



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

SUSANNE CROCAMO VENTILARI DA COSTA

Avaliação do tratamento com ácido **Zoledrônico** Neoadjuvante associado ao esquema baseado em **Antraciclina** seguido de **Taxane**, em Pacientes com câncer de mama localmente avançado. **Zo-NAnTax.**

Orientadora: Prof. Dra Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

**RIO DE JANEIRO
2018**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

SUSANNE CROCAMO VENTILARI DA COSTA

Avaliação do tratamento com ácido **Zoledrônico** Neoadjuvante associado ao esquema baseado em **Antraciclina** seguido de **Taxane**, em Pacientes com câncer de mama localmente avançado. **Zo-NAnTax.**

Apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Orientadora: Prof. Dra Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

**RIO DE JANEIRO
2018**

C837a Costa, Susane Crocamo Ventilari da.

Avaliação do tratamento com ácido zoledrônico neoadjuvante associado ao esquema baseado em antraciclina seguido de taxane, em pacientes com câncer de mama localmente avançado- zonantax./ Susane Crocamo Ventilari da Costa. - Rio de Janeiro: INCA, 2018.

166f.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia) - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.

Orientadora: Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay.

1. Neoplasia Mamária. 2. Tratamento Neoadjuvante. 3. HER2-positivo. 4. Ácido Zoledrônico. I. Abdelhay, Eliana Saul Furquim Werneck (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99449



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

SUSANNE CROCAMO VENTILARI DA COSTA

Avaliação do tratamento com ácido **Zoledrônico** Neoadjuvante associado ao esquema baseado em **Antraciclina** seguido de **Taxane**, em Pacientes com câncer de mama localmente avançado. **Zo-NAnTax**.

ORIENTADORA: Prof. Dra Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Aprovada em: 26/02/2018.

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Denise Pires de Carvalho

Prof. Dra. Carolina Panis

Prof. Dra. Liz Maria de Almeida

Prof Dr. Miguel Angelo M. Moreira

Prof. Dr. Daniel Bulzico – Suplente I

Prof. Dr. Gabriela Nestal de Moraes – Suplente II

RIO DE JANEIRO

2018

Dedico esta tese à Cibele Isaias Crocamo, minha amada mãe, amiga, Mestra e companheira incondicional de todos os momentos; luz da minha vida. Obrigada! Sem você este sonho não poderia ter sido alcançado.

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe Cibele Isaias Crocamo, pelo seu carinho, pela confiança e incentivo. Pelas lições de sabedoria, de amor, de paciência e de perseverança. Por estar sempre ao meu lado.

Ao meu querido padrasto José Carlos Muniz Brasil, por sua amizade incondicional, pelo carinho, pelo incentivo e por procurar resolver problemas do cotidiano, minimizando meus *stresses* e aborrecimentos para que eu estivesse focada na minha tese.

Ao meu querido marido Luiz Cerqueira da Costa, pelo carinho, por se tornar o “mestre cuca da casa” e pela compreensão dos muitos momentos em que eu tive que me ausentar para que este sonho pudesse se realizar.

Ao meu amado filho Pedro Crocamo Ventilari da Costa, pelo seu carinho, por sua energia positiva e por ele demonstrar uma cumplicidade incondicional.

À minha amada Escola e aos Mestres presentes nela, pelo carinho, incentivo e força para que fosse possível trilhar nesta árdua estrada do conhecimento.

À minha querida orientadora Dra Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay pela confiança, pela amizade construída, pela atenção, pela forma com que ensina e se dedica aos seus alunos, por me apresentar novos caminhos na biologia molecular, que podem ser aliados aos caminhos clínicos dentro da oncologia e pelas conversas estimulantes, onde o raciocínio científico me fez alcançar momentos de pura felicidade.

Ao Dr Carlos Gil pela confiança no meu ideal e assim ter iniciado a minha jornada como sua orientanda.

Aos Drs José Bines, Gilberto Amorim e Rodrigo Moura, meus chefes da Oncologia Clínica do INCA-HCIII durante essa trajetória, que me apoiaram desde o início embrionário desse sonho, quando eu só fazia matérias como ouvinte, até a sua efetiva concretização com a conclusão do Doutorado.

À querida Dra Marisa Dreyer Breitenbach, pela amizade, pelo apoio, carinho e incentivo, fundamentais para o meu ingresso na Pós-graduação e para esta nova etapa que venho construindo na Pesquisa Clínica.

À querida Dra Liz Almeida pelo carinho e apoio ao meu ingresso na Pós-Graduação.

À querida Roberta Sarmento enfermeira coordenadora de pesquisa que cuidou e coordenou o andamento de todos os processos do estudo que deu origem a minha tese, com carinho, amizade, respeito, dedicação e competência.

Aos meus queridos enfermeiros coordenadores de pesquisa, Alexandre do Carmo, Manuela Vasques, Renata Obadia e Shalom Rodrigues dos Santos, pela amizade, respeito e por toda vez que se fez necessário terem cuidado de forma dedicada e amorosa do andamento de todos os processos do estudo que deu origem a minha tese.

À querida Nilzilene Lopes, por seu cuidado com os processos regulatórios e administrativos do estudo, pelo carinho, respeito, amizade e pela companhia nos dias em que ficamos trabalhando até tarde, no HCIII.

À querida Sandra que manteve em ordem as consultas, exames e atendimento das pacientes, com esmero e atenção.

Aos Drs Bruno Fuser, Rafael Jacob, Cláudia e Fernanda Elias por estarmos juntos no atendimento e discussões da evolução das pacientes e comigo terem abraçado esse estudo de forma atenciosa e carinhosa.

Aos queridos Dra Sandra Gioia e Dr Pedro Maroun que foram fundamentais para a completude desse estudo, em relação ao tempo ótimo de cirurgia das pacientes.

À querida Pamela Moutinho, pelos cuidados e atenção com as amostras coletadas.

Aos médicos residentes de Oncologia Clínica do primeiro ano (Rs1) de 2014 e 2015, que com dedicação, atenção, respeito e carinho me auxiliaram na triagem e oferecimento às pacientes a possibilidade de participarem desse estudo.

À Dra Renata Binato, pelo seu carinho, por sua amizade, sua inestimável colaboração, me ajudando, não importando onde e nem quando (até nas suas férias na Disney), por me mostrar os “mistérios” da expressão gênica e sua análise de maneira simples e amigável.

Às Dra_s Lídia Maria e Giselle Maria Vignal, pela amizade, pelo carinho, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelos domingos inteiros que passamos no DIPAT vendo e revendo as lâminas de imunohistoquímica.

Às Dras Vivianne Aguilera Freitas, Karuline Catein pelo carinho, por terem comungado comigo este sonho e bravamente temos chegado ao final apesar de todas as dificuldades que tivemos que superar.

À Dra Maria Theresa Accioly, por sua prestimosa e fundamental colaboração com o projeto, por conseguir fazer a “multiplicação dos anticorpos”.

À querida Andréia Pires Dantas, gestora da Pós-graduação que compreendia a correria da minha vida e com carinho e atenção sempre procurou me ajudar.

Aos queridos Danielle Cristina e Rodrigo Mafra, assistentes da Pós-graduação por estarem sempre prontos a me auxiliarem nos processos da Pós.

À querida Isabele Small pelo carinho, amizade e por juntas nos debruçarmos, em várias noites, para análise dos dados clínicos desse estudo.

À Camila Burgo e Rafael Cohen, por terem realizado a monitoria desse estudo de forma imparcial e dedicada para autenticar os dados e resultados e, para atestar suas conformidades com o GCP.

Ao Carlos Augusto de Sousa e à Isabel Cristina da Nóbrega, da ARPC, que foram preciosos na reta final, para a análise estatística resguardando o banco de dados.

A todos os meus queridos amigos que de forma direta ou indireta me apoiaram e me incentivaram, em toda essa minha trajetória.

A todos os profissionais do INCA e em especial aos do HCIII, que colaboraram de forma preciosa para o êxito e conclusão da minha tese.

Às minhas queridas pacientes, motivo de todo o meu esforço e dedicação, que entenderam e aceitaram participar dessa proposta de estudo para a produção de conhecimento, vislumbrando a possibilidade de colaborarem para um bem maior.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão para existir. Como não ficar assombrado quando se contempla os mistérios da eternidade, da vida, da estrutura maravilhosa da realidade? É bastante se tentarmos meramente compreender um pouco deste mistério a cada dia. Nunca perca a sagrada curiosidade... Não pare de se maravilhar.”

Albert Einstein

(1879 - 1955)



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

Avaliação do tratamento com ácido **Zoledrônico** Neoadjuvante associado ao esquema baseado em **Antraciclina** seguido de **Taxane**, em pacientes com câncer de mama localmente avançado. **Zo-NAnTax**.

RESUMO

Susanne Crocamo Ventilari da Costa

Apesar dos grandes avanços tecnológicos, o câncer de mama continua a ser um grande problema de saúde pública. É fundamental a individualização terapêutica através do melhor conhecimento do mecanismo de ação e do sinergismo de novas drogas ou de drogas já conhecidas que possam representar impacto em ganho de sobrevida, com menor toxicidade e menor custo. Por isso desenvolvemos este projeto translacional com o objetivo primário de avaliarmos a eficácia da terapêutica neoadjuvante de quatro ciclos de antraciclina / ciclofosfamida (AC) seguido por quatro ciclos de docetaxel com trastuzumabe associando ao ácido zoledrônico, em pacientes com câncer de mama estágio IIA a IIIB com receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) positivo, através da mensuração da taxa de resposta patológica completa (pRC) ao tratamento. Secundariamente avaliamos a segurança, a associação da taxa de pRC com o perfil molecular por imunohistoquímica, com a expressão gênica diferencial dos tumores, com a alteração da adesividade e o *compliance* ao tratamento. 60 pacientes incluídas seguindo os critérios do protocolo receberam o tratamento proposto e foram avaliadas quanto a segurança e o *compliance*, 58 destas realizaram subsequentemente cirurgia da mama e integraram a análise exploratória da associação de fatores clínicos, histopatológicos e moleculares com a taxa de pRC. Quando não houve resposta patológica completa, a quantificação do índice da doença residual (DR) foi realizada através da calculadora validada do *MD Anderson Cancer Center* e classificada em: RCB (carga de câncer residual) 0 (pRC), I (doença residual mínima), II (doença residual moderada) e III (doença residual extensa). Vinte e quatro pacientes (42%) das 58 elegíveis para avaliação de eficácia alcançaram pRC (RCB 0), sendo a mediana de idade de 54 anos e a do tamanho do tumor de 61mm. A maioria das pacientes tiveram eventos adversos (EA) graus 1 e 2 (náuseas, 76%; mialgia 73%). Os EAs grau 3 mais frequentes foram a neutropenia febril (20%; 12 pacientes) e a diarreia (12%; 07 pacientes) e o grau 4 foi neutropenia febril (3%, 2 pacientes). Não houveram EAs grau 3 ou 4 relacionados ao ácido zoledrônico. Menor taxa de *compliance* foi devido ao docetaxel (86%). Elevado Ki67 e expressão em núcleo/citoplasma de β -catenina foram associados com maiores taxas de pRC. Análises moleculares por microarranjos comparando amostras ao diagnóstico de pacientes com pRC ou não, mostrou genes diferencialmente expressos envolvidos na sinalização P13K/PKC (proliferação celular), Notch1 (célula tronco) e resposta imune inata (HLAB). Estes dados sugerem que alguns destes processos podem ser utilizados como biomarcadores de resposta ao esquema terapêutico proposto. Desta forma concluímos que a combinação de tratamento neoadjuvante com ácido zoledrônico e quimioterapia com base em antraciclina, taxano e trastuzumabe em pacientes com câncer de mama estágio IIA a IIIB HER2 positivo resultou em altas taxas de pRC (42%) com boa tolerância sem aumentar a toxicidade à quimioterapia.

Palavras Chaves: Câncer de mama, tratamento neoadjuvante, HER2-positivo, ácido zoledrônico



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

Evolution of acid **Zoledronic** in Neoadjuvant treatment combined with chemotherapy based in **Anthracycline** followed by **Taxane** in locally advanced breast cancer. **Zo-NAnTax.**

ABSTRACT

Susanne Crocamo Ventilari da Costa

Despite major technological advances, breast cancer remains a major public health problem. It is fundamental to therapeutic individualization through better knowledge of the mechanism of action and the synergism of new drugs or drugs already known that may have an impact on survival gain, with lower toxicity and less cost. Therefore we developed this translational project with the primary end point evaluating the efficacy of neoadjuvant therapy of four cycles of anthracycline / cyclophosphamide (AC) followed by four cycles of docetaxel with trastuzumab associated with zoledronic acid in patients with stage IIA to IIIB breast cancer with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive, by measuring the complete pathological response rate (pRC) to the treatment. The secondary end points included were the possible associations between pRC, clinico variables, molecular profile by immunohistochemistry, the differential gene expression of the tumors, the change of adhesiveness, safety and compliance with the study treatment. Sixty patients included in the protocol were treated with the proposed treatment and were evaluated for safety and compliance. Fifty-eight patients underwent subsequent breast surgery and integrated the exploratory analysis of the association of clinical, histopathological and molecular factors with the pRC rate. When there was no complete pathological response, the residual disease index (DR) was quantified using the validated MD Anderson Cancer Center calculator and classified as: RCB (residual cancer burden) 0 (pRC), I (minimal residual disease), II (moderate residual disease) and III (extensive residual disease). Twenty-four patients (42%) out of 58 eligible for efficacy assessment achieved pRC (RCB 0), the median age being 54 years and the tumor size 61mm. Most patients had adverse events (AE) grade 1 and 2 (nausea, 76%, myalgia 73%). The most frequent grade 3 AEs were febrile neutropenia (20%, 12 patients) and diarrhea (12%, 07 patients) and grade 4 was febrile neutropenia (3%, 2 patients). There were no grade 3 or 4 AEs related to zoledronic acid. Lower compliance rate was due to docetaxel (86%). High Ki67 and nuclei / cytoplasmic expression of β -catenin were associated with higher pRC rates. Molecular analyzes by microarrays comparing samples at the diagnosis of patients with pRC or not, showed differentially expressed genes involved in the signaling P13K / PKC (cell proliferation), Notch1 (stem cell) and innate immune response (HLAB). These data suggest that some of these processes can be used as biomarkers of response to the proposed therapeutic scheme. We concluded that the combination of neoadjuvant treatment with zoledronic acid and chemotherapy based on anthracycline, taxane and trastuzumab in patients with stage IIA to IIIB HER2 positive breast cancer resulted in high rates of pRC (42%) with good tolerance without increasing toxicity to chemotherapy.

Keywords: Breast cancer, neoadjuvant treatment, HER2-positive, zoledronic acid

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Classificação histológica dos tumores de mama, <i>WHO</i> 2012.....	36
Tabela 1.2 - Descrição do TNM para o estadiamento do câncer de mama.....	38
Tabela 1.3 - Estadiamento do câncer de mama pelo TNM.....	39
Tabela 1.4 - Relação entre o subtipo molecular do câncer de mama e o padrão de imunomarcção.....	45
Tabela 4.1 - Características basais e demográficas de todas as pacientes tratadas sistemicamente.....	75
Tabela 4.2 - Características histopatológicas e de imunohistoquímica basais de todas as pacientes tratadas sistemicamente.....	76
Tabela 4.3 - Distribuição das pacientes segundo marcadores moleculares de prognóstico na biópsia da mama, pré-tratamento neoadjuvante.....	78
Tabela 4.4 - Distribuição das pacientes segundo resultados da resposta patológica.....	79
Tabela 4.5 - Associação entre resposta patológica completa (RCB 0) e características clinicopatológicas basais.....	80
Tabela 4.6 - Distribuição das pacientes segundo a ocorrência dos eventos adversos.....	81
Tabela 4.7 - Taxa de <i>compliance</i> distribuída pelo tipo de medicamento utilizado no regime de quimioterapia neoadjuvante.....	82
Tabela 4.8 - Tratamento cirúrgico realizado após a neoadjuvância.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Padrão da expressão gênica de 85 amostras de tecido mamário.....	43
Figura 1.2 - Família dos Receptores do Fator de crescimento epidérmico humano (HER) e a cascata de transdução de sinal via ativação de HER2.....	48
Figura 1.3 - Bloqueio extracelular do HER2.....	51
Figura 1.4 - Modelos da estrutura do ácido zoledrônico.....	55
Figura 1.5 - Via do mevalonato.....	56
Figura 3.1 - Esquema do tratamento investigacional proposto.....	63
Figura 3.2 - Calculadora para avaliação da doença residual mínima (DRM),.....	69
Figura 4.1 - Diagrama de Fluxo das pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	74
Figura 4.2 - Exemplo do diagnóstico patológico de CDI de mama por H&E e dos marcadores moleculares de prognóstico por imunohistoquímica de pacientes do estudo.....	77
Figura 4.3 - Distribuição numérica dos genes diferencialmente expressos.....	83
Figura 4.4 - Apresentação em forma de <i>clusters</i> dos 267 genes diferencialmente expressos.....	83
Figura 4.5 - Apresentação em forma de <i>clusters</i> dos 182 genes diferencialmente expressos.....	85
Figuras	
4.6 a 4.9 - Vias de sinalização encontradas na análise <i>in silico</i>	87-90
Figura 4.10 - Principais processos relacionados com os genes diferencialmente expressos.....	90
Figura 4.11 - Vias de interação entre os genes encontrados diferencialmente.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCSG	Grupo austríaco de estudos sobre câncer de mama e colorretal; do inglês: Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group
aC	antes de Cristo
AC	Doxorrubicina + Ciclofosfamida
AJCC	Comitê Conjunto Americano de Câncer; do inglês: American Joint Committee on Cancer
Akt	Proteína quinase B; do inglês: Protein Kinase B
Anti PD-L1	Anticorpo anti-ligante da morte programada1; do inglês: Anticorpo anti programmed death-ligand 1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AppI	Éster de ácido trifosfórico 1-adenosina-5-il éster 3-(3-metilbut-3-enil)
ARPC/INCA	Área Representativa de Pesquisa Clínica/INCA
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica; do inglês: American Society of Clinical Oncology
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada; do inglês: Ataxia-telangiectasia mutated
BCI	Índice de câncer de mama; do inglês: Breast Cancer Index
Beta-HCG	Gonadotrofina coriônica humana – fração Beta
BF	Bifosfonato
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas; do inglês: Bone morphogenetic proteins
BOOG	Grupo Holandês de Estudos do Câncer de Mama; do inglês: A Dutch Breast Cancer Trialists' Group
BRCA1	Gene humano do câncer de mama 1; do inglês: Human Breast Cancer gene 1
BRCA2	Gene humano do câncer de mama 2; do inglês: Human Breast Cancer gene 2
NSABP	Grupo B de câncer e leucemia, do inglês: Cancer and Leukemia Group B
CAR	Receptor de antígeno quimérico, do inglês: Chimeric Antigen Receptor
c-Fos	Proto-oncogene nuclear c-Fos
CDH1	Caderina 1; do inglês: Cadherin 1
CDI	Carcinoma Ductal Infiltrante
CDK	Inibidores de quinases dependênes de ciclina; do inglês: Cyclin-

