disponíveis (137 pacientes tratadas com EC e 138 tratadas com ET). As pacientes com tumores HER-2 positivos tiveram uma resposta objetiva significativamente maior do que aquelas com tumores HER-2 negativos após o tratamento com ET, mas não com EC; uma tendência para uma melhor sobrevida livre de progressão (SLP) e SG foi descrita nas pacientes com tumores HER-2 positivo tratadas com taxano [52]. A combinação de doxorubicina com paclitaxel (DT) como primeira linha em 49 pacientes com CMM resultou em uma resposta completa de 31% (15 pacientes), a



qual foi aumentada para 50% nas pacientes com tumores HER-2 positivo, uma melhora estatisticamente significativa em comparação com os 17% observados nas pacientes com tumores HER-2 negativo [53].

Em uma recente meta-análise sobre o uso de taxanos como agentes únicos ou em combinação com antraciclinas no tratamento de primeira linha para pacientes com CMM, o uso de antraciclina apenas foi significativamente melhor do que o taxano como droga única em termos de SLP, mas não em termos de SG. Além disso, as combinações com taxanos resultaram em uma TRG significativamente melhor do que as combinações com antraciclinas, mas foram marginalmente melhor em termos de SLP e não em termos de SG [54].

### **III – Taxanos em combinação com trastuzumab:**

#### **1) Dados *in vitro*:**

Trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado anti-p185<sup>HER2/neu</sup>, com grande afinidade para o receptor do HER-2, foi projetado a partir de um clone humano IgG e dos resíduos do ligante de antígenos do anticorpo monoclonal de rato 4D5 [55]. O trastuzumab tem sido utilizado como rotina no tratamento de pacientes com CMM e HER-2 positivo, e, recentemente, demonstrou importante benefício em termos de SLD e SG no CM precoce administrado em combinação ou após a QT adjuvante [56-58]. Existe uma hipótese de que o trastuzumab possa sensibilizar células do CM com superexpressão do HER-2 através da repressão da regulação do

p21<sup>Cip1</sup> mediada pelo HER-2, permitindo a ativação da quinase p34<sup>Cdc2</sup> pelo paclitaxel, resultando em apoptose [59].

Em uma concentração IC<sub>50</sub>, a combinação de trastuzumab com paclitaxel ou docetaxel foi sinérgica nas células MCF7 (HER-2 -), MDA-MB453 (HER-2 ++), e SKBR3 (HER-2 +++). Entretanto, em uma concentração IC<sub>30</sub> - IC<sub>70</sub>, o trastuzumab interagiu de forma aditiva com o docetaxel nas células SKBR3 e MDA-MB453, enquanto que uma interação aditiva e sinérgica foram observadas com paclitaxel nas células SKBR3 e MDA-MB453, respectivamente [60]. Interações sinérgicas também foram descritas com a combinação de trastuzumab com paclitaxel/carboplatina (índice de combinação, IC: 0,64, p<0,0001) e docetaxel/carboplatina (IC: 0,34, p<0,00004) [61]; um IC <1 significa sinérgismo e =1 significa efeito aditivo [62]. Efeitos citotóxicos aditivos foram observados com a combinação de trastuzumab e paclitaxel (IC= 0,91, p=0,21) *in vitro* bem como *in vivo*, resultando em uma redução significativa no volume das células Her-2-transfectadas MCF7 comparada com a QT sozinha (p<0,05) [62]. Esses resultados são coerentes com os dados reportados por Baselga e colegas, que descreveram um efeito citotóxico aumentado do paclitaxel nas células BT-474 e SKBR3 com superexpressão do HER-2; esse efeito foi confirmado *in vivo* com inibição de 93% do crescimento de tumor em ratos transplantados com células BT-474 e tratados com trastuzumab e paclitaxel [63]. Inibição do crescimento do tumor em 5 semanas foi superior no grupo de tratamento combinado quando comparado ao paclitaxel sozinho (p=0,016), mas não ao trastuzumab sozinho (p=0,4). Além disso, uma erradicação maior do tumor em 5 semanas foi observada em animais tratados com trastuzumab e

paclitaxel, quando comparado com paclitaxel ou trastuzumab sozinhos ( $p=0,004$  e  $p=0,04$ , respectivamente). Neste estudo, dois mecanismos são propostos para explicar como o trastuzumab produz um aumento no efeito tumoricida do paclitaxel: a) a soma de efeitos anti-câncer das duas drogas agindo em diferentes alvos; e b) a exposição ao paclitaxel pode produzir uma super regulação do receptor do HER-2, tornando as células mais sensíveis ao efeito antiproliferativo do trastuzumab [63].

Uma subregulação da expressão do HER-2 através de inibição da super regulação do  $p21^{Cip1}$  e da expressão da fosforilação do Cdc2-Tyr-15 foi observada em células de CM com superexpressão do HER-2 (MDA-MB-435, MDA-MB-453 e SKBR3) tratadas com trastuzumab, mas não nas células controles ou tratadas com paclitaxel. O tratamento com trastuzumab e paclitaxel produziu um efeito aditivo na ativação do  $p34^{Cdc2}$ , o qual é necessário para a indução da apoptose pelo paclitaxel. A desfosforilação do Cdc2-Tyr-15 e a subregulação do  $p21^{Cip1}$  ocorrem, pelo menos, 24 horas após o tratamento com trastuzumab, e o pré-tratamento com trastuzumab aumenta a apoptose induzida pelo paclitaxel, sendo mais citotóxico *in vitro* e mais efetivo na inibição do crescimento dos tumores transplantados, apresentando maior apoptose *in vivo* [64].

## 2) Dados clínicos:

Transportando as hipóteses prévias para a clínica, alguns estudos randomizados com taxanos em combinação com trastuzumab foram realizados em pacientes com CMM e tumores HER-2 positivos e os resultados estão sumarizados

na tabela 4. O estudo M77001 incluiu pacientes com tumores HER-2 positivos (IHQ 3 + ou FISH +), e é o único estudo que comparou docetaxel sozinho a docetaxel e trastuzumab como tratamento de primeira linha para CMM. A adição do trastuzumab ao docetaxel resultou numa melhora significativa em TRG, TPP e SG, com maior efeito quando a combinação era administrada desde o início do tratamento do que quando o trastuzumab era adicionado ao docetaxel no momento da progressão [65].

Dois outros estudos avaliaram o paclitaxel administrado a cada 3 semanas [12] ou semanal [66], sozinho ou em combinação com trastuzumab. Ambos estudos resultaram numa melhora significativa da TRG e TPP no subgrupo de pacientes HER-2 positivo no braço com trastuzumab. A tripla combinação de paclitaxel/carboplatina/trastuzumab foi administrada em 188 pacientes com CMM e tumores HER-2 positivos (IHQ 2 +/3 +). Um aumento na TRG e TPP foram relatadas quando a tripla combinação foi administrada nas pacientes cujos tumores eram HER-2 IHQ 3+ [67]. O paclitaxel semanal em combinação com carboplatina e trastuzumab em pacientes com CMM e superexpressão do HER-2 (IHQ 3 + ou FISH +) resultou em uma melhor TRG do que quando administrado a cada 3 semanas (o valor de p não foi descrito). O braço do paclitaxel a cada 3 semanas foi fechado prematuramente devido à pobre tolerância ao tratamento [68].

Recentemente, Buzdar e colegas relataram um aumento significativo da RCp com 4 ciclos de paclitaxel seguidos de 4 ciclos de FEC com trastuzumab semanal, em 18 pacientes, comparadas a 16 pacientes tratadas com QT apenas (67% *versus* 25%, respectivamente; p=0,02). Apesar desse pequeno estudo ser de fase II randomizado, os resultados eram provocantes e o estudo foi prematuramente

fechado [69]. O seguimento do estudo demonstrou que a eficácia permanece a mesma após a inclusão de 22 pacientes adicionais [70]. Outro estudo neoadjuvante testou a eficácia da combinação docetaxel/carboplatina com ou sem trastuzumab em pacientes com CM estágio III. Das 37 pacientes com avaliação patológica, 11 (29%) demonstraram RCp do tumor primário e 5 desses casos eram HER-2 positivos. Entre 22 pacientes com tumores HER-2 positivos que completaram o tratamento neoadjuvante, RPC foi descrita em 36,4% no grupo trastuzumab e em 9% no grupo docetaxel/carboplatina [71].

Destes sete estudos, cinco eram estudos randomizados de fase II [66-69] e somente dois não incluíram pacientes com CMM [69, 71]. Portanto, a interpretação dos resultados é difícil e não nos permite concluir se o HER-2 está envolvido na resistência aos taxanos nas pacientes estudadas.

#### **IV – Domínio extracelular do HER-2 como fator preditivo de resposta aos taxanos:**

O domínio extracelular do receptor do HER-2 (HER-2 ECD), uma proteína de aproximadamente 105 Kda, é dividida e separada do receptor [72]. A mesma pode ser detectada no soro de mulheres com CMM através do uso do teste de enzima ligada imunoabsorvente (ELISA). A porcentagem média das pacientes apresentando HER-2 ECD circulante elevado é de 45,6% (variação, 23% a 80%) [73]. Sua presença tem sido correlacionada com uma maior agressividade do tumor, e uma boa correlação existe entre HER-2 ECD e superexpressão do HER-2, utilizando IHQ

quando o valor de corte é otimizado em 15 ng/mL [72]. Alguns estudos foram realizados para avaliar o papel do HER-2 ECD em pacientes tratadas com taxanos e os resultados são conflitantes, como demonstrado na tabela 5.

Em um estudo prospectivo, os níveis do HER-2 ECD foram preditivos de resposta, com uma significativa relação inversa nas pacientes com CMM tratadas com doxorrubicina e paclitaxel. Adicionalmente, uma menor duração de resposta foi encontrada nas pacientes com altos níveis de HER-2 ECD na análise multivariada ( $p=0,04$ ) [74]. Esses resultados foram confirmados em outros dois estudos: i) menores taxa de resposta e duração de resposta (7,9 meses *versus* 14,4 meses;  $p=0,04$ ) foram observadas em pacientes com altos níveis de HER-2 ECD tratadas com combinação de gemcitabina e paclitaxel, administrados a cada duas semanas [75]; ii) níveis elevados de ECD também foram associados a uma menor duração de resposta ( $p<0,005$ ) e TPP ( $p<0,005$ ) em 38 pacientes com CMM tratadas com docetaxel e epirrubicina como QT de primeira linha [76]. Do contrário, uma ausência de correlação entre HER-2 ECD e resposta ao tratamento com ET foi descrita nas pacientes tratadas com QT de primeira linha, apesar do intervalo livre de progressão ser maior nas pacientes com níveis aumentados de HER-2 ECD quando tratadas com ET, mas não com EC ( $p=0,0341$ ) [72].

Com o objetivo de analisar a correlação entre HER-2 ECD e a resposta aos taxanos, os dados de 280 entre 739 pacientes envolvidas no estudo ECOG 1193 foram revisados. Cento e nove pacientes receberam paclitaxel como droga inicial, 107 receberam doxorrubicina e 64 inicialmente tratadas com doxorrubicina tiveram seu tratamento modificado para paclitaxel no momento da progressão. Os autores

não encontraram associação entre a positividade do HER-2 ECD e a resposta objetiva ( $p=0,51$ ) [77]. Este estudo clínico foi recentemente publicado, mas nenhuma informação adicional foi descrita [78]. Em pacientes tratadas com dose intensificada de paclitaxel semanal (90 mg/m<sup>2</sup> durante 6 semanas, a cada 9 semanas), nenhuma diferença nas taxas de resposta (TR) foi encontrada entre as pacientes HER-2 ECD negativo e positivo (valor de corte 15 ng/mL) [79]. A concentração do HER-2 ECD foi testada antes e após 3 ciclos de docetaxel mas nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao estado do HER-2 ECD no braço com docetaxel [80].

