



LEONARDO ROBERTO DA SILVA

PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM
PACIENTES COM CARCINOMA LUMINAL DE MAMA

*PREDICTORS OF RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN
PATIENTS WITH LUMINAL BREAST CANCER*

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

LEONARDO ROBERTO DA SILVA

PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM
PACIENTES COM CARCINOMA LUMINAL DE MAMA

*PREDICTORS OF RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN
PATIENTS WITH LUMINAL BREAST CANCER*

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Tocoginecologia,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de mestre em Ciências da
Saúde, área de concentração em Oncologia Ginecológica e
Mamária

*Paper submitted to the Programme of Obstetrics and Gynecology
of the Unicamp's Health Sciences Faculty for obtaining the title of
Master in Health Sciences, in the concentration area of Breast and
Gynecological Oncology*

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO LEONARDO ROBERTO DA SILVA, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38p Silva, Leonardo Roberto da, 1979-
Preditores de resposta à quimioterapia neoadjuvante em pacientes com carcinoma luminal de mama / Leonardo Roberto da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Luiz Carlos Zeferino.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Terapia neoadjuvante. 2. Neoplasias da mama. 3. Antígeno Ki-67. 4. Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos. I. Zeferino, Luiz Carlos, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in patients with luminal breast cancer

Palavras-chave em inglês:

Neoadjuvant therapy

Breast neoplasms

Ki-67 antigen

Response evaluation criteria in solid tumors

Área de concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Mestre em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luiz Carlos Zeferino [Orientador]

Afonso Celso Pinto Nazário

César Cabello dos Santos

Data de defesa: 20-08-2015

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

RESUMO

Introdução: Os carcinomas luminais de mama apresentam resposta variável à quimioterapia neoadjuvante. A identificação precoce das pacientes que se beneficiarão desse tratamento é importante para se evitar tratamento desnecessário e suas decorrentes toxicidades. O objetivo desse estudo é identificar preditores de resposta à quimioterapia neoadjuvante no carcinoma luminal de mama.

Metodologia: Nós incluímos pacientes com carcinoma luminal de mama tratadas com quimioterapia pré-operatória em nosso serviço, no anos de 2013 e 2014. Dados demográficos, clínicos e patológicos foram coletados. Análises de imunoistoquímica para receptores de estrogênio e progesterona, HER2 e Ki67 foram realizadas em amostras obtidas antes do tratamento. A quimioterapia foi composta por esquema baseado em antraciclinas e taxanos. Resposta patológica completa (RPC) foi definida como ausência de doença invasora nas peças cirúrgicas da mama e da axila.

Resultados: Foram incluídas cento e vinte pacientes, totalizando 131 tumores. As taxas de RPC foram de 6,11% na amostra geral, 5,26% para tumores luminais B-like (HER2-negativos) e 12,9% para luminais B-like (HER2-positivos). Nenhum preditor independente de RPC foi identificado. Cinquenta e dois tumores (39,7%) apresentaram resposta clínica completa, e grau histológico III (OR=9,05; IC95% 1,07-7,98; p=0,04), status pré-menopausal (OR=9,05; IC95% 2,01-40,87; p=0,004), e índice de Ki67 $\geq 20\%$ (OR=2,71; IC95% 1,04-6,99; p=0,04) foram preditores independentes desse desfecho. A análise da curva ROC mostrou que o índice de Ki67 pré-tratamento tem baixo desempenho na identificação de pacientes que apresentarão resposta clínica completa (área sob a curva=0,660; IC95% 0,563-0,758). Pacientes com resposta clínica completa apresentaram maior chance de serem submetidas a cirurgia conservadora.

Conclusões: A taxa de RPC é baixa entre os carcinomas luminais de mama submetidos a quimioterapia neoadjuvante. No entanto, parâmetros clinico-patológicos podem ajudar a identificar pacientes que apresentarão resposta clínica completa.

Palavras-Chave: terapia neoadjuvante. carcinoma luminal de mama. Ki67. resposta clínica.

ABSTRACT

Purpose: Luminal breast cancers show a variable response to neoadjuvant chemotherapy. The early determination of those patients who will benefit from this treatment is important to avoid overtreatment and the resulting toxicity. The purpose of this study is to identify predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in luminal breast cancer.

Methods: We included patients with luminal breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy at the institution in 2013 and 2014. Demographic, clinical, and pathological data were collected. Immunohistochemistry analyses of estrogen and progesteron receptors, HER2 and Ki67 were conducted in samples obtained before treatment. Chemotherapy consisted in anthracycline/taxane-based scheme. Pathologic complete response was defined as the absence of invasive disease in the breast and axilla surgical specimens.

Results: One hundred and twenty patients, totaling 131 tumors were included. Pathologic complete response rates were 6.11% in the overall sample, 5.26% for luminal B-like (HER2-negative) tumors and 12.9% for luminal B-like (HER2-positive) tumors. None independent predictor of pathologic complete response was identified. Fifty-two tumors (39,7%) showed complete clinical response, and histologic grade III (OR=2.92; 95% CI 1.07-7.98; $p = 0.04$), premenopausal status (OR=9.05, 95% CI 2.01-40.87; $p = 0.004$), Ki67 index $\geq 20\%$ (OR=2.71, 95% CI 1.04 to 6,99; $p = 0.04$) were independent predictors for this outcome. ROC curve analysis showed that Ki67 index has a poor performance in identifying patients who will present complete clinical response (area under the curve=0.660, 95% CI 0.563-0.758). Patients with complete clinical response were more likely to be submitted to conservative surgery.

Conclusions: Pathologic complete response rate is low among luminal tumors undergoing neoadjuvant chemotherapy. However, clinicopathological parameters can help identify patients who will present complete clinical response.

Palavras-Chave: neoadjuvant therapy. luminal breast cancer. Ki67. clinical response.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. CAPÍTULO - <i>PREDICTORS OF RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH LUMINAL BREAST CANCER</i>	26
4. CONCLUSÕES	46
5. REFERÊNCIAS	47
6. APÊNDICE	61
7. ANEXO	64

Dedico este trabalho....

Aos meus pais, Luisa e Milton, que
iluminam o caminho da minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luiz Carlos Zeferino, pela calorosa acolhida e por ter sempre me apoiado e incentivado, estando presente em todos os momentos que levaram à conclusão deste trabalho, iluminando-me com sua sabedoria e seu profissionalismo exemplares.

Aos meus colegas de trabalho, em especial Susana Oliveira Botelho Ramalho e Paola Bertolotti Cardoso Pinto, pelo enorme carinho e pelas sábias palavras com as quais sempre me presentearam.

Aos professores Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian e Dr. César Cabello dos Santos, pelas brilhantes colocações que tanto enriqueceram este trabalho.

À Prof Sophie Françoise M. Derchain, pela presença amiga e auxílio inestimável.

Ao Marcelo Tavares de Lima, por ter sido sempre tão solícito e ter desempenhado papel essencial em nossas análises estatísticas

Às funcionárias Margarete Donadon, Márcia Regina Siqueira, Neusa Balduci, Débora Fernandes, Sônia Pianca e Regina Barros, pelo auxílio em todos os momentos.

À equipe de enfermagem do Serviço de Oncologia do Hospital da Mulher Prof José Aristodemo Pinotti (CAISM)/UNICAMP, por terem me acolhido com tanto carinho e pela eterna paciência e dedicação.

Ao Dr. Renato Flora Vargas, pela grande contribuição quanto aos aspectos anatomopatológicos e imunoistoquímicos deste estudo.

À equipe do LAPE/CAISM, especialmente ao Júlio César de Moraes, pela disponibilidade e imensa ajuda na realização das reações de imunoistoquímica.

Às pacientes, por compartilharem comigo momentos tão difíceis e me mostrarem, diariamente, a beleza do ser humano.

Aos amigos Jeferson José Baeta Neto, Matheus Silva Neto de Oliveira, Thaís Diamante, Patrícia Menezes, Débora Bicudo Faria Shützer e Luiza Borges, por acreditarem no meu potencial e pelo incentivo constante.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional e pela compreensão em todas as minhas ausências.

Ao Rafael, por fazer tudo valer a pena.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1. Sumário de estudos clínicos em carcinoma de mama e os respectivos pontos de corte empregados para Ki67	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC-T	Doxorrubicina/ciclofosfamida-taxano
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
Erb-B2	Proteína codificada pelo gene <i>ERBB2</i>
EUA	Estados Unidos da América
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NSABP	<i>National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
RCB	<i>Residual cancer burden index</i>
RCC	Resposta clínica completa
RE	Receptor de estrogênio
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RP	Receptor de progesterona
RPC	Resposta patológica completa
SG	Sobrevida global
SLR	Sobrevida livre de recorrência
<i>ypT0 ypN0</i>	Ausência de doença invasora e não-invasora na mama e nos linfonodos
<i>ypT0/is ypN0/+</i>	Ausência de doença invasora na mama, permitindo-se doença não-invasora na mama e linfonodos negativos ou comprometidos
<i>ypT≤1mic ypN0/+</i>	Presença de doença invasora residual de pequeno volume na mama, permitindo-se doença não-invasiva ou focalmente invasiva na mama e linfonodos negativos ou comprometidos

1. Introdução Geral

No Brasil e no mundo, o carcinoma da mama é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma. Segundo a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2014 foram diagnosticados, no Brasil, 57.120 novos casos, o que gera um risco de 56,09 casos para cada 100.000 mulheres [1]. Em 2013, no Brasil, a mortalidade por carcinoma de mama foi de 13,66 para cada 100.000 mulheres, sendo a principal causa de morte por câncer entre elas.[2]

Desde a década de 1990, observa-se uma redução significativa da mortalidade por carcinoma de mama, tanto nos Estados Unidos da América (EUA) quanto em outros países [3,4]. Tal redução se deve, pelo menos em parte, à implantação do rastreamento com a mamografia em intervalos regulares e o desenvolvimento e administração de terapias adjuvantes, como quimioterapia, terapia endócrina e radioterapia.[5]

O diagnóstico precoce e início do tratamento em tempo adequado garantem um melhor prognóstico para as pacientes com câncer de mama. No Brasil, de acordo com dados do estudo CONCORD-2, a sobrevida em cinco anos chega a 87,4% [6]. Apesar disso, muitas pacientes ainda são diagnosticadas em estádios mais avançados da doença.