	Dependent Kinase Inhibitors
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHEK2	Gene humano de ponto de verificação quinase 2; do inglês: Human gene Checkpoint kinase 2
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTC	Células Tumorais Circulantes
CTLA-4	Proteína Associada aos Linfócitos T Citotóxicos-4, do inglês: Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein-4
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindole; do inglês: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DELTA	Receptores proteicos transmembrana ligantes do receptor NOTCH
DNA	Ácido desoxirribonucleico; do inglês: deoxyribonucleic acid
DOC	Docetaxel
DR	Doença Residual
EA	Evento Adverso
EAS	Evento Adverso Sério
ECD	Domínio extracelular solúvel; do inglês: soluble extracellular domain
ECOG	Grupo cooperativo de oncologia da Europa oriental; do inglês: Eastern Cooperative Oncology Group
eCRF	Formulário de relatório de caso eletrônico; do inglês: Electronic Case Report Form
EP	EndoPredict
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos; em inglês: Food and Drug Administration
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FPP	Farnesil pirofosfato
FPPS	Farnesil pirofosfato sintetase
FSH	Hormônio Folículo Estimulante; do inglês: Follicle stimulating hormone
GCP	Boas Práticas Clínicas; do inglês: Good Clinical Practices
GE	General Electric
GEICAM	Grupo Espanhol de investigação em câncer de mama; do espanhol: Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
GLI2	Zinc finger protein
Globocan	Portal da web para pesquisa internacional do cancer, do inglês: Web

H&E	Hematoxilina-Eosina
HER1	Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico humano; do inglês: Human epidermal growth factor receptor type 1
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; do inglês: Human epidermal growth factor receptor type 2
HER2/neu	Gene humano do Fator de crescimento epidérmico Receptor tipo 2; do inglês: Human gene Epidermal growth factor Receptor-type 2
HER3	Receptor tipo 3 do fator de crescimento epidérmico humano; do inglês: Human epidermal growth factor receptor type 3
HER4	Receptor tipo 4 do fator de crescimento epidérmico humano; do inglês: Human epidermal growth factor receptor type 4
HLA B	Antígeno leucocitário humano classe I, B; do inglês: Human Leukocyte antigen class I, B
HMG-CoA	3-hidroxi-3-methyl-glutaril coenzima A
IA	Inibidor da Aromatase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPP	Isoprenóide difofostato
JAGGED	Família de proteínas de superfície que interagem com NOTCH
JONIE	Organização Japonesa de Especialistas em tratamentos Neoadjuvantes Inovadores; do inglês: Japanese Organization of Specialists in Innovative Neoadjuvant Treatments
Ki67	Antígeno presente no núcleo das células na interfase, marcador de proliferação celular, sendo o nome derivado da cidade de origem (Kiel, Alemanha) e do número do clone original na placa de 96 poços
Ki67/MIB-1	Anticorpo monoclonal que se liga ao antígeno Ki67
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	Hormônio Luteinizante; do inglês: Luteinizing Hormone
LHRH	Hormônio de liberação do hormônio luteinizante; do inglês: Luteinizing Hormone–Releasing Hormone
LNS	Linfonodo sentinela
LOH	Perda de heterozigose; do inglês: Loss of heterozygosity
Mamma Print	Ensaio genômico de câncer de Mama de 70-Genes
MAPK	Proteínas-quinases ativadas por mitógenos

MEK	Família de Proteínas Quinases específicas
MET/hora	Equivalente Metabólico da Tarefa/hora
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos; do inglês: Mammalian target of rapamycin
NAC	Quimioterapia Neoadjuvante; do inglês: Neoadjuvant Chemotherapy
N-BF	Bifosfonato contendo nitrogênio
NOS	Não especificado; do inglês not otherwise specified
Receptor NOTCH	Receptor transmembrana de passagem única
NSABP	Projeto nacional de tratamento cirúrgico adjuvante de câncer de mama e colon; do inglês: Adjuvant e Bowel National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
OMS	Organização Mundial da Saúde
Oncotype DX/mama	Ensaio genômico de câncer de mama de 21-genes
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PAI-1	Inibidor tipo 1 do ativador de plasminogenio; do inglês: Plasminogen activator inhibitor-1
PAM50	Ensaio de Assinatura de Gene de Prognóstico do Câncer de Mama Prosigna
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase; do inglês: Poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	Reação em cadeia da polimerase; do inglês: Polymerase chain reaction
PD-1	Proteína de morte programada 1; do inglês: Programmed cell death protein 1
PDGF A	Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade A; do inglês: Platelet-derived growth fator subunit A
PD-L1	Ligante da proteína de morte programada 1; do inglês: Programmed cell death-ligand protein 1
PKC	Proteína quinase C; do inglês: Protein kinase C
PET-CT	Tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada; do inglês: Positron Emission Tomography - Computed Tomography
PGM	Maquina de análise personalizada do genoma; do inglês: Personalized Genome Machine
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase / fosfatidilinositol-3-quinase; do inglês: Phosphatidylinositol 3-kinase / fosfatidilinositol-3-quinase
pRC	Resposta Patológica Completa; do inglês: Pathological Complete Response

OS	Estatus de Desempenho; do inglês: Performance Status
PTEN	Fosfatase tensina homóloga; do inglês: Phosphatase and tensin homolog
Rac	Proteína da subfamília de Rho
Raf	Fibrosarcoma Rapidamente Acelerado; do inglês: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Ras	Sarcoma de rato; do inglês: Rat sarcoma
RCB	Carga de Câncer Residual; do inglês Residual Câncer Burden
RE	Receptor de Estrogênio
RH	Receptores Hormonais
Rho	Proteína hexamérica da subfamília de Ras
RNA	Ácido Ribonucléico; do inglês: Ribonucleic acid
RNeasy Mini Kit	Purificação rápida de alta qualidade de RNA a partir de células; do inglês: Fast Purification of High-Quality RNA from cells
RP	Receptor de Progesterona
RS/ROR	Escore de recorrência / Escore do risco de recorrência; do inglês: Recurrence score / Risk of recurrence score
SCAP	Proteína ativadora de clivagem SREBP; do inglês: SREBP cleavage activating protein
SHH	Sonic hedgehog
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLUG	Zinc finger transcriptional repressor
SPSS	Pacote estatístico para ciências sociais; do inglês: Statistical Package for the Social Sciences
SOS	Homólogo de mamífero do gene son of sevenless de drosófila; do inglês: Mammalian homologue of the son of sevenless
SER	Elemento Regulatório de Esterol; do inglês: Element-Binding Protein
SREBP	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol; do inglês: Sterol Regulatory Element-Binding Protein
SSC	Solução de Citrato de Sódio Salino
STK11	Serina/Treonina quinase 11; do inglês: Serine/threonine kinase 11
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta; do inglês: Transforming growth factor beta

TIE2	Receptor de superfície que se liga e é ativado por angiopoetinas
TIL	Linfócitos infiltrantes de tumores; do inglês: Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TIMP	Inibidor de metaloprotease; do inglês: Inhibitor of metalloprotease
TNM	Classificação de Tumores Malignos – Tumor, Nodo, Metástase
TP53	Gene que codifica a fosfoproteína p53; do inglês: Gene encoding p53 phosphoprotein
TransATAC	Subestudo translacional de Arimidex, Tamoxifeno, sozinho ou em combinação; do inglês: Translational substudy of Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
uPA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase; do inglês: urokinase-type Plasminogen Activator
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular; do inglês: Vascular Endothelial Growth Factor
WHI	Iniciativa Saúde da Mulher; do inglês: Women's Health Initiative
WHO	Organização Mundial da Saúde; do inglês: World Health Organization
WNT	Via de sinalização intracelular canônica e não canônica
ZOL	Ácido Zoledrônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	História do câncer de mama	22
1.2	Epidemiologia	27
1.3	Fatores de risco	29
1.3.1	Fatores de risco que não podem ser modificados	29
1.3.2	Fatores de risco relacionados ao estilo de vida	30
1.4	Controle do câncer de mama	32
1.4.1	Controle do câncer de mama no Brasil	33
1.5	Diagnóstico	34
1.5.1	Classificação dos Tumores de Mama	35
1.6	Fatores prognósticos e preditivos de resposta	39
1.7	Tratamento do câncer de mama invasivo	43
1.7.1	Subtipos moleculares de câncer de mama	43
1.7.2	Visão geral do tratamento do câncer de mama	45
1.7.2.1	<i>Tratamento neoadjuvant</i>	46
1.7.2.2	<i>Tratamento neoadjuvante das pacientes com tumor HER2 positivo</i>	48
1.7.3	Novas abordagens terapêuticas com potencial de sinergismo de resposta ou de reversão da sensibilidade ao bloqueio HER	53
1.7.3.1	<i>Abemaciclibe - Inibidor de CDK4/6</i>	53
1.7.3.2	<i>Neratinibe – Inibidor de pan-HER</i>	53
1.7.3.3	<i>Atezolizumabe – Anti PD-L1</i>	54
1.7.3.4	<i>Ado-trastuzumabe emtansina (T-DMI)</i>	54
1.7.3.5	<i>Ácido Zoledrônico – Bifosfonato</i>	54
1.7.3.5.1	<i>Estudos pré-clínicos da ação anti-tumoral do ácido zoledrônico</i>	58
1.7.3.5.2	<i>Estudos Clínicos da ação anti-tumoral do ácido zoledrônico</i>	58
2	OBJETIVOS	62
2.1	Objetivo Primário	62
2.2	Objetivos Secundários	62
3	MATERIAL E MÉTODOS	63

3.1	Desenho do Estudo	63
3.2	População Alvo	64
3.2.1	Consentimento Livre Informado	64
3.2.2	Critérios de inclusão.....	64
3.2.3	Critérios de exclusão	65
3.3	Tratamento Proposto	65
3.3.1	Da descontinuação tratamento/estudo.....	66
3.4	Avaliação Clínica, Laboratorial e Radiológica	66
3.4.1	Avaliação clínica inicial.....	66
3.4.2	Avaliação patológica	67
3.5	Avaliação da Resposta patológica	69
3.5.1	Resposta patológica completa (pRC).....	69
3.5.2	Doença residual.....	69
3.6	Avaliação de segurança e ajustes na medicação em função da toxicidade	70
3.6.1	Coleta dos eventos adversos.....	70
3.7	Avaliação do <i>compliance</i>	70
3.8	Análise do perfil de expressão gênica nos tecidos tumorais	71
3.8.1	Extração de RNA total	71
3.8.2	<i>Microarray</i>	71
3.8.3	Análise <i>in silico</i>	72
3.9	Acompanhamento clínico	72
3.10	Tratamento Cirúrgico	72
3.11	Coleta de dados e dos eventos adversos	72
3.12	Análise estatística	73
4	RESULTADOS	74
4.1	População do estudo	74
4.1.1	Resultados da avaliação dos marcadores moleculares de prognóstico, por IHQ, das pacientes que realizaram o tratamento sistêmico e cirúrgico propostos.....	76

4.2	Resultados da Resposta Patológica.....	78
4.3	Avaliação das possíveis associações entre a taxa de resposta patológica completa e variáveis clinicopatológicas.....	79
4.4	Segurança.....	80
4.5	<i>Compliance</i> ao tratamento proposto.....	82
4.6	Análise da expressão gênica diferencial de pacientes que tiveram pRC ao tratamento <i>versus</i> as que ficaram com doença residual.....	82
4.6.1	Vias de sinalização e processos relacionados com os genes diferencialmente expressos encontrados na comparação entre as pacientes que tiveram pRC ao tratamento e as que ficaram com doença residual.....	85
4.7	Tratamento cirúrgico realizado.....	91
5	DISCUSSÃO.....	93
6	CONCLUSÕES.....	100
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	101
8	ANEXOS.....	124
8.1	Carta do CEP de aprovação do estudo Zo-NAnTax.....	124
8.2	Parecer da CONEP de aprovação do estudo Zo-NAnTax.....	125
8.3	Carta da ANVISA de aprovação do estudo Zo-NAnTax.....	130
8.4	1º Termo de Consentimento Livre Esclarecido aprovado pelo CEP do estudo Zo-NAnTax.....	131
8.5	Artigo submetido ao Journal of Clinical Oncology.....	140
8.6	Lista de genes diferencialmente expressos nas biópsias das amostras pré-tratamento de 18 pacientes do estudo Zo-NAnTax.....	158

1 INTRODUÇÃO

1.1 História do Câncer de Mama

O câncer tem sido considerado uma doença moderna devido aos principais fatores de risco que estão associados ao seu desenvolvimento como, tabagismo, obesidade, radiação, poluição e longevidade, fatores que não estavam presentes em tempos remotos; mas os conhecimentos atuais dos padrões moleculares de desenvolvimento e achados arqueológicos surpreendentes indicam que provavelmente, o câncer assola o homem desde o seu surgimento na Terra (BREASTED, 1930).

Como parte fundamental do êxito atual em relação ao tratamento e diagnóstico do câncer, o avanço tecnológico a partir do meado do século XX, permitiu a elucidação de problemas biológicos complexos. Inequivocamente a mais importante delas se deu com a descoberta da estrutura química exata do ácido desoxirribonucleico (DNA) por James Watson e Francis Crick em 1953 (WATSON; CRICK, 2003), trabalho que lhes rendeu o prêmio Nobel de Medicina em 1962 e permitiu o estudo da base do código genético, sua transcrição, tradução e sua habilidade em ativar e bloquear genes em todas as células.

A partir da década de 1980 com o melhor entendimento e descoberta de oncogenes, de proto-oncogenes, de genes supressores de tumores e de suas vias de sinalização foi possível o avanço de tratamentos mais elaborados de hormonioterapia, de quimioterapia, de imunoterapia, de terapias alvo molecular e das terapias baseadas em solucionar problemas no DNA (BISHOP, 1991); estratégias que modificaram definitivamente o prognóstico dos pacientes portadores de câncer de mama.

Sem dúvida, o primeiro tratamento sistêmico de grande impacto para o câncer de mama foi o tratamento anti hormonal com o tamoxifeno (inibidor seletivo do receptor de estrogênio), inicialmente estudado para anticoncepção, mas que se mostrou eficaz na redução dos tumores de mama em experimentos realizados em ratas e publicados em 1976 (JORDAN, 1976). No ano seguinte os primeiros resultados do tratamento de mulheres com câncer de mama avançado com tamoxifeno são publicados e relacionam a resposta tumoral à positividade dos receptores de estrogênio levando o FDA (Food and Drug Administration) a aprovar o seu uso para pacientes com câncer de mama avançado (KIANG; KENNEDY, 1977).

Em relação à quimioterapia para o câncer de mama, os maiores avanços da década de 1970 foram os primeiros resultados de estudos que demonstraram a eficácia da doxorubicina no tratamento do câncer de mama avançado (COLE *et al.*, 1974).

A doxorubicina permanece como opção terapêutica para todos os estádios, podendo ser usada como droga única, mas demonstrando vantagem em relação à taxa de resposta, quando do seu uso combinado a outras drogas (MATTIOLI *et al.*, 2004).

O reconhecimento de que as células do câncer replicam seu DNA e se multiplicam de forma desordenada direcionou a procura de novas drogas que atuassem durante esses processos fundamentais para a sobrevivência das células. Nesta perspectiva o Instituto Nacional de Câncer Americano (NCI) montou um programa para avaliação de milhares de extratos de plantas quanto a sua atividade antineoplásica e a segunda classe de drogas mais importante para o tratamento do câncer de mama é descoberta; os taxanes. O primeiro representante da classe foi o paclitaxel e sua estrutura molecular foi descrita em 1971 (BRYAN; TWELVES, 2011).

Outras drogas citotóxicas importantes para o tratamento do câncer de mama também surgiram nesse período, como a vinorelbina, a carboplatina, a gencitabina (só aprovada para o tratamento do câncer de mama em 2004) e a capecitabina (primeira quimioterapia oral), e com elas, o estudo dos mecanismos de resistência às drogas (LUQMANI, 2005).