O paclitaxel, administrado semanalmente ou a cada 3 semanas com ou sem trastuzumab, demonstrou TR semelhante entre as pacientes com alto ou baixo níveis de HER-2 ECD. No entanto, a proporção do declínio do HER-2 ECD em 34 pacientes que responderam ao tratamento foi 61%, comparada a 38% em 15 pacientes que não responderam ao tratamento ( $p=0,067$ ) [81]. A TRG foi maior nas pacientes com HER-2 ECD elevado durante a inclusão e tratadas com paclitaxel e trastuzumab semanais como primeira ou segunda linha de tratamento [82]. Adicionalmente, nas pacientes com HER-2 ECD elevada na inclusão e que apresentavam níveis inferiores a 15 ng/mL durante a semana 12 do tratamento, uma maior probabilidade de resposta ao tratamento semanal com trastuzumab e paclitaxel foi descrita ( $p=0,005$ ) [83].

Em uma análise combinada de quatro estudos randomizados em pacientes com CMM e câncer de pulmão, envolvendo 375 pacientes, Leyand-Jones e colegas não encontraram qualquer utilidade clínica para o HER-2 ECD, utilizando dois valores de corte diferentes (15 e 100 ng/mL) [84].

Em todos esses estudos descritos, tipos diferentes de testes de ELISA foram usados: Oncogene em quatro estudos [72, 75, 76, 79], Calbiochem em um [74], Bayer diagnostics em dois [82, 83] e Bender Medsystems em um [80]. Somente três estudos não utilizaram o valor de corte de 15 ng/mL: um utilizou 30 ng/mL [75] e outros dois, 450 fmol/mL [74] ou o nível da concentração sérica [80]. Todos os estudos analisaram pacientes com CMM e dois deles eram estudos randomizados de fase III [72, 77].

### **Discussão:**

A QT com docetaxel ou paclitaxel, sozinhos ou em combinação, possui um papel importante no tratamento do CM (metastático, adjuvante ou neoadjuvante) e, atualmente, não existem marcadores preditivos úteis para identificar quais são as pacientes que responderão aos taxanos. Em uma grande proporção das pacientes com CM, o tratamento com taxanos não resulta em resposta, podendo causar efeitos adversos significantes, incluindo neuropatia. A habilidade em identificar preditores de resposta ou resistência a esses agentes permitiria uma melhor seleção de tratamento a uma paciente em particular.

Os tumores da mama HER-2 positivo têm sido associados a um prognóstico pobre e a uma menor resposta a terapias sistêmicas (QT e/ou tratamento hormonal). Entre os agentes que podem apresentar resistência devido à superexpressão do HER-2 encontram-se os taxanos, a cisplatina [17], o 5-fluorouracil [85] e o tamoxifeno [86-89]. Diferentes mecanismos estão, possivelmente, envolvidos na



resistência aos taxanos, tais como a inibição da apoptose ou a ativação de vias da tirosina quinase como demonstrado nos estudos *in vitro*. A compreensão desses mecanismos pode ajudar a reduzir a resistência e a melhor definir as terapias alvos.

O manual sobre os marcadores tumorais, publicados no ano de 2000 pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica, não recomenda o uso do estado do HER-2 para determinar a prescrição de QT a base de taxanos como tratamento adjuvante ou metastático, devido à pobreza e à contradição dos resultados dos estudos [90]. A Avaliação de Tecnologia da Sociedade Americana de Oncologia Clínica também não recomenda, fora de um estudo clínico, o uso de testes de sensibilidade ou de resistência à QT para selecionar os agentes quimioterápicos para uma paciente individual. Portanto, os oncologistas devem tomar decisões relacionadas à quimioterapia baseando-se em estudos publicados, no estado de saúde e nas preferências das pacientes. Por essas razões, a participação em estudos clínicos para avaliar essas tecnologias permanece uma prioridade [91].

Os estudos pré-clínicos e clínicos têm apresentado resultados contraditórios em relação ao potencial valor preditivo do HER-2 para a resposta aos taxanos, sugerindo que o mesmo pode estar associado a sensibilidade ou resistência a esses agentes. Isto pode ocorrer, em parte, devido à grande heterogeneidade da seleção de pacientes, dos tratamentos administrados e dos métodos e coloração utilizados para definir a positividade do HER-2. Em termos de desenho de estudo e seleção das pacientes, muitos dos estudos são análises retrospectivas de tecido arquivado e poucos são provenientes de estudos clínicos randomizados; existe uma falta de distinção entre o valor prognóstico e o valor preditivo do HER-2; há diferentes

pacientes incluídas e diferentes tipos de terapias administradas. Além disso, poucas pacientes incluídas nos estudos clínicos são incluídas nos estudos translacionais, podendo resultar em um viés. Em termos de métodos de detecção, há diferentes técnicas e reagentes entre as técnicas, diferenças entre valores de corte para definir um resultado como positivo ou negativo, tumor *versus* HER-2 circulante e diferentes preparações de espécies.

O valor preditivo do HER-2 para a resposta aos taxanos como agentes únicos permanece controverso, apesar de três estudos demonstrarem uma maior taxa de ORR aos taxanos para as pacientes com CMM e tumores HER-2 positivo [1, 35, 37]. Quando os taxanos são administrados em combinação a outras drogas quimioterápicas, a taxa de TRG é, na maioria das vezes, maior nas pacientes com tumores HER-2 positivo do que nas pacientes com tumores HER-2 negativo. Infelizmente, os mecanismos para essas maiores taxas de resposta não são adequadamente elucidados e muitas questões permanecem sem respostas.

O trastuzumab pode sensibilizar as células do CM com superexpressão do HER-2 aos taxanos, resultando em uma interação aditiva ou sinérgica. No entanto, se essa resposta é causada pelo trastuzumab ou por sua ligação ao receptor do HER-2 é ainda incerto e pesquisas futuras são necessárias. O HER-2 ECD tem sido avaliado em pacientes com CMM e a redução nos seus níveis durante o tratamento parece ser relacionada com uma maior TRG, apesar de somente três estudos terem produzido resultados estatisticamente significativos [74, 75, 82]. Portanto, o estado do HER-2 e o ECD sérico não estão prontos para serem usados como marcadores preditivos de resposta à QT com taxanos como rotina clínica.

Mais recentemente, a técnica de expressão de genes tem sido utilizada para o desenvolvimento de um modelo de predição de resposta ao docetaxel e paclitaxel. Chang e colegas relataram 92 genes relacionados com a resposta ao docetaxel ( $p=0,001$ ) usando a tecnologia de *microarray*. Os tumores sensíveis apresentavam uma maior expressão de genes envolvidos no ciclo celular, citoesqueleto, adesão, proteínas de transporte, proteínas de modificação, transcrição e estresse ou apoptose, enquanto os tumores resistentes apresentavam uma maior expressão dos genes de transcrição e de sinais de transdução. Entretanto, esse estudo não foi desenhado para descobrir genes específicos de resposta ou resistência ao docetaxel, mas para identificar padrões de genes que poderiam ser utilizados como testes preditivos em pacientes com CM [92]. Devido a dificuldades em realizar os estudos de *microarray*, esse mesmo grupo estudou a expressão de genes através da técnica de adaptador competitivo da reação em cadeia da polimerase (ATAC-PCR) em 44 pacientes tratadas com docetaxel. O perfil genético das pacientes que não responderam ao tratamento era caracterizado por uma elevada expressão de genes controlando o micro-ambiente celular redox, isto é os genes redox, tais como tireodoxina, glutathione S-transferase e peroxiredoxina. A superexpressão desses genes protegeu a cultura de células tumorais mamárias da morte celular induzida pelo docetaxel, sugerindo que a estimulação do sistema do redox possui um papel fundamental na resistência ao docetaxel [93].

Ayers e colegas examinaram a possibilidade de desenvolver um preditor multigene de RCp ao tratamento sequencial de paclitaxel semanal e FAC (T/FAC) como tratamento neoadjuvante do CM. Uma RCp foi obtida em 13 pacientes (31%)

entre 42 pacientes; 24 pacientes foram utilizados como teste e 18 pacientes como validação. Os autores não puderam identificar qualquer marcador único associado com RCp para ser usado como um preditor individual. Um modelo multigene com 74 marcadores ( $p \leq 0,09$ ) foi construído utilizando-se dados das amostras de teste e confirmado com as amostras de validação. No geral, uma acurácia de 78% foi observada, com valor preditivo positivo de 100% para RCp, um valor preditivo negativo de 73%, sensibilidade de 43% e especificidade de 100% [94]. Recentemente, este estudo aumentou o seu número de pacientes para 133, com taxa de RCp de 26% (34 pacientes). Uma análise nominal do grupo de 30 genes (análise discriminante linear diagonal) foi selecionada para a validação independente. Foi observada significativa maior sensibilidade (92% *versus* 61%) quando comparada aos preditores clínicos, tais como idade, grau histológico e estado do receptor de estrogênio. Esse grupo de 30 genes preditores farmacogenômicos também, corretamente, identificaram todas, exceto uma paciente, que obtiveram RCp (12 de 13 pacientes) e todas, exceto uma paciente, para as quais esperava-se encontrar doença residual (27 de 28 pacientes) [95].

Devido aos problemas descritos acima, pode ser que a resistência ou sensibilidade aos taxanos seja melhor avaliada pela assinatura de múltiplos genes do que por uma única discriminação molecular.

Em conclusão, apesar de mais de uma década de pesquisa, o valor preditivo do HER-2 na QT a base de taxanos ainda não é validado e, portanto, não pode ser utilizado como rotina na prática clínica. Esta é, infelizmente, a mesma situação para todos os outros marcadores de resposta à QT. Para obter o desejado nível 1 de

evidência, meta-análises bem conduzidas utilizando dados individuais e/ou estudos prospectivos com hipóteses biológicas são necessários. Alguns desses estudos estão em curso, tais como os estudo BIG-EORTC-p53, e seus resultados são ansiosamente esperados.

**Referências:**

[1] Baselga J, Seidman AD, Rosen PP, Norton L. HER2 overexpression and paclitaxel sensitivity in breast cancer: therapeutic implications. *Oncology (Williston Park)* 1997;11(3 Suppl 2):43-8.

[2] Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res* 1991;51(8):2212-22.

[3] Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(20):9552-6.

[4] Van Poznak C, Tan L, Panageas KS, Arroyo CD, Hudis C, Norton L, et al. Assessment of molecular markers of clinical sensitivity to single-agent taxane therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(9):2319-26.

[5] Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8(4):307-25.

[6] Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, et al. Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):923-30.

- [7] Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer* 1994;73(9):2359-65.
- [8] Kronqvist P, Kuopio T, Nykanen M, Helenius H, Anttinen J, Klemi P. Predicting aggressive outcome in T1N0M0 breast cancer. *Br J Cancer* 2004;91(2):277-81.
- [9] Yu D, Liu B, Tan M, Li J, Wang SS, Hung MC. Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms. *Oncogene* 1996;13(6):1359-65.
- [10] Witters LM, Santala SM, Engle L, Chinchilli V, Lipton A. Decreased response to paclitaxel versus docetaxel in HER-2/neu transfected human breast cancer cells. *Am J Clin Oncol* 2003;26(1):50-4.
- [11] Bali P, Pranpat M, Swaby R, Fiskus W, Yamaguchi H, Balasis M, et al. Activity of suberoylanilide hydroxamic Acid against human breast cancer cells with amplification of her-2. *Clin Cancer Res* 2005;11(17):6382-9.
- [12] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-92.
- [13] Yu D, Liu B, Jing T, Sun D, Price JE, Singletary SE, et al. Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene* 1998;16(16):2087-94.