O carcinoma de mama localmente avançado inclui tumores primários de grande tamanho (maior diâmetro superior a 5,0 cm), com envolvimento cutâneo e/ou de parede torácica, bem como os tumores associados a comprometimento nodal regional extenso. Além disso, inclui um subgrupo denominado carcinoma

inflamatório da mama, menos comum, mas que se associa a prognóstico particularmente ruim. Nos EUA, dados de 2006 revelaram uma incidência de 10% do carcinoma de mama localmente avançado [7]. No entanto, tem sido demonstrado que, em populações submetidas ao rastreamento, essa parcela pode ser reduzida a até 5%.[8]

Com base em dados do INCA para dois períodos de tempo, foi observado que, entre os anos de 1990 e 1994, aproximadamente 47% das pacientes brasileiras com diagnóstico de carcinoma de mama apresentaram-se com estágio inicial III (doença localmente avançada). No segundo período de tempo analisado, 1995-2002, houve redução nessa porcentagem, mas mantendo-se ainda em um terço dos casos (32,6%) [8]. O prognóstico dessas pacientes é, sob uma perspectiva global, ruim. A sobrevida em três anos se situa em torno de 70% e, em cinco anos, chega a apenas 50%.[9]

O câncer é uma doença genética, sendo o tipo esporádico o mais comum. Ele surge a partir do acúmulo de diversas alterações genéticas e epigenéticas que fazem com que as células tumorais sejam capazes de escapar dos mecanismos de controle de proliferação, ativar vias intracelulares que estimulam a divisão celular e evitam a apoptose, invadir tecidos circunjacentes e produzir metástases à distância [10]. Partindo da hipótese de que a significativa variação observada clinicamente no carcinoma de mama teria correspondência com diferenças em termos de expressão gênica, Perou e colaboradores avaliaram os perfis de expressão de 8.102 genes em 65 amostras de carcinoma de mama, sendo possível identificar quatro grupos com características moleculares

distintas: receptor de estrogênio(RE)+/*luminal-like*; *basal-like*; *Erb-B2+*; e mama normal [11]. Em termos de expressão gênica, hoje se admite que os chamados subtipos intrínsecos de carcinoma de mama dividem-se em dois grande subgrupos, RE+ e RE-, com características clínicas, prognóstico e resposta ao tratamento diferentes.[12]

Embora essa análise tenha sido conduzida inicialmente com o objetivo de estudar a biologia tumoral, as evidências mais atuais mostram que a avaliação da expressão gênica adiciona informações de prognóstico aos critérios tradicionalmente empregados, como estadiamento e características morfológicas do tumor [12]. O escore de recorrência baseado na avaliação de 21 genes selecionados é um teste prognóstico validado e atualmente recomendado como ferramenta auxiliar na definição quanto à indicação de tratamento adjuvante em pacientes sem comprometimento axilar.[13]

Paralelamente a isso, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese permitiu o desenvolvimento de terapias-alvo, como o trastuzumabe, anticorpo monoclonal anti-HER2. Essa glicoproteína transmembrana com porção intracelular possuindo atividade de tirosina quinase pertence à família de receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e se encontra envolvida na ativação de vias metabólicas que controlam crescimento celular, diferenciação e também angiogênese [14,15]. O HER2 encontra-se superexpresso em 18% a 20% dos carcinomas de mama e, em tais pacientes, o trastuzumabe mudou a história natural da doença, garantindo um benefício de sobrevida global que ainda não

era alcançado com a quimioterapia isoladamente [16,17]. A identificação de outros biomarcadores com poder preditivo é necessária, especialmente em tumores sem superexpressão/amplificação de HER2.

O tratamento sistêmico previamente ao tratamento cirúrgico definitivo, denominado tratamento neoadjuvante, é recomendado a quase todas as pacientes com diagnóstico de carcinoma localmente avançado da mama. O objetivo primário dessa abordagem é reduzir o volume tumoral e permitir a realização de tratamento cirúrgico com melhores resultados estéticos naquelas pacientes consideradas inoperáveis ao diagnóstico, mas também naquelas com tumores operáveis e que desejam ser submetidas a cirurgia conservadora [18]. Além disso, o tratamento neoadjuvante permite a observação direta da resposta ao tratamento, com o potencial de fornecer dados que podem ser usados com intenção preditiva e prognóstica [19]. A partir de estudos em tratamento adjuvante, aquele que é administrado após a cirurgia, podemos obter informações quanto a desfechos de sobrevida livre de recorrência (SLR) e sobrevida global (SG), porém tais estudos exigem a inclusão de grande número de pacientes e que as mesmas sejam acompanhadas por longo período, o que leva a um elevado custo. Por outro lado, estudos em tratamento neoadjuvante podem ser conduzidos com menor número de pacientes e em menor intervalo de tempo, além de fornecer informações sobre desfechos intermediários, como a resposta patológica completa (RPC) e a resposta clínica, os quais poderiam prever o benefício em termos de desfechos a longo prazo, com menor custo.

Essas vantagens estimularam a ampliação do número de estudos em neoadjuvância, nos últimos anos, inclusive para inclusão de novas drogas.[20]

A RPC à quimioterapia neoadjuvante ocorre em 15-40% das pacientes e é, de fato, um indicador de benefício em termos de SLR e SG [18,21]. No entanto, de acordo com a literatura, a RPC apresenta diferentes definições: (1) ausência de doença invasora e não-invasora na mama e nos linfonodos (*ypT0 ypN0*); (2) ausência de doença invasora na mama, podendo haver doença não-invasora residual na mama e linfonodos comprometidos (*ypT0/is ypN0/+*); (3) ausência de doença invasora de volume significativo na mama, permitindo-se a presença de doença invasora focal ou doença não-invasora na mama e linfonodos comprometidos (*ypT $\leq$ 1mic ypN0/+*). Para comparar essas diferentes definições quanto ao seu papel preditor de SLR e SG, von Minckwitz e colaboradores conduziram estudo no qual incluíram 6.377 pacientes submetidas a tratamento neoadjuvante. Foi observado que a RPC definida como ausência de doença invasora e não-invasora na mama e nos linfonodos foi associada a uma SLR significativamente superior em comparação às outras.[22]

Em uma análise de 12 estudos em terapia neoadjuvante, com dados de 11.955 pacientes, Cortazar e colegas investigaram o potencial preditor de SLR e SG da RPC à quimioterapia neoadjuvante. A erradicação de doença invasora na mama e nos linfonodos (*ypT0 ypN0* ou *ypT0/is ypN0*) foi associada a melhora na SLR (*ypT0 ypN0*: razão de risco, RR, de 0,44; IC95% 0,39-0,51; *ypT0/is ypN0*: RR de 0,48; IC95% 0,43-0,54) e SG (*ypT0 ypN0*: RR de 0,36; IC95% 0,30-0,44; *ypT0/is ypN0*: RR de 0,51; IC95% 0,45-0,58). Tal associação foi mais forte para

os tumores triplo-negativos e tumores HER2-positivos não-luminais-*like*. No entanto, não foi possível quantificar a associação entre a melhora da taxa de RPC e os desfechos a longo prazo [23]. Esse último achado pode ter algumas explicações. Em pacientes que apresentam intrinsicamente um melhor prognóstico, o aumento da taxa de RPC indicaria um benefício marginal. Além disso, nos estudos incluídos na análise observa-se a combinação de pacientes com tumores biologicamente distintos, como por exemplo tumores com forte sensibilidade à terapia endócrina, os quais já apresentam prognóstico favorável. Por fim, o benefício da adição de agentes terapêuticos em termos de aumento da taxa de RPC foi baixo na maioria dos estudos incluídos, exceto para a combinação de trastuzumabe. As taxas de RPC foram de 35% vs 15% para quimioterapia com e sem trastuzumabe, respectivamente, o que se traduziu em um aumento absoluto de 13% na sobrevida livre de eventos em cinco anos para as pacientes com RPC. Esses achados sugerem que aumento mais significativo na taxa de RPC é necessário para levar a mudança nos desfechos a longo prazo.[24]

No estudo NSABP B-18, 1.523 pacientes com tumores operáveis foram aleatorizadas para serem submetidas a quimioterapia baseada em antraciclina antes ou após o tratamento cirúrgico. A taxa de cirurgia conservadora foi superior no grupo de mulheres que recebeu tratamento neoadjuvante (67,8% vs 59,8%), mas a SLR e a SG foram semelhantes nos dois grupos. Um achado importante foi de que a ocorrência de resposta patológica completa (RPC) ao tratamento neoadjuvante foi associada a melhor SLR, embora esse achado

tenha adicionado pouca informação prognóstica ao que se obtinha com o tratamento adjuvante [25]. A análise desses dados com seguimento mediano de nove anos mostrou que se mantinha a semelhança entre os grupos em termos de SLR e SG , porém o benefício da obtenção de RPC tornou-se mais significativo (SG em nove anos: 85% para pacientes com RPC vs 73% para pacientes com resposta clínica completa mas doença invasora no espécime cirúrgico).[26]

Posteriormente, foi avaliada a adição de taxanos à quimioterapia neoadjuvante baseada em antraciclinas, no estudo NSABP B-27. Nesse estudo, 2.411 pacientes com tumores operáveis foram aleatorizadas para receberem quatro ciclos de AC seguidos de cirurgia, quatro ciclos de AC seguidos de quatro ciclos de taxano (AC-T) e então cirurgia, ou quatro ciclos de AC seguidos de cirurgia e quatro ciclos de taxano em adjuvância. A associação do taxano antes da cirurgia levou a aumento da taxa de resposta global (90,7% vs 85,5%; $p < 0,001$), de RPC (26,1% vs 13,7%; $p < 0,001$) e do número de pacientes com linfonodos negativos no espécime cirúrgico (58,2% vs 50,8%; $p < 0,001$). Mas novamente não foi demonstrado benefício em termos de SG e SLR com o tratamento neoadjuvante em comparação ao adjuvante [27]. Com base nesses resultados, o esquema baseado em antraciclinas e taxanos é, hoje, amplamente empregado no tratamento neoadjuvante do carcinoma de mama.

Na tentativa de aumentar as taxas de RPC e, assim, melhorar o prognóstico dessas pacientes, outras abordagens de tratamento quimioterápico foram estudadas. A associação de outros agentes com atividade comprovada no

cenário metastático, como capecitabina e gencitabina, ao esquema AC-T, não levou a melhora nas taxas de RPC, resposta clínica completa (RCC) e de cirurgia conservadora, mesmo com a adição de agentes que atuam na via da angiogênese, no caso o bevacizumabe [28,29]. O conhecimento da variabilidade fenotípica do carcinoma de mama formou a base para a realização de estudos que visaram avaliar a administração de quimioterapia neoadjuvante guiada pela resposta. No estudo GeparTrio, 2.090 pacientes receberam dois ciclos de esquema contendo antraciclina e taxano em combinação, seguidos de uma avaliação de resposta. As pacientes que apresentavam resposta foram aleatorizadas para receber mais quatro ou seis ciclos do mesmo esquema; aquelas cujo tumor não mostrou resposta foram aleatorizadas para receberem mais quatro ciclos do mesmo esquema ou quatro ciclos de um esquema contendo vinorelbina e capecitabina. Embora tenha sido demonstrado que a mudança do esquema no caso de não-resposta tenha resultado em melhora de SLR e que, nas pacientes com resposta, a adição de mais seis ciclos (vs quatro ciclos) também melhorou a SLR, não houve diferença em termos de RPC e nem na taxa de cirurgia conservadora [30]. Tal abordagem ainda é considerada investigacional.

Em relação à quimioterapia neoadjuvante, ainda não somos capazes de prever a resposta individual a determinados agentes, nem determinar qual a melhor droga em cada caso especificamente [31]. Alguns avanços, porém, foram feitos. No caso de tumores denominados triplo-negativos, ou seja, sem expressão de receptores hormonais e HER2, não há indicação de terapia

endócrina e anti-HER2. Além disso, tais tumores associam-se a pior prognóstico quando comparados aos outros subtipos, embora tenham melhor resposta ao tratamento com quimioterapia [32,33]. A avaliação do emprego de platinas no tratamento neoadjuvante de pacientes com carcinoma de mama triplo negativo baseou-se na observação de resposta no contexto de doença metastática. A observação de que tumores triplo-negativos apresentam resposta ao uso de platinas na doença metastática levou ao delineamento de estudos em neoadjuvância. Von Minckwitz e colaboradores conduziram estudo no qual incluíram 315 pacientes com tumores triplo-negativos que foram submetidas a um curso inicial de quimioterapia baseada em antraciclinas e taxanos com bevacizumabe, seguido de aleatorização para receber ou não carboplatina semanal. Foi observado aumento significativo da taxa de RPC (53% vs 37%; odds ratio, OR, 1,94; IC95% 1,24-3,04), porém maior taxa de descontinuação de tratamento devido a toxicidade (49% vs 36%) [34]. Resultados semelhantes foram reportados por Sikov e colaboradores [35]. Pela maior toxicidade e pelo fato de ainda não existirem dados de prognóstico a longo prazo, incluindo o impacto em SLR e SG, o uso de platina no tratamento neoadjuvante do carcinoma de mama triplo-negativo ainda não está consolidado.