Observações de que determinadas famílias apresentavam numerosos casos de câncer de mama e/ou ovário, e que isso aumentava as chances de desenvolvimento de câncer de mama nas gerações subsequentes, pautaram os pesquisadores para estudarem a possibilidade de haver uma herança genética envolvida neste processo (ANDERSON, 1992).

Dois genes de suscetibilidade importantes na manutenção da estabilidade do DNA, por codificar proteínas de reparo, foram identificados com mutações que podem levar à Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e Ovário, o BRCA1 identificado em 1994 (EASTON, 1995) e o BRCA2 em 1995 (WOOSTER *et al.*, 1995).

A hipótese gênica só foi possível ser investigada e comprovada devido ao desenvolvimento da técnica de sequenciamento de DNA por Frederick Sanger, na década de 1970 (SANGER; COULSON, 1975) que fornece subsídios para análise detalhada de um gene e da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por Kary Mullis, em 1983; técnica essa que amplifica um segmento de DNA facilitando o diagnóstico, a monitorização da sua função e o desenvolvimento de tecnologias de expressão gênica, tão importante para o tratamento individualizado dos anos atuais (RABINOW, 2011).

O Projeto Genoma Humano, iniciado em 1990 utilizou-se da tecnologia de sequenciamento para o conhecimento e montagem do genoma humano (VENTER *et al.*,

2001) dando oportunidade para a descoberta da origem de diversas doenças e possibilitando o desenvolvimento de drogas alvo específicas. Como no caso do sequenciamento do cromossoma 17; especificamente do gene Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2/neu) (SCHECHTER, 1984) que em última instancia favoreceu a descoberta de um tratamento inovador com anticorpo alvo dirigido, o Trastuzumabe, que modificou efetivamente a sobrevida de pacientes com câncer de mama em todos os estádios, onde há superexpressão da proteína HER2.

O HER2/neu é um proto-oncogene que codifica uma proteína tirosina quinase transmembrana (p185^{HER2} ou HER2). Quando sua porção extracelular é ativada ela desencadeia uma série de ativações diretamente através da sua via de sinalização ou através da interação com outras vias, como a Akt e MAPK, que são capazes de regular a proliferação, migração, diferenciação, apoptose e a motilidade celular (IQBAL, Nida; IQBAL, Naveed., 2014).

Em 1987 os resultados de um estudo que testou pacientes com câncer de mama, em relação à expressão de HER2, demonstraram que a amplificação e/ou superexpressão do gene ocorria em 25% dos carcinomas invasivos de mama e que essas pacientes tinham um pior prognóstico, com redução de sobrevida e do tempo até a recaída. A identificação da superexpressão de HER2 se torna um fator prognóstico mais importante que a presença de linfonodos axilares positivos (SLAMON, 1987).

Após quase três décadas da descoberta da primeira droga alvo para o tratamento do câncer de mama, o tamoxifeno, ocorre o desenvolvimento da segunda droga alvo, o anticorpo murino humanizado anti HER2 (CARTER *et al.*, 1992) denominado trastuzumabe, que teve o seu primeiro estudo fase II publicado em 1996, onde foi comprovada sua eficácia no tratamento de pacientes com câncer de mama metastático, politratadas e com superexpressão de HER2 no tumor (BASELGA *et al.*, 1996).

O câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea, ele tem história natural, resposta terapêutica e características moleculares diferentes. São várias doenças denominadas de uma única forma, entretanto, através dos estudos epidemiológicos e do avanço das técnicas moleculares já é possível identificar diferentes subtipos e traçar uma abordagem terapêutica mais individualizada.

Perou C M *et al* em 2000 postularam que a diversidade fenotípica dos tumores de mama poderia ser acompanhada por uma correspondente diversidade da expressão gênica e esses formariam padrões que poderiam ser identificados utilizando-se a técnica de micro arranjos de cDNA. Em seu estudo, eles analisaram a expressão gênica de amostras da mama

de 42 indivíduos com e sem câncer e puderam subdividir o câncer de mama em quatro subtipos intrínsecos: Normal *like*, luminal, tipo HER2 e *Basal like* (PEROU *et al.*, 2000).

Na chegada ao século XXI a busca pelo tratamento individualizado do câncer de mama ganha nova perspectiva, devido às ferramentas genéticas que caracterizam o perfil de expressão gênica dos tumores e fornecem informações como: risco de recorrência e/ou predição de resposta à quimioterapia e/ou hormonioterapia. O Oncotype Dx, o Mamma Print e o PAM50 são testes que visam identificar as pacientes com aparente fenótipo de baixo risco, mas que evoluem mal porque em verdade têm genótipo agressivo e por isso devem ser tratadas como tal (VAN'T VEER *et al.*, 2002; PAIK *et al.*, 2004; FILIPITS *et al.*, 2014).

A preocupação com a qualidade de vida se torna mais evidente na medida em que passam a existir mais opções de tratamentos e as pacientes sobrevivem mais. Por esta razão, a introdução de questionários de qualidade de vida tanto para pacientes com doença inicial quanto para pacientes com doença avançada passa a ser parte integrante dos estudos clínicos, contribuindo para o norteamento da escolha terapêutica individualizada (KING *et al.*, 2000; BOTTOMLEY, 2002).

Estudos com drogas que melhoram a qualidade de vida, como os bifosfonatos que reduzem a reabsorção óssea, promovem redução da dor óssea e de eventos ósseos nas pacientes com metástase óssea, ganharam importância e foram determinantes para a introdução, na diretriz da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), do uso desta classe de medicamentos como suporte do tratamento do câncer de mama com metástase óssea (HILLNER *et al.*, 2000).

Caminhando no mesmo sentido, a atividade física se torna parte integrante do tratamento, com benefício clínico tanto em relação à qualidade de vida quanto à redução do risco de morte (HOLMES *et al.*, 2005).

Quase três décadas após a aprovação do tamoxifeno para o tratamento do câncer de mama metastático, uma nova classe de drogas “anti-hormonais” é aprovada como opção para o tratamento das pacientes pós-menopausica: - os inibidores e inativadores da aromatase (MOURIDSEN *et al.*, 2001).

Nos anos seguintes novas drogas citotóxicas são aprovadas para o tratamento do câncer de mama avançado, como a gencitabina, vinorelbina, capecitabina, cisplatina/carboplatina, ixabepilona, nab-paclitaxel e a eribulina (ANDREOPOULOU; SPARANO, 2013), mas as antraciclínicas e os taxanes (docetaxel e paclitaxel) permanecem como padrão ouro do tratamento neoadjuvante e adjuvante, associada ou não ao bloqueio HER2, de acordo com a superexpressão ou não do receptor (NCCN Guidelines, 2018).

Em detrimento às descobertas das novas drogas citotóxicas, o conhecimento científico das últimas décadas permitiu uma sedimentação do interesse na individualização do tratamento oncológico através da elucidação de mecanismos de resistência, da identificação de vias de sinalização alteradas, da identificação de mutações germinativas ou somáticas e da compreensão da dinâmica da imunidade tumoral, identificando-se biomarcadores específicos que podem ser utilizados como marcadores diagnósticos, prognósticos e ou preditivos de resposta.

A partir destes novos conhecimentos houve o desenvolvimento de novas drogas alvo (MASOUD; PAGÈS, 2017), algumas já em uso na rotina do tratamento do câncer de mama, como os anti-HER2 (Trastuzumabe, Pertuzumabe), droga conjugada anticorpo-quimioterapia (Ado-trastuzumabe emtansina) inibidores de tirosina quinase do HER1 e 2 (Lapatinibe), inibidor da via PI3K/Akt/mTOR (Everolimus), anti-angiogenico (Bevacizumabe) e mais recentemente o inibidor seletivo de quinase dependente de ciclina 4 e 6 (Palbociclibe); aprovado nos Estados Unidos em 2015 mas ainda não aprovado no Brasil.

Esforços continuam a ser concentrados na identificação de biomarcadores que possam personalizar cada vez mais o tratamento das neoplasias malignas, mas infelizmente com custos cada vez maiores, devido ao alto nível de sofisticação tecnológica. Entre os resultados promissores para o tratamento do câncer de mama, podemos citar as drogas alvo de *checkpoints* imune-específicos anti PD1 (Nivolumabe, Pembrolizumabe), anti PDL1 (Avelumabe, Atezolizumabe) e anti CTLA-4 (Tremelimumabe) (BEDOGNETTI *et al.*, 2016), inibidores da PARP (Olaparibe, Talazoparibe) (LIVRAGHI; GABER, 2015) e novos inibidores da via PI3K/Akt/mTOR (Taselisibe, Burparlisibe e Ipatasertibe) (LEE *et al.*, 2015).

Em estágios mais iniciais de avaliação clínica, mas já com resultados positivos, tem-se a terapia epigenética (CONNOLLY; STEARNS, 2012), terapia com receptores quiméricos de antígenos de célula T (CARs) (HOUOT *et al.*, 2015) e vacinas a partir de proteínas altamente imunogênicas expressas no câncer de mama (KIM *et al.*, 2016), ou a partir de células dendríticas autólogas (SANTISTEBAN, 2016) e até o uso de moduladores sítios-específicos de metástases (SEVENICH *et al.*, 2014).

O futuro aponta para uma medicina de precisão, na qual os dados moleculares de cada indivíduo, o melhor conhecimento da atividade das vias de sinalização e da relação individual tumor/microambiente serão utilizados como aliados diretos no combate da doença e as opções terapêuticas poderão, ao invés de destruírem células, reverter as alterações identificadas como causadoras do câncer, com menos toxicidade e maior eficácia.

1.2 Epidemiologia

O câncer de mama é um grave problema de saúde pública. É a neoplasia maligna mais comum em mulheres em todo o mundo. De acordo com os últimos dados estatísticos mundiais da Globocan, em 2012 a incidência mundial de câncer de mama foi estimada em 1,67 milhões, com 522 mil mortes (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx), um aumento de 18% a partir de 2008 na incidência e na mortalidade relacionada ao câncer de mama.

Tao *et al* referem dados publicados pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) que demonstram que o panorama futuro se mantém sombrio com uma previsão de aumento na incidência do câncer de mama mundial até 2050, para 3,2 milhões de novos casos, apesar dos avanços tecnológicos nas ciências médicas e de cuidados de saúde que possibilitam a detecção precoce e a identificação de fatores de risco, a doença continua avançando indicando que muito ainda precisa ser estudado, conhecido e realizado (TAO *et al.*, 2015).

Diferenças na incidência, tipo molecular e mortalidade pelo câncer de mama têm sido identificados entre as várias regiões mundiais e entre as raças, o que pode estar relacionado com a carga genética, o desenvolvimento socioeconômico, diferentes exposições aos fatores de risco, e diferenças de acesso ao diagnóstico precoce e a terapias ativas (BHIKOO *et al.*, 2011a; BHIKOO *et al.*, 2011b).

Jemal *et al.* analisaram os dados publicados pela GLOBOCAN em 2008 para entenderem as diferenças entre as incidências do câncer de mama pelo mundo. Concluíram que as maiores taxas são encontradas nos países industrializados da América do Norte e Europa Ocidental, as taxas de incidência intermediárias ocorrem na América do Sul e no norte da África, e a menor incidência é geralmente encontrada, no oeste da Ásia e da África Austral. Mesmo nas áreas com taxas mais baixas, o câncer de mama ainda é o câncer mais comumente diagnosticado entre as mulheres (JEMAL *et al.*, 2011).

Em relação à mortalidade, quase 60% do total de mortes por câncer de mama ocorrem em países economicamente em desenvolvimento, embora as taxas de incidência da doença e mortalidade sejam mais baixas nessas áreas. Isto é devido à desigual distribuição da população entre as regiões do mundo, com diferentes recursos econômicos, e dificuldades na realização do rápido diagnóstico e acesso aos tratamentos mais efetivos (JEMAL *et al.*, 2011).

Interessante ressaltar a influência do meio, que é capaz de transformar uma população de baixo risco de desenvolvimento de câncer de mama em uma população de alto risco, como demonstrado no estudo de Ziegler *et al.* no qual mulheres que imigraram para o Estados

Unidos a partir de países asiáticos, onde as taxas eram 4 a 7 vezes menores, após viverem lá por mais de dez anos, aumentaram o risco de desenvolvimento de câncer de mama em 80% (ZIEGLER *et al.*, 1993). Essa mudança também foi verificada entre os latinos e suas gerações, que depois de imigrarem para os Estados Unidos, apresentaram uma elevação do risco de até 40% (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Os motivos para os quais a imigração para os países industrializados aumenta o risco de câncer de mama não são totalmente claros, mas fatores que podem afetar o comportamento reprodutivo tais como, o uso de contraceptivos orais, história de amamentação ou escolhas sobre quando, e se a mulher terá filhos, terapia de reposição hormonal mais facilmente difundida, mudanças na alimentação com piora nutricional e incorporação de aditivos e conservantes alimentares, maior exposição a poluentes ambientais, dificuldades sociais e a combinação de vários desses fatores, têm sido implicados no aumento do risco de câncer de mama (ANDREEVA *et al.*, 2007).

É importante identificar padrões de risco independentes como, raça, etnia, e histórico de migração, apesar de que todas as mulheres devem limitar sua exposição aos fatores de risco já conhecidos, e procurar adotar comportamentos que promovam a sua saúde geral física e mental (ANDREEVA *et al.*, 2007).

No Brasil, o perfil epidemiológico para a ocorrência do câncer de uma maneira geral se assemelha ao da América Latina e do Caribe. A estimativa para o biênio 2018-2019 (excetuando-se o câncer de pele não melanoma) é de cerca de 420 mil novos casos de câncer, sendo que nas mulheres, o tipo mais frequente é o câncer de mama com uma previsão de 59.700 novos casos, o que representa 29,5% dos cânceres em mulheres (INCA, 2018).

Dados de mortalidade apontam como sendo a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, e especificamente nos países em desenvolvimento como o Brasil, com aproximadamente 15.500 mil mortes estimadas para o ano de 2015 (INCA, 2014a). Nos países desenvolvidos é a segunda causa de morte por câncer, ficando atrás somente do câncer de pulmão (FITZMAURICE, 2015).

Apesar da sobrevida em cinco anos, ter aumentado de 78% para 87% entre os períodos de 1995 a 1999 e 2000 a 2004 respectivamente (INCA, 2014b), os avanços no conhecimento e controle dos fatores de risco, do tratamento e do diagnóstico precoce ainda não foram suficientes para reduzirem as taxas de mortalidade por câncer de mama que continuam elevadas no Brasil; 14 óbitos a cada 100 mil mulheres em 2015 (INCA, 2014b). Muito devido ao fato de nos anos subsequentes, as pacientes mais frequentemente iniciarem tratamento em estádios avançados, devido às dificuldades de acesso e possibilidades de utilização de novas drogas e novas tecnologias (PAIVA; CESSE, 2015).

1.3 Fatores de risco

O câncer de mama é uma doença de desenvolvimento muito complexo. A maioria das mulheres que tem um ou mais fatores de risco nunca desenvolverá câncer de mama, enquanto muitas outras, já com câncer, não têm fatores de risco identificados. Mesmo quando uma mulher com fatores de risco conhecidos desenvolve câncer de mama, ainda é difícil saber exatamente o quanto esses fatores podem ter contribuído, individualmente ou associados pois convivemos com muitos deles ao mesmo tempo.

Décadas de pesquisas epidemiológicas levaram à identificação de um número de condições individuais, de estilo de vida e ambientais que aumentam a probabilidade de desenvolvimento do câncer de mama. Alguns fatores de risco, como idade ou raça, não podem ser alterados. Outros fatores de risco associados a fatores ambientais ou a comportamentos pessoais tais como fumar, ingerir bebida alcoólica e dieta não saudável, podem ser eliminados. Alguns fatores afetam o risco mais do que outros, e seu risco pode mudar ao longo do tempo, devido a situações como o envelhecimento ou estilo de vida.

1.3.1 Fatores de risco que não podem ser modificados

- **Gênero** - Ser mulher é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. A ocorrência em homens é de um caso para cada cem mulheres (WEISS; MOYSICH; HELEN, 2005).
- **Idade** - O risco aumenta com a idade. A doença é menos comum em mulheres com menos de 40 anos de idade, sendo cerca de 0,8% dos cânceres de mama em mulheres com idade menor que 30 anos e, de 6,5% em mulheres com idade entre 30 e 40 anos (JARDINES *et al.*, 2002).
- **Fatores Genéticos** - O câncer de mama hereditário representa cerca de 5 a 10% dos carcinomas de mama. A causa mais comum é uma mutação herdada nos genes BRCA1 e BRCA2. Mutações em outros genes, embora raras, podem também levar ao câncer de mama hereditário, como, por exemplo, ATM, CHEK2, TP53 (síndrome de Li-Fraumeni), PTEN (doença de Cowden), CDH1, e STK11 (síndrome de Peutz-Jeghers) (LEVY-LAHAD; FRIEDMAN, 2007; APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013).
- **Histórico Familiar** - O risco de câncer de mama é maior entre as mulheres com parentes em primeiro grau (mãe, irmã ou filha) que tiveram a doença. Nesses casos o risco de surgimento da doença praticamente dobra. Ter dois parentes de primeiro grau aumenta o seu risco cerca de três vezes (CGHFBC, 2001).