- [14] Zhang L, Lau YK, Xia W, Hortobagyi GN, Hung MC. Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel. *Clin Cancer Res* 1999;5(2):343-53.
- [15] Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, et al. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 2003;22(21):3205-12.
- [16] Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1997;15(5):537-47.
- [17] Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, McDonnell TJ, et al. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* 1998;2(5):581-91.
- [18] Tan M, Jing T, Lan KH, Neal CL, Li P, Lee S, et al. Phosphorylation on tyrosine-15 of p34(Cdc2) by ErbB2 inhibits p34(Cdc2) activation and is involved in resistance to taxol-induced apoptosis. *Mol Cell* 2002;9(5):993-1004.
- [19] Ciardiello F, Caputo R, Pomatico G, De Laurentiis M, De Placido S, Bianco AR, et al. Resistance to taxanes is induced by c-erbB-2 overexpression in human MCF-10A mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment with an antisense oligonucleotide targeting type I protein kinase A. *Int J Cancer* 2000;85(5):710-5.



- [20]** Montgomery RB, Guzman J, O'Rourke DM, Stahl WL. Expression of oncogenic epidermal growth factor receptor family kinases induces paclitaxel resistance and alters beta-tubulin isotype expression. *J Biol Chem* 2000;275(23):17358-63.
- [21]** Bacus SS, Gudkov AV, Lowe M, Lyass L, Yung Y, Komarov AP, et al. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene* 2001;20(2):147-55.
- [22]** Blagosklonny MV, Schulte TW, Nguyen P, Mimnaugh EG, Trepel J, Neckers L. Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1. *Cancer Res* 1995;55(20):4623-6.
- [23]** Blagosklonny MV, Robey R, Bates S, Fojo T. Pretreatment with DNA-damaging agents permits selective killing of checkpoint-deficient cells by microtubule-active drugs. *J Clin Invest* 2000;105(4):533-9.
- [24]** Huang Y, Sheikh MS, Fornace AJ, Jr., Holbrook NJ. Serine protease inhibitor TPCK prevents Taxol-induced cell death and blocks c-Raf-1 and Bcl-2 phosphorylation in human breast carcinoma cells. *Oncogene* 1999;18(23):3431-9.
- [25]** Lieu CH, Liu CC, Yu TH, Chen KD, Chang YN, Lai YK. Role of mitogen-activated protein kinase in taxol-induced apoptosis in human leukemic U937 cells. *Cell Growth Differ* 1998;9(9):767-76.
- [26]** Rasouli-Nia A, Liu D, Perdue S, Britten RA. High Raf-1 kinase activity protects human tumor cells against paclitaxel-induced cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 1998;4(5):1111-6.

- [27] Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res* 1998;58(16):3620-6.
- [28] Wolfson M, Yang CP, Horwitz SB. Taxol induces tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 in murine RAW 264.7 cells. *Int J Cancer* 1997;70(2):248-52.
- [29] Shtil AA, Mandlekar S, Yu R, Walter RJ, Hagen K, Tan TH, et al. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells. *Oncogene* 1999;18(2):377-84.
- [30] Wang TH, Wang HS, Ichijo H, Giannakakou P, Foster JS, Fojo T, et al. Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem* 1998;273(9):4928-36.
- [31] Daly JM, Olayioye MA, Wong AM, Neve R, Lane HA, Maurer FG, et al. NDF/herregulin-induced cell cycle changes and apoptosis in breast tumour cells: role of PI3 kinase and p38 MAP kinase pathways. *Oncogene* 1999;18(23):3440-51.
- [32] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270(5240):1326-31.
- [33] Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(8):2334-56.

**[34]** Sjostrom J, Collan J, von Boguslawski K, Franssila K, Bengtsson NO, Mjaaland I, et al. C-erbB-2 expression does not predict response to docetaxel or sequential methotrexate and 5-fluorouracil in advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 2002;38(4):535-42.

**[35]** Di Leo A, Chan S, Paesmans M, Friedrichs K, Pinter T, Cocquyt V, et al. HER-2/neu as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. *Breast Cancer Res Treat* 2004;86(3):197-206.

**[36]** Hamilton A, Larsimont D, Paridaens R, Drijkoningen M, van de Vijver M, Bruning P, et al. A study of the value of p53, HER2, and Bcl-2 in the prediction of response to doxorubicin and paclitaxel as single agents in metastatic breast cancer: a companion study to EORTC 10923. *Clin Breast Cancer* 2000;1(3):233-40; discussion 241-2.

**[37]** Volm M, Herma, Symmans WF, Formenti SC, Oratz R, Shapiro R, et al. Her2 Status Predicts Response to Preoperative Paclitaxel in Patients with Breast Cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999:Abst 394.

**[38]** Stearns V, Singh B, Tsangaris T, Crawford JG, Novielli A, Ellis MJ, et al. A prospective randomized pilot study to evaluate predictors of response in serial core biopsies to single agent neoadjuvant doxorubicin or paclitaxel for patients with locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(1):124-33.

**[39]** Gonzalez-Angulo AM, Krishnamurthy S, Yamamura Y, Broglio KR, Puztai L, Buzdar AU, et al. Lack of association between amplification of her-2 and response to preoperative taxanes in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2004;101(2):258-63.

**[40]** Estevez LG, Cuevas JM, Anton A, Florian J, Lopez-Vega JM, Velasco A, et al. Weekly docetaxel as neoadjuvant chemotherapy for stage II and III breast cancer: efficacy and correlation with biological markers in a phase II, multicenter study. *Clin Cancer Res* 2003;9(2):686-92.

**[41]** Modi S, DiGiovanna MP, Lu Z, Moskowitz C, Panageas KS, Van Poznak C, et al. Phosphorylated/activated HER2 as a marker of clinical resistance to single agent taxane chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cancer Invest* 2005;23(6):483-7.

**[42]** Taucher S, Rudas M, Mader RM, Gnant M, Sporn E, Dubsy P, et al. Influence of neoadjuvant therapy with epirubicin and docetaxel on the expression of HER2/neu in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82(3):207-13.

**[43]** Marcus E, Coon J, Holden C, Chen S, Gail S, Harvey P, et al. Predictors of Response to Doxorubicin and Docetaxel in Locally Advanced Breast Cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000:(abstr 2582).

**[44]** Frasci G, D'Aiuto G, Comella P, Thomas R, Botti G, Rubulotta M, et al. Weekly cisplatin-epirubicin-paclitaxel (PET) with granulocyte-colony stimulating factor support versus tri-weekly epirubicin-paclitaxel in locally advanced breast cancer: final comprehensive and subgroup analysis of SICOG phase III study. *J Clin Oncol* 2006;24(18S):20S (abst 572).

**[45]** Loibl S, Blohmer JU, Raab G, Steffen J, Kaufmann M, Löhner A, et al. Prospective central assessment of HER-2 status by FISH is not a predictive factor for pathologic complete response (pCR) in 648 breast cancer patients treated preoperatively with an anthracycline / taxane based regimen in the multicentric GesparTrio trial. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(Suppl 1):S46.

**[46]** Learn PA, Yeh IT, McNutt M, Chisholm GB, Pollock BH, Rousseau DL, Jr., et al. HER-2/neu expression as a predictor of response to neoadjuvant docetaxel in patients with operable breast carcinoma. *Cancer* 2005;103(11):2252-60.

**[47]** Formenti SC, Spicer D, Skinner K, Cohen D, Groshen S, Bettini A, et al. Low HER2/neu gene expression is associated with pathological response to concurrent paclitaxel and radiation therapy in locally advanced breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52(2):397-405.

**[48]** Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C, et al. TAC improves disease free survival and overall survival over FAC in node positive early breast cancer patients, BCIRG 001: 55 months follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82(Suppl 1):(abst 43).

**[49]** Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;352(22):2302-13.

**[50]** Hayes DF, Thor AD, Dressler L, Weaver D, Broadwater G, Goldstein LJ, et al. HER2 predicts benefit from adjuvant paclitaxel after AC in node-positive breast cancer: CALGB 9344. *J Clin Oncol* 2006;24(18S):5S (abst 510).

**[51]** Luck HJ, Thomssen C, Untch M, Kuhn W, Eidtmann H, Du Bois A, et al. Multicentric Phase III Study in First Line Treatment of Advanced Metastatic Breast Cancer (ABC). Epirubicin/Paclitaxel (ET) Vs Epirubicin/Cyclophosphamide (EC). A Study of the Ago Breast Cancer Group. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000:(abst 280).

**[52]** Konecny GE, Thomssen C, Luck HJ, Untch M, Wang HJ, Kuhn W, et al. Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(15):1141-51.

**[53]** Gianni L, Capri G, Mezzelani A, Valagussa P, Greco M, Bertuzzi A, et al. HER-2/neu (HER2) amplification and response to doxorubicin/paclitaxel (AT) in women with metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997:(abstr 491).

**[54]** Piccart MJ, Burzykowski T, Sledge GW, Carmichel J, Luck HJ, Mackey JR, et al. Effects of taxanes alone or in combination with anthracyclines on tumor response, progression-free survival and overall survival in first-line chemotherapy of patients with metastatic breast cancer: an analysis of 4256 patients randomized in 12 trials. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(Suppl 1):S278 (abst 6086).

**[55]** Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that

has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17(9):2639-48.

**[56]** Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1659-72.

**[57]** Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1673-84.

**[58]** Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(8):809-20.

**[59]** Yu D. Mechanisms of ErbB2-mediated paclitaxel resistance and trastuzumab-mediated paclitaxel sensitization in ErbB2-overexpressing breast cancers. *Semin Oncol* 2001;28(5 Suppl 16):12-7.

**[60]** Merlin JL, Barberi-Heyob M, Bachmann N. In vitro comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin) combined with paclitaxel (Taxol) or docetaxel (Taxotere) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. *Ann Oncol* 2002;13(11):1743-8.

**[61]** Konecny GE, Pegram M, Beryt M, Untch M, Slamon D. Therapeutic Advantage of Chemotherapy Drugs in Combination with Herceptin Against Human Breast Cancer Cells with HER-2/neu Overexpression. *Breast Cancer Res Treat* 1999:abstr 467.

**[62]** Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999;18(13):2241-51.

**[63]** Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998;58(13):2825-31.

**[64]** Lee S, Yang W, Lan KH, Sellappan S, Klos K, Hortobagyi G, et al. Enhanced sensitization to taxol-induced apoptosis by herceptin pretreatment in ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2002;62(20):5703-10.

**[65]** Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005;23(19):4265-74.

**[66]** Gasparini G, Gion M, Mariani L, Papaldo P, Crivellari D, Filippelli G, et al. Randomized Phase II Trial of weekly paclitaxel alone versus trastuzumab plus weekly paclitaxel as first-line therapy of patients with Her-2 positive advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006.

**[67]** Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, Belt R, Illegbodun D, Loesch D, et al. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared



with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(18):2786-92.

**[68]** Perez EA, Suman VJ, Rowland KM, Ingle JN, Salim M, Loprinzi CL, et al. Two concurrent phase II trials of paclitaxel/carboplatin/trastuzumab (weekly or every-3-week schedule) as first-line therapy in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer: NCCTG study 983252. *Clin Breast Cancer* 2005;6(5):425-32.

**[69]** Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(16):3676-85.

**[70]** Buzdar AU, Valero V, Ibrahim N, Francis D, Theriault RL, Green M, et al. Prospective data of additional patients treated with neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by FEC chemotherapy with trastuzumab in HER-2 positive operable breast cancer, and an update of initial study population. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(Suppl 1):S233.

**[71]** Chang HR, Slamon D, Prati R, Glaspy J, Pegram M, Kass FC, et al. A phase II study of neoadjuvant docetaxel/carboplatin with or without trastuzumab in locally advanced breast cancer: response and cardiotoxicity. *J Clin Oncol* 2006;24(18S):569S (abst 10515).

[72] Muller V, Witzel I, Luck HJ, Kohler G, von Minckwitz G, Mobus V, et al. Prognostic and predictive impact of the HER-2/ neu extracellular domain (ECD) in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;86(1):9-18.