A adição de trastuzumabe ao tratamento neoadjuvante do carcinoma de mama HER2-positivo levou a melhora dos desfechos clínicos. Em uma metanálise que incluiu dois estudos aleatorizados nos quais as pacientes foram tratadas com esquemas de quimioterapia baseados em antraciclinas e taxanos, as pacientes que receberam trastuzumabe apresentaram um aumento

significativo na taxa de RPC (43% vs 20%; RR=2,07; IC95% 1,41-3,03) e na SLR (39% vs 26%; RR=0,67; IC95% 0,48-0,94), em comparação às que receberam apenas quimioterapia [36]. Além disso, a obtenção de RPC em pacientes com tumores HER2-positivos está associada a melhor SLR e SG [37].

Outros agentes anti-HER2 também foram estudados no cenário neoadjuvante. O lapatinibe mostrou ser inferior ao trastuzumabe em termos de RPC, quando avaliado isoladamente em associação à quimioterapia, mas quando os dois agentes anti-HER2 foram combinados houve aumento da taxa de RPC, embora isso não tenha se traduzido em melhora do número de cirurgias conservadoras [38-40]. No estudo NeoALTTO, Baselga e colaboradores reportaram que a adição do lapatinibe à combinação de trastuzumabe e quimioterapia aumentou significativamente a taxa de RPC em 20% [39]. Dois anos após essa publicação, a apresentação dos dados do estudo ALTTO levou a questionamentos quanto à capacidade de se prever os resultados no contexto adjuvante a partir dos resultados de estudos conduzidos na neoadjuvância, considerando-se o mesmo tratamento. No estudo ALTTO, Piccart-Gebhart e colaboradores avaliaram o papel da adição do lapatinibe ao trastuzumabe no tratamento adjuvante de pacientes com tumores HER2-positivos. Nesse estudo, o lapatinibe foi associado a um aumento na SLR, porém sem atingir significância estatística (RR de 0,84; 0,70-1,02; p=0,048), o que contrasta com os resultados obtidos no estudo NeoALTTO [41]. Porém, diferenças metodológicas entre os dois estudos podem explicar esse contraste. Conforme ressalta DeMichele e colaboradores, o risco basal das pacientes nos

dois estudos é diferente, com SLR em quatro anos de 75% no NeoALTTO e de 87% no ALTTO, o que pode refletir diferenças biológicas nos tumores que afetam sua resposta ao tratamento. Em comparação ao NeoALTTO, o estudo ALTTO incluiu maior porcentagem de pacientes sem acometimento linfonodal e de tumores positivos para receptores hormonais. Além disso, a determinação da RPC no NeoALTTO foi realizada antes da administração das antraciclinas, uma classe de drogas ativas na doença HER2-positiva, o que pode ter influenciado nos resultados obtidos com o lapatinibe. Finalmente, os autores se comprometeram a apresentar os dados com seguimento mediano de 4,5 anos, independente do número de eventos registrados; assim, até a apresentação do estudo haviam ocorrido apenas 555 eventos, de um total de 850 eventos necessários pelo cálculo inicial, o que reduz o poder estatístico do estudo.[42]

Um caso marcante foi o do agente anti-HER2 pertuzumabe. Essa droga é um anticorpo monoclonal que inibe a dimerização dos receptores HER2, tendo um mecanismo de ação diferente do trastuzumabe. No contexto neoadjuvante, o pertuzumabe foi avaliado em dois estudos aleatorizados de fase II. No primeiro deles, NeoSphere, Gianni e colaboradores incluíram 417 pacientes que receberam um de quatro esquemas: docetaxel mais trastuzumabe, docetaxel mais trastuzumabe e pertuzumabe, trastuzumabe mais pertuzumabe, ou docetaxel mais pertuzumabe. As taxas de RPC foram, respectivamente, 29%, 46%, 17% e 24%; a ocorrência de RPC foi mais frequente em tumores RE-negativos, em comparação aos tumores RE-positivos. A adição do pertuzumabe não aumentou significativamente a toxicidade [43]. No segundo, TRYPHAENA,

223 pacientes receberam trastuzumabe e pertuzumabe associados a diferentes esquemas de quimioterapia, para avaliação de segurança cardíaca. A taxa de RPC variou entre 57% e 66%, sendo superior entre tumores RE-negativos (65% a 84% vs 46% a 50% em tumores RE-positivos)[44]. Com base nos resultados desses dois estudos e nos dados obtidos no tratamento no contexto metastático, e aguardando-se os dados de um estudo de adjuvância já iniciado, o *Food and Drug Administration* (FDA), nos EUA, concedeu, pela primeira vez, uma aprovação acelerada condicional para uso do pertuzumabe no tratamento neoadjuvante da doença HER2-positiva.[45]

Com relação aos tumores que expressam receptores hormonais, o grupo denominado luminal, as taxas de resposta à quimioterapia neoadjuvante são inferiores quando comparadas às obtidas em tumores RE-negativos [27,46,47]. A taxa de RPC em tumores luminais submetidos a quimioterapia neoadjuvante é da ordem de 6% a 11%, porém o impacto prognóstico desse desfecho clínico não é significativo para a maioria dessas pacientes, especialmente aquelas com tumores classificados como luminais *A-like*. [22]

Os tumores classificados como luminais *A-like* apresentam baixo índice de proliferação, determinado pela expressão de Ki67 (<14%), não possuem superexpressão/amplificação de HER2 e apresentam expressão de RP igual ou superior a 20%. Já os tumores chamados de luminais *B-like* são subdivididos em luminais *B-like* (HER2-negativos), caracterizados por expressão de Ki67 igual ou superior a 14% e/ou expressão de RP inferior a 20%; e luminais *B-like*/HER2-positivos, com superexpressão/amplificação de HER2, independente do

resultado de expressão de Ki67 e RP. As pacientes com tumores luminais *B-like* apresentam prognóstico intermediário entre o de tumores luminais *A-like* e tumores HER2-positivo/receptores hormonais-negativos e triplo-negativos. Por isso, as pacientes com tumores luminais *B-like* comumente recebem quimioterapia, especialmente aquelas com tumores HER2-positivos, para as quais ainda não existem dados que permitam a omissão do emprego de agentes citotóxicos.[48]

A administração de tratamento adjuvante sistêmico, como quimioterapia e terapia endócrina, reduziu a mortalidade câncer-específica [7]. No entanto, o benefício da quimioterapia adjuvante em tumores RE-positivos é significativamente menor quando comparado ao obtido em pacientes com tumores RE-negativos. Berry e colaboradores combinaram dados de três estudos aleatorizados para comparar o benefício da quimioterapia adjuvante em relação ao status de RE, em pacientes com envolvimento nodal. Em uma amostra de mais de 6.600 pacientes, foi observado que o ganho em termos de SLR foi, em média, de 26% em tumores RE-positivos, em comparação a 55% em tumores RE-negativos. O aumento relativo na SG em cinco anos foi de 4,0% nas pacientes com tumores RE-positivos vs 16,7% naquelas com tumores RE-negativos.[49]

Considerando-se essa menor resposta à quimioterapia e o benefício da terapia endócrina no tratamento adjuvante de carcinomas luminais de mama HER2-negativos [50], a terapia endócrina neoadjuvante configura-se em uma alternativa para esse grupo de pacientes. O emprego do tamoxifeno em

mulheres idosas com contraindicação a outras modalidades de tratamento levou às primeiras informações sobre o benefício dessa estratégia [51,52]. Posteriormente, estudos que compararam o uso de tamoxifeno com ou sem cirurgia mostraram que, embora a adição de cirurgia tenha melhorado o controle local, a SG era semelhante quando se comparava pacientes tratadas com tamoxifeno isoladamente vs cirurgia seguida de tamoxifeno [53,54]. Esses resultados deram base ao desenvolvimento de estudos com inibidores de aromatase e com a inclusão de pacientes pós-menopausadas mais jovens. Em uma metanálise que incluiu quatro estudos comparando o tratamento endócrino neoadjuvante com inibidor de aromatase vs tamoxifeno, Seo e colaboradores observaram que os inibidores de aromatase foram associados a maior taxa de resposta clínica objetiva (RR=1,29; IC95% 1,14-1,47; $p<0,001$) e de cirurgia conservadora (RR=1,36; IC95% 1,16-1,59; $p<0,0001$).[55]

Semiglazov e colaboradores conduziram estudo de fase II no qual aleatorizaram 239 pacientes com carcinomas de mama com expressão de receptores hormonais para receberem tratamento neoadjuvante com inibidor de aromatase (letrozol ou anastrozol) ou quimioterapia baseada em antraciclina e taxano, por três meses, seguido de tratamento cirúrgico. Não foram observadas diferenças em termos de resposta clínica objetiva, tempo até obtenção de resposta e RPC. Foi observada uma tendência a maior taxa de cirurgia conservadora no grupo tratado com inibidores de aromatase (33% vs 24%; $p=0,058$). Efeitos adversos foram mais comuns e de maior intensidade entre as pacientes tratadas com quimioterapia [56]. Em outro estudo, 95 pacientes com

carcinoma luminal HER2-negativo foram aleatorizadas para receberem tratamento neoadjuvante com quimioterapia baseada em antraciclina ou exemestane. Pacientes pré-menopausadas representaram mais de 50% da amostra e, no caso de alocação para o grupo do exemestane, elas recebiam também goserelina. Entre as pacientes na pré-menopausa, a quimioterapia foi associada a maior taxa de resposta clínica (66% vs 48%; $p=0,075$); no entanto, entre as pacientes com tumores apresentando baixa expressão de Ki67 ($<10\%$), a taxa de resposta foi semelhante entre as que receberam quimioterapia e tratamento endócrino [57].

Assim, os tumores luminais, especialmente luminais *A-like*, são caracterizados por boa resposta ao tratamento endócrino e menor resposta à quimioterapia, mesmo no contexto neoadjuvante. No entanto, algumas pacientes com tumores luminais apresentam pior prognóstico e derivariam maior benefício do tratamento quimioterápico. As questões que se impõem são: como identificar essas pacientes e como selecionar o melhor tratamento em cada caso. Uma possível estratégia envolve o emprego dos biomarcadores.

O Ki67 foi descrito no início da década de 1980, como sendo uma proteína nuclear, não-histona, em um laboratório da Universidade de Kiel, Alemanha, de onde se originou seu nome. O número 67 refere-se à posição do clone identificado na placa com 96 orifícios. Seu papel exato ainda não foi esclarecido, mas sabe-se que o Ki67 encontra-se expresso em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0, ou de repouso, atingindo pico de expressão durante a mitose, sendo considerado um marcador de proliferação

celular. Além disso, os estudos mostram que o Ki67 apresenta boa correlação com parâmetros de grau tumoral.[58]

O consenso de Saint Gallen, publicado em 2013, recomenda o emprego do Ki67 para a diferenciação entre tumores luminais A e luminais B, com um ponto de corte sugerido de 14%, sendo esse parâmetro incluído no processo decisório quanto ao tratamento sistêmico das pacientes com carcinoma de mama [48]. A escolha desse biomarcador se baseou no fato de que quando comparadas as assinaturas genéticas por microarranjo de tumores luminais A e B, a principal diferença entre os dois grupos em termos biológicos foi a expressão de genes relacionados à proliferação celular [59,60].

Em 2010, foram publicadas recomendações para avaliação do Ki67 no carcinoma de mama, por um painel de especialistas. Reconheceu-se o potencial papel do Ki67 tanto no contexto de estudos clínicos quanto na prática clínica, porém não foi possível chegar a um consenso quanto ao melhor ponto de corte para definição de tumores com alta taxa vs baixa taxa de proliferação, já que os valores empregados nos estudos eram muito variáveis [61]. Duas metanálises avaliaram o valor prognóstico do Ki67 no carcinoma de mama. Stuart-Harris e colaboradores avaliaram 85 estudos, totalizando 32.825 pacientes, em busca de evidências quanto à correlação entre marcadores de proliferação celular e desfechos de sobrevida em pacientes com carcinoma de mama. O Ki67 foi avaliado em 43 desses estudos e, na análise multivariada, expressão aumentada desse biomarcador foi associada a menor SG e SLR [62]. Na

metanálise de Azambuja e colegas, que incluiu 46 estudos e mais de 12.000 pacientes, os resultados foram semelhantes.[63]

No entanto, destaca-se a importante heterogeneidade quanto à metodologia empregada nos estudos, o que gera inconsistências em termos de fatores pré-analíticos, analíticos e de interpretação. A tabela 1 ilustra a variabilidade nos pontos de corte para Ki67 adotados em diferentes estudos.