- **Histórico Pessoal de Câncer de Mama** - Uma mulher com câncer de mama tem um risco de 3 a 4 vezes maior de desenvolver um novo câncer de mama. Isso é diferente de uma recidiva (SINGLETARY, 2003).
- **Raça e Etnia** – As mulheres brancas têm uma taxa global superior de câncer da mama em relação às mulheres Africano-Americano, no entanto, esta diferença não é aparente até 50 anos de idade, mas ela é marcante após a menopausa. Já em mulheres jovens é mais comum nas negras e nas de origem judaica Ashkenazi, devido a maior taxa de mutação nos genes BRCA (SINGLETARY, 2003).
- **Mamas Densas** - Mulheres com mamas densas têm um risco aumentado de câncer de mama em relação às mulheres com mamas menos densas. Uma série de fatores pode afetar a densidade da mama, como idade, estado menopausal, uso de medicamentos, gravidez e genético (WORSHAM, 2007).
- **Doenças Benignas da Mama** - Mulheres diagnosticadas com determinadas condições benignas da mama podem ter um risco aumentado de câncer de mama. As doenças benignas da mama são classificadas de acordo com o risco (WORSHAM, 2007):
 - a - *Lesões não-proliferativas* - Não estão associadas ao crescimento excessivo do tecido mamário e não parecem afetar o risco de câncer de mama: - incluem fibrose e/ou cistos simples, hiperplasia, adenose, ectasia ductal, tumor filóide, papiloma único, necrose, fibrose periductal, metaplasia escamosa e apócrina, calcificações, tumores benignos, como lipoma, hamartoma, hemangioma, neurofibroma e adenomioepitelioma.
 - b - *Lesões proliferativas sem atipia* - Estas condições apresentam crescimento excessivo das células dos ductos ou lobos e incluem a hiperplasia ductal, o fibroadenoma, a adenose esclerosante, a papilomatose e a cicatriz radial.
 - c - *Lesões proliferativas com atipia* - Nestas condições, existe um crescimento excessivo de células normais com atípicas dos ductos ou lobos que podem elevar o risco de câncer de mama de 3 a 5 vezes. Estes tipos de lesões incluem: - hiperplasia ductal atípica e hiperplasia lobular atípica.

1.3.2 Fatores de risco relacionados ao estilo de vida

- **Obesidade** – Resultados de estudos epidemiológicos que avaliaram a relação de risco entre a obesidade e o desenvolvimento de câncer de mama demonstraram um risco aumentado entre as mulheres na pós-menopausa que foi inversamente proporcional ao das mulheres na pré-menopausa.

Esta relação ainda não está totalmente esclarecida, mas um dado consistente dos estudos é a importância da fase da vida em que ocorre o desenvolvimento da obesidade para que haja aumento de risco. O ganho de peso durante a fase adulta parece estar mais relacionado ao aumento de risco de câncer de mama da mulher na pós-menopausa (VAN DEN BRANDT *et al.*, 2000).

- **Fatores ligados à reprodução** (SINGLETTARY, 2003)

a - Prolongada exposição ao estrogênio endógeno - As mulheres que tiveram menarca precoce (antes dos 12 anos) ou tiveram a menopausa após os 55 anos têm um risco aumentado de câncer de mama.

b - Prolongada exposição ao estrogênio exógeno – Uso de anticoncepcional com elevadas concentrações de estrogênio e a terapia de reposição hormonal (TRH) com combinação de estrogênio e progesterona, na menopausa estão associados à elevação do risco. O risco se iguala às mulheres que não fazem reposição hormonal, após cinco anos de interrupção do tratamento.

O Instituto Nacional de Saúde (WHI) publicou em 2002 um estudo emblemático sobre reposição hormonal, com mais de 15.000 mulheres na pós-menopausa. O estudo demonstrou, após uma mediana de 5,6 anos de *follow-up*, que as mulheres tomando estrogênio com progesterona tinham um aumento de 26% no risco de desenvolvimento de câncer da mama invasivo, em comparação com as mulheres que tomaram placebo.

Após a publicação do WHI a prescrição da TRH nos Estados Unidos reduziu em quase 40% entre 2002 e 2003. Durante aproximadamente o mesmo período, houve um declínio de 6,7% na incidência de câncer de mama receptor de estrogênio positivo, principalmente entre as mulheres com idade maior ou igual a 50 anos. Foi a primeira ação efetiva para redução da incidência do câncer de mama.

c - Idade tardia para a primeira gravidez – As mulheres que não tiveram filhos ou que tiveram o primeiro filho após os 30 anos têm um risco aumentado de câncer de mama.

d - Controle da Natalidade - O uso de pílulas anticoncepcionais aumenta o risco de câncer de mama em relação às mulheres que nunca usaram. Esse risco volta ao normal após a interrupção do uso dos contraceptivos por um período igual ou maior que dez anos.

e - Amamentação – Se o período somado da amamentação de todas as gravidezes for de 1 a 2 anos, tem um caráter protetor.

- **Radioterapia Prévia** - As mulheres que fizeram radioterapia na região do tórax têm um risco aumentado de câncer de mama (SINGLETARY, 2003).
- **Exposição ao Dietilestilbestrol** - É um estrogênio sintético não esteroide. Foi muito utilizado entre a década de 1940 e 1970 em mulheres grávidas para evitar abortamento fetal, nas décadas posteriores viu-se que aumentava o risco de desenvolvimento de câncer de mama, não só nas mães que a utilizaram como em suas filhas (REED; FENTON, 2013).
- **Alcoolismo** – A ingestão de álcool está associada a um modesto aumento do risco de desenvolver câncer de mama nas pacientes que ingerirem dois ou mais *drinks* por dia (mais de 12 g de álcool) (JARDINES *et al.*, 2002).
- **Atividade Física** – Hmwe H Kyu *et al.* publicaram uma metanálise em 2016 que avaliou a relação da dose-resposta da atividade física e doenças crônicas, entre elas o câncer de mama. Eles demonstraram que o risco de desenvolvimento de câncer de mama, reduz com o aumento do volume total da atividade física, expresso em múltiplos de equivalente metabólico por tempo (MET/hora) (KYU *et al.*, 2016).
- **Tabagismo** – O risco de desenvolvimento de câncer de mama para as mulheres, tanto na pré quanto na pós-menopausa, com tabagismo ativo ou passivo, se eleva em relação às não tabagistas e ainda permanece elevado até 20 anos após a parada de fumar. Na pré-menopausa este risco parece estar mais relacionado ao desenvolvimento do câncer de mama receptor hormonal positivo (AL-DELAIFY *et al.*, 2004; LUO, *et al.*, 2011).

1.4 Controle do câncer de mama

A melhor estratégia relativa aos carcinomas é aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de seu desenvolvimento, para que ações preventivas possam levar à redução da sua incidência até a erradicação da doença.

Devido à individualização orgânica e a extrema heterogeneidade tumoral associada à presença de fatores de risco conhecidos e não conhecidos, o câncer de mama se torna uma doença de comportamento dinâmico, em constante transformação. Por isso, apesar de ser historicamente um dos carcinomas mais bem estudado, só apresenta duas abordagens efetivas na redução de sua incidência; que é a redução do uso de TRH (RAVDIN *et al.*, 2007) e a mastectomia bilateral profilática para mulheres com mutação gênica de risco (REED *et al.*, 2004).

Com isso, planejamentos para o controle do câncer de mama através da detecção precoce ganham importância fundamental e incluem o diagnóstico precoce e o rastreamento.

1.4.1 Controle do câncer de mama no Brasil

→ Detecção Precoce

A detecção precoce parte da educação da mulher e dos profissionais de saúde para o reconhecimento dos sinais e sintomas do câncer de mama, até ao acesso rápido e facilitado aos serviços de saúde.

A ampla divulgação da política de alerta ao cuidado das mamas, que inclui orientações para que a mulher realize a auto palpação das mamas sempre que se sentir desconfortável, aprendendo a identificar as mudanças fisiológicas das mamas nos diferentes ciclos da vida, valorizando a descoberta de pequenas alterações nas mamas e estimulando a busca de assistência médica, sempre que desconfiar dessas alterações, objetiva a redução do número de mulheres que fazem o seu diagnóstico com tumores avançados, comprometendo suas possibilidades de cura (INCA, 2017).

→ Rastreamento

A importância do rastreamento se deve ao fato de possibilitar o diagnóstico dos tumores de mama antes que os sinais e sintomas apareçam. Ele pode ser oportunístico, quando o exame de rastreio é realizado na medida em que as pacientes chegam às unidades de saúde ou organizado, quando as mulheres na faixa etária de interesse são formalmente convidadas para realizarem os exames (INCA, 2017).

O rastreio organizado é mais eficaz porque é capaz de reduzir a mortalidade, por isso deve integrar a política de saúde pública, como recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

No Brasil não há uma política de rastreamento de base populacional, mas a partir da década de 1980 foram implementadas ações de controle do câncer de mama e de colo de útero (BICALHO; ALEIXO, 2002).

Em relação ao câncer de mama, a mamografia é o exame complementar preconizado para o rastreamento em mulheres de 50 a 69 anos com intervalos bianuais, fazendo parte da rotina da atenção integral à saúde da mulher, de acordo com a recomendação do INCA atualizada em 2015 (INCA, 2017). Fora desta faixa etária os dados de benefício são controversos, excetuando-se nas pacientes de alto risco, nas quais os resultados com a ressonância nuclear magnética são superiores ao da mamografia (SARDANELLI *et al.*, 2011).

Para que o rastreamento seja eficaz, não basta ter mamógrafos em grande quantidade. É importante ter um número suficiente, de acordo com a distribuição da população alvo e principalmente (INCA, 2017):

- Informar e mobilizar a população e a sociedade civil organizada;

- Alcançar a meta de cobertura da população-alvo;
- Garantir acesso ao diagnóstico e tratamento oportuno;
- Garantir a qualidade das ações;
- Monitorar e gerenciar continuamente as ações.

A partir da suspeição clínica e/ou radiológica, a biópsia deve ser realizada para o diagnóstico de certeza, tanto em lesões mamárias palpáveis quanto em impalpáveis.

1.5 Diagnóstico

Existem quatro técnicas para a realização da biópsia de lesões na mama (BATTISTA *et al*, 2001):

- ***Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)***

É um procedimento simples de rápida execução, mas necessita de um patologista mais treinado e muitas vezes não possibilita a diferenciação entre o carcinoma *in situ* e o invasivo. Também inviabiliza a realização da imunohistoquímica para os receptores hormonais e o HER2. É um método bom para uma primeira triagem das pacientes, principalmente em lugares de mais difícil acesso.

- ***Core biópsia***

É muito difundida no nosso meio, pois é possível a retirada de material suficiente para uma avaliação histopatológica e dos marcadores moleculares tanto em lesões palpáveis quanto em impalpáveis, quando se realiza guiada por um método de imagem. É minimamente invasiva.

- ***Mamotomia***

É uma biópsia que retira mais material que a core, mas necessita de um maior aparato para ser realizada. Sua principal indicação está relacionada às lesões com microcalcificações, agrupadas ou não, e a necessidade de biópsia de lesões em gordura. Também possibilita a colocação de *clip* metálico que facilita a identificação da área da lesão, no momento da cirurgia.

- ***Biópsia Excisional***

É um procedimento cirúrgico e está reservado para quando há uma discordância entre o resultado da core biópsia/mamotomia e a clínica, em caso de lesões papilares ou no diagnóstico de hiperplasias atípicas ductais e lobulares.

1.5.1 Classificação dos Tumores de Mama

Existe uma grande variedade de tipos histológicos de tumores de mama. Para que haja normatização e reprodutibilidade dos diagnósticos, a Organização Mundial da Saúde (WHO), após aprovação de um Comitê de Consenso, publica atualizações periódicas de acordo com os novos conhecimentos histopatológicos, sendo elas um guia que é referência para patologistas, oncologistas e pesquisadores, com ampla aceitação internacional (Tabela 1.1) (LAKHANI, 2012).

O tipo histológico mais comum é o carcinoma ductal infiltrante não especificado (NOS) que representa 70 a 80% de todos os tumores de mama, seguido pelo carcinoma lobular infiltrante com cerca de 5 a 15% e, o percentual restante é dividido entre os outros tipos histológicos específicos (LAKHANI, 2012).

Tabela 1.1 - Classificação histológica dos tumores de mama, WHO 2012

CARCINOMA INVASIVO DE MAMA	
<p>Carcinoma ductal invasivo, SOE Carcinoma tipo misto Carcinoma pleomórfico</p> <p>cinoma com células gigantes tipo osteoclasto Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos Carcinoma com elementos melanóticos</p> <p>Carcinoma lobular invasivo Carcinoma lobular clássico Carcinoma lobular sólido Carcinoma lobular alveolar Carcinoma lobular pleomórfico Carcinoma túbulo-lobular Carcinoma lobular misto</p> <p>Carcinoma tubular Carcinoma cribriforme invasivo Carcinoma com elementos medulares Carcinoma medular Carcinoma medular atípico e invasivo SOE</p>	<p>Carcinoma mucinoso Carcinoma de células em anel de sinete Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma com diferenciação apócrina Carcinoma metaplásico sem tipo especial Carcinoma adenoescamoso de baixo grau Carcinoma metaplásico fibromatose-símile Carcinoma de células escamosas Carcinoma de células fusiformes Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal Carcinoma metaplásico com diferenciação condroide Carcinoma metaplásico com diferenciação Carcinoma metaplásico com diferenciação em outros tipos mesenquimais Carcinoma metaplásico misto Carcinoma mioepitelial</p>
TIPOS TUMORAIS EPITELIAIS RAROS	LESÕES PROLIFERATIVAS PRECURSORAS E INTRADUCTAIS
<p>Carcinoma com elementos neuroendócrinos Tumor neuroendócrino bem diferenciado Carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado (carcinoma de pequenas células) Carcinoma com diferenciação neuroendócrina</p> <p>Carcinoma secretor Carcinoma papilar invasivo Carcinoma de células acinares Carcinoma mucoepidermoide Carcinoma oncocítico Carcinoma rico em lipídeos Carcinoma de células claras rico em glicogênio Carcinoma sebáceo Tumores tipo glândula salivar/anexos cutâneos Cilindroma e Hidroadenoma de células claraa</p>	<p>Lesões precursoras Carcinoma ductal in situ Neoplasia lobular Carcinoma lobular in situ Carcinoma lobular in situ clássico</p> <p>Carcinoma lobular in situ pleomórfico Hiperplasia lobular atípica Lesões proliferativas intraductais Hiperplasia ductal usual Lesões de células colunares Atipia epitelial plana Hiperplasia ductal atípica Carcinoma ductal in situ</p>
TUMORES EPITELIAIS/MIOEPITELIAIS	LESÕES E NEOPLASIAS PAPILARES LESÕES
<p>Adenoma pleomórfico Adenomioepitelioma Adenomioepitelioma com carcinoma Carcinoma adenoide cístico</p>	<p>Papiloma intraductal Papiloma intraductal com hiperplasia atípica Papiloma intraductal com carcinoma ductal in situ Papiloma intraductal com carcinoma lobular in situ</p> <p>Carcinoma papilífero intraductal Carcinoma papilífero encapsulado Carcinoma papilífero encapsulado com invasão Carcinoma papilífero sólido In situ Carcinoma papilífero sólido Invasivo</p>
TUMORES MESENQUIMAIS	
<p>Fasците nodular Miofibroblastoma Fibromatose tipo desmoide Tumor miofibroblástico inflamatório Lesões vasculares benignas Hemangioma Angiomatose Lesões vasculares atípicas</p> <p>Hiperplasia pseudoangiomatosa do estroma Tumor de células granulares</p>	<p>Tumores benignos da bainha de nervo periférico Neurofibroma Schwannoma</p> <p>Lipoma Angiolipoma</p> <p>Lipossarcoma Angiossarcoma Rabdomiossarcoma Osteossarcoma Leiomioma e Leiomiossarcoma</p>
TUMORES DE PROLIFERAÇÃO EPITELIAL BENIGNO	TUMORES FIBROEPITELIAL
<p>Adenose esclerosante Adenose apócrina Adenose microglandular Lesão esclerosante complexa/cicatriz radial Adenomas Adenoma tubular, Adenoma lactante, Adenoma apócrino e Adenoma ductal</p>	<p>Fibroadenoma Tumor filóide Benigno Borderline Maligno Tumor estromal periductal de baixo grau</p> <p>Hamartoma</p>
LINFOMA MALIGNO	TUMORES DO MAMILO
<p>Linfoma difuso de grandes células Linfoma de Burkitt Linfoma de célula T Linfoma anaplásico de grandes células, ALK negativo Linfoma de células B extranodal de zona marginal tipo MALT</p>	<p>Adenoma de mamilo Adenoma siringomatoso Doença de Paget do mamilo</p>

International Agency for Research on Cancer, 2012. Fonte: Adaptado do WHO Classification of Tumours of the Breast.

Além da padronização do laudo histopatológico, o agrupamento dos tumores em estádios levou à melhor padronização do tratamento dos tumores malignos, na qual foi considerada o T – tamanho e extensão do tumor primário, o N - número e forma de comprometimento de linfonodos regionais e o M – presença ou não de metástases a distância, sistema TNM (BRIERLEY, 2006).

O sistema TNM foi inicialmente desenvolvido em 1943 por Pierre Denoix, mas foi só em 1977 que o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) o adotou e publicou o primeiro Manual para estadiamento do câncer (BRIERLEY, 2006).

Além de direcionar a uma abordagem terapêutica e acompanhamento individualizado das pacientes, o TNM tem importância na estimativa prognóstica da doença, sendo o estágio I o mais precoce e IV o mais avançado e de pior prognóstico (Tabelas 1.2 E 1.3) (EDGE, *et al.*, 2010).