[73] Carney WP, Neumann R, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP. Monitoring the circulating levels of the HER2/neu oncoprotein in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004;5(2):105-16.

[74] Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, Casado A, et al. Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2356-62.

[75] Colomer R, Llombart-Cussac A, Lluch A, Barnadas A, Ojeda B, Caranana V, et al. Biweekly paclitaxel plus gemcitabine in advanced breast cancer: phase II trial and predictive value of HER2 extracellular domain. *Ann Oncol* 2004;15(2):201-6.

[76] Im SA, Kim SB, Lee MH, Im YH, Lee KH, Song HS, et al. Docetaxel plus epirubicin as first-line chemotherapy in MBC (KCSG 01-10-05): phase II trial and the predictive values of circulating HER2 extracellular domain and vascular endothelial growth factor. *Oncol Rep* 2005;14(2):481-7.

[77] Stender M, Neuberg D, Wood WC, Sledge GW. Correlation of circulating c-erb B-2 extracellular domain (Her-2) with clinical outcome in patients with metastatic breast cancer (MBC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997:abstr 541.

**[78]** Sledge GW, Neuberg D, Bernardo P, Ingle JN, Martino S, Rowinsky EK, et al. Phase III trial of doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer: an intergroup trial (E1193). *J Clin Oncol* 2003;21(4):588-92.

**[79]** Luftner D, Henschke P, Flath B, Akrivakis C, Schnabel S, Prinz B, et al. Serum HER-2/neu as a prediction and monitoring parameter in a phase II study with weekly paclitaxel in metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 2004;24(2B):895-906.

**[80]** Perez EA, Geeraerts L, Suman VJ, Adjei AA, Baron AT, Hatfield AK, et al. A randomized phase II study of sequential docetaxel and doxorubicin/cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2002;13(8):1225-35.

**[81]** Seidman AD, Broadwater G, Carney WP, Dressler L, Berry DA, Norton L, et al. Serum HER2 extracellular domain (ECD) levels and efficacy of weekly (W) or every 3-weekly (q3W) paclitaxel (P) with or without trastuzumab (T) in patients (pts) with metastatic breast cancer (MBC): CALGB 150002/9840. *J Clin Oncol* 2005;23(16S):18S (abst 558).

**[82]** Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL, Pusztai L, et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(7):1800-8.

**[83]** Fornier MN, Seidman AD, Schwartz MK, Ghani F, Thiel R, Norton L, et al. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly

trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Ann Oncol* 2005;16(2):234-9.

**[84]** Leyland-Jones B, Marty M, Baselga J, Gatzemeier U, Barton C, Lennon S. HER2 extracellular domain (ECD) levels do not predict clinical response or the time course of progression, in patients (pts) with metastatic breast cancer (MBC) or non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* 2004;15 (Suppl 3):abst 510.

**[85]** Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Osaki A, Toge T. The role of HER-2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer (review). *Oncol Rep* 2002;9(1):3-9.

**[86]** Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Ryden S, et al. ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett* 1994;81(2):137-44.

**[87]** Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(12):926-35.

**[88]** Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996;14(10):2702-8.

**[89]** Newby JC, Johnston SR, Smith IE, Dowsett M. Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3(9):1643-51.

**[90]** Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1865-78.

**[91]** Schrag D, Garewal HS, Burstein HJ, Samson DJ, Von Hoff DD, Somerfield MR. American Society of Clinical Oncology Technology Assessment: chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J Clin Oncol* 2004;22(17):3631-8.

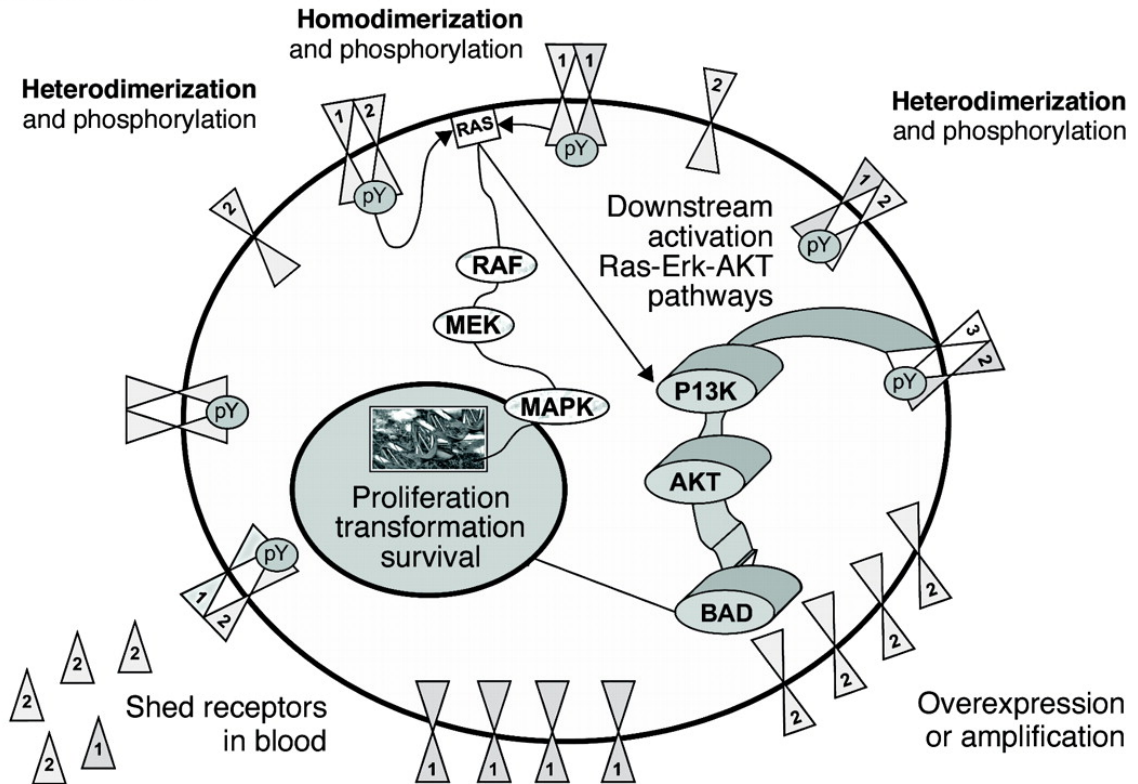
**[92]** Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003;362(9381):362-9.

**[93]** Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, Kim SJ, Ando A, Miyoshi Y, et al. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 2005;23(3):422-31.

**[94]** Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(12):2284-93.

**[95]** Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(26):4236-44.

**ErbB1 (EGFR)** ligands: EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, AR, Epi,  $\beta$ -cellulin  
**ErbB2 (HER2)** no ligands (preferred partner for heterodimerization)  
**ErbB3** ligands but no kinase activity, potent AKT activator  
**ErbB4** uncertain role



**Figura 1.** A cascata de sinais de transdução do sinal ErbB. Reproduzido com permissão de AlphaMed Press, a partir do artigo Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB2 inhibitor lapatinib. Burris HA 3<sup>rd</sup>, Oncologist 2004; 9 Suppl 3: 10-15; permissão concedida através do Copyright Clearance Center, Inc.

**Tabela 1. Hipóteses *in vitro* para a resistência aos taxanes nas células de câncer de mama superexpressando HER-2**

<b>Células de Câncer de Mama</b>	<b>Droga</b>	<b>Mecanismo provável</b>	<b>Ref.</b>
MDA-MB-435.eB (HER-2-transfectadas)	P	Mecanismo não mdr-1 Novos mecanismos?	[9]
SKBR-3, BT 483, MDA-MB-361, MDA-MB-453, BT-474 <i>versus</i> MDA-MB-231, MDA-MB-435, HBL-100	P e D	Superexpressão p170 <sup>mdr-1</sup>	[13]
MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3, BT-483, BT-474 <i>versus</i> MDA-MB-231, MCF-7, HBL-100, MDA-MB-435	P	Atividade da tirosina quinase HER-2/neu ↑	[14]
MDA-MB-361, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SKBR-3, BT-474, MCF-7 <i>Her-2 versus</i> MDA- MB-435, MDA-MB-231, MCF-7	P	Via PI-3K Atividade Akt quinase	[15]
MDA-MB-435.eB (HER-2-transfectadas)	P	↑ p21 <sup>Cip1</sup> Atividade reduzida p34 <sup>Cdc2</sup>	[17]
MDA-MB-435.eB <i>versus</i> MDA-MB-435	P	Ativação da inibição p34 <sup>Cdc2</sup> , ↑ p21 <sup>Cip1</sup> , Fosforilação inibitória do Cdc2 (Y15-p)	[18]
MCF-10A HER-2, MCF-10A Ha-ras, MCF-10 HE (HER-2+ras) <i>versus</i> MCF-10A	P e D	Ativação do PKA I Superfosforilação do Bcl2	[19]
WtEGFR-NIH3T3 (CO12), EGFRvIII- NIH3T3 (HC2), HER-2-Ras- NIH3T3 (Val-12) HER-2 mutant- HC2H (T691)	P	Polimerização diminuída da β- tubulina, ↑ tubulina classe IVa	[20]
MCF-7-HER-2 <i>versus</i> MCF-7	P	vias ERK e p38 MAPK	[21]

**Abreviações:** PKA I: proteína quinase dependente do type I c-AMP; D: docetaxel; P: paclitaxel; ↑: super regulação



**Tabela 2.** Estudos publicados avaliando o valor preditivo do HER-2 na terapia com taxanos (agentes únicos)

Drogas	Número de pacientes no braço dos TAX (C/T)	Fase do estudo	Estágio de doença	Método e anticorpo	TRG em HER-2 +	TRG em HER-2 -	Valor de p	Referências
P ou D	202/122	II	IV	IHQ (mAB 4D5)	65,2%	35,5%	<b>0,002</b>	[1]
D	131/66	III	IV	IHQ (HercepTest)	53%	53%	0,50	[34]
D	161/85	III	IV	FISH (PathVysion)	67%	40%	<b>0,03</b>	[35]
P	166/87	III	IV	IHQ (Biogenex)	24%	24%	NR	[36]
P	21/15	II	T2-3	IHQ (Não relatado)	71% <sup>a</sup>	28,5% <sup>a</sup>	<b>&lt;0,05</b>	[37]
P	29/29	II	T3-4	IHQ (Biogenex)	38%	28%	0,667	[38]
P ou D	71	II	II/III	FISH (Vysis)	16% <sup>b</sup>	10% <sup>b</sup>	0,68	[39]
D	56/46	II	II III	IHQ (HercepTest)	7 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	0,355	[40]

**Tabela 2, abreviações:** C/T: estudo clínico/Translacional; D: docetaxel; FISH: hibridização in situ fluorescente; IHQ: imuno-histoquímica; NR: não relatado; TRG: taxa de resposta global; P: paclitaxel; TAX: taxane; <sup>a</sup> resposta clínica ou patológica completa; <sup>b</sup> resposta patológica completa

**Tabela 3.** Estudos publicados avaliando o valor preditivo do HER-2 na terapia com taxanos (terapia combinada)

<b>Drogas</b>	<b>Número de pacientes no braço dos TAX (C/T)</b>	<b>Fase do estudo</b>	<b>Estágio de doença</b>	<b>Método e anticorpo</b>	<b>TRG em HER-2 +</b>	<b>TRG em HER-2 -</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Referências</b>
ED	97/97	II	I-III	FISH (PathVysion) IHQ (HercepTest)	NR	NR	0,876	[42]
AD	19/19	II	IIB, IIIA, IIIB	IHQ (Não relatado)	56%	10%	<b>0,05</b>	[43]
PET	200/100	III	IIIB	IHQ (Não relatado)	31%	5%	<b>0,037</b>	[44]
TAC	745*/648	III	> 2 cm	FISH (Não relatado)	24,5% <sup>b</sup>	19,2% <sup>b</sup>	0,17	[45]
ACD	45/45	III	I - IIIA	IHQ (Zymed)	78%	81%	0,99	[46]
P + RT	36	II	IIB, IIIA, IIIB	IHQ (BioGenex) RT-PCR (Taqman)	NR NR	NR NR	0,11 <b>0,009</b>	[47]
EP	516*/138	III	IV	FISH (Vysis)	76%	50%	<b>0,005</b>	[52]
AP	49/49	II	IV	FISH (não relatado)	50% <sup>a</sup>	17%	<b>&lt;0,02</b>	[53]