Tabela 1. Sumário de estudos clínicos em carcinoma de mama e os respectivos pontos de corte empregados para Ki67

Estudos (Ref)	Pacientes	Técnica/Anticorpo	Ponto de Corte
Bonnefoi et al (66)	n=179	IHC/MIB-1	≥20%
Pennault-Llorca (67)	n=1.190	IHC/MIB-1	>20%
Motollese et al (68)	n=157	IHC/policlonal	>10%
Viale et al (69)	n=1.924	IHC/MIB-1	>19%
Michalides et al (70)	n=394	IHC/MIB-1	>5%
Viale et al (71)	n=2.685	IHC/MIB-1	>11%
MacGrogan et al (72)	n=128	IHC/MIB-1	>40%
Bottini et al (73)	n=210	IHC/MIB-1	três grupos: <10%; 11-29%; >30%
Generali et al (74)	n=114	IHC/MIB-1	≥10%
Von Minckwitz et al (75)	n=196	IHC/MIB-1	três grupos: baixo, 0-15%; médio, 16-30%; elevado, 31-100%

Ref: referência; IHQ: imuno-histoquímica; MIB-1: anticorpo monoclonal de rato anti-Ki67 humano

Adaptada de Luporsi et al (76)

Em um estudo que teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade da avaliação do Ki67 em grandes laboratórios de vários países, observou-se apenas moderada concordância entre os laboratórios. Os autores concluíram que, devido à limitada validade analítica, a adoção de pontos de corte de Ki67 obtidos em outro laboratório só poderá ser recomendada após a padronização da metodologia de leitura do exame [64]. Assim, o consenso da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) não recomenda o uso do Ki67 para avaliação de prognóstico em pacientes com câncer [65].

Em uma coorte de 357 pacientes com carcinoma de mama, Cheang e colaboradores procederam à classificação por perfil de expressão gênica. Na diferenciação entre tumores luminais *A-like* e *B-like*, eles encontraram um ponto de corte de 13,25% para o Ki67 determinado por imuno-histoquímica, com uma sensibilidade de 72% e especificidade de 77%. A partir desses resultados, e para garantir uma melhor avaliação visual, os autores propuseram categorizar os tumores luminais *A-like* quando o percentual de células que expressam Ki67 for inferior a 14% e os luminais *B-like* quando for igual ou superior a 14%. Quando esses achados foram aplicados a uma coorte independente de 4.046 pacientes com carcinoma de mama, dos quais 2.847 eram luminais, a sobrevida câncer-específica em 10 anos foi de 92% para aquelas classificadas como luminais *A-like* e 79% para luminais *B-like* e 78% para luminais/HER2-positivos ($p < 0,001$ para todas as análises). Em comparação às pacientes com tumores luminais *A-like*, aquelas com tumores luminais *B-like* apresentaram maior risco de recidiva (razão de risco, RR, de 1,6; IC95% 1,0-2,5) e morte (RR de 2,1; IC95% 1,2-3,8).

Além disso, no subgrupo de pacientes que receberam apenas terapia endócrina no contexto adjuvante, a sobrevida câncer-específica em 10 anos foi de 79% para tumores luminais *A-like* e de 64% para tumores luminais *B-like* ($p<0,001$). Tumores luminais *B-like* apresentaram um risco 1,5 vezes maior de recaída e morte, quando comparados aos luminais *A-like* [77]. Com base nesse estudo, o valor de 14% foi o recomendado no consenso de St Gallen de 2013.

Tamaki e colaboradores publicaram recentemente um estudo no qual incluíram 408 pacientes com carcinoma de mama e avaliaram a correlação entre a expressão de Ki67, RE e HER2 e o grau histológico, bem como analisaram SLR e SG de acordo com o Ki67 ao diagnóstico. Além de terem observado diferença significativa na expressão de Ki67 de acordo com o status de RE e HER2, o Ki67 foi identificado como preditor independente de SG (RR de 39,12; $p=0,031$) e SLR (RR de 10,85; $p=0,011$) nos tumores RE-positivos/HER2-negativos. Foram conduzidas análises de vários pontos de corte de Ki67 para diferenciação entre tumores luminais *A-like* e luminais *B-like*, sendo recomendado um ponto de corte entre 20% e 25%, com base nos dados de SLR.[78]

O papel preditor de resposta à quimioterapia neoadjuvante ainda não está claro, embora tenha sido avaliado em alguns estudos. Sueta e colaboradores avaliaram os preditores de RPC após quimioterapia neoadjuvante em pacientes com carcinoma de mama ($n=121$) que receberam antraciclinas com ou sem taxanos. O Ki67 foi o único preditor de RPC entre tumores RE-positivos, com um OR de 6,24 (IC95% 1,40-27,7). Entre as pacientes com tumores luminais, a

média de Ki67 inicial foi de 43% entre as que obtiveram RPC e de 29% entre as com resposta parcial. Foi identificado um ponto de corte de 35% para diferenciação entre tumores luminais com maior chance de RPC, com uma sensibilidade de 81,8% e especificidade de 63,6% [79].

Achados semelhantes foram reportados por Horimoto e colaboradores. Nesse estudo, 114 pacientes portadoras de tumores luminais/HER2-negativos foram tratadas com quimioterapia neoadjuvante com esquema baseado em antraciclinas com ou sem taxanos. A taxa global de RPC foi de 10%, tendo sido mais elevada em tumores RP-negativos em comparação a tumores RP-positivos. O Ki67 foi analisado como variável contínua, e valores mais elevados foram associados a maior taxa de RPC. O melhor ponto de corte de Ki67 para diferenciação entre tumores com e sem RPC foi determinado por análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), tendo sido obtido um valor de 35%, com sensibilidade de 79% e especificidade de 73% [80]. Ponto de corte semelhante, entre 36% e 40%, para predição de RPC após quimioterapia neoadjuvante em tumores luminais/HER2-negativos foi encontrado em estudo conduzido por Fasching e colegas.[81]

Ao avaliar os possíveis parâmetros de não-resposta à quimioterapia neoadjuvante, em 490 pacientes com carcinoma de mama, Balmativila e colaboradores observaram que o grupo de pacientes sem resposta era menos frequentemente caracterizado por alto grau histológico, e se encontrava mais comumente tumores RE-positivos, RP-positivos e HER2-negativos. A taxa de RPC foi de apenas 3% entre os tumores luminais *A-like*, mas chegou a 16%

entre os luminais B-*like*. O valor médio do Ki67 no grupo de pacientes que respondeu ao tratamento foi de 38,4%, em comparação a 27,9% entre as não-respondedoras. O ponto de corte calculado para classificação desses dois grupos foi de 18%, com sensibilidade de 47% e especificidade de 77%; esse ponto de corte não exibiu poder discriminatório nos tumores HER2-positivos e triplo negativos, sugerindo que talvez o Ki67 tenha efeito preditivo mais significativo nos tumores menos agressivos de acordo com outros critérios de prognóstico [82]. De fato, Jones e colegas, em estudo com 175 pacientes com carcinoma de mama sem expressão de receptores hormonais, observaram que o Ki67 pré-tratamento não foi preditor de RPC e nem de resposta clínica [83]. No entanto, outros estudos sugeriram que o Ki67 também teria papel preditor de resposta à quimioterapia em tumores sem expressão de receptores hormonais.[84,85]

No estudo GeparTrio, Denkert e colaboradores avaliaram 1.166 amostras de biopsia por agulha grossa para analisar diferentes pontos de corte para Ki67 em relação a RPC, SLR e SG. O seguimento mediano foi de 82,4 meses para SLR e de 91 meses para SG. Os pesquisadores empregaram um algoritmo para achado de pontos de corte disponível gratuitamente *online* (*Cutoff Finder*), tendo sido identificados vários valores estatisticamente significativos para cada desfecho. Com base em dados de estudos prévios, eles optaram por dividir as pacientes em três grupos, de acordo com Ki67: baixo ($\leq 15\%$), intermediário (15,01% a 35%) e alto ($> 35\%$). Entre as pacientes que apresentaram RPC, 4,2% apresentavam Ki67 inicial baixo, 12,8% intermediário e 29,0% alto. O subgrupo

de tumores luminais foi o único no qual o Ki67 pré-tratamento foi preditor independente de SLR e SG; já nas pacientes sem RPC, Ki67 elevado foi preditor de pior prognóstico em termos de SLR e SG. Um achado interessante foi de que, nas pacientes com RPC, o achado de Ki67 elevado pré-tratamento foi associado a melhor SLR e SG.[86]

Outro parâmetro estudado em relação a prognóstico e resposta no carcinoma de mama é a expressão de Ki67 encontrada durante e após tratamento neoadjuvante. Assersohn e colegas avaliaram pacientes submetidas a quimioterapia, terapia endócrina ou a combinação das duas modalidades antes do tratamento cirúrgico. As pacientes que receberam cada modalidade isoladamente apresentaram diferentes padrões de mudança na expressão de Ki67, após duas a três semanas de tratamento, quando comparados os tumores com resposta clínica parcial/completa e as que não tiveram resposta [87].

O Ki67 determinado após o término do tratamento neoadjuvante foi identificado como marcador de prognóstico em termos de SLR e SG em diferentes estudos. Jones e colaboradores avaliaram 103 pacientes que receberam tratamento neoadjuvante com quimioterapia isolada ou combinada a terapia endócrina. O Ki67 pós-tratamento foi o único fator de prognóstico para SLR e SG [88]. Em outro estudo, a adição da expressão de Ki67 após tratamento neoadjuvante aos critérios de doença residual (*Residual Cancer Burden* - RCB) aumentou a acurácia para predição de SLR e SG [89]. Tal papel prognóstico foi corroborado por outros autores [90,91].

Em outra análise dos dados do estudo GeparTrio, von Minckwitz e colaboradores avaliaram o impacto prognóstico e preditivo do Ki67 determinado após a quimioterapia neoadjuvante. Foram incluídas 1.151 pacientes, com um seguimento mediano de 5,2 anos, sendo 488 pacientes com Ki67 considerado baixo ($\leq 15\%$) na amostra de tumor residual. Ki67 elevado ou intermediário foi associado a elevação do risco de recaída e morte, em comparação a Ki67 baixo, sendo o risco de recaída aumentado principalmente nos primeiros três anos. As pacientes com tumores luminais, cujas lesões residuais exibiam Ki67 baixo apresentaram prognóstico semelhante às que tiveram RPC. Além disso, a conversão de Ki67 pré-tratamento elevado para valores baixos após o mesmo apresentaram melhor prognóstico do que aquelas com valores iniciais baixo e intermediário. A adição do Ki67 pós-tratamento aos modelos de predição de risco melhorou a acurácia dos mesmos em pacientes com tumores luminais. Esses resultados apontam para a importância dos conceitos de resposta farmacodinâmica persistente e resistência precocemente adquirida. A avaliação pós-operatória do Ki67 poderia auxiliar a identificar aquelas pacientes nas quais seriam necessárias estratégias adicionais de tratamento adjuvante, visando redução de risco.[92]

Em resumo, o delineamento de estudos em tratamento neoadjuvante do carcinoma de mama é viável e permite a obtenção de resultados em um intervalo curto de tempo, com inclusão de menor número de pacientes, quando se compara aos estudos em adjuvância. Além disso, os desfechos obtidos após o tratamento neoadjuvante são importantes do ponto de vista de prognóstico,

pelo menos em alguns subtipos tumorais. Existem evidências de que o Ki67 está associado de forma consistente à proliferação celular e ao grau histológico do tumor, sendo um biomarcador de fácil acesso na prática clínica, apesar de existir importante variação interlaboratorial em sua avaliação. É um potencial preditor de resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante e também de prognóstico quando determinado após esse tratamento, especialmente em tumores luminais. Como esses tumores tendem a apresentar menor resposta à quimioterapia e podem ser tratados com terapia endócrina, menos tóxica e com eficácia comparável, o Ki67 pode ser uma importante ferramenta no processo decisório de quais pacientes poderiam ser poupadas da quimioterapia.