Tabela 1.2 – Descrição do TNM para o estadiamento do câncer de mama

TUMOR PRIMÁRIO (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma in situ.
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal in situ, Tis (LCI) : Carcinoma lobular in situ, Tis (Paget) : Doença de Paget do mamilo não associadas com o carcinoma invasivo e / ou carcinoma in situ (DCIS e / ou LCIS) no parênquima mamário subjacente.
T1	Tumor ≤ 20 mm..
T1mi	Tumor ≤ 1 mm, T1a : Tumor > 1 ≤ 5 mm, T1b : Tumor > 5 ≤ 10 mm, T1c : Tumor > 10 ≤ 20 mm.
T2	Tumor > 20 ≤ 50 mm.
T3	Tumor > 50 mm.
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede torácica e / ou para a pele (ulceração ou pele nódulos).
T4a	Tumor com extensão à parede torácica, T4b : Carcinoma não inflamatório com ulceração e/ou nódulos satélites ipsilateral e/ ou edema (incluindo <i>peau d'orange</i>) da pele, T4c : Tumor T4a e T4b, T4d : Carcinoma inflamatório.
LINFONODOS REGIONAIS – CLÍNICO (N)	
NX	Os linfonodos axilares (LNA) ipsilateral não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástases em linfonodos ipsilateral.
N1	Metástase para LNA nível I e II ipsilateral clinicamente móveis.
N2	Metástase para LNA clinicamente fixos entre eles ou entre outras estruturas adjacentes ou para LN da mama interna ipsilateral na ausência de evidência clínica de metástase em LNA.
N2a	Metástases para LNA clinicamente fixos entre eles ou entre outras estruturas adjacentes e N2b : Metástases clinicamente detectadas para a mama interna ipsilateral na ausência de evidência clínica de metástase em LNA.
N3	Metástases para LN infraclavicular e/ou supraclavicular ipsilateral (nível III) com ou sem envolvimento axilar ou da mama interna.
N3a	Metástase em LN infraclavicular ipsilateral (s), N3b : Metástase em LN mama interna e envolvimento axilar ipsilateral, N3c : Metástase em linfonodo supraclavicular ipsilateral.
LINFONODOS REGIONAIS – PATOLÓGICO (pN)	
pnX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
pN0	Ausência de metástases em linfonodos regionais por hematoxilina-eosina (H&E).
pN0 (i-)	Sem metástases em LNA por H&E e imunohistoquímica (IHQ), pN0 (i +) : Presença de células malignas em LNA ≤ 0,2 mm por H&E ou IHC, incluindo células tumorais isoladas (ITC), pN0 (mol -) : Sem metástases em LNA por achados moleculares negativos (transcriptase reversa reação em cadeia da polimerase [RT-PCR]), pN0 (mol +) : Metástases em LNA identificada por RT-PCR e negativa por H&E e IHC.
pN1	Presença de micrometástases (> 0,2 mm e /ou > 200 células, mas nenhuma > 2,0 mm); ou metástases em 1-3 LNA; e/ou em LNs da mama interna, com metástases detectadas por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente detectadas.
pN1mi	Presença de micrometástases, pN1a : Presença de metástases em 1-3 LNA (pelo menos uma metástase > 2,0 mm), pN1b : Presença de metástases nos LNs da mama interna, com micrometástases ou macrometástases detectadas por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente detectado, pN1c : Presença de metástases em 1-3 LNA e em LNs da mama interna, com micrometástases ou macrometástases detectadas por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente detectado.
pN2	Presença de metástases em 4-9 LNA ou em LNs da mama interna, detectados clinicamente na ausência de metástases em LNA.
pN2a	Presença de metástases em 4-9 LNA, pN2b : Presença de metástases em LN da cadeia mama interna clinicamente detectada na ausência de metástases em LNA.
pN3	Presença de metástases em ≥ 10 LNA; ou em LN infraclavicular (nível III axilar); ou em LNs da cadeia mama interna clinicamente detectados ou LNs da mama interna, detectados clinicamente com pelo menos 1 LNA positivo no nível I e II ou mais de 3 LNA e LNs da mama interna com micrometástases ou macrometástases detectadas por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente detectadas; ou presença de metástases em LNs supraclaviculares ipsilateral.
pN3a	Presença de metástases em ≥ 10 LNA; ou em LN infraclavicular (nível III axilar), pN3b : Presença de metástases em LNs da mama interna ipsilateral clinicamente detectados, com pelo menos 1 LNA; ou em mais de 3 LNA e metástases em LNs da mama interna com micrometástases ou macrometástases detectadas por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente detectadas, pN3c : Metástases em linfonodos supraclaviculares homolaterais.
Obs 1 - Se não houver dissecação axilar após a pesquisa do linfonodo sentinela o “pN” será acompanhado de (sn).	
Obs 2 - Tanto “pT” quanto “pN” serão representados acrescentando-se a letra “y” quando a paciente tiver feito tratamento neoadjuvante.	
METASTASE À DISTANCIA (M)	
M0	Nenhuma evidência clínica ou radiográfica de metástases à distância.
M0 (i +)	Nenhuma evidência clínica ou radiográfica de metástases à distância, mas com células tumorais molecularmente ou microscopicamente detectadas no sangue, medula óssea ou em outro tecido nodal não regional, não maiores do que 0,2 mm de um paciente sem sintomas ou sinais de metástases circulante.
M1	Presença de metástases à distancia detectadas por meios clínicos, radiográficos clássicos e/ou comprovadas por H&E > 0,2 mm.

Fonte: Adaptado do *The American Joint Committee on Cancer: 7th edition of the AJCC cancer staging manual*, 2010.

Tabela 1.3 - Estadiamento do câncer de mama pelo TNM

Estadiamento	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	qualquer T	N3	M0
IV	qualquer T	qualquer N	M1

Fonte: Adaptado do *The American Joint Committee on Cancer: 7th edition of the AJCC cancer staging manual*, 2010.

1.6 Fatores Prognósticos e Preditivos de Resposta

São marcadores capazes de fornecer informações sobre o desfecho clínico de um paciente, no momento do diagnóstico, independente do tratamento. Idealmente eles devem ter valor prognóstico significativo independente, ser viáveis, disponíveis, reprodutíveis, de fácil interpretação pelos clínicos e terem sido testados em estudos clínicos.

- **Idade** - Estudos demonstram que após o ajuste pelo estadiamento, características do tumor e tratamento; a idade < 35 anos é um fator prognóstico desfavorável independente do câncer de mama inicial (FREDHOLM, *et al.*, 2009).
- **Tamanho do tumor** - A sobrevida global e a sobrevida livre de recorrência reduzem de forma inversamente proporcionais com o tamanho do tumor primário (CARTER, *et al.*, 1989; ROSEN, *et al.*, 1993).

- **Estado linfonodal** - É o fator prognóstico mais relevante, sendo mais importante quando a sua positividade é dada pela metodologia do H&E. O prognóstico mais reservado está associado ao comprometimento de quatro ou mais linfonodos axilares homolaterais ao câncer de mama (ROSEN, *et al.*, 1993).
- **Tipo histológico do tumor** - Alguns tipos histológicos têm melhor prognóstico, como o carcinoma mucinoso, o tubular e o medular, mas por outro lado, o carcinoma inflamatório, micropapilar e os metaplásicos tendem a ter um pior prognóstico (WEIGELT, *et al.*, 2010).
- **Grau histológico** - É um preditor independente de sobrevida ao câncer de mama específico e de sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama operável. Três características do tumor são avaliadas (formação de túbulos/diferenciação glandular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica) e um escore é montado onde grau 1 é favorável, grau 2 intermediário e grau 3 desfavorável (RAICHA *et al.*, 2008).
- **Invasão linfovascular peritumoral** - Estudos com acompanhamento longo demonstram que a presença de invasão linfovascular aumenta o risco de recorrência e morte nas pacientes com doença inicial (ROSEN *et al.*, 1989).
- **Marcadores de proliferação** - Vários métodos para medição da proliferação foram avaliados na tentativa de correlacioná-los com o prognóstico da doença. Marcadores putativos da fração do DNA na fase S, índice de timidina, índice mitótico, Ciclina D1, Ki67/MIB-1, entretanto, devido a falta de consistência e a não reprodutibilidade dos resultados, não devem ser utilizados como marcadores independentes (ROSSI *et al.*, 2015; CALY *et al.*, 2004; KENNY *et al.*, 1999). A avaliação por imunohistoquímica do Ki67 foi a metodologia mais extensamente estudada e ela parece ter um valor prognóstico independente, porém ainda existem problemas na determinação do seu valor de corte.
- **uPA/PAI-1** - O Sistema ativador de plasminogenio tem papel reconhecido na invasão e metastatização dos tumores de mama, atuando principalmente no controle da degradação da matriz extracelular. As concentrações do ativador de plasminogenio tipo uroquinase (uPA) e do inibidor tipo 1 do ativador de plasminogenio (PAI-1), se mostraram serem fator prognóstico importante. Níveis elevados no tumor primário do uPA e/ou do PAI-1 indicam que a paciente tem elevado risco de recidiva de doença e de

morte. Apesar de validado em estudo prospectivo, seu uso não é difundido devido à necessidade de se ter uma grande amostra de tecido tumoral e de ser realizado em material a fresco (DUFFY *et al.*, 2014).

- **TP53** - Dados sugerem que pacientes com mutação somática de TP53 têm pior prognóstico em relação às pacientes que não têm. A sua avaliação é por sequenciamento, o que limita o seu uso na prática diária (OLIVIER *et al.*, 2006). A perda de heterozigosidade (LOH) de TP53 se correlaciona com pior desfecho clínico em relação a sobrevida, mas não se tem desenvolvida uma metodologia prática para o seu uso clínico de rotina (HIRANO *et al.*, 2001).
- **Receptores hormonais** - O aumento de expressão dos receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RPg) tem valor prognóstico positivo com maior sobrevida global, sobrevida livre de doença e tempo para falha ao tratamento, pelo menos nos cinco primeiros anos após o tratamento e preditivo de resposta à hormonioterapia (FISHER *et al.*, 1988).
- **c-erbB-2 (HER2/neu)** - É um proto-oncogene e sua superexpressão está associada a um pior pronóstico devido ao aumento da agressividade do tumor, das taxas de recorrência e da mortalidade e preditivo de resposta ao bloqueio do seu produto; o receptor transmembrana HER2 (WINSTANLEY *et al.*, 1991).
- **Domínio extracelular solúvel (ECD) do HER2** - Alguns estudos mostraram associações significativas entre concentrações séricas elevadas do ECD e maior agressividade do tumor; com má resposta às terapias utilizadas, incluindo ao trastuzumabe, enquanto outros não. Uma metanálise onde 63 estudos foram avaliados concluiu que essa disparidade é devida à grande diferença entre o desenho dos estudos e o ponto de corte da concentração sérica do ECD, para a determinação da associação com os resultados evolutivos da doença (LEYLAND-JONES; SMITH *et al.*, 2011).
- **Marcadores de invasão e metástase** - Muitos marcadores têm sido propostos como potenciais indicadores de prognóstico, como a E-caderina, nm23, β -catenina, inibidores das metaloproteases (TIMPs) e a osteopontina (HEIMANN *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2000; LISS *et al.*, 2009; ZDUNIAK *et al.*, 2015), mas ainda são necessários estudos clínicos prospectivos bem desenhados, para conclusões definitivas.
- **Células tumorais circulantes (CTC)** - Estudos demonstram que a presença de CTC antes do tratamento cirúrgico curativo do câncer de mama,

tem impacto negativo no prognóstico destas mulheres (FRANKEN *et al.*, 2012).

- **Fatores moleculares e genômicos** - Usando a técnica de complementariedade de DNA por micro arranjo, Perou e cols em 2000 classificaram os tumores de mama em quatro subtipos moleculares diferentes com implicações clínicas (incidência, fatores de risco e sensibilidade ao tratamento) e prognósticas diferentes (PEROU *et al.*, 2000; PRAT *et al.*, 2015). Em relação ao prognóstico, o subtipo Luminal A mostrou ter melhor prognóstico do que os outros subtipos em vários estudos clínicos fase III (TransATAC, GEICAM9906, CALGB9741, ABCSG08, NCIC-CTG MA.5 e NCIC-CTG MA.12).

Evolutivamente, testes multigênicos foram desenvolvidos para individualizar as pacientes com câncer de mama invasivo de acordo com o prognóstico em cinco e/ou mais que cinco anos e/ou prever a eficácia da hormonioterapia isolada sobre a quimioterapia seguida de hormonioterapia.

De acordo com os estudos que validaram esses testes, eles podem ter:

a - Valor prognóstico no período de 0-5 anos para as pacientes com câncer de mama receptor hormonal positivo HER2 negativo - Oncotype DX 21- genes escore de recorrência (RS) (PAIK *et al.*, 2004), PAM50 risco de recorrência (ROR) score (NIELSEN *et al.*, 2010), o índice de câncer de mama (BCI) (JEREVALL *et al.*, 2011), EndoPredict (EP) e o EPclin, derivado do EP; ele incorpora o estado nodal e o tamanho do tumor para criar um algoritmo de diagnóstico integrado para as decisões clínicas (FILIPITS *et al.*, 2011).

b - Valor prognóstico a partir do quinto ano para as pacientes com câncer de mama receptor hormonal positivo HER2 negativo - índice de câncer de mama (BCI), EndoPredict (EP) e o EPclin (SESTAK *et al.*, 2013).

c - Valor preditivo de benefício à quimioterapia para as pacientes com câncer de mama receptor hormonal positivo HER2 negativo - Oncotype DX 21- genes escore de recorrência (RS) (ALBAIN *et al.*, 2010).

1.7 Tratamento do câncer de mama invasivo

1.7.1 Subtipos moleculares de câncer de mama

O comportamento clínico e a resposta terapêutica do câncer de mama são extremamente variados e isso é explicado em parte, pelas características moleculares diferentes. Perou e seu grupo foram os primeiros a identificarem quatro/cinco subtipos moleculares de câncer de mama (Luminal (A e B), luminal HER, HER2 e tipo *basal like* e mama normal), através da análise da clusterização hierárquica que utilizou a técnica de microarranjo com cDNA de tumores de pacientes com câncer de mama (PEROU, 2000).

No ano seguinte Sorlie e cols publicam os resultados da análise da clusterização hierárquica com 85 amostras de tecido mamário, sendo 78 carcinomas de mama, três tumores benignos e quatro tecidos normais identificando cinco/seis subtipos moleculares diferentes (Figura 1.1); Luminal (A, B e C), luminal HER, HER2, tipo *basal like* e mama normal; (SORLIE, 2001). Os autores mostraram que esses subtipos tinham prognóstico e resposta terapêutica diferente, eles representam diferentes fenótipos clínicos o que possibilita a identificação de terapias específicas (SORLIE, 2001).

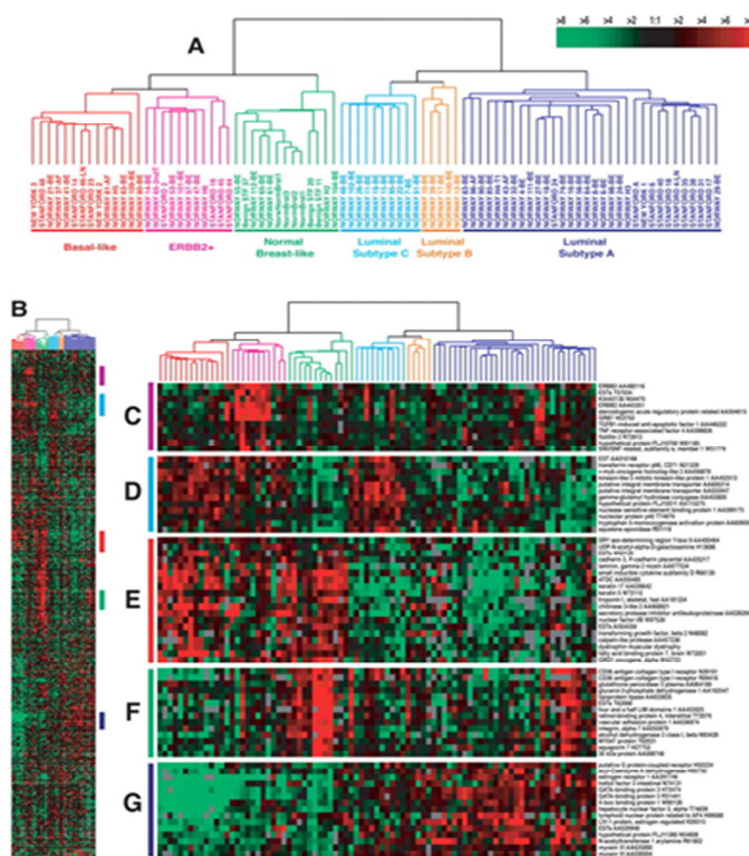


Figura 1.1- Padrão da expressão gênica de 85 amostras de tecido mamário sendo, 78 carcinomas de mama, três tumores benignos de mama e quatro tecidos normais de mama, que foram analisados por agrupamento hierárquico utilizando o conjunto de clones intrínsecos de 476 cDNAs. Em (A) o dendrograma de agrupamento mostra os cinco (seis) subtipos de tumores divididos nas cores: Subtipo luminal A, azul escuro; Subtipo luminal

B, amarelo; Subtipo luminal C, azul claro; Mama normal, verde; Basal-like, vermelho e HER2/*neu* +, rosa. Em (B) diagrama de agrupamento reduzido, as barras coloridas à direita representam as inserções apresentadas em C-G. Em (C) agrupamento de superexpressão de HER2/*neu*. Em (D) um novo agrupamento desconhecido. Em (E) agrupamento de células epiteliais basais enriquecidas. Em (F) agrupamento semelhante ao da mama normal. Em (G) agrupamento epitelial luminal contendo RE. Fonte: Adaptado de Sørli *et al.*, 2001.