**Tabela 3, abreviações:** AC: doxorubicina + ciclofosfamida; ACD: doxorubicina + ciclofosfamida + docetaxel; AP: doxorubicina + paclitaxel; C/T: estudo clínico/Translacional; EC: epirrubicina + ciclofosfamida; ED: epirrubicina + docetaxel; EP: epirrubicina + paclitaxel; FISH: hibridização in situ fluorescente; IHQ: imuno-histoquímica; NR: não relatado; TRG: taxa de resposta global; PET: cisplatina, Epirrubina, Paclitaxel ; RT : radioterapia; RT-PCR: reação de polymerase em cadeia em tempo real; TAX: taxano. <sup>a</sup> Resposta Completa; <sup>b</sup> resposta patológica completa \* número total de pacientes em ambos braços

**Tabela 4.** Estudos randomizados de fase II e III com trastuzumab e taxanes em pacientes com câncer de mama metastático e superexpressão do HER-2

<b>Fase do estudo</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Braço de Tratamento</b>	<b>TRG (valor de p)</b>	<b>TPP</b>	<b>Referências</b>
III	96	P	17%	3,0 m	<b>[12]</b>
	92	P + H	42%	6,9 m	
			<b>(&lt; 0,001)</b>	<b>(&lt; 0,001)</b>	
II	186	D	34%	6,1 m	<b>[65]</b>
		D + H	61%	11,7 m	
			<b>(0,0002)</b>	<b>(0,03)</b>	
II	124	P semanal	47,5%	272 dias	<b>[66]</b>
		P semanal + H	84,5%	369 dias	
			<b>(0,0005)</b>	<b>(0,03)</b>	
III	98	Pcarbo q3s + s H	57%	13,8 m	<b>[67]</b>
	98	P q3s + s H	36%	7,6 m	
			<b>(0,03)</b>	<b>(0,005)</b>	
II	43	P + carbo + H q3s	65%	9,9 m	<b>[68]</b>
	48	S P + carbo + H	81%	13,8 m	

**Abreviações:** Carbo: carboplatina; D: docetaxel; H: herceptin; HD: herceptin + docetaxel; HP: herceptin + paclitaxel; m: meses; NR: não relatado; TRG: taxa de resposta global; P: paclitaxel; Pcarbo: paclitaxel + carboplatina; TPP: tempo para a progressão; q3s: cada 3 semanas; s: semanal;

**Tabela 5.** Estudos clínicos usando ECD para avaliar a resposta aos taxanos em câncer de mama metastático

<b>Drogas</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Fase do estudo</b>	<b>Estágio da doença</b>	<b>TRG em HER-2 ECD +</b>	<b>TRG em HER-2 ECD -</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Referências</b>
EC	54	III	IV	29,4%	41,9%	NR	[72]
EP	47			50%	46,2%		
DP	58	II	IV	62%	78%	<b>0,021</b>	[74]
GP	42	II	IV	42%	83%	<b>0,02</b>	[75]
A base de paclitaxel	280	III	IV	NR	NR	0,51	[77]
Paclitaxel	35	II	IV	40,9%	38,5%	0,4	[79]
D→AC	17	II	IV	NR	NR	0,432	[80]
AC→D	16						
P ± T	275	II	IV	59%	50%	0,35	[81]
P + T	30	II	IV	76%	33%	<b>0,04</b>	[82]

**Abreviações:** AC: doxorrubicina + ciclofosfamida; D: docetaxel; EC: epirrubicina + ciclofosfamida; DP: doxorrubicina + paclitaxel; EP: epirrubicina + paclitaxel; GP: gemcitabina + paclitaxel; NR: não relatada; TRG: taxa de resposta global; P: paclitaxel; RT: radioterapia; T: trastuzumab

## 7.3 Artigo 3 em português

J Clin Oncol; a ser submetido

IF 2005 11.810

**Benefício a longo prazo de quimioterapia adjuvante com epirrubicina em altas doses para pacientes com câncer de mama e linfonodo positivos: análise de eficácia do estudo Belga multicêntrico após seguimento mediano de 12 anos**

**Benefício a longo prazo de quimioterapia adjuvante com epirrubicina em altas doses para pacientes com câncer de mama e linfonodo positivos: análise de eficácia do estudo Belga multicêntrico após seguimento mediano de 12 anos**

Evandro de Azambuja<sup>1,2</sup>, Marianne Paesmans<sup>1</sup>, Marc Beauduin<sup>3</sup>, Anita Vindevoghel<sup>4</sup>, Nathalie Cornez<sup>5</sup>, Claude Finet<sup>6</sup>, Fernand Ries<sup>7</sup>, Marie Thérèse Closon-Dejardin<sup>8</sup>, Joseph Kerger<sup>9</sup>; Philippe Gobert<sup>10</sup>, Christian Focan<sup>11</sup>, Alain Tagnon<sup>12</sup>, Stella Dolci<sup>1</sup>, Jean M. Nogaret JM<sup>1</sup>, Martine J. Piccart-Gebhart<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Jules Bordet e Universidade Livre de Bruxelas (U.L.B), Bruxelas, Bélgica;

<sup>2</sup>Estudante de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Hospital de Jolimont-Lobbès, La Louvière, Bélgica; <sup>4</sup>Clínica Sainte Elisabeth, Namur, Bélgica; <sup>5</sup>CHU de Tivoli, La Louvière, Bélgica; <sup>6</sup>Hospital de Braine L'Alleud, Waterloo, Bélgica; <sup>7</sup>Centro Hospitalar de Oncologia, Luxemburgo; <sup>8</sup>Centro Hospitalar de Liège, Bélgica; <sup>9</sup>Serviço de Oncologia, Clínicas Universitárias UCL, Godinne, Bélgica; <sup>10</sup>Clinique Saint Joseph, Arlon, Bélgica; <sup>11</sup>CHC, Liège, Bélgica; <sup>12</sup>Rede Hospitalar de Medicina Social, Tournai, Bélgica

**Correspondência para:**

Martine Piccart-Gebhart, MD, PhD

Instituto Jules Bordet - Boulevard de Waterloo, 125 ; 1000 Bruxelas - Bélgica

Telefone: + 32 2 541 32 06; Fax: + 32 2 538 08 58

e-mail: [martine.piccart@bordet.be](mailto:martine.piccart@bordet.be)



**Palavras-chave:** Câncer de mama, quimioterapia adjuvante, epirubicina, linfonodo positivo

## **Sumário**

**Introdução:** Os resultados de 4 anos desse estudo, publicados previamente (Piccart MJ et al. J Clin Oncol 2001; 19:3103-3110), mostraram que a combinação de altas doses de epirubicina 100 mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida 830 mg/m<sup>2</sup> (HEC) foi superior à epirubicina em doses convencionais de 60 mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup> (EC) em termos de sobrevida livre de eventos (SLE; redução de 27%) no tratamento adjuvante de pacientes com câncer de mama (CM) e linfonodos positivos. No presente estudo, relatamos os dados de 15 anos de eficácia e toxicidade a longo prazo desse estudo belga multicêntrico com três braços.

**Pacientes e métodos:** entre março de 1988 e dezembro de 1996, 777 pacientes elegíveis foram randomizadas para receber 6 ciclos de ciclofosfamida via oral, metotrexate e 5-fluorouracil (CMF), 8 ciclos de EC ou 8 ciclos de HEC. Pacientes pós menopáusicas apresentando tumores com expressão de receptores hormonais (RH) ou cuja expressão de receptores era desconhecida receberam tamoxifeno, com início após o último ciclo de quimioterapia.

**Resultados:** a SLE em 15 anos foi de 45% para pacientes que receberam CMF, 39% para pacientes que receberam EC e 50% para pacientes que receberam HEC. Os *hazard ratios* foram 1) para HEC *versus* EC 0,77 (IC 95% 0,60-0,98; p= 0,03); 2) para HEC *versus* CMF 0,90 (IC 95% 0,70-1,15; p= 0,39); e 3) para EC *versus* CMF 0,90 (IC 95% 0,70-1,15; p= 0,21). Não foram observadas diferenças na

sobrevida global (SG). Toxicidade cardíaca foi mais frequente com HEC do que com CMF (11 pacientes *versus* 1 paciente;  $p=0,006$ ) mas não mais do que com EC ( $p=0,21$ ). Não houve diferença na incidência de leucemia mieloide aguda.

**Conclusão:** O tratamento com altas doses de epirrubicina demonstrou SLE superior quando comparado com epirrubicina em baixa dose, embora esse benefício não tenha sido visto quando comparado com CMF. Além disso, altas doses de epirrubicina resultaram em mais cardiotoxicidade, o que pode inviabilizar seu uso na prática diária.

## Introdução

O *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)* recentemente relatou um aumento na incidência do CM de 1974 até 2003 nos Estados Unidos da América (EUA). Uma análise mais detalhada indica um aumento importante de 1980 até 1987 (3,7% por ano) seguido por um aumento menor (0,5% por ano) de 1987 até 2001, com uma estabilização de 2001 até 2003. A sobrevida do CM em 5 anos, dos anos de 1996 até 2002, é 89% para estágio II e 60% para estágio III, respectivamente [1].

Os resultados de 15 anos do *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG)* mostraram que poliquimioterapia adjuvante a base de antraciclinas reduz a taxa de morte anual do CM em cerca de 38% para mulheres mais jovens do que 50 anos e em cerca de 20% para aquelas entre 50-69 anos, independentemente do uso de tamoxifeno, estado hormonal, estado nodal ou outras

características tumorais, e esse benefício é ainda observado após 15 anos de seguimento [2].

As antraciclina, doxorubicina e epirubicina, são muito utilizadas no tratamento do CM. Altas doses de epirubicina adjuvante (100 mg/m<sup>2</sup>) têm demonstrado sobrevida livre de doença (SLD) superior em 10 anos e sobrevida global (SG) comparada a baixas doses (50 mg/m<sup>2</sup>), sem aumento em complicações tais como toxicidade cardíaca ou leucemia aguda [3].

Nesse estudo, relatamos os resultados em 15 anos de um estudo multicêntrico de fase III que iniciou em 1988, comparando duas doses de epirubicina e ciclofosfamida com o esquema CMF clássico como terapia adjuvante em CM com linfonodos positivos. Na época do início do estudo, pacientes não eram rotineiramente selecionados para o estado hormonal ou HER2.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

### **População de Pacientes**

Detalhes do desenho, critérios de elegibilidade, administração do tratamento e análise estatística foram descritos previamente [4]. Resumidamente, este foi um estudo multicêntrico, randomizado, aberto, envolvendo mulheres de até 70 anos com CM operável que haviam sido submetidas a mastectomia radical modificada ou tumorectomia com dissecação de linfonodos axilares. Critérios de elegibilidade incluíam pelo menos um linfonodo positivo de um mínimo de 10 ressecados,

margens livres e nenhuma disfunção cardíaca [fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) dentro dos limites normais]. Pacientes com CM metastático foram excluídas. O comitê de ética de cada instituição participante aprovou o protocolo do estudo e todos os pacientes forneceram consentimento informado por escrito.