Diante disso, pretendemos avaliar a relação entre a expressão de Ki67 ao diagnóstico do carcinoma de mama com a expressão de receptores hormonais e a resposta clínica e patológica à quimioterapia neoadjuvante, bem como os efeitos do tratamento sobre a expressão desse biomarcador e dos receptores hormonais em amostras obtidas de tumores residuais após a cirurgia.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a relação entre a expressão à imuno-histoquímica de Ki67, receptores hormonais e HER2, tipo e grau histológicos dos tumores, bem como características clínicas da paciente com a resposta clínica e patológica após a quimioterapia neoadjuvante para o carcinoma luminal de mama.

2.2. Específicos

2.2.1. Avaliar a associação entre a resposta à quimioterapia neoadjuvante e:

2.2.1.1. Expressão de Ki67, receptores hormonais e HER2 à imuno-histoquímica

2.2.1.2. Características morfológicas do tumor e dados clínicos das pacientes

2.2.1.3. Tratamento cirúrgico

3. Capítulo

Introduction

Breast cancer is a heterogeneous disease, with different patterns of gene expression that determine the characterization of at least four subtypes with different prognosis and response to treatment [1,2]. Predictive and prognostic markers such as lymph node involvement, expression of estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors, and overexpression/amplification of HER2 have been identified in the literature and are used routinely, but they have only limited power in the individualized determination of prognosis and choice of therapeutic agents.

The administration of preoperative treatment permits the direct observation of tumor behavior and the study of potential biomarkers of therapeutic response and prognosis in a relatively short time and with few patients. Most such studies have evaluated the use of chemotherapy and targeted therapies, such as trastuzumab for HER2-positive tumors, with regards to clinical response rate and pathologic complete response (PCR), the latter being an independent prognostic factor in some patients [3-6].

Data concerning preoperative endocrine therapy is scarce and refers mainly to postmenopausal women. In studies comparing preoperative chemotherapy and endocrine therapy, although the mean time to achieve a clinical response was similar, chemotherapy was associated with a higher rate of PCR, but also with more toxicity and fewer patients undergoing breast conserving surgery [7,8].

In fact, the rate of PCR to chemotherapy in tumors expressing hormone receptors is only 6% to 11%, and the prognostic impact of clinical outcome is less clear for these patients, especially luminal A-like tumors (ER + / PR + / HER2-negative / Ki67 <14%) [9,10]. On the other hand, it has been established that some patients with tumors expressing hormone receptors have a worse prognosis and so are able to benefit from chemotherapy. This is the case for HER2-positive tumors, for which the standard therapy consists in chemotherapy associated to the monoclonal antibody trastuzumab. Among patients with ER-positive/HER2-negative tumors, the identification of those who would benefit from chemotherapy is a challenge.

The Ki67 is a nuclear protein, which is expressed in all cell cycle phases except the resting phase and is a marker of cell proliferation [10]. In tumors expressing hormone receptors, analysis of the genetic signature identifies two subgroups, namely luminal A-like and luminal B-like tumors, whose difference lies in the increased expression of genes associated with cell proliferation, and the expression of Ki67 reflects this difference [11-13].

This marker has therefore been studied as a predictor of response and prognosis in patients undergoing preoperative endocrine therapy [14-16]. With respect to chemotherapy, the role of Ki67 is not yet clear, although some studies suggest that it is a predictive biomarker for PCR in ER-positive tumors [5,17,18]. Thus, Ki67 is a biomarker with the potential to be used in the selection of patients with luminal tumors who would most benefit from preoperative chemotherapy.

The aim of our study was to evaluate the relationship between the proteic expression of Ki67, ER, PR and HER2 in the diagnosis of luminal breast cancer and the clinical and pathologic response to preoperative chemotherapy. An additional aim was to establish a Ki67 cut-off in order to identify responders to treatment.

Patients and Methods

This study is a retrospective cohort study, which was conducted at the Prof José Aristodemo Pinotti Women's Hospital, State University of Campinas (CAISM/UNICAMP). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences (FCM) at UNICAMP (CEP 1246/2009).

Patients

We selected 120 patients, with a total of 131 luminal breast cancers, who received preoperative chemotherapy at our hospital in 2013 and 2014 before undergoing surgery. Cases of abandonment of treatment, use of preoperative endocrine therapy and where it was not possible to recover the original paraffin blocks of thick needle biopsy were excluded.

Treatment and response evaluation

In 113 cases, the administered chemotherapy consisted of AC (A: doxorubicin 60 mg/m²; C: cyclophosphamide 600 mg/m²) every 21 days, followed by a taxane (paclitaxel 175 mg/m² or docetaxel 75 mg/m²) every 21 days, or the

reverse. Four patients received only the AC scheme for six cycles and two taxane for only four cycles. One patient received five cycles of CMF (C: cyclophosphamide 600 mg/m²; M: methotrexate 40 mg/m², F: 5-fluorouracil 600 mg/m²) followed by four cycles of AC and four cycles of taxane. Trastuzumab was administered to six patients among those with HER2-positive tumors. The clinical response to chemotherapy in terms of the primary tumor and metastatic lymph nodes was assessed by two-dimensional measurement of the largest diameter in all cycles and was classified as follows: partial, in cases of incomplete reduction compared to the initial staging; complete absence of palpable lesion; progression, growing lesion; stable disease, maintained dimensions.

Histology

Paraffin blocks and slides were retrieved from the archive of the Department of Pathology, FCM/UNICAMP, and were analyzed in the Experimental Pathology Laboratory (LAPE) of CAISM. We analyzed the material obtained from core biopsies for the initial diagnosis and surgical specimens from mastectomy or conservative surgery, both fixed in buffered formalin and embedded in paraffin. The histological classification, was made by a pathologist according to the criteria of the World Health Organization (WHO) [19]. The determination of the histological grade was made according to the modified Bloom-Richardson system [20]. Pathological response to preoperative

chemotherapy was defined as the absence of invasive disease in the surgical specimens from the breast and axilla surgical specimens [21].

Immunohistochemistry was used to evaluate the proteic expression of ER (clone 1D5 1: 1000, Dako), PR (clone PgR 636 1: 800, Dako), HER2 (Clone PN2A 1: 1100) and Ki67 (clone MIB1 1: 500, Dako), according to standard protocols. Internal and external positive and negative controls were used to validate the reactions. The slides were analyzed by an experienced pathologist who was blinded to the treatment administered and clinical response obtained. Nuclear staining was seen for ER, PR and Ki67. The result for ER and PR was considered positive if at least 1% of the nuclei stained, and we also evaluated the intensity of staining [22]. The expression of Ki67, as a percentage, was determined after the selection of hot spots and calculation of the average value [23]. The HER2 expression score was defined according to the following: score 0, no staining in invasive tumor cells or membrane staining in $\leq 10\%$ of invasive cancer cells; score 1+ incomplete weak membrane staining barely perceptible in more than 10% of invasive cancer cells; score 2+ weak to moderate membrane staining in more than 10% of invasive tumor cells; and score 3+, strong complete membrane staining and in more than 10% of invasive tumor cells [24]. Cases with an HER2 score of 2+ according to immunohistochemistry were referred to perform *in situ* hybridization (ISH). Quantification was achieved by the relationship between HER2 and CEP-17, and a result with a ratio higher than 2.0 was considered positive. Polysomy of chromosome 17 was seen in the presence of three or more zip-17 signals by more than 6% of the tumor cells [25].

Surrogate definitions of intrinsic subtypes of breast cancer

The classification of luminal tumors was conducted based on the results of immunohistochemistry and in accordance with the criteria set during the 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference [26]. Luminal A-like tumors were those with ER-positive, PR-positive in 20% or more of the nuclei, HER2-negative and Ki67 <14%. Luminal B-like (HER2-negative) tumors were those with ER-positive and HER2-negative and one or more of the following: PR-negative or staining of less than 20% of the nuclei, Ki67 $\geq$ 14%. Luminal B-like (HER2-positive) tumors were those with overexpressed or amplified HER2, regardless of the results of PR and Ki67.

Statistical analysis

The comparison between demographic and clinical characteristics according to the status of the clinical and pathological response was determined by chi-square test or Fisher's exact test in the case of categorical variables, and by ANOVA or Mann-Whitney test for continuous variables. Univariate and multivariate logistic regression analyses were used to evaluate the association between potential predictors and response to treatment. ROC curves were constructed to evaluate the predictive power of Ki67 and the intensity of expression of hormone receptors in relation to the clinical and pathological response. The tests were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, USA). All tests were two-tailed.

Results

Table 1 details the characteristics of the patients. Complete clinical response to chemotherapy was observed in 52/131 (39.7%) tumors and partial response/stable disease in 79/131 (60.3%) tumors. Premenopausal patients, histological grade III tumors and a high Ki67 expression index were more likely to involve complete tumor clinical response ($p < 0.05$ for all). The expression of ER and PR as a dichotomous variable employing the 1% cut-off point was not correlated with the clinical complete response. However, when analyzing the percentage of expression of these receptors as a continuous variable using a median 40% as the cut-off point, tumors with ER expression equal to or above 40% showed an increased probability of tumor complete clinical response (odds ratio, OR, 2.14; 95% CI 1.05 to 4.35; $p = 0.03$).

The variables with a statistically significant association with complete tumor clinical response in the non-adjusted analysis were included in the multivariate logistic regression model. As shown in Table 2, histological grade III (OR 2.92, 95% CI 1.07 to 7.98; $p = 0.04$), premenopausal status (OR 9.05, 95% CI 2.01 to 40.87, $p = 0.004$) and a Ki67 expression index equal to or higher than the median 20% (OR = 2.71, 95% CI 1.04 to 6.99; $p = 0.04$) increased the probability of obtaining complete clinical response. In this model, the predictive power of RE expression lost its statistical significance (OR 2.29, 95% CI 0.94 to 5.55; $p = 0.06$). Patients with clinical complete response were more likely to be submitted to breast conserving surgery ($p = 0.005$).