O subtipo luminal A apresenta, em relação aos demais, o melhor prognóstico. São tumores que apresentam receptor de estrogênio e progesterona positivos, baixo grau histológico e amplificação e/ou superexpressão de HER2 negativos. Estudos recentes ainda revelam que esse subtipo deve apresentar um índice de Ki-67, avaliado por imunistoquímica, inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (CHEANG, 2009).

O subtipo Luminal B exibe receptor de estrogênio e/ou progesterona positivos que por vezes estão expressos em baixos níveis. Não têm amplificação e/ou superexpressão de HER2 e frequentemente têm um número aumentado de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes MKI67 (Ki-67), CCNB1 e MYBL2. A expressão de RE, RPg, HER2 e mais recentemente a utilização do índice do Ki-67, distinguem o subtipo luminal A do luminal B (CHEANG, 2009).

O subtipo luminal C é controverso, no estudo de Sortie ele apresentou *clusters* de genes altamente expresso em todos os subtipos luminais, basais e nos HER2. Em estudos posteriores não se encontra mais relato desse subtipo, pela dificuldade na sua caracterização (Figura 1.1).

O subtipo luminal HER é caracterizado pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais, tem HER2 superexpresso e normalmente tem um índice de Ki-67 igual ou superior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (PARK, 2012).

O subtipo luminal B e o luminal HER foram significativamente associados a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença específica em relação ao que o subtipo luminal A e de se beneficiar mais de quimioterapia (SORTIE, 2001).

O subtipo HER2, como o próprio nome indica, tem superexpressão do HER2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais. Esse subgrupo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais (SORTIE, 2001).

O subtipo *basal like* é caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais, demonstra padrão prognóstico mais reservado em relação aos outros subtipos. Está associado a uma menor sobrevida livre da doença e a uma menor sobrevida global (PARK, 2012). Morfologicamente, é caracterizado por alto grau histológico, por elevado índice mitótico, pela presença de áreas de necrose central e pela presença de infiltrado linfocítico (CHIN *et al.*, 2010).

Através da imunohistoquímica (IHQ) pode-se estimar seu perfil gênico de agressividade, tanto pela negatividade dos receptores hormonais e da falta de superexpressão de HER2 quanto pela positividade da expressão de citoqueratina 5 ou 5/6 e do EGFR (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 – Relação entre o subtipo molecular de câncer de mama e o padrão de imunomarcacão

Subtipo Molecular	Padrão de Imunomarcacão
Luminal A	RE e RPg +, HER2 - e Ki67 < 14%
Luminal B	RE e/ou RPg +, HER2 - e/ou Ki67 ≥ 14%
Luminal HER	RE e/ou RPg +, HER2 + e/ou Ki67 ≥ 14%
HER	RE e RPg -, HER2 + e/ou Ki67 ≥ 14%
Basal like	RE e RPg -, HER2 - e/ou Ki67 ≥ 14%, CK5/6 e EGFR +

HER2: Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano; EGFR: Receptor tipo 1 do Fator de Crescimento Epidérmico; RE: Receptor de Estrogênio; RPg: Receptor de Progesterona; Ki-67: Antígeno nuclear; CK5/6: Citoqueratina 5/6.

1.7.2 Visão geral do tratamento do câncer de mama

O tratamento do câncer de mama é dividido em sistêmico; onde pode se utilizar quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo molecular e, tratamento local através de cirurgia (radical ou conservadora) e de radioterapia. Quando realizado antes da cirurgia curativa é chamado de neoadjuvante, após a cirurgia curativa de adjuvante e para pacientes metastáticas, de paliativo.

A escolha da melhor associação das terapias leva em consideração o estadiamento clínico e/ou patológico, o tipo histológico, a presença de receptores de estrogênio e progesterona, a superexpressão do HER2 no tumor e o estado de saúde da paciente. Em casos selecionados, o uso de testes multigênicos e de avaliação da mutação em BRCA1 e 2 também são utilizados para a estimativa de risco e definição de conduta. Sendo importante considerar que em pacientes jovens, na pré-menopausa, possíveis questões sobre fertilidade e opções de manutenção da fertilidade devem ser discutidas antes do início do tratamento.

Um comitê internacional formado pelos mais renomados especialistas dos grandes grupos cooperativos do mundo, envolvidos no atendimento a pacientes com câncer de mama, em pesquisa clínica e básica se reúne em Saint Gallen/Áustria a cada dois anos para discutir evidências, controvérsias e formular consenso (Consenso de Saint Gallen) sobre a terapia primária do câncer de mama não metastático. O último Consenso foi em março de 2017 e apesar de já existir um breve sumário publicado (GNANT; HARBECK; THOMSEN, 2017) a publicação original ainda não ocorreu, por isso nos baseamos no Consenso de Saint Gallen de 2015.

O Consenso de Saint Gallen de 2015 (COATES *et al.*, 2015) dividiu os subgrupos de câncer de mama através de critérios clínicos, patológicos e moleculares e lançou a atualização

das recomendações para o tratamento cirúrgico primário e sistêmico de pacientes não metastáticas, conforme sumarizado nas tabelas 1.2 e 1.3. Esta diretriz serve de base para as decisões terapêuticas do câncer de mama, não só a nível internacional como no INCA.

O tratamento citotóxico do câncer de mama não metastático pode ser realizado com drogas isoladas ou combinadas. Conforme já exposto anteriormente, os esquemas de tratamento, mas frequentemente utilizados englobam as antraciclina, os taxanes e um esquema tríplice com ciclofosfamida, metotrexato e 5-Fluourouracil. As platinas podem ser utilizadas (na neoadjuvância), em casos muito selecionados quando há mutação de BRCA1/2 ou quando há contraindicação para utilizar esquemas contendo antraciclina, em pacientes com tumor HER2 positivo, estágio II e III (NCCN Guidelines, 2018).

Os anticorpos monoclonais disponíveis para as pacientes que superexpressam o HER2 são o trastuzumabe e o pertuzumabe e a droga conjugada com o trastuzumabe; a ado-trastuzumabe emtansina. Finalmente, como opção de tratamento sistêmico tem-se os anti-hormônios, exclusivos para as pacientes cujo tumor expressa RE e/ou RPg > 1%. Eles podem ser utilizados na neoadjuvância, na adjuvância após a quimioterapia citotóxica, na adjuvância como único tratamento e no tratamento paliativo (NCCN Guidelines, 2018).

As drogas disponíveis são o tamoxifeno, os inibidores/inativadores da aromatase e os agonistas do hormônio luteinizante. Para a escolha terapêutica, além de se levar em conta os fatores de risco e o perfil molecular do tumor, é fundamental a observância do *status* da menopausa, porque diferente do tamoxideno que age bloqueando os receptores de estrogênio na mama e por isso pode ser utilizado tanto em mulheres na pré-menopausa quanto na menopausa, os inibidores/inativadores da aromatase são utilizados exclusivamente nas mulheres na pós-menopausa, pois na pré-menopausa com os ovários funcionando, eles têm eficácia limitada em suprimir a produção estrogênica e na pós-menopausa onde a da aromatase passa a depender exclusivamente da aromatização de andrógenos em sítios extra-ovarianos eles são bem ativos (COATES *et al.*, 2015).

1.7.2.1 Tratamento neoadjuvante

A quimioterapia neoadjuvante (NAC) é o tratamento realizado antes da cirurgia para pacientes com carcinoma infiltrante de mama normalmente maiores que dois centímetros. Ele objetiva atingir operabilidade para tumores inicialmente inoperáveis ou favorecer cirurgia conservadora para tumores com indicação inicial de mastectomia radical ou ainda servir de teste de quimiossensibilidade *in vivo*, tornando possível a avaliação da eficácia da terapia sistêmica. Pode também servir de “termômetro” de prognóstico nos subgrupos de triplo negativos (RE, RPg e HER2 negativos) e HER2 positivos nos quais a resposta patológica

completa, pRC (ausência de tumor infiltrante na mama e nos linfonodos) está associada a um melhor prognóstico, com ganho de sobrevida (VON MINCKWITZ *et al.*, 2012; CORTAZAR *et al.*, 2014).

Desde os resultados positivos do estudo NSABP B27, que avaliou o benefício da incorporação do docetaxel ao esquema de adriamicina com ciclofosfamida (AC) na neoadjuvância, comparando dois braços de tratamento; um grupo que recebeu AC, com o grupo que recebeu AC seguido de docetaxel e este último alcançou taxas significativamente maiores de resposta clínica completa (40,4 *versus* 65,4%, respectivamente) e pRC (25,6% *versus* 13,7%; respectivamente) além de *downstaging* significativa dos linfonodos axilares (RASTOGI *et al.*, 2008) o padrão da quimioterapia neoadjuvante, em todos os subtipos moleculares de câncer de mama continua até os dias de hoje, sendo regimes contendo antraciclina e taxano (NCCN Guidelines, 2018).

As diferentes definições de resposta patológica completa tornavam difíceis as comparações entre os vários resultados dos estudos, mas uma metanálise publicada em 2014 que envolveu 11.955 pacientes consolidou essa definição. Os autores examinaram os diferentes tipos de definições e concluíram que quando havia resposta completa na mama, mas doença residual no linfonodo axilar, tanto a sobrevida livre de eventos quanto a sobrevida global eram inferiores, quando comparadas ao grupo sem doença residual na mama e nos linfonodos, ou só com doença residual não invasiva (ypT0 ypN0 ou ypT0/is ypN0) (CORTAZAR *et al.*, 2014).

Como resultado, o FDA adotou o uso do ypT0 ypN0 ou ypT0 /is ypN0 como possíveis definições de pRC e assim um estudo que tenha esse objetivo como parte do seu desenho, pode pleitear a aprovação acelerada de novos agentes a partir dos resultados de pRC do tratamento do câncer agressivo de mama inicial (FDA, 2014).

As taxas de pRC são extremamente influenciadas pelo subtipo molecular dos tumores. Tumores considerados de baixo grau, que têm receptores de estrogênio e progesterona positivos e HER2 negativo apresentam baixas taxas de resposta patológica completa (<10%), o que não interfere na sobrevida. Em contrapartida, pacientes com HER2 positivo e RH negativos ou triplo negativos têm maiores taxas de pRC e estão fortemente associadas ao prognóstico (CORTAZAR *et al.*, 2014).

Estabelecida mais claramente a definição de resposta patológica completa, estudos identificaram que um grupo de pacientes que não atingiam a pRC tinham prognóstico semelhante às que atingiam, principalmente se o comprometimento axilar não era identificado (HENNESSY *et al.*, 2005).

A partir destes resultados Symmans *et al.* propuseram uma avaliação que quantificasse a doença residual (DR) do tumor de mama após o tratamento neoadjuvante, levando em consideração diâmetros bidimensionais do tumor de mama no espécime retirado, a proporção de carcinoma invasivo na área inicial do tumor, o número de linfonodos axilares que contém metástase e o maior diâmetro dessa metástase. Com esses parâmetros foi possível determinar, através de uma calculadora, o índice de carga de câncer residual (RCB), sendo $RCB\ 0 = pRC$ e o cálculo de dois pontos de corte que dividem as pacientes em três grupos: RCB I (DR mínima), RCB II (DR moderada) e RCB III (DR extensa) (SYMMANS *et al.*, 2007).

Esta metodologia mostrou-se altamente reprodutível e extremamente importante, por demonstrar que RCB tinha valor prognóstico em todos os subgrupos de câncer de mama e que pacientes classificadas como RCB-0 e I tinham taxas de sobrevidas semelhantes. Assim, vários estudos de neoadjuvância passaram a utiliza-la como objetivo principal ou secundário, ao invés da pRC (SYMMANS *et al.*, 2013).

1.7.2.2 Tratamento Neoadjuvante das pacientes com tumor HER2 positivo

A identificação dos receptores de tirosina-quinase da família HER, seu papel na diferenciação, sobrevivência e proliferação celular e sua relação com a agressividade da doença trouxeram grande avanço no tratamento neo, adjuvante e paliativo do câncer de mama.

Existem quatro receptores; o HER1 (EGFR), o HER2, o HER3 e o HER4 (Figura 1.2), que têm estrutura transmembrana, com um domínio extracelular rico em cisteína, uma porção intramembrana e um domínio citoplasmático de tirosina-quinase com resíduos de tirosina (HUDIS, 2007).

O domínio extracelular após ligação com o seu ligante muda sua conformação, tornando-o ativo para que ocorra sua dimerização e a consequente fosforilação do domínio intracelular, desencadeando uma cascata de transdução de sinais, incluindo aquelas envolvendo Raf/Ras/MEK/MAPK e PI3K/Akt que levam de maneira fisiológica ou carcinogênica, à diferenciação, sobrevivência e proliferação celular (HUDIS, 2007).

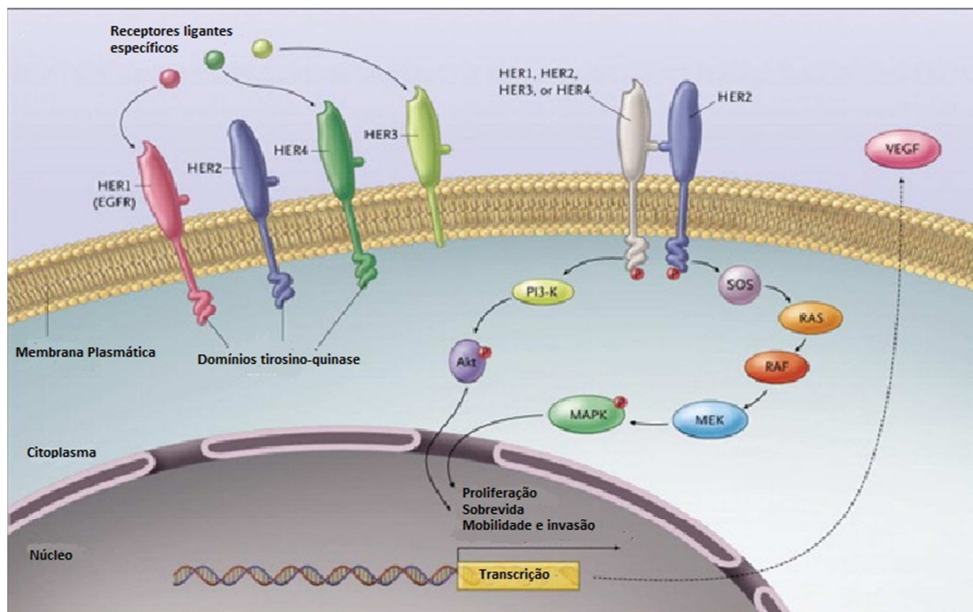


Figura 1.2 - Família dos Receptores do Factor de crescimento epidérmico humano (HER) e a cascata de transdução de sinal via ativação de HER2. Eles têm quatro membros; EGFR (HER1), HER2, HER3 e HER4. São receptores transmembranas, com um domínio intracelular de tirosino-quinase, exceto o HER3, existem ligantes específicos conhecidos para o HER1, HER3 e HER4. A Transdução de sinal se dá após a homodimerização ou heterodimerização que induz a fosforilação do domínio tirosina-quinase ativando simultaneamente a proliferação celular e a sinalização de sobrevivência. HER2 é o parceiro de dimerização preferido para os outros membros da família HER. A fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio intracelular de HER2 ativa a quinase lipídica fosfoinositida 3-quinase (PI3K), que fosforila um fosfatidilinositol que por sua vez se liga e fosforila a proteína quinase B (Akt), mantendo a sobrevivência das células. Paralelamente, a *mammalian homologue of the son of sevenless* (SOS), um fator de troca de nucleotídeo de guanina, ativa a enzima de sarcoma de rato (RAS) que, por sua vez, ativa o fator de ativação do receptor (RAF) e então a proteína quinase ativada por mitógeno (MEK). MEK fosforila outra proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK), impulsionando a proliferação celular. Um dos muitos outros efeitos a jusante é a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que estimula a angiogênese. Fonte: Adaptado de Colombo *et al.*, 2010.

A seleção do parceiro para a dimerização é determinante para as funções de sinalização celular e segue uma ordem hierárquica, favorecendo os heterodímeros em detrimento dos homodímeros. O HER2 é o receptor que tem atividade catalítica de quinase mais forte (HUDIS, 2007).

Slamon e cols. em 1987 identificaram que 20 a 30% das mulheres com câncer de mama apresentavam superexpressão do receptor HER2 devido a amplificação do gene ou a sua desregulação transcripcional, o que significava um comportamento mais agressivo, mesmo em tumores com estádios bem precoces (SLAMON, 1987).

Além dos mecanismos de ligação ao domínio extracelular, os receptores tirosina-quinase podem ser estimulados por outras vias de sinalização. Essas vias marginais podem advir da ativação de receptores acoplados a proteínas G, de receptores de citocinas/proteínas de adesão ou de receptores ativados por canais de cálcio voltagem dependentes o que, no caso do HER2, favorece resistência ao bloqueio do seu domínio extracelular (CHANG, 2007).