### **Regimes de Tratamento**

Pacientes elegíveis foram centralmente randomizadas no escritório operacional da unidade de quimioterapia do Instituto Jules Bordet. Os fatores de estratificação incluíram instituição participante, número de linfonodos axilares envolvidos (um a três ou acima de 4 linfonodos) e estado menopausal (pré ou pós menopáusicas). As pacientes foram randomizadas para receber CMF por seis ciclos (ciclofosfamida oral 100 mg/m<sup>2</sup> nos dias 1 à 14, metotrexato 40 mg/m<sup>2</sup> intravenoso (iv) nos dias 1 e 8 e 5-fluorouracil 600 mg/m<sup>2</sup> iv nos dias 1 e 8 a cada 28 dias), EC por oito ciclos (epirrubicina 60 mg/m<sup>2</sup> iv no dia 1, ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup> iv no dia 1 a cada 21 dias) ou HEC por oito ciclos (epirrubicina 100 mg/m<sup>2</sup> iv no dia 1, ciclofosfamida 830 mg/m<sup>2</sup> iv no dia 1 a cada 21 dias). A duração do tratamento foi de 24 semanas nos três braços do estudo. Tamoxifeno por 5 anos foi administrado para pacientes pós menopáusicas com receptor de estrogênio positivo ou desconhecido, começando após o último ciclo de quimioterapia. Radioterapia era mandatória para todas as pacientes que haviam sido submetidas a cirurgia conservadora de mama. Radioterapia pós mastectomia era opcional, dependendo da rotina do centro.

## **Análise Estatística**

O desfecho primário foi SLE, a qual foi definida como o tempo entre a randomização até a primeira ocorrência de progressão de doença documentada, surgimento de segundo tumor maligno primário, morte ou data do último seguimento. Os desfechos secundários incluíram SLE à distância (SLED) e sobrevida global (SG). SLED foi definida da mesma maneira que SLE, mas recorrência loco-regional não foi considerada um evento. CM contralateral foi considerado como segundo tumor primário. SG foi definida como o tempo entre a data da randomização até a data da morte por qualquer causa ou a data da última consulta. A análise de eficácia foi feita por intenção de tratamento (ITT). Testes  $\chi^2$  para dados categóricos e testes logarítmicos para o ponto final do tempo até o evento forneceram valor-p bicaudal. Curvas de Kaplan-Meier foram calculadas para SLE e SG. Análise de regressão proporcional de Cox foi usada para estimar os *hazard ratios* e intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Análises estatísticas foram feitas com o programa SPSS versão 14.

## **RESULTADOS**

### **Características das Pacientes**

As características básicas dos tumores das pacientes e dos tratamentos são mostrados na tabela 1. Informação adicional à respeito do grau histológico e

nova classificação do tamanho do tumor foram adicionados aos dados originais. Nenhuma diferença estatisticamente significativa na distribuição das características principais foi observada entre os três braços de tratamento. Duzentas e cinquenta e cinco, 267 e 255 pacientes elegíveis foram tratadas com CMF, EC e HEC, respectivamente. Vinte e sete pacientes não foram elegíveis e as razões foram previamente descritas [4]. No momento da presente análise, o seguimento médio era de 12,2 anos (entre 0,4 e 17,3 anos) sem diferença estatisticamente significativa nos três braços ( $p=0,81$ ). Vinte e três (9%), 21 (8%), e 20 (8%) pacientes foram perdidas do acompanhamento nos braços do CMF, EC e HEC, respectivamente

### **Eficácia do Tratamento**

No momento da presente análise, 358 eventos para SLE e 284 mortes foram relatadas, como mostrado na tabela 2. A SLE em 15 anos nos três braços do estudo foram as seguintes: CMF = 45%, HEC = 50% and EC = 39%. O *hazard ratio* não ajustado para SLE foi 0,77 (IC 95% 0,60-0,98;  $p= 0,03$ ) no braço HEC comparado com o braço EC; 0,90 (IC 95% 0,70-1,15;  $p= 0,39$ ) no braço CMF comparado com HEC; e 0,90 (IC 95% 0,70-1,15;  $p=0,21$ ) no braço EC comparado com CMF. Na análise multivariada, o grau histológico (1 *versus* 2 e 3), número de linfonodos positivos, estado hormonal, tipo de cirurgia, idade e estado de menopausa foram fatores prognósticos para a SLE. O *hazard ratio* ajustado para SLE para pacientes tratadas com HEC comparado com EC foi de 0,75 (IC 95% 0,59-0,96;  $p=0,02$ )

(Figura 1). Esse benefício não mudou quando as pacientes não elegíveis foram incluídas na análise (análise ITT ) (dados não demonstrados).

Uma análise exploratória de subgrupo foi realizada em relação à SLE e os parâmetros que foram investigados incluíram idade (< 50 ou ≥ 50 anos), número de linfonodos axilares positivos ipsilaterais (1 a 3 ou ≥ 4), tamanho do tumor (pT1 ou > pT1), estado hormonal (positivo ou negativo) e grau histológico (1 *versus* 2 e 3). SLE significativamente maior foi encontrada no subgrupo de 4 ou mais linfonodos positivos (HR 0,70; IC 95% 0,50-0,98; p=0,04) e pacientes com receptores hormonais positivos (HR 0,73; IC 95% 0,52-1,04; p=0,08) recebendo HEC (Figuras 2 e 3). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi vista em relação a idade, grau histológico e superexpressão do HER-2 (dados não mostrados).

A SG em 15 anos foi a seguinte: CMF = 57%, HEC = 59%, and EC = 56%. O HR não ajustado foi de 0,85 (IC 95% 0,64-1,13; p=0,26) no braço HEC comparado com o braço EC; 0,90 (IC 95% 0,67-1,20; p=0,45) no braço HEC comparado com CMF; e 0,95 (IC 95% 0,72-1,25; p=0,70) no braço EC comparado com CMF. A tabela 3 sumariza SLE e SG em 5, 10 e 15 anos e a tabela 4 sumariza o HR e IC 95% para SLE, SLED and SG em 15 anos.

### **Insuficiência cardíaca congestiva**

Entre as pacientes elegíveis, 17 casos de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) foram documentados (CMF, n=1; EC, n=5; HEC, n= 11; teste do qui-quadrado para heterogeneidade: p=0,009). Desses 17 casos de ICC, 12 pacientes haviam sido

submetidas à radioterapia regional esquerda, 4 pacientes à radioterapia regional direita e somente uma paciente não havia recebido radioterapia. O risco de desenvolvimento de ICC foi mais alto em pacientes recebendo HEC do que CMF (teste exato de Fisher  $p=0,006$ ) mas não significativamente mais alto do que EC ( $p=0,21$ ).

### **Segundo tumor maligno**

Sessenta e sete pacientes desenvolveram um segundo tumor primário incluindo CM contralateral (21 pacientes no grupo CMF, 22 pacientes no grupo EC e 24 no grupo HEC;  $p=0,86$ ). Leucemia mielóide aguda (LMA) foi relatada em uma paciente no braço EC, em 4 pacientes no braço HEC e em nenhuma no braço CMF (teste do qui quadrado para heterogeneidade  $p=0,07$ ), resultando na morte dessas 5 pacientes. A tabela 5 resume os segundos tumores primários entre os três grupos de tratamento e a tabela 6 resume os 5 casos de LMA.

### **Discussão**

Esses resultados a longo prazo confirmam que altas doses de epirrubicina e ciclofosfamida significativamente melhoram a SLE em 15 anos, quando comparadas a doses menores da mesma combinação de regimes numa população com CM com linfonodos positivos. Esse benefício foi observado em toda a população, assim como no subgrupo de pacientes com 4 ou mais linfonodos positivos e em pacientes com



receptores hormonais positivos. Embora o nosso estudo não tenha tido poder para comparação de tratamentos em subgrupos baseado em linfonodos ou receptores hormonais, esses resultados são similares àqueles relatados pelo *National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group* (NCIC CTG) MA5 em 10 anos [5].

O sucesso da terapia adjuvante em prolongar a sobrevida livre de doença (SLD) resulta no tratamento de milhares de mulheres a cada ano. A meta-análise do EBCTCG mostrou, num acompanhamento de 15 anos, um benefício da quimioterapia com antraciclina em relação ao CMF em termos de prevenção de recorrência e aumento de sobrevida; esses benefícios foram vistos na maior parte das pacientes com CM inicial: pacientes pré- e pós-menopáusicas, com receptores hormonais pobremente e fortemente positivos e tanto em linfonodos positivos quanto negativos [2,6].

O *French Adjuvant Study Group 01* (FASG 01), que foi conduzido em pacientes com CM com linfonodos positivos e pré menopáusicas, demonstrou uma melhor SLD em 10 anos com seis ciclos de 5-fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida (FEC) 50 mg/m<sup>2</sup> comparado a três ciclos de FEC 50 mg/m<sup>2</sup> ou FEC 75 mg/m<sup>2</sup> [7]. Além disso, o FASG 05 também demonstrou que pacientes tratadas com altas doses de epirrubicina (FEC 100 mg/m<sup>2</sup>) têm uma melhor SLD e SG em 10 anos comparadas às pacientes tratadas com doses mais baixas (FEC 50 mg/m<sup>2</sup>) [3]. A SLD em 10 anos foi de 50,7% e 45,3% (Wilcoxon p=0,036), respectivamente, o que é comparável aos nossos resultados de SLE em 15 anos (39% no braço do EC e 50% no braço do HEC). Em contraste, o *Cancer and Leukemia Group B 9344* (CALGB) não mostrou melhor eficácia terapêutica com doses mais altas de

doxorrubicina (60, 75 ou 90 mg/m<sup>2</sup>) em pacientes com CM com linfonodos positivos [8].

O NCIC CTG MA 5 mostrou que altas doses de epirrubicina (120 mg/m<sup>2</sup>) produziram uma significativa melhora na taxa de sobrevida livre de recorrência em 10 anos comparado com CMF em pacientes pré-menopáusicas com CM com linfonodos positivos (52% *versus* 45%, respectivamente; p=0,007), enquanto nenhuma diferença em SG e uma ligeira maior incidência de ICC foram relatadas com essa dose alta [5].

No nosso estudo, o risco de desenvolver ICC foi mais alto em pacientes tratadas com HEC do que CMF mas não mais alto do que no braço do EC. O risco de desenvolver toxicidade cardíaca, particularmente ICC, é fortemente associado à dose cumulativa de antraciclina. No entanto, várias análises indicaram que a epirrubicina pode ser menos cardiotoxicidade que a doxorrubicina em doses equimolares [6]. A dose cumulativa de epirrubicina no presente estudo foi de 800 mg/m<sup>2</sup> no braço HEC e de 480 mg/m<sup>2</sup> no braço EC. Numa análise retrospectiva de 2553 pacientes tratadas com epirrubicina em diferentes estudos do FASG, o risco em 7 anos de desenvolver disfunção do ventrículo esquerdo (DVE) foi de 1,36% (IC 95% 0,85-1,87) e foi associada com idade ≥ 65 anos e índice de massa corporal (IMC) > 27 kg/m<sup>2</sup>. Se a dose cumulativa de epirrubicina não excedesse 628 mg/m<sup>2</sup>, o risco de desenvolver DVE não estaria aumentado [7]. No relato de 10 anos do estudo FASG, toxicidade cardíaca tardia (antes da recidiva) ocorreu em quatro pacientes (1,5%) no braço de FEC 50 e em três pacientes (1,1%) no braço do FEC 100 (p=0,72) [3].