Table 1. Baseline characteristics of the patients according to the clinical and pathological

Characteristic	All	Clinical tumoral complete response		p	Pathological complete response		p
		yes n (%)	no n (%)		yes n (%)	no n (%)	
	n=120	n=56	n=73		n=8	n=123	
Age, median in years	49,0	47,0	52,0	0,03 ³	43,0	50,0	0,13 ¹
Menopausal status							
Pre-menopausal	72 (55,0)	41 (57,7)	30 (42,3)	0,0003 ²	6 (75,0)	66 (53,7)	0,29 ²
Post-menopausal	59 (45,0)	15 (26,0)	43 (74,0)		2 (25,0)	57 (46,3)	
Stage							
IA-IIA	24 (18,3)	14 (25,0)	9 (12,4)	0,26 ⁴	2 (25,0)	22 (17,9)	0,0006 ²
IIB	33 (25,2)	14 (25,0)	19 (26,0)		0 (0)	33 (26,8)	
IIIA	30 (22,9)	16 (28,6)	13 (17,8)		6 (75,0)	24 (19,5)	
IIIB-C	44 (33,6)	12 (21,4)	32 (43,8)		0 (0)	44 (35,8)	
Clinical basal T stage							
T2	51 (40,8)	25 (47,2)	26 (36,1)	0,29 ⁴	3 (37,5)	48 (41,0)	0,013 ²
T3	31 (24,8)	16 (30,2)	15 (20,8)		5 (62,5)	26 (22,2)	
T4	43 (34,4)	12 (22,6)	31 (43,1)		0 (0)	43 (36,8)	
Clinical basal N stage							
N0	38 (29,0)	20 (35,7)	18 (24,7)	0,24 ⁴	2 (25,0)	36 (29,3)	1,00 ²
N1	67 (51,2)	26 (46,4)	40 (54,8)		4 (50,0)	63 (51,2)	
N2-3	26 (19,8)	10 (17,9)	15 (20,5)		2 (25,0)	24 (19,5)	
Histological grade							
I-II	94 (73,4)	35 (62,5)	59 (84,3)	0,009 ⁴	0 (0)	94 (78,3)	<0,0001 ²
III	34 (26,6)	21 (37,5)	11 (15,7)		8 (100)	26 (21,7)	
Histological subtype							
Ductal	112 (86,8)	48 (85,7)	62 (87,3)	0,79 ²	8 (100)	104 (86)	0,59 ²
Lobular	9 (7,0)	3 (5,4)	6 (8,5)		0 (0)	9 (7,4)	
Mixed	8 (6,2)	5 (8,9)	3 (4,2)		0 (0)	8 (6,6)	
ER status							
Negative	2 (1,5)	2 (3,6)	0 (0)	0,18 ²	0 (0)	2 (100)	0,88 ²
Positive (≥ 1%)	129 (98,5)	54 (96,4)	73 (100)		8 (6,2)	121 (93,8)	

PR status Negative Positive (≥ 1%)	19 (14,5) 112 (85,5)	11 (19,6) 45 (80,4)	8 (11,0) 65 (89,0)	0,25 ⁴	2 (25,0) 6 (75,0)	17 (13,8) 106 (86,2)	0,33 ²
HER2 status Negative Positive	96 (73,9) 34 (26,1)	37 (67,3) 18 (32,7)	57 (78,1) 16 (21,9)	0,24 ⁴	3 (37,5) 5 (62,5)	93 (76,2) 29 (23,8)	0,03 ²
Pretreatment Ki67 index <14% ≥14%	35 (28,2) 89 (71,8)	7 (14,0) 43 (86,0)	27 (37,0) 46 (63,0)	0,009 ⁴	0 (0) 8 (9,0)	35 (100) 81 (91,0)	0,06 ²
Intrinsic subtype non-HER2 Luminal A Luminal B-nãoHER2	21 (16,4) 76 (59,4)	1 (2,6) 38 (97,4)	19 (33,3) 38 (66,7)	0,0007 ⁴	0 (0) 4 (5,3)	21 (100) 72 (94,7)	0,57 ²

ER: estrogen receptor; PR: progesteron receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2

¹ANOVA; ²Fisher exact test; ³Mann-Whitney; ⁴chi-square

Table 2. Multivariate logistic regression of the predictors of clinical tumoral complete response

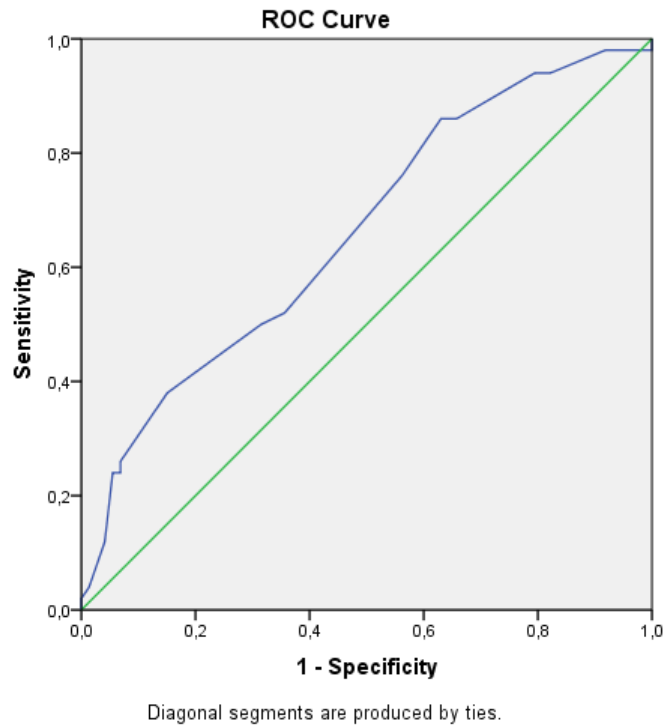
Characteristic	odds ratio (IC95%)	p
Histological grade: III vs I-II	2,92 (1,07-7,98)	0,04
Menopausal status: pre vs post	9,05 (2,01-40,87)	0,004
Pretreatment Ki67 index: $\geq 20\%$ vs $< 20\%$	2,71 (1,04-6,99)	0,04
Percentual expression of ER: $\geq 40\%$ vs $< 40\%$	2,29 (0,94-5,55)	0,006

IC95%: 95% confidence interval; ER: estrogen receptor

The overall PCR rate was 6.11% ($n = 8$). No patient with luminal A-like tumors presented PCR, while the rates were 5.26% (4/76) and 12.9% (4/31) for luminal B-like (HER2-negative) and luminal B-like (HER2-positive), respectively. In the unadjusted analysis of PCR predictors, a high histological grade (III vs I / II) for HER2 positive status and early stage T2/T3 vs T4 were significantly correlated to PCR ($p < 0.05$ for all). The positivity for HER2 increased the likelihood of achieving PCR fivefold (OR 5.34, 95% CI 1.20 to 23.73; $p = 0.028$), although it was not possible to evaluate the effect of trastuzumab in this outcome due to the small number patients receiving the drug ($n = 6$). We found no association between pretreatment Ki67 index and PCR ($p = 0.29$) when all the patients were included in the analysis, even after the exclusion of HER2-positive tumors ($p = 0.06$). In the multivariate analysis, we found no independent predictor of PCR in our sample (data not shown).

To identify the cut-off point of pretreatment Ki67 expression able to differentiate patients with complete clinical response, an analysis of the ROC curve was performed (Figure 1). The area under the curve (AUC) was 0.660 (95% CI 0.563 to 0.758), indicating that it has a poor predictive performance [27]. A 27.5% cut-off had a specificity of 68.5% and 50% sensitivity for discrimination between patients with and without complete clinical response.

Figure 1. ROC curve analysis of the pretreatment Ki67 index as a predictor of clinical tumoral complete response. The area under the curve was 0,660 (IC95% 0,563-0,758). A cutoff point of 27,5% showed 50% sensibility and 68,5% specificity in differentiating between clinical tumoral complete response and partial response/stable disease.



Discussion

In our study, the PCR rate for breast luminal tumors was 6.11%, being more common in smaller size tumors, histological grade, and high overexpression/amplification of HER2, which is in agreement with the literature [3,5]. The positive HER2 has been associated with a fivefold increase in the probability of PCR, and in this subgroup of patients the PCR rate was 12.9%. This value is lower than that identified in the literature, probably because in our study only a small number of patients ($n = 6$) received trastuzumab associated with chemotherapy.

Unlike the findings observed in previous studies [4,5], we found no association between the expression of Ki67 index and PCR. Similarly, we did not identify any independent predictor of PCR in this study. This can be explained, at least partly, by the sample size and the small number of patients with PCR. However, using the 14% cut-off for the classification of HER2-negative tumors in luminal A-like and luminal B-like (HER2-negative), the PCR rate for the two groups was 0% and 5.26%, respectively, suggesting that tumors with higher Ki67 expression may be more likely to PCR. In fact, in the analysis that deleted HER2-positive tumors, the observed p-value was borderline ($p = 0.06$) when compared to tumors with low and high expression of Ki67.

Xu and colleagues found that, in patients undergoing preoperative chemotherapy and response evaluation with clinical examination and magnetic resonance imaging, the Ki67 pretreatment was associated with a higher rate of clinical response [28]. However, these findings were not reproduced by other authors [29,30]. In our study, we identified the Ki67 pretreatment, histological grade and menopausal status as independent predictors of complete tumor clinical response, which was associated with a higher breast conservation rate. The ROC curve analysis showed that, in this sample, the Ki67 demonstrated a poor performance in identifying tumors with complete tumor clinical response. However, a 27.5% cut-off point showed moderate specificity, which is important from the clinical point of view since it reduces the number of false predictions of patients with complete clinical tumor response. Such patients could thus be spared preoperative chemotherapy administered for this purpose.

The identification of tumor clinical predictors of response in patients with luminal tumors is essential since recent evidence suggests that this subgroup of patients achieving PRC has lower prognostic significance, especially in the luminal A-like tumors [3]. When evaluating predictors of non-response to preoperative chemotherapy, Balmativola and colleagues found that the PCR rate of luminal tumors was only 3%, and that a third of these tumors showed no pathological response [31]. For this subgroup of patients, a focused approach to the preoperative endocrine treatment associated with the early assessment of changes in the expression of proliferation markers such as Ki67 can help differentiate patients who present a good clinical response to treatment and those for whom chemotherapy should be indicated.

Limitations to our study include its retrospective nature, the relatively small sample size and the use of certain preoperative Ki67 in the biopsy sample by thick needle, which cannot fully represent the diversity of expression of proliferation markers. However, we emphasize the relatively high number of patients submitted to preoperative chemotherapy with data collected and the homogeneity of treatment, which was administered according to standard protocols.

In conclusion, patients with luminal tumors who are undergoing preoperative chemotherapy have a low PCR rate only when evaluating HER2-negative tumors. The Ki67 expression index was not a significant predictor of PCR, similar to hormone receptor and HER2, when considering the influence of other factors. However, elevated Ki67 index, high histological grade and

premenopausal status were independent predictors of tumor complete clinical response, which was most likely associated with conservative surgery. Such parameters could be considered in decision-making regarding the indication of preoperative chemotherapy for patients with HER2-negative luminal tumors who could be spared radical surgery.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. PEROU CM, SØRLIE T, EISEN MB, et al (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-52. doi: 10.1038/35021093
2. SØRLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):10869-74. doi: 10.1073/pnas.191367098
3. VON MINCKWITZ G, UNTCH M, BLOHMER JU, et al (2012) Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 30(15):1796-1804. doi: 10.1200/JCO.2011.38.8595
4. SÁNCHEZ-MUÑOZ A, NAVARRO-PEREZ V, PLATA-FERNÁNDEZ Y, et al (2015) Proliferation determined by Ki-67 defines different pathologic response to

neoadjuvant trastuzumab-based chemotherapy in HER2-positive breast cancer. Clin Breast Cancer [Epub ahead of print]. doi: 10.1016/j.clbc.2015.01.005

5. FASCHING PA, HEUSINGER K, HAEBERLE L, et al (2011) Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. BMC Cancer 11:486. doi: 10.1186/1471-2407-11-486

6. SHERI A, SMITH IE, JOHNSTON SR, et al (2015) Residual proliferative cancer burden to predict long-term outcome following neoadjuvant chemotherapy. Ann Oncol 26(1):75-80. doi: 10.1093/annonc/mdu508

7. SEMIGLAZOV VF, SEMIGLAZOV VV, DASHYAN GA, et al (2007) Phase 2 randomized trial of primary endocrine therapy versus chemotherapy in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive breast cancer. Cancer 110(2):244-54. doi: 10.1002/cncr.22789

8. ALBA E, CALVO L, DE LA HABA JR, et al (2012) Chemotherapy (CT) and hormonotherapy (HT) as neoadjuvant treatment in luminal breast cancer patients: results from the GEICAM/2006-03, a multicenter, randomized, phase II study. Ann Oncol 23(12):3069-74. doi: 10.1093/annonc/mds132

9. COLLEONI M, VIALE G, ZAHRIEH D, et al (2004) Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. Clin Cancer Res 10(19):6622-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0380

10. YERUSHALMI R, WOODS R, RAVDIN PM, et al (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. Lancet Oncol 11(2):174-83. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70262-1

11. PEROU CM, JEFFREY SS, VAN DE RIJN M, et al (1999) Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16):9212-7. doi: 10.1073/pnas.96.16.9212
12. CHEANG MCU, CHIA SK, VODUC D, et al (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101(10):736-50. doi: 10.1093/jnci/djp082
13. GOLDHIRSCH A, WOOD WC, COATES AS, et al (2011) Strategies for subtypes -- dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22(8):1736-47. doi: 10.1093/annonc/mdr304
14. DOWSETT M, SMITH IE, EBBS SR, et al (2007) Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 99:167-70. doi: 10.1093/jnci/djk020
15. BEDARD PL, SINGHAL SK, IGNATIADIS M, et al (2011) Low residual proliferation after short-term letrozol therapy is an early predictive marker of response in high proliferative ER-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 18(6):721-30. doi: 10.1530/ERC-11-0180
16. TOI M, SAJI S, MASUDA N, et al (2011) Ki67 index changes, pathological response and clinical benefits in primary breast cancer patients treated with 24 weeks of aromatase inhibition. *Cancer Sci* 102(4):858-65. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01867.x
17. SUETA A, YAMAMOTO Y, HAYASHI M, et al (2014) Clinical significance of pretherapeutic Ki67 as a predictive parameter for response to neoadjuvant

chemotherapy in breast cancer: is it equally useful across tumor subtypes?.