O trastuzumabe foi o primeiro anticorpo anti o domínio extracelular do HER2. Ele é um anticorpo humanizado que se liga a uma porção justa membrana para prevenir a ativação

da tirosina-quinase intracelular através do receptor (Figura 1.3). O mecanismo de ação não é totalmente elucidado, mas acredita-se que esta ligação interfira com a dimerização do HER2, aumente a sua destruição endocítica, iniba a clivagem do seu domínio extracelular e ative o sistema imune (HUDIS, 2007).

Em 2001 foi publicado o primeiro estudo clínico fase III que comparava a resposta terapêutica com quimioterapia isolada versus associada ao trastuzumabe, em mulheres portadoras de câncer de mama metastático com hiperexpressão do HER2, em primeira linha para doença metastática. A associação se mostrou significativamente melhor em relação ao maior tempo para progressão da doença, taxa de resposta, tempo de duração de resposta e de sobrevida global abrindo caminho, definitivamente, para a mudança da abordagem terapêutica nesse tipo de paciente (SLAMON *et al.*, 2001).

Outra maneira de bloqueio da via do HER2 é a inibição do sítio intracelular de tirosino-quinase do receptor, essa estratégia foi utilizada para as pacientes que falhavam ao uso do trastuzumabe. O lapatinibe é a droga com estudos mais sedimentados nesse contexto, ele é de apresentação oral, atua como inibidor reversível do sítio tirosino-quinase intracelular dos receptores HER1 (EGFR) e HER2 (KONECNY *et al.*, 2006); demonstrou ser ativo no tratamento do câncer de mama, estando aprovado para o uso em mulheres com câncer de mama avançado HER2 positivo que falham a terapia com trastuzumabe (CAMERON *et al.*, 2008).

A partir dos resultados positivos das pacientes com câncer de mama metastático vários estudos com associação de trastuzumabe à quimioterapia no cenário neoadjuvante foram publicados, mas grande parte com limitações de análise devido às diferenças nas metodologias aplicadas, nos perfis das pacientes incluídas, nas diferentes quimioterapias utilizadas e nas diferentes formas de uso do trastuzumabe (PIERGA *et al.*, 2010; UNTCH *et al.*, 2010).

De maneira geral, pacientes com hiperexpressão do HER2, tratadas só com quimioterapia, sem bloqueio do receptor, apresentavam maiores taxas de pRC (mediana de 22%), quando comparada às que eram HER2 negativo (mediana de 12%). Ao acrescentar o trastuzumabe ao tratamento padrão, a taxa de pRC se elevava de maneira significativa (mediana de 35,1%) além de resultar, também, em ganho de sobrevida livre de doença (BUZDAR *et al.*, 2007; PIERGA *et al.*, 2010; UNTCH *et al.*, 2010; UNTCH *et al.*, 2011; GIANNI *et al.*, 2014).

Em 2007 o painel internacional em terapia neoadjuvante publica recomendações para a terapia sistêmica do câncer de mama primário, nas quais incluem o trastuzumabe como parte do tratamento de pacientes com doença HER2 positiva, que tenha sido programado menos

seis ciclos de um regime contendo antraciclina e taxano, sugerindo o uso do trastuzumabe associado a antraciclina somente em estudos clínicos, devido a possibilidade de cardiotoxicidade grave (KAUFMANN *et al.*, 2007).

Apesar dos bons resultados com a associação do trastuzumabe, à quimioterapia neoadjuvante, a pRC ainda não é alcançada na sua totalidade, por isso o lapatinibe foi avaliado em associação ao trastuzumabe no contexto neoadjuvante demonstrando aumento da taxa de resposta completa, mas sem impacto na sobrevida e com grande toxicidade (PICCART-GEBHART *et al.*, 2014). Então novas drogas têm sido estudadas nesse cenário, principalmente com intuito da reversão de possível resistência ao trastuzumabe.

O pertuzumabe é uma das drogas que procura reduzir os escapes do bloqueio da sinalização via HER2. Ele é um anticorpo monoclonal que se liga ao domínio externo II do HER2, impedindo sua dimerização principalmente com o HER3 com o qual ele forma o dímero de sinalização mitogênica mais potente (BASELGA; SWAIN, 2009). Sua associação ao trastuzumabe promove bloqueio do HER2 em dois domínios externos diferentes (duplo bloqueio), ampliando assim o efeito anti-mitogênico (Figura 1.3).

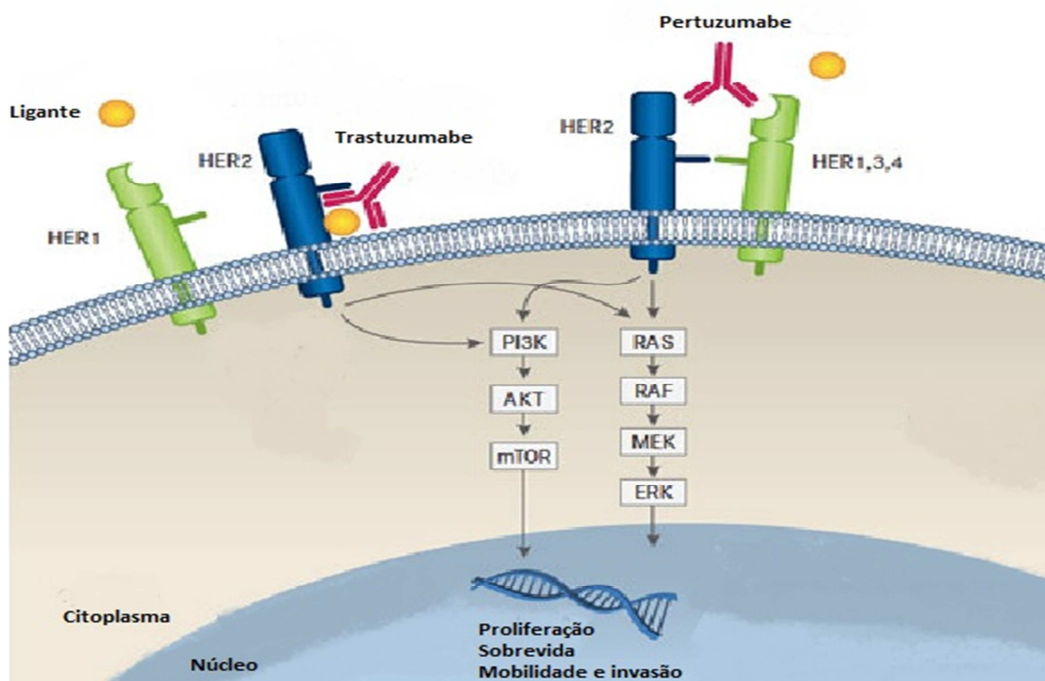


Figura 1.3 – Bloqueio extracelular do HER2. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal que se liga ao domínio extracelular IV do receptor HER2 impedindo a progressão da cascata de sinalização por sua via. Pode ser utilizado como anticorpo único ou associado ao pertuzumabe; anticorpo monoclonal que se liga ao sítio II do domínio extracelular do HER2. O pertuzumabe inibe a dimerização do HER2 com outros receptores da família HER, especialmente HER3. O heterodímero HER2-HER3 é um forte ativador de sinalização através da via PI3K-Akt-mTOR. Ele deve ser utilizado em associação com o trastuzumabe formando o duplo bloqueio. PI3K - quinase lipídica fosfoinositida 3-quinase, Akt- proteína quinase B, RAS – proteína indutora de sarcoma em rato,

RAF - receptor de *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*, MEK e ERK – proteínas quinase ativada por mitógenos. HER - Receptor Factor de crescimento epidérmico humano, HER2,3 - Receptor Tipo 2,3 do Fator de crescimento epidérmico humano. Fonte disponível em: <http://www.onclive.com/publications/contemporary-oncology/2014/february-2014/antibody-drug-conjugates-and-t-dm1#sthash.AEcESYHK.dpuf> Acesso em: 26 fev 2017.

O duplo bloqueio com os dois anticorpos (trastuzumabe e pertuzumabe) associados à quimioterapia foi bem avaliado em estudo de primeira linha com pacientes portadoras de câncer de mama metastático HER2 positivo onde foi comparado com quimioterapia, trastuzumabe e placebo, os resultados foram impressionantes, inclusive com aumentos significativos da sobrevida global mediana em 15,7 meses a favor das pacientes que realizaram o duplo bloqueio associado a quimioterapia (BASEFGA *et al.*, 2012; SWAIN, *et al.*, 2015).

Por isso em setembro de 2013, o FDA concedeu aprovação acelerada ao pertuzumabe como componente do tratamento neoadjuvante de quimioterapia com trastuzumabe para câncer de mama HER2 positivo inicial, localmente avançado ou inflamatório (AMIRI-KORDESTANI *et al.*, 2014). Além dos ótimos resultados do estudo paliativo CLEOPATRA, a aprovação acelerada baseou-se nos resultados de eficácia do estudo neoadjuvante fase II NeoSphere e nos resultados de segurança do estudo TRYPHAENA (GIANNI *et al.*, 2010; SCHNEEWEISS *et al.*, 2011).

No estudo NeoSphere a taxa de pCR foi de 45,8% no braço da combinação de docetaxel com ambos os agentes anti-HER2 e, portanto, significativamente maior, quando comparado com a taxa de 29% no braço de trastuzumabe com docetaxel. Com relação à segurança, o estudo TRYPHAENA demonstrou que essa associação não elevava de forma significativa a toxicidade cardíaca, maior preocupação em termos de toxicidade (GIANNI *et al.*, 2010; SCHNEEWEISS *et al.*, 2011).

No Brasil o tratamento neoadjuvante com os dois anticorpos foi aprovado pela ANVISA em agosto de 2016 e vem sendo adotado como tratamento padrão deste perfil de paciente na medicina privada, mas ainda não disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS). É uma associação terapêutica dispendiosa que sem a quimioterapia pode variar de R\$ 22.775,00 a R\$ 27.605,64 a cada 21 dias de tratamento, para uma paciente de 70 quilos.

Mesmo com o duplo bloqueio do HER2 (trastuzumabe e pertuzumabe) associado à quimioterapia, ainda existem células malignas sobreviventes, fazendo-se necessário novas abordagens terapêuticas e ampliação do conhecimento molecular, principalmente com a compreensão dos mecanismos de escape das células, para que elas possam ser eliminadas ou controladas de forma definitiva.

1.7.3 Novas abordagens terapêuticas com potencial de sinergismo de resposta ou de reversão da sensibilidade ao bloqueio HER

1.7.3.1 Abemaciclibe - Inibidor de CDK4/6

O Abemaciclibe é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK4/CDK6) que, por conseguinte inibe a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) e a transição da fase G1 para a S do ciclo celular (PATNAIK *et al.*, 2016).

Goel *et al.*, utilizando – se de modelos animais, linhagens celulares e xenotransplante, identificaram níveis anormalmente elevados de proteínas ciclina D1 e de CDK4 em amostras teciduais de tumores HER2 positivos recorrentes e que mantinham a viabilidade celular sustentada, mesmo com o bloqueio de HER2. Após vários experimentos concluíram que este aumento era um mecanismo importante de resistência da célula HER2 positiva.

Esses resultados foram comprovados através de experimentos nos quais se fazia o bloqueio da expressão de ciclina D1 e via-se a reversão da resistência ao bloqueio do HER2. Eles também demonstraram haver um efeito sinérgico quando se bloqueava o HER2 e a expressão de ciclina D1 através da associação do abemaciclibe com lapatinibe ou do abemaciclibe com trastuzumabe. Estudos clínicos estão em desenvolvimento para testar essa hipótese (GOEL *et al.*, 2016).

Palbociclibe e ribociclibe, outros inibidores de CDK4/6 ainda têm estudos clínicos com resultados muito iniciais.

1.7.3.2 Neratinibe – Inibidor de pan-HER

O neratinibe é um inibidor oral pan-HER irreversível. Dados pré-clínicos em linhagens celulares de câncer de mama HER2 positivas sugerem que ele possa transpor a resistência primária e adquirida ao trastuzumabe (CANONICI *et al.*, 2013).

O neratinibe demonstrou atividade antitumoral tanto entre as pacientes tratadas quanto entre as não tratadas previamente com trastuzumabe. Em um ensaio clínico de fase II, a mediana da sobrevida livre de progressão observada com neratinibe foi de 22,3 semanas entre as pacientes expostas previamente ao trastuzumabe e de 39,6 semanas entre as que não tinham sido expostas ao trastuzumabe. As taxas de resposta objetiva foram de 24% e 56%, respectivamente (BURSTEIN *et al.*, 2012), mas um estudo de segurança mostrou que mais de 90% das pacientes apresentavam diarreia e 50% neutropenia (JANKOWITZ *et al.*, 2013).

O poziotinibe, outro inibidor pan-HER está sendo estudado, ainda sem resultados clínicos.

1.7.3.3 Atezolizumabe – Anti PD-L1

O atezolizumabe é uma droga anti-PD-L1. O PD-L1 é um ligante do receptor PD-1 que tem papel co-inibitório do sistema imune e está superexpresso em linfócitos do infiltrado tumoral (TIL). Estudos de biomarcadores demonstraram que presença de TILs e a expressão de PD-1 no tumor estão associados com mau prognóstico no câncer de mama HER2 positivo (MUNST *et al.*, 2013). Os efeitos dos anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1 foram investigados em estudos pré-clínicos e o anticorpo anti-PD1 apresentou sinergismo quando associado ao trastuzumabe (STAGG *et al.*, 2011). Ainda com estudos clínicos em andamento.

1.7.3.4 Ado-trastuzumabe emtansina (T-DM1)

O T-DM1 é uma droga conjugada, ou seja, um anticorpo (trastuzumabe) associado a uma droga citotóxica (emtansine), que no passado foi abandonada devido a sua grande toxicidade. Ao se ligar ao HER2 esse conjugado é internalizado e a emtansine é liberada no interior da célula resultando em morte celular (LAMBERT; CHARI, 2014).

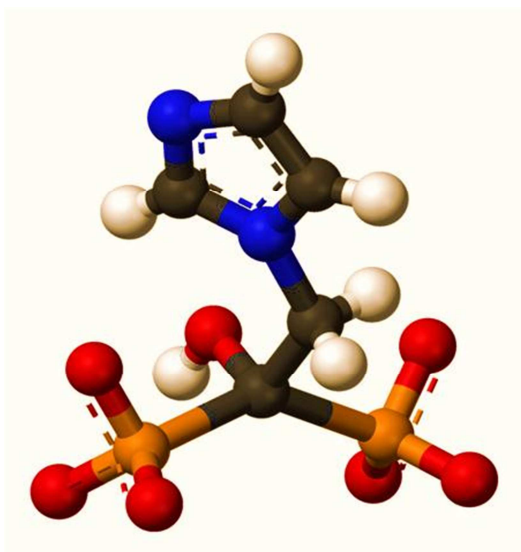
Estudos em linha metastática demonstraram que o T-DM1 é eficaz para as pacientes que falharam ao uso de trastuzumabe (VERMA *et al.*, 2012). Mas quando associado ao pertuzumabe na neoadjuvância os resultados foram frustrantes, com uma taxa de resposta patológica completa inferior ao grupo controle (44% e 56% respectivamente) (HURVITZ *et al.*, 2016).

1.7.3.5 Ácido Zoledrônico – Bifosfonato

O ácido zoledrônico (ZOL) é um bifosfonato (BF) de terceira geração utilizado para redução de eventos ósseos tanto em doenças benignas quanto em malignas, que ganhou mais visibilidade no cenário do tratamento antitumoral a partir do 33º Simpósio de Câncer de mama de San Antonio - Texas, quando um estudo para tratamento adjuvante do câncer de mama mostrou que a associação de ZOL a hormonioterapia reduzia a taxa de recidiva de doença em relação às pacientes que faziam hormonioterapia isolada (GNANT *et al.*, 2010).

A sua estrutura básica consiste de um carbono central não hidrolisável, dois grupos fosfatos laterais e dois grupos hidroxila (R1 e R2) ligados à região central desse carbono. Essa estrutura química é essencial para a sua afinidade mais específica com a matriz óssea. A porção estrutural final do grupo na posição R2 determina a potência para a inibição da reabsorção óssea (Figura 1.4). Um grupo nitrogênio ou amino em R2 (N-BF), como o que tem o ácido zoledrônico, aumenta a sua potência anti-reabsorção de 10 a 10.000, em relação aos BF que não os contém (DUNFORD *et al.*, 2001).

A)



B)

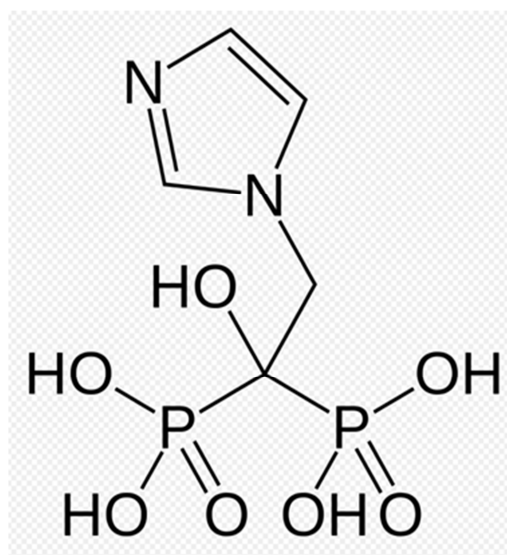


Figura 1.4 – Modelos da estrutura do ácido zoledrônico. A) Modelo da estrutura química do ácido zoledrônico, C₅H₁₀N₂O₇P₂, por cristalografia de raios X construído em CrystalMaker 8.3. Imagem gerada em Accelrys DS Visualizer. Código de cor: Carbono, C: preto; Hidrogênio H: branco; Nitrogênio, N: azul; Oxigênio, O: vermelho; Fósforo, P: laranja Estrutura por cristalografia de raios X construído em CrystalMaker 8.3. Imagem gerada em Accelrys DS Visualizer. B) Representação da estrutura química do ácido zoledrônico. Disponível em: <<http://www.cancernetwork.com/asco-2014-breast-cancer/less-frequent-zoledronic-acid-ok-breast-cancer-patients-bone-mets>>. Acesso em: 27 fev 2017.