De maneira importante, o uso adjuvante do trastuzumab, o qual é um anticorpo monoclonal, em pacientes com CM HER-2 positivo mostrou uma importante redução de risco de recidiva e/ou morte quando essa droga é dada concomitante ou após o término da terapia adjuvante [9-12]. No entanto, há um risco aumentado de toxicidade cardíaca, com diminuição da FEVE e /ou ICC em pacientes tratadas com trastuzumab, embora os benefícios claramente excedam os riscos. Nessas pacientes com tumores HER-2 positivo, o uso de antraciclina deve ser considerado cuidadosamente, a fim de minimizar a toxicidade cardíaca. Um estudo recente de fase III mostrou que o uso mais curto de epirrubina (FEC x 3) seguido por 3 ciclos de docetaxel (FEC-D) é eficaz em termos de SLD e SG em pacientes com CM e linfonodos positivos. Embora ocorrendo raramente no geral, houve menos eventos cardíacos no braço FEC-D (P = 0,03), atribuíveis principalmente à baixa dose cumulativa de antraciclina [13]. Além disso, o BCIRG 006, recentemente apresentado no *San Antonio Breast Cancer Symposium 2006*, mostrou que o tratamento com TCH (docetaxel, carboplatina e trastuzumab), ainda que eficaz em termos de SLD e SG em pacientes com CM HER-2 positivo, tinha menos risco de ICC graus 3-4, quando comparado com AC-TH (doxorubicina, ciclofosfamida, docetaxel e trastuzumab). Mesmo que os resultados a curto prazo sejam provocativos, necessita-se de acompanhamento mais prolongado com esse regime de adjuvância sem antraciclina [12].

Alternativamente, pacientes com tumores HER-2 positivo onde antraciclina e trastuzumab são considerados agentes adjuvantes importantes, a adição de taxanos

nos casos com linfonodos positivos pode minimizar as doses cumulativas de antraciclina e, portanto, reduzir o risco de ICC, preservando a eficácia global.

Outra toxicidade importante a longo prazo com regimes com antraciclina é o desenvolvimento de leucemia mielóide aguda (LMA) e síndrome mielodisplásica (SM). Uma meta-análise de 7,110 pacientes com CM inicial tratadas com epirrubicina mostrou que a incidência cumulativa de LMA/SN foi de 0,55%. Em 4,760 pacientes com doses cumulativas de epirrubicina  $\leq 720$  mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida  $\leq 6,300$  mg/m<sup>2</sup>, a incidência cumulativa em 8 anos de LMA/SM foi de 0,37% comparada a 4,97% em 261 patients que receberam doses cumulativas mais altas tanto de epirrubicina como de ciclofosfamida. Houve um aumento progressivo no risco, com probabilidades de 0,07% para 300 mg/m<sup>2</sup>, 0,34% para 600 mg/m<sup>2</sup>, e 1,53% para 900 mg/m<sup>2</sup>. Portanto, a incidência cumulativa aumentou vertiginosamente, alcançando 9,94% para 900 mg/m<sup>2</sup> [14]. O risco cumulativo em 9 anos de desenvolver leucemia foi de 0,34% em 2,603 pacientes tratadas com epirrubicina e participantes de oito estudos do FASG [15]. No nosso estudo, quatro casos de leucemia aguda foram relatados no braço HEC e um no braço EC (1,56% e 0,37%, respectivamente).

Infelizmente, não existe comparação direta do risco leucemogênico entre a doxorubicina e a epirrubicina. O *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) revisou os dados de 8,363 pacientes participantes em 6 estudos de fase III que investigaram regimes com AC (doxorubicina dose cumulativa de 240 mg/m<sup>2</sup>). No total, 43 pacientes (0,50%) desenvolveram LMA ou SM e a incidência foi muito maior nos regimes mais intensivos [16].

Em conclusão, esse estudo belga multicêntrico não demonstrou superioridade de doses altas de epirrubicina comparadas ao CMF clássico e as possíveis explicações já foram discutidas previamente [4]. No entanto, a eficácia a longo termo do HEC comparado ao EC em pacientes com CM com linfonodos positivos é mantida. Uma vantagem em SLE também é observada no subgrupo com 4 ou mais linfonodos positivos e com receptores hormonais positivos. No entanto, de acordo com nossas conclusões prévias, não recomendamos o uso do regime HEC na prática clínica diária, principalmente devido ao alto risco de cardiotoxicidade relativa às doses de epirrubicina e devido à falta de superioridade das antraciclinas sobre o CMF no nosso estudo. Mais importante, para o futuro, grandes estudos randomizados com pesquisa translacional e revisão patológica central para identificar as pacientes que terão mais benefício com uma determinada quimioterapia são necessários; o escalonamento de doses nem sempre leva a um maior benefício mas uma melhor seleção de pacientes pode levar.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Dra Phuong Dinh por sua assistência editorial.

**Referências:**

[1] Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer Statistics, Trends, and Multiple Primary Cancer Analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007;12(1):20-37.

[2] Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365(9472):1687-717.

[3] Bonneterre J, Roche H, Kerbrat P, Bremond A, Fumoleau P, Namer M, et al. Epirubicin increases long-term survival in adjuvant chemotherapy of patients with poor-prognosis, node-positive, early breast cancer: 10-year follow-up results of the French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* 2005;23(12):2686-93.

[4] Piccart MJ, Di Leo A, Beauduin M, Vindevoghel A, Michel J, Focan C, et al. Phase III trial comparing two dose levels of epirubicin combined with cyclophosphamide with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(12):3103-10.

[5] Levine MN, Pritchard KI, Bramwell VH, Shepherd LE, Tu D, Paul N. Randomized trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: update of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA5. *J Clin Oncol* 2005;23(22):5166-70.

- [6]** Gluck S. Adjuvant chemotherapy for early breast cancer: optimal use of epirubicin. *Oncologist* 2005;10(10):780-91.
- [7]** Fumoleau P, Roche H, Kerbrat P, Bonneterre J, Romestaing P, Fargeot P, et al. Long-term cardiac toxicity after adjuvant epirubicin-based chemotherapy in early breast cancer: French Adjuvant Study Group results. *Ann Oncol* 2006;17(1):85-92.
- [8]** Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirrincione CT, Goldstein LJ, Martino S, et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(6):976-83.
- [9]** Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9555):29-36.
- [10]** Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1673-84.
- [11]** Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(8):809-20.
- [12]** Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowsky T, Martin M, Pawlicki M, et al. BCIRG 006: 2nd interim analysis phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC®T) with doxorubicin and

cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC®TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100:abstract 52.

**[13]** Roche H, Fumoleau P, Spielmann M, Canon JL, Delozier T, Serin D, et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5664-71.

**[14]** Praga C, Bergh J, Bliss J, Bonnetterre J, Cesana B, Coombes RC, et al. Risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in trials of adjuvant epirubicin for early breast cancer: correlation with doses of epirubicin and cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 2005;23(18):4179-91.

**[15]** Campone M, Roche H, Kerbrat P, Bonnetterre J, Romestaing P, Fargeot P, et al. Secondary leukemia after epirubicin-based adjuvant chemotherapy in operable breast cancer patients: 16 years experience of the French Adjuvant Study Group. *Ann Oncol* 2005;16(8):1343-51.

**[16]** Smith RE, Bryant J, DeCillis A, Anderson S. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. *J Clin Oncol* 2003; 21(7): 1195-1204.



**Tabela 1.** Características das pacientes e dos tumores das 777 pacientes elegíveis

<b>Total de pacientes (n=777)</b>	<b>CMF (n=255)</b>	<b>EC (n=267)</b>	<b>HEC (n=255)</b>
<b>Idade média (anos)</b>	49	49	49
Variação	26-70	25-68	28-66
<b>Estado menopausal %</b>			
Pré-menopáusia	56	58	59
Pós-menopáusia	44	42	41
<b>Tipo de cirurgia %</b>			
Mastectomia	67	63	64
Conservadora	33	37	36
<b>Tamanho do tumor (pT) %</b>			
≤ 2 cm	41	41	46
2-5 cm	40	39	37
> 5 cm	4	1	1
Desconhecido	15	19	16
<b>Número de linfonodos positivos %</b>			
1-3	59	59	61
≥ 4	41	41	39
<b>Grau histológico %</b>			
1	18	18	18
2	46	48	43
3	23	21	21
Desconhecido	13	13	18
<b>Estado dos RE %*</b>			
Positivo (> 10 fmol/mg)	58	52	51
Negativo	26	31	33
Desconhecido	16	17	16

**Legendas:** RE: receptor de estrogênio; pT: tamanho patológico do tumor; CMF: ciclofosfamida, metotrexate, fluorouracil; EC: epirrubicina, ciclofosfamida; HEC: altas doses de epirrubicina e ciclofosfamida; \* por ensaio de ligação

**Tabela 2.** Eventos ocorridos durante todo o período do estudo e utilizados para a avaliação dos desfechos

	CMF (n=255)	EC (n=267)	HEC (n=255)
Número de eventos*			
Recidiva locorregional	16	27	18
Recidiva à distância	93	110	75
CM contralateral (CMC)	11	8	11
Morte	95	100	89
Segundo tumor primário (não CMC)	10	14	13
Livre de qualquer evento	130	124	138

\* **Nota básica:** uma paciente pode apresentar mais de um evento; CMF: ciclofosfamida, metotrexate, fluorouracil; EC: epirubicina, ciclofosfamida; HEC: altas doses de epirubicina e ciclofosfamida

**Tabela 3.** Sobrevida livre de evento e sobrevida global em 5, 10 e 15 anos

	<b>CMF (n=255)</b>	<b>EC (n=267)</b>	<b>HEC (n=255)</b>
<b>Sobrevida livre de evento (%)</b>			
Em 5 anos	67	63	72
Em 10 anos	55	48	58
Em 15 anos	45	39	50
<b>Sobrevida global (%)</b>			
Em 5 anos	81	77	83
Em 10 anos	65	65	70
Em 15 anos	57	56	59

**Legendas:** CMF: ciclofosfamida, metotrexate, fluorouracil; EC: epirrubicina, ciclofosfamida; HEC: altas doses de epirrubicina e ciclofosfamida

**Tabela 4.** *Hazard Ratios* (HR) e intervalos de confiança de 95% para a distribuição de eventos usando dados de seguimento até 15 anos

	<b>SLE</b>	<b>SLED</b>	<b>SG</b>
	<b>HR (Intervalo de confiança a 95%)</b>		
<b>HEC versus EC</b>	<b>0,77 (0,60-0,98)</b>	0,80 (0,62-1,03)	0,85 (0,64-1,13)
<b>HEC versus CMF</b>	0,90 (0,70-1,15)	0,92 (0,71-1,20)	0,90 (0,67-1,20)
<b>EC versus CMF</b>	0,90 (0,70-1,15)	0,87 (0,68-1,12)	0,95 (0,72-1,25)

**Legendas:** SLE: sobrevida livre de evento; SLED: sobrevida livre de evento à distância; SG: sobrevida global; CMF: ciclofosfamida, metotrexate, fluorouracil; EC: epirubicina, ciclofosfamida; HEC: altas doses de epirubicina e ciclofosfamida

**Tabela 5.** Segundo tumor primário conforme o braço de tratamento

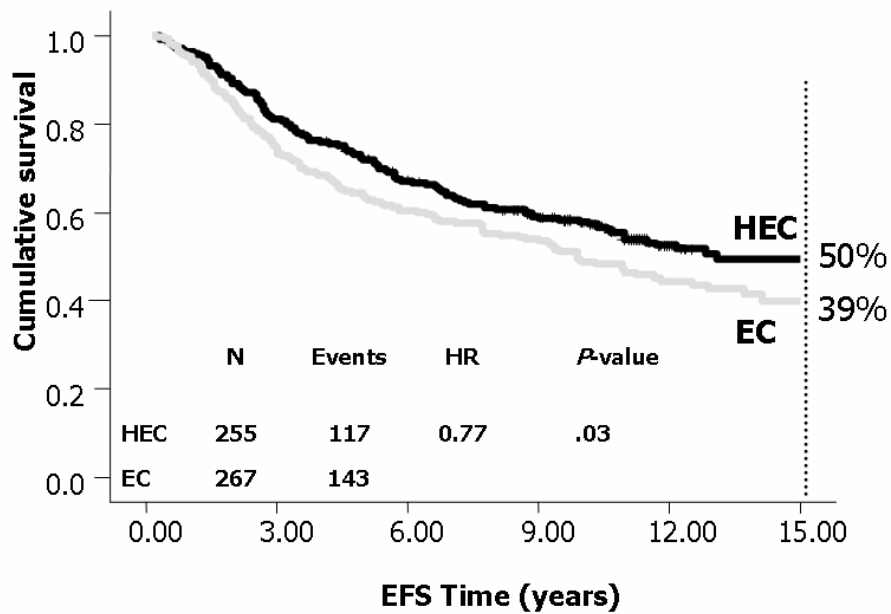
	Braço de tratamento		
	CMF (n=255)	EC (n=267)	HEC (n=255)
Leucemia mielóide aguda		1	4
Sistema nervoso central			1
Cérvice <i>In Situ</i>	1		1
Leucemia crônica			1
Cólon	4	1	
CM contralateral (CMC)	11	8	11
Endométrio		1	
Esôfago	1	1	
Pulmão	1	4	2
Linfoma Non-Hodgkin	1	2	1
Ovário			2
Pâncreas		1	
Pele (melanoma)	1	1	
Pele (não-melanoma)		1	
Tireóide	1	1	1
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>24</b>