Surgery 155(5):927-35. doi: 10.1016/j.surg.2014.01.009

18. HORIMOTO Y, ARAKAWA A, TANABE M, et al (2014) Ki67 expression and the effect of neo-adjuvant chemotherapy on luminal HER2-negative breast cancer. BMC Cancer 14:550. doi: 10.1186/1471-2407-14-550

19. TAVASSOELI FA, DEVILEE P (2003) Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. 3rd ed. Lyon: IARC.

20. SINGLETARY SE, ALLRED C, ASHLEY P, et al (2002) Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. J Clin Oncol 20:3628-36. doi: 10.1200/JCO.2002.02.026

21. MAZOUNI C, PEINTINGER F, WAN-KAU S, et al (2007) Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. J Clin Oncol 25(19):2650-55. doi: 10.1200/JCO.2006.08.2271

22. HAMMOND ME, HAYES DF, DOWSETT M, et al (2010) American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Clin Oncol 28(16):2784-95. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6529

23. DOWSETT M, NIELSEN TO, A'HERN R, et al (2008) Assessement of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. Breast 17(4):323-34. doi: 10.1016/j.breast.2008.02.002

24. WOLFF AC, HAMMOND ME, HICKS DG, et al (2013) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American

Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol 31(31):3997-4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984

25. MIDDLETON LP, PRICE KM, PUIG P, et al (2009) Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. Arch Pathol Lab Med 133(5):775-80. doi: 10.1043/1543-2165-133.5.775

26. GOLDBIRSH A, WINER EP, COATES AS, et al (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Ann Oncol. 24(9):2206-23. doi: 10.1093/annonc/mdt303

27. GREINER M, PFEIFFER D, SMITH RD (2000) Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med 45(1-2):23-41. doi: 10.1016/S0167-5877(00)00115-X

28. XU L, LIU YH, YE JM, et al (2010) Relationship between Ki67 expression and tumor response to neoadjuvant chemotherapy with anthracyclines plus taxanes in breast cancer. Zhonghua Wai Ke Za Zhi 48(6):450-3.

29. JONES RL, SALTER J, A'HERN R, et al (2010) Relationship between oestrogen receptor status and proliferation in predicting response and long-term outcome to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. Breast Cancer Res Treat 119(2):315-23. doi: 10.1007/s10549-009-0329-x

30. TAN QX, QIN QH, YANG WP, et al (2014) Prognostic value of Ki67 expression in HR-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol* 7(10):6862-70.
31. BALMATIVOLA D, MARCHIÒ C, MAULE M, et al (2014) Pathological non-response to chemotherapy in a neoadjuvant setting of breast cancer: an inter-institutional study. *Breast Cancer Res Treat* 148(3):511-23. doi: 10.1007/s10549-014-3192-3

4. Conclusões

A expressão de receptores hormonais, Ki67 e HER2 não foi preditora independente de RPC em nossa amostra. A positividade para HER2 aumentou em cinco vezes a probabilidade de RPC na análise não-ajustada, mas seu efeito perdeu significância estatística após ajustes para covariáveis. Tal resultado pode ser explicado pelo pequeno número de casos com RPC em nosso estudo. O Ki67 pré-tratamento foi identificado como preditor independente de RCC.

Entre as características clínicas das pacientes e morfológicas dos tumores, status pré-menopausal (vs pós-menopausadas) e grau histológico III (vs I-II) foram preditoras de RCC.

As pacientes com resposta clínica tumoral completa apresentaram maior probabilidade de serem submetidas a cirurgia conservadora, de forma que os preditores identificados na análise de regressão logística multivariada poderiam ser usados para identificação de pacientes com tumores luminais nas quais se pretende indicar quimioterapia neoadjuvante.

5. Referências

1. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COORDENAÇÃO NACIONAL DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>. Acessado em: 09 de abril de 2015.
2. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COORDENAÇÃO NACIONAL DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. Atlas On-line de mortalidade. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br>. Acessado em: 15 de julho de 2015.
3. PARKIN D.M., BRAY F.I., DEVESA S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 2001; 37(suppl 8):4-66.
4. RIES L., EISNER M., KOSARY C.L., et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2004.
5. BERRY D.A., CRONIN K.A., PLEVRITIS S.K., et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353(17):1784-92.
6. ALLEMANI C., WEIR H.K., CARREIRA H., et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015; 385(9972):977-1010.
7. NEWMAN L.A. Epidemiology of locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2009; 19(4):195-203.

8. GIORDANO S.H. Update on locally advanced breast cancer. *Oncologist*. 2003; 8(6):521-30.
9. THULER L.C.S.; MENDONÇA G.A. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27(11):656-60.
10. BELL D.W. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *J Pathol*. 2010; 220(2):231-43.
11. PEROU C.M., SØRLIE T., EISEN M.B., et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797):747-52.
12. SØRLIE T., PEROU C.M., TIBSHIRANI R., et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(19):10869-74.
13. MAMOUNAS E.P., TANG G., FISHER B., et al. Association between the 21-gene recurrence score assay and risk of locoregional recurrence in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *J Clin Oncol*. 2010; 28(10):1677-83.
14. CAREY L.A.; PEROU C.M.; LIVASY C.A.; DRESSLER L.G.; COWAN D.; CONWAY K.; et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006; 295(21):2492-2502.
15. PETIT A.M., RAK J., HUNG M.C., et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo:

angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol.* 1997; 151(6):1523-30.

16. GIATROMANOLAKI A., KOUKOURAKIS M.I., SIMOPOULOS C., et al. c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1alpha dependent. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(23):7972-7.

17. SLAMON D.J., LEYLAND-JONES B., SHAK S., 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.

18. KAUFMANN M., VON MINCKWITZ G., MAMOUNAS E.P., et al. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19(5):1508-16.

19. ESSERMAN L.J., DEMICHELE A. Accelerated approval for pertuzumab in the neoadjuvant setting: winds of change? *Clin Cancer Res.* 2014; 20(14):3532-6.

20. CAREY L.A., WINER E.P. Defining success in neoadjuvant breast cancer trials. *Lancet.* 2014; 384(9938):115-6.

21. MIEOG J.S., VAN DE VELDE C.J. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; (2):CD005002.

22. VON MINCKWITZ G., UNTCH M., BLOHMER J.U., et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2012; 30(15):1796-1804.

23. CORTAZAR P., ZHANG L., UNTCH K., et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014; 384(9938):164-72.
24. CAREY L.A., WINER E.P. Defining success in neoadjuvant breast cancer trials. *Lancet*. 2014; 384(9938):115-6.
25. FISHER B., BRYANT J., WOLMARK N., et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16(8):2672-85.
26. WOLMARK N., WANG J., MAMOUNAS E., et al. Preoperative Chemotherapy in Patients With Operable Breast Cancer: Nine-Year Results From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001; (30):96-102.
27. BEAR H.D., ANDERSON S., BROWN A., et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*. 2003; 21(22):4165-74.
28. VON MINCKWITZ G., REZAI M., LOIBL S., et al. Capecitabine in addition to anthracycline- and taxane-based neoadjuvant treatment in patients with primary breast cancer: phase III GeparQuattro study. *J Clin Oncol*. 2010; 28(12):2015-23.
29. BEAR H.D., TANG G., RASTOGI P., et al. Bevacizumab added to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366(4):310-20.

30. HUOBER J., VON MINCKWITZ G., DENKERT C., et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 124(1):133-40.
31. RASTOGI P., ANDERSON S.J., BEAR H.D., et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol.* 2008; 26(5):778-85.
32. SINGER C.F., KLINGLMÜLLER F., STRATMANN R., et al. Response prediction to neoadjuvant chemotherapy: comparison between pre-therapeutic gene expression profiles and in vitro chemosensitivity assay. *PLoS One.* 2013; 8(6):e66573.
33. LIN N.U., VANDERPLAS A., HUGHES M.E., et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer.* 2012; 118(22):5463-72.
34. VON MINCKWITZ G., SCHNEEWEISS A., LOIBL S., et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15(7):747-56.
35. SIKOV W.M., BERRY D.A., PEROU C.M., et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic

complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015; 33(1):13-21.

36. PETRELLI F., BORGONOVO K., CABIDDU M., et al. Neoadjuvant chemotherapy and concomitant trastuzumab in breast cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *Anticancer Drugs*. 2011; 22(2):128-35.

37. UNTCH M., FASCHING P.A., KONECNY G.E., et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol*. 2011; 29(25):3351-7.

38. UNTCH M., LOIBL S., BISCHOFF J., et al. Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(2):135-44.

39. BASELGA J., BRADBURY I., EIDTMANN H., et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*. 2012; 379(9816):633-40.

40. GUARNERI V., FRASSOLDATI A., BOTTINI A., et al. Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: results of the randomized phase II CHER-LOB study. *J Clin Oncol*. 2012; 30(16):1989-95.

41. PICCART-GEBHART M.J., HOLMES A.P., BASELGA J., et al. First results from the phase III ALTTO trial (BIG 2-06; NCCTG [Alliance] N063D) comparing

- one year of anti-HER2 therapy with lapatinib alone (L), trastuzumab alone (T), their sequence (T-L), or their combination (T+L) in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer (EBC) [abstract]. *J Clin Oncol*. 2014; 32:LBA4.
42. DEMICHELE A., YEE D., BERRY D.A., et al. The neoadjuvant model is still the future for drug development in breast cancer? *Clin Cancer Res*. 2015; 21(13):2911-5.
43. GIANNI L., PIENKOWSKI T., IM Y.H., et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(1):25-32.
44. SCHNEEWEISS A., CHIA S., HICKISH T., et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol*. 2013; 24(9):2278-84.
45. ESSERMAN L.J., DEMICHELE A., et al. Accelerated approval for pertuzumab in the neoadjuvant setting: winds of change? *Clin Cancer Res*. 2014; 20(14):3632-6.
46. COLLEONI M., VIALE G., ZAHRIEH D., et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(19):6622-8.