O ZOL e os outros N-BFs inibem a reabsorção óssea mediada por osteoclastos por dois mecanismos de indução de apoptose dos osteoclastos; estímulo a caspase 3 (MÖNKKÖNEN *et al.*, 2006) e por inibição da atividade da farnesil pirofosfato sintetase (FPPS), enzima chave na via do mevalonato que ao ser inibida promove o acúmulo intracelular de um análogo de ATP, éster de 1-adenosina-5' - éster 3- (3-metilbut-3-enil) éster trifosfórico (ApppI), com conseqüente acúmulo de pirofosfato de isopentenil intracelular (IPP). ApppI induz apoptose direta através do bloqueio do nucleotídeo adenina translocase (ANT) mitocondrial (MÖNKKÖNEN *et al.*, 2006).

A integridade da via do mevalonato é importante para uma série de outras funções da célula, além da produção de lipídeos isoprenóides como IPP, farnesil pirofosfato (FPP) e o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), ela também é responsável pela produção de colesterol. O FPP e GGPP são necessários na modificação pós-translacional (prenilação) de GTPases como Ras, Rho e Rac. Essas moléculas estão envolvidas na regulação da proliferação, na sobrevivência, na formação de vesículas intracitoplasmática e rearranjo da membrana plasmática e na organização do citoesqueleto celular (LUCKMAN *et al.*, 1998) (Figura 1.5).

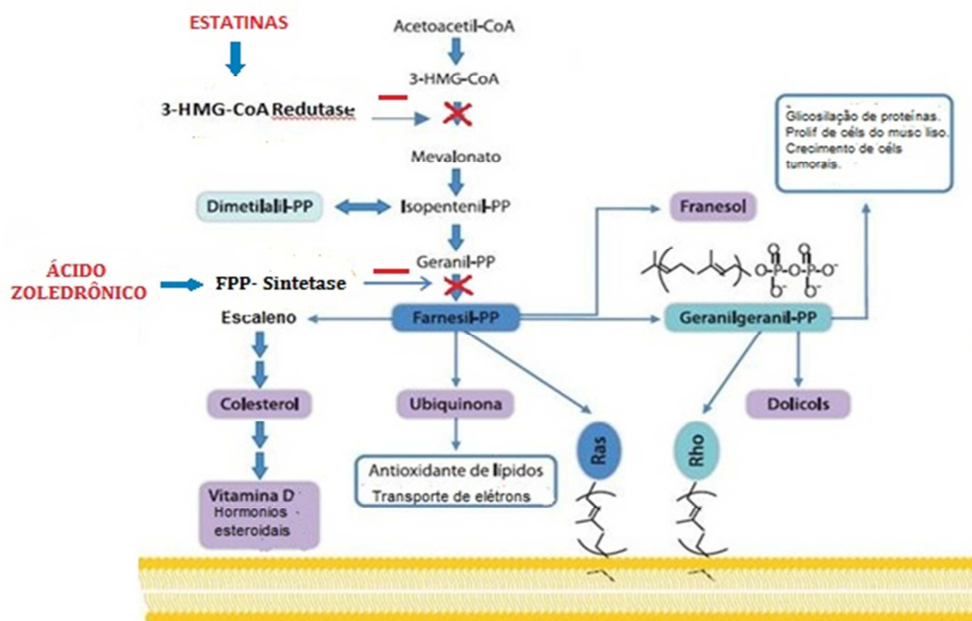


Figura 1.5 – Via do mevalonato. Ela produz unidades precursoras de isoprenóides necessárias para a biossíntese de uma variedade de moléculas importantes que contribuem para diversas funções celulares, variando desde a síntese de colesterol até a N-glicosilação e prenilação de proteínas. As estatinas e bifosfonatos são duas classes de fármacos que inibem o metabolismo do mevalonato e assim inibem a prenilação das proteínas. A modulação da prenilação das proteínas é considerada um mecanismo chave pelo qual as estatinas e bifosfonatos alteram as respostas inflamatórias e imunitária. HMGCoA - hidroximetil glutaril coenzima A HMGCoA redutase - hidroximetil glutaril-coenzima A-redutase, FPP -: farnesil pirofosfato sintase, IPP - isopentilo pirofosfato, farnesilPP - difosfato de farnesilo, geranylgeranylPP - geranylgeranyl difosfato.

Proteínas da superfamília Ras consistem de muitas famílias de GTPases monoméricas, mas apenas as da família Ras e da Rho estão envolvidas com sinalização celular. Elas têm sido extensamente estudadas devido as suas implicações em eventos patológicos e fisiológico das células. As proteínas Ras atuam em uma rede complexa de sinalização intracelular (Ras – Raf (MAPKKK) – Mek (MAPKK) - Erk (MAPK)) relacionada à progressão do ciclo celular, crescimento, migração, alterações do citoesqueleto celular, apoptose e senescência. Mutações em qualquer um dos genes que as codificam são causas comuns de tumorigenese em humanos (FERNÂNDEZ-MEDARDE *et al.*, 2011).

Além das mutações gênicas, a atividade oncogênica da proteína Ras é dependente de seu ancoramento na membrana plasmática através da ocorrência de modificações pós-translacionais que inclui a farnesilação, processo importante para mediar as interações proteína-proteína e proteína-membrana. A identificação desses mecanismos é fundamental para a exploração de alvos terapêuticos (LEE *et al.*, 2015).

A via do mevalonato é regulada pelos níveis de colesterol, embora os mecanismos homeostáticos sejam apenas parcialmente compreendidos. Uma maior oferta de colesterol exógeno vindo da dieta reduz a produção endógena e, ao contrário uma baixa oferta alimentar tem efeito oposto. Mas o principal mecanismo regulatório se dá através da detecção de

colesterol intracelular, no retículo endoplasmático, pela proteína SREBP (esterol elemento ligação proteína reguladora 1 e 2) (GOLDSTEIN; BROWN *et al.*, 1990).

Então, na presença de colesterol intracelular, a SREBP se liga a outras duas proteínas: SCAP (SREBP-ativação de clivagem da proteína) e Insig1. Quando os níveis de colesterol caem, a Insig-1 se dissocia do complexo SREBP-SCAP, permitindo que o complexo migre para o aparelho de Golgi, onde a SREBP é clivada pela S1P e S2P (protease sítio 1 e 2), duas enzimas que são ativadas pela SCAP, quando os níveis de colesterol estão baixos (GOLDSTEIN; BROWN *et al.*, 1990).

A SREBP clivada então migra para o núcleo, se liga ao elemento regulatório de esterol (SRE) agindo como um fator de transcrição, que estimula a transcrição de diversos genes. Entre esses, estão o gene receptor da lipoproteína de baixa densidade, o da HMG-CoA sintetase e o da HMG-CoA redutase. O primeiro propicia o maior influxo de LDL da corrente sanguínea e o segundo leva a um aumento da produção de colesterol endógeno. Quando LDL está disponível, as atividades das HMG-CoAs são abolidas e a produção de mevalonato termina. E quando há acúmulo de colesterol ou, a célula para de crescer ou, o gene do receptor de LDL é reprimido (GOLDSTEIN; BROWN *et al.*, 1990).

Mutações no gene P53 são extensamente estudadas e estão presentes em mais da metade dos cânceres. Em recente estudo, utilizando-se culturas 3D de células de câncer de mama foi demonstrado que essas mutações podem se correlacionar com o aumento da expressão de genes que ativam a via do mevalonato contribuindo assim, para o seu fenótipo maligno. Os autores ainda constataram essa correlação e seu significado biológico em pacientes com câncer de mama, ao verificarem que a elevação da atividade da via do mevalonato se correlacionou significativamente com uma taxa mais elevada de p53 mutada, e que estas pacientes tiveram uma sobrevida significativamente diminuída (FREED-PASTOR *et al.*, 2012).

Estes resultados poderão ter implicações terapêuticas, tanto em relação à descoberta de potenciais novos alvos gênicos, quanto para melhor classificar as pacientes em relação ao prognóstico da doença.

Atualmente o ácido zoledrônico é utilizado em terapias primárias de doenças que causam grande reabsorção óssea, incluindo as múltiplas formas de osteoporose (Juvenil, pós-menopausa ou do idoso, induzida por glucocorticóide, induzida por transplante, induzida por imobilidade, relacionada à privação de andrógenos e relacionada ao uso de inibidores da aromatase), doença de Paget do osso, Osteogênese imperfeita, hipercalcemia, câncer primário de osso e câncer de qualquer primário com metastática óssea (DRAKE *et al.*, 2008).

1.7.3.5.1 Estudos pré-clínicos da ação anti-tumoral do ácido zoledrônico

Dados de estudos pré-clínicos, translacionais e em modelos animais indicam que o efeito antitumoral do ZOL possa ocorrer devido à inibição da proliferação de células tumorais (KOTO *et al.*, 2010), indução de apoptose (DI SALVATORE *et al.*, 2011), efeito sinérgico/aditivo a antraciclina, ao paclitaxel e ao letrozol (JAGDEV *et al.*, 2001; OTTEWELL *et al.*, 2008; NEVILLE-WEBBE *et al.*, 2010), inibição da angiogênese (DI SALVATORE *et al.*, 2011), diminuição da invasão e migração das células tumorais (DENOYELLE *et al.*, 2003; HIRAGA *et al.*, 2004), ativação da resposta imune antitumoral celular específica (HAMILTON *et al.*, 2015) e repolarização de macrófagos associados ao tumor (COSCIA *et al.*, 2010).

Estes estudos são importantes para fundamentar as pesquisas clínicas na busca de alternativas terapêuticas que melhorem os resultados de sobrevida, com menor toxicidade e custos mais acessíveis a todos.

1.7.3.5.2 Estudos Clínicos da ação anti-tumoral do ácido zoledrônico

- **Na adjuvância**

A população avaliada nos grandes estudos fase III com a associação do ácido zoledrônico é de mulheres com câncer de mama, em tratamento adjuvante com hormonioterapia, na pós-menopausa, com RH positivo e HER2 negativo.

O estudo Austríaco do Grupo de Estudo de Câncer de Mama e Colorretal (ABCSCG-12) foi o primeiro estudo clínico fase III, adjuvante, desenhado para avaliação da sobrevida livre de doença (SLD) como objetivo principal. Pacientes na pré-menopausa, mas utilizando análogo LHRH (menopausa química) e na pós-menopausa em tratamento hormonal foram randomizadas para a associação ou não do ácido zoledrônico. Como resultado, o estudo demonstrou redução do surgimento de metástases a distância, redução de recidivas locorregional e contralateral, bem como uma tendência para reduzir o risco de morte, no grupo das pacientes na pré-menopausa que realizaram supressão ovariana e tratamento endócrino associados ao ácido zoledrônico (4 mg intravenosa a cada 6 meses durante 3 anos), comparadas com as que não fizeram o ácido zoledrônico (GNANT *et al.*, 2009; GNANT *et al.*, 2015).

O efeito protetor do ácido zoledrônico persistiu mesmo após um seguimento médio de 94,4 meses, com uma redução significativa no risco de eventos (23%) e uma redução no risco de morte (34 %), quando comparadas com as que não fizeram o ácido zoledrônico.

Em outro grande estudo fase III o AZURE, as pacientes com tumor com RH positivo e HER2 negativo foram randomizadas para terapia padrão (qualquer quimioterapia (neo)

adjuvante e/ou terapia endócrina), com ou sem ácido zoledrônico durante três anos. Apesar de também ter tido como objetivo principal a avaliação de SLD, seus resultados são mais difíceis de serem interpretados devido aos benefícios só terem sido encontrados em subpopulações do estudo (COLEMAN *et al.*, 2011). Assim, em um seguimento mediano de 59 meses, não foram encontradas diferenças significativas na DFS na população total do estudo, entretanto no grupo de pacientes que já estavam na pós-menopausa, há mais de cinco anos antes da entrada no estudo, foi encontrado um benefício significativo em termos de DFS com uma redução de risco de metástases à distância de 26% e de recidiva loco-regional de 49% (COLEMAN *et al.*, 2011).

Os resultados destes dois estudos sugerem que os benefícios do ZOL adjuvante podem ser maiores nas pacientes que atingem o bloqueio máximo do estrogênio.

Três outros estudos (Z-FAST, E-ZO-FAST e ZO-FAST) com desenhos semelhantes investigaram o efeito do ácido zoledrônico na densidade mineral óssea como objetivo principal, em pacientes na pós-menopausa com câncer de mama RH positivo e HER2 negativo em uso de inibidor da aromatase (IA) adjuvante. Eles compararam o início precoce da associação do ZOL com o início tardio, tendo a SLD como um dos objetivos secundários.

Os resultados dos três estudos indicam que o início precoce do ZOL em pacientes fazendo uso de IA é mais eficaz na prevenção da perda óssea, em comparação ao início tardio. Acrescido disso, o estudo ZO-FAST também demonstrou benefício em relação à SLD com o tratamento combinado em comparação do uso de IA isolado (BRUFISKY *et al.*, 2012; LLOMBART *et al.*, 2012; COLEMAN *et al.*, 2013).

- **Na neoadjuvância**

Estudos disponíveis na literatura variam muito de objetivo principal e em sua grande maioria são retrospectivos, com pacientes HER2 negativo e receptor hormonal positivo.

O único estudo que incluiu pacientes HER2 positivos foi publicado em 2012 por Chavez-MacGregor M. *et al.* e avaliou a resposta patológica, retrospectivamente, de pacientes que realizaram quimioterapia e vinham em uso de diferentes bifosfonatos orais com intuito de tratar osteoporose/osteopenia. Importante referir que as pacientes com tumor HER2 positivo não utilizaram trastuzumabe na neoadjuvância. A taxa de pRC foi maior no grupo que usou bifosfonato em relação ao grupo que não usou, embora não tenha sido estatisticamente significativa (25.4% e 16%, $p = 0,11$), mas esses resultados são discutíveis devido a problemas na seleção e no tratamento das pacientes incluídas (CHAVEZ-MACGREGOR *et al.*, 2012).

No estudo AZURE, uma análise exploratória, retrospectiva do subgrupo de pacientes que utilizaram ou não o ácido zoledrônico na neoadjuvância, evidenciou que as pacientes que realizaram a combinação tiveram menor doença residual (mediana de 15.5 mm e 27.4 mm respectivamente) e maior taxa de resposta patológica completa (17.7% e 6.9% respectivamente). Esses resultados foram explicados pelos autores, como consequência do efeito antitumoral do ZOL (COLEMAN *et al.*, 2010).

O NEOZOTAC do grupo Holandês de Estudos do Câncer de Mama (BOOG) e o JONIE-1 da Organização Japonesa de Especialistas em tratamentos Neoadjuvantes Inovadores (JONIE) foram estudos clínicos prospectivos, neoadjuvantes, de pacientes com tumor HER2 negativo, com objetivo primário de avaliação da resposta patológica comparativa entre um grupo de tratamento de quimioterapia com ZOL e outro sem. No primeiro estudo, a taxa de pRC não foi diferente entre os dois grupos de tratamento (17% e 16% $p = 0.81$), entretanto, quando se analisou o subgrupo de pacientes na pós-menopausa houve benefício a favor do tratamento combinado (18% e 11%) (CHAREHBILI *et al.*, 2013).

No estudo JONIE-1 houve diferença da pRC entre os dois grupos a favor da combinação (14,8% e 7,7%), e concordante com o estudo NEOZOTAC, este benefício foi também mais consistentemente identificado nas mulheres na pós-menopausa (18,4% e 5,1%). Além disso, também identificou benefício superior no subgrupo das pacientes com tumores triplos negativos (35.3% e 11.8%) (HASEGAWA *et al.*, 2015).

Apesar dos inúmeros estudos moleculares que demonstram um racional para o efeito anti-tumoral do ácido zoledrônico, os estudos clínicos ainda apresentam resultados conflitantes e nenhum biomarcador foi claramente definido como preditor de resposta à essa associação terapêutica.

O enfoque principal do benefício clínico da associação do ácido zoledrônico à quimioterapia tem sido investigado nas pacientes com subtipo tumoral luminal A e B não HER. Porém quando se explora mais detalhadamente o seu mecanismo de ação em relação ao bloqueio da via do mevalonato, é possível inferir que o seu benefício seja mais expressivo para as pacientes que superexpressem o HER2 e que possuam algum tipo de resistência ao bloqueio da porção externa do receptor, pois a prenilação de GTPases, como Ras e Rho é muito importante para a regulação direta de várias vias de sinalização, ou indireta através da integração com outras vias, como a do HER e a do PI3K.

Apesar da evolução no conhecimento dos mecanismos moleculares ligados ao câncer de mama e dos grandes avanços tecnológicos, tanto em relação ao diagnóstico quanto ao tratamento, com o surgimento de drogas direcionadas a alvos moleculares altamente

específicas, a taxa de mortalidade por câncer de mama ainda é extremamente elevada. Por isso é fundamental que se continue a estudar estratégias que minimizem este quadro.

Com base no racional biológico do qual as pacientes com tumores de mama HER2 positivo possam ter maior benefício na associação do ácido zoledrônico com quimioterapia e com o bloqueio do HER