**Nota:** uma paciente no braço CMF foi diagnosticada com leucemia crônica após o diagnóstico de CM contralateral (primeiro evento); CMF: ciclofosfamida, metotrexate, fluorouracil; EC: epirrubicina, ciclofosfamida; HEC: altas doses de epirrubicina e ciclofosfamida

**Tabela 6.** Sumário dos casos de leucemia mielóide aguda diagnosticados no presente estudo

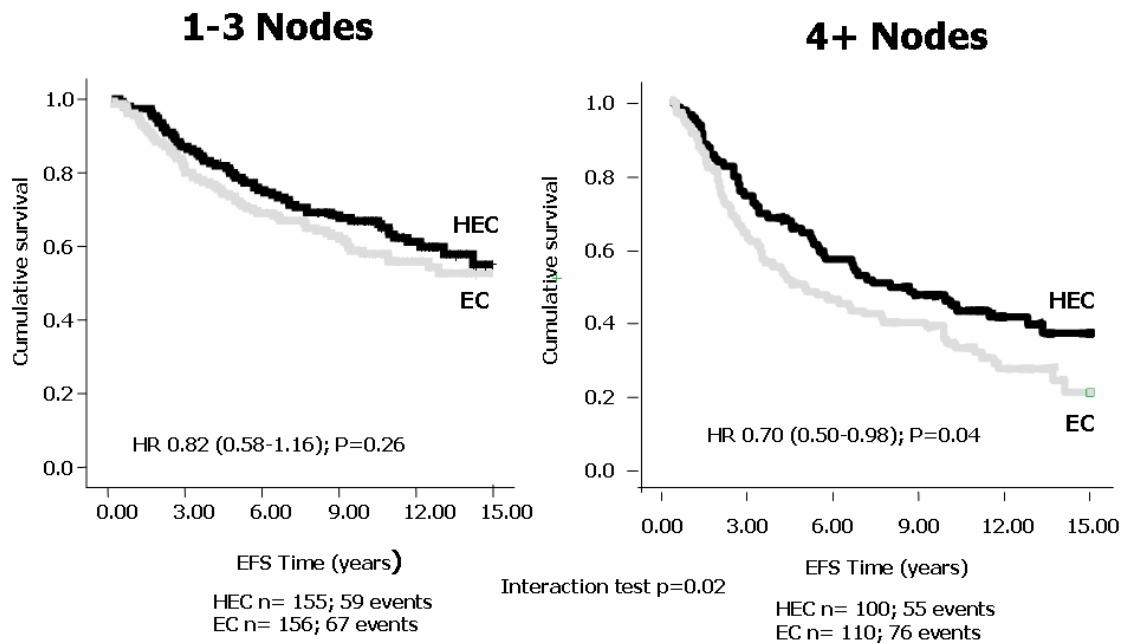
<b>Braço de tratamento</b>	<b>Idade na randomização (anos)</b>	<b>Meses entre a randomização e o diagnóstico de LMA</b>	<b>Tipo de LMA*</b>
<b>HEC</b>	51	21	LMA M5
<b>HEC</b>	58	33	LMA M5
<b>HEC</b>	54	58	LMA M6
<b>EC</b>	60	81	LMA **
<b>HEC</b>	53	196	LMA **

**Legendas:** LMA: leucemia mielóide aguda; M5: leucemia aguda monoblástica e monocítica; M6: leucemia aguda eritróide; \* conforme os critérios da classificação Francesa-Americana-Britânica (FAB); \*\* o subtipo não foi relatado



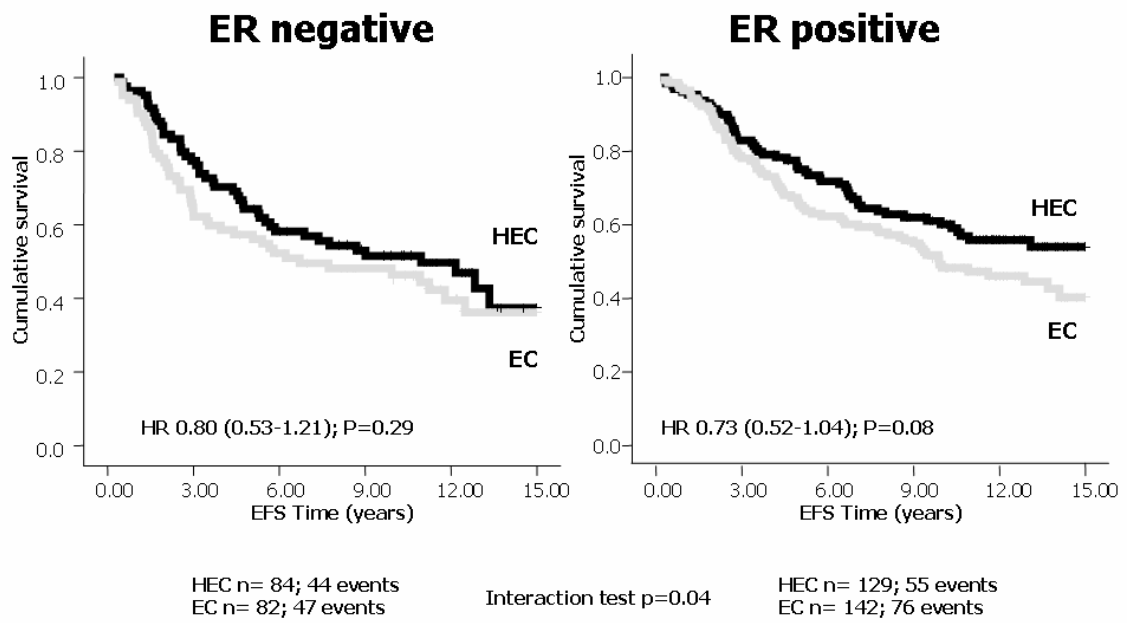
Multivariate analyses: HR 0.75 (0.59-0.96); P=0.02

**Figura 1.** Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de evento para HEC *versus* EC em 15 anos.



**Figura 2.** Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de evento para HEC *versus* EC em 15 anos, conforme o número de linfonodos positivos.





**Figura 3.** Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de evento para HEC *versus* EC em 15 anos, conforme o estado do receptor de estrogênio.

## 8. Considerações finais e perspectivas

Os dois estudos originais realizados pelo nosso grupo e descritos em detalhe anteriormente levaram às seguintes conclusões:

Artigo 1: A alta expressão do Ki-67 possui um papel prognóstico importante no CM, sendo responsável por um pior desfecho nas pacientes que apresentam esse marcador elevado. Esse pior desfecho, traduzido por pior sobrevida global e pior sobrevida livre de doença, foi observado na população global e nas subpopulações estudadas, tais como as pacientes com linfonodos negativos, linfonodos positivos e as que não receberam tratamento sistêmico adjuvante. Esse último subgrupo de pacientes não tratadas, apesar de ser pequeno, constitui o grupo para o qual a avaliação do Ki-67 como fator prognóstico parece ser mais precisa, visto que não existe a interação de nenhum tratamento sistêmico. Apesar de nosso estudo apresentar certas limitações descritas anteriormente, o mesmo apresenta um impacto importante na literatura médica, pois é a primeira e, até o momento, única meta-análise avaliando o papel prognóstico do Ki-67 no CM precoce. Este estudo foi o resultado de um esforço importante entre oncologistas, cientistas e estatísticos avaliando mais de 12,000 pacientes, o qual representa uma amostra significativa de pacientes com CM.

No futuro, a expressão do Ki-67 analisada por IHC poderá ser utilizada em larga escala para avaliação prognóstica do CM precoce. No entanto, uma padronização do ponto de corte, dos anticorpos utilizados, da coloração e da captura

do antígeno utilizadas será necessária para determinar o real valor prognóstico para este marcador. Também esperamos que as recomendações disponíveis para o estudo de marcadores prognósticos e preditivos sejam seguidos. Com isso, poderemos realmente acessar o valor de cada marcador e evitar os possíveis vieses de cada estudo. Com o uso rotineiro dessas recomendações, os estudos e meta-análises futuros, tais como a apresentada nessa tese pelo nosso grupo, poderão atingir o nível 1 de evidência em ciência e possuirão mais poder para definir a utilização de um marcador específico na prática clínica diária.

Artigo 3: Neste estudo randomizado de fase III, iniciado nos anos 80, período em que o tratamento das pacientes não eram selecionadas de acordo com alvos específicos (tais como a superexpressão do HER-2), a administração de altas doses de epirrubicina levaram a uma melhor sobrevida livre de doença na população global, nas pacientes com 4 ou mais linfonodos positivos e naquelas com receptores hormonais positivos. Infelizmente, nosso estudo não demonstrou benefício algum das antraciclina quando comparadas ao esquema padrão CMF, mas confirmou o benefício das altas doses de epirrubicina em comparação a doses menores. Adicionalmente, esse benefício encontrado com altas doses não esteve acompanhado de maior toxicidade cardíaca ou de maior número de leucemias mielóides agudas, quando comparadas a esquema com doses menores de epirrubicina. Entretanto, a incidência de insuficiência cardíaca foi maior do que nas pacientes tratadas com CMF, embora seja sabido que as antraciclina possuem um risco elevado de cardiotoxicidade. Devido aos resultados de vários estudos

publicados e a um melhor conhecimento da biologia do CM, sabemos que a dose de epirrubicina utilizada em nosso estudo não deve ser prescrita como rotina. Também, sabemos que uma melhor seleção dos pacientes, em termos de biologia do CM, pode levar a uma melhor escolha da quimioterapia adjuvante. Por exemplo, sabemos que as pacientes apresentando tumores HER-2 positivos beneficiam-se do uso das antraciclina, mas, como demonstrado nos estudos mais recentes, essas pacientes apresentam um importante benefício com o uso de trastuzumab adjuvante durante 1 ano. Nesse caso, a paciente estará exposta a duas drogas cardiotoxícas, sem levar em consideração a radioterapia no lado esquerdo da caixa torácica (e por conseqüência, o coração), quando indicada. Nesses casos, a seleção de regimes eficazes e com uma menor dose de antraciclina devem ser levados em consideração, tais como o uso de 3 ciclos de FEC seguidos de 3 ciclos de docetaxel (empregados no esquema BCIRG 001).

Acreditamos que o amplo conhecimento da biologia do CM tem sido responsável por várias mudanças na escolha dos tratamentos adjuvantes, com melhor seleção das drogas a serem utilizadas para cada paciente individual. A antiga idéia de que “um tipo de QT é bom para todos (*one size fits all*)” deve ser abandonada e cada paciente deve ser tratada como uma paciente particular, levando em consideração a biologia do tumor, a escolha pessoal de cada paciente, as comorbidades, e os efeitos secundários a curto e a longo prazo de cada tratamento administrado.