47. RING A.E, SMITH I.E., ASHLEY S., et al. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer*. 2004; 91(12):2012-7.
48. GOLDHIRSCH A., WINER E.P., COATES A.S., et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013; 24(9):2206-23.
49. BERRY D.A., CIRINCIONE C., HENDERSON I.C., et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive cancer. *JAMA*. 2006; 295(14):1658-67.
50. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011; 378(9793):771-84.
51. PREECE P.E., WOOD R.A., MACKIE C.R., et al. Tamoxifen as initial sole treatment of localised breast cancer in elderly women: a pilot study. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982; 284(6319):869-70.
52. BERGMAN L., VAN DONGEN J.A., VAN OOIJEN B., et al. Should tamoxifen be a primary treatment choice for elderly breast cancer patients with locoregional disease? *Breast Cancer Res Treat*. 1995; 34(1):77-83.
53. CHAKRABARTI J., KENNY F.S., SYED B.M., et al. A randomised trial of mastectomy only versus tamoxifen for treating elderly patients with operable

primary breast cancer-final results at 20-year follow-up. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011; 78(3):260-4.

54. HIND D., WYLD L., BEVERLEY C.B., REED M.W. Surgery versus primary endocrine therapy for operable primary breast cancer in elderly women (70 years plus). *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; (1):CD004272.

55. SEO J.H., KIM Y.H., KIM J.S. Meta-analysis of pre-operative aromatase inhibitor versus tamoxifen in postmenopausal woman with hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 63(2):261-6.

56. SEMIGLAZOV V.F., SEMIGLAZOV V.V., DASHYAN G.A., et al. Phase 2 randomized trial of primary endocrine therapy versus chemotherapy in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer*. 2007; 110(2):244-54.

57. ALBA E., CALVO L., ALBANELL J., et al. Chemotherapy (CT) and hormonotherapy (HT) as neoadjuvant treatment in luminal breast cancer patients: results from the GEICAM/2006-03, a multicenter, randomized, phase-II study. *Ann Oncol*. 2012; 23(12):3069-74.

58. YERUSHALMI R., WOODS R., RAVDIN P.M., et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010; 11(2):174-83.

59. HU Z., FAN C., OH D.S., et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006; 7:96.

60. PEROU C.M., JEFFREY S.S., VAN DE RIJN M., 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.

61. DOWSETT M., NIELSEN T.O., A'HERN R., et al. Assessement of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *Breast*. 2008; 17(4):323-34.
62. STUART-HARRIS R., CALDAS C., PINDER S.E., PHAROAH P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a sistematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008; 17(4):323-34.
63. DE AZAMBUJA E., CARDOSO F., DE CASTRO G. JR, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007; 96(10):1504-13.
64. POLLEY M.Y., LEUNG S.C., MCSHANE L.M., et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(24):1897-906.
65. HARRIS L., FRITSCHÉ H., MENNEL R., et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(33):5287-312.
66. BONNEFOI H., DIEBOLD-BERGER S., THERASSE P., et al. Locally advanced/inflammatory breast cancers treated with intensive epirubicin-based neoadjuvant chemotherapy: are there molecular markers in the primary tumour that predict for 5-year clinical outcome? *Ann Oncol*. 2003; 14(3):406-13.
67. PENAULT-LLORCA F., ANDRÉ F., SAGAN C., et al. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27(17):2809-15.

68. MOTTOLESE M., BENEVOLO M., DEL MONTE G., 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.
69. VIALE G., REGAN M.M., MASTROPASQUA M.G., et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(3):207-12.
70. MICHALIDES R., VAN TINTEREN H., BALKENENDE A., 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.
71. VIALE G., GIOBBIE-HURDER A., REGAN M.M., et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol.* 2008; 26(34):5569-75.
72. MACGROGAN G., MAURIAC L., DURAND M., et al. Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erbB-2, MiB1, pS2 and GST pi. *Br J Cancer.* 1996; 74(9):1458-65.
73. BOTTINI A., BERRUTI A., BRIZZI M.P., et al. Cytotoxic and antiproliferative activity of the single agent epirubicin versus epirubicin plus tamoxifen as primary chemotherapy in human breast cancer: a single-institution phase III trial. *Endocr Relat Cancer.* 2005; 12(2):383-92.

74. GENERALI D., BUFFA F.M., BERRUTI A., et al. Phosphorylated ERalpha, HIF-1alpha, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27(2):227-34.
75. VON MINCKWITZ G., SINN H.P., RAAB G., et al. Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(2):R30.
76. LUPORSI E., ANDRÉ F., SPYRATOS F., et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 132(3):895-91.
77. CHEANG M.C.U., CHIA S.K., VODUC D., et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(10):736-50.
78. TAMAKI K., ISHIDA T., TAMAKI N., et al. Analysis of clinically relevant values of Ki67 labeling index in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer.* 2014; 21(3):325-33.
79. SUETA A., YAMAMOTO Y., HAYASHI M., et al. Clinical significance of pretherapeutic Ki67 as a predictive parameter for response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: is it equally useful across tumor subtypes?. *Surgery.* 2014; 155(5):927-35.

80. HORIMOTO Y., ARAKAWA A., TANABE M., et al. Ki67 expression and the effect of neo-adjuvant chemotherapy on luminal HER2-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2014; 14:550.
81. FASCHING P.A., HEUSINGER K., HAEBERLE L., et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011; 11:486.
82. BALMATIVOLA D., MARCHIÒ C., MAULE M., et al. Pathological non-response to chemotherapy in a neoadjuvant setting of breast cancer: an inter-institutional study. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 148(3):511-23.
83. JONES R.L., SALTER J., A'HERN R., et al. Relationship between oestrogen receptor status and proliferation in predicting response and long-term outcome to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 119(2):315-23.
84. TAN Q.X., QIN Q.H., YANG W.P., et al. Prognostic value of Ki67 expression in HR-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(10):6862-70.
85. YOSHIOKA T., HOSODA M., YAMAMOTO M., et al. Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer*. 2015; 22(2):185-91.
86. DENKERT C., LOIBL S., MÜLLER B.M., et al. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol*. 2013; 24(11):2786-93.

87. ASSERSOHN L., SALTER J., POWLES T.J., et al. Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 82(2):113-23.
88. JONES R.L., SALTER J., A'HERN R., et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 116(1):53-68.
89. SHERI A., SMITH I.E., JOHNSTON S.R., et al. Residual proliferative cancer burden to predict long-term outcome following neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol.* 2015; 26(1):75-80.
90. OHNO S., CHOW L.W., SATO N., et al. Randomized trial of preoperative docetaxel with or without capecitabine after 4 cycles of 5-fluoruracil-epirubicin-cyclophosphamide (FEC) in early-stage breast cancer: exploratory analyses identify Ki67 as a predictive biomarker for response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 142(1):69-80.
91. TANEI T., SHIMOMURA A., SHUMAZU K., et al. Prognostic significance of Ki67 index after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2011; 37(2):155-61.
92. VON MINCKWITZ G., SCHMITT W.D., LOIBL S., et al. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(16):4521-31.

6. Apêndice - Ficha clínica para coleta de dados

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - PÓS-GRADUAÇÃO EM TOCGINECOLOGIA

Estudo: Avaliação da expressão e dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante no Ki67 em
carcinomas mamários de fenótipo luminal e sua correlação com a resposta ao tratamento

ID: _____ HC: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos

Data do Diagnóstico Histológico: ____/____/____

Status Menopausal: ☐ pré ☐ pós

Número da Biopsia: Core: _____ Peça: _____

Número do Bloco: Core: _____ Peça: _____

1. Tipo Histológico

☐ 1. Carcinoma Ductal Invasor ☐ 2. Carcinoma Lobular Invasor ☐ 3. Carcinoma
Misto ☐ 4. Histologia Especial

2. Grau Histológico Pré-Quimioterapia

☐ 1. I ☐ 2. II ☐ 3. III

3. Estádio Clínico T

☐ 1. T1 ☐ 2. T2 ☐ 3. T3 ☐ T4a ☐ T4b
☐ T4c ☐ T4d

4. Estádio Clínico N

☐ 1. N0 ☐ 2. N1 ☐ 3. N2 ☐ 4. N3

5. Agrupamento Prognóstico

☐ 1. IA ☐ 2. IB ☐ 3. IIA ☐ 4. IIB ☐ 5. IIIA ☐ 6. IIIB ☐ 7. IIIC
☐ 8. IV

6. Expressão de Receptores Hormonais - RH_____

6.1. Estrogênio: ☐ 1. Positivo Porcentagem:____ Intensidade: ☐ 1. fraco ☐ 2. moderado ☐ 3. forte
☐ 2. Negativo

6.2. Progesterona: ☐ 1. Positivo Porcentagem:____ Intensidade: ☐ 1. fraco ☐ 2. moderado ☐ 3. forte
☐ 2. Negativo

7. Expressão de HER2/neu - I_____

7.1. Imuno-Histoquímica: ☐ 1. 1+ ☐ 2. 2+ ☐ 3. 3+

7.2. FISH: ☐ 1. Amplificado ☐ 2. Não-Amplificado ☐ 3. Não Realizado

8. Expressão de Ki67 Pré-Quimioterapia

Porcentagem:_____

9. Quimioterapia Neoadjuvante

☐ 1. AC-T ☐ 2. Antraciclina ☐ 3. Taxano ☐ 4. Trastuzumabe

Número de ciclos – AC:_____ Taxano:_____

10. Resposta Clínica na Mama

☐ 1. Resposta Clínica Parcial

☐ 2. Resposta Clínica Completa

☐ 3. Doença Estável

☐ 4. Progressão

11. Resposta Clínica Linfonodal

|___| 1. Resposta Clínica Parcial

|___| 2. Resposta Clínica Completa

|___| 3. Doença Estável

|___| 4. Progressão

12. Abordagem Cirúrgica na Mama

|___| 1. Mastectomia

|___| 2. Cirurgia Conservadora

13. Abordagem Axilar

|___| 1. Linfonodo Sentinela

|___| 2. Esvaziamento Axilar

14. Resposta Patológica

|___| 1. Resposta Parcial

|___| 2. Resposta Completa

Resposta Mama: _____

Resposta Linfonodos: _____

RCB: _____

15. Expressão de Ki67 Pós-Quimioterapia

I _____

Porcentagem: _____

Data do Preenchimento:

Assinatura:

7. Anexo - Parecer CEP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 15/12/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1246/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0967.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EXPRESSÃO DA COX-2 E DA P53 NOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA E AVALIAÇÃO DE SEU VALOR COMO FATOR PREDITIVO E PROGNÓSTICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Kátia Piton Serra

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 14/12/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 15/12/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Correlacionar os subtipos moleculares de carcinoma ductal invasivo de mama com a expressão da COX-2 e da p53 e avaliar seu valor preditivo e prognóstico.

III - SUMÁRIO

Serão analisados 261 casos de mulheres com carcinoma ductal invasivo de mama, incluídos os blocos de parafina e preparadas lâminas de Tissue Microarray (TMA). A avaliação da expressão da COX-2 p53, e os marcadores que definem e classificam os subtipos moleculares de câncer de mama será realizada por imunohistoquímica e FISH. Análise estatística: Os dados serão analisados descritivamente por meio de frequência absoluta (n) e relativas (%), médias, desvio-padrão, mediana, primeiro e terceiro quartis, valores mínimos e máximos. O teste qui-quadrado de Pearson e exato de Fisher serão utilizados para avaliar a homogeneidade entre os grupos e as variáveis categóricas; serão empregados os testes t de Student ou Anova para as variáveis contínuas. Para avaliar o tempo de sobrevida serão construídas curvas de sobrevida usando o método Kaplan-Meier. O nível de significância adotada será de 5% e o software utilizado para análise o SAS.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo, com análise de material anátomo-patológico no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM/UNICAMP. O projeto apresenta-se bem redigido, com metodologia adequada. Os critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos estão bem definidos; cálculo do tamanho amostral e análise estatística estão bem embasados por cálculos estatísticos. Os aspectos éticos estão bem discutidos no corpo do projeto e será solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O orçamento é detalhado.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de dezembro de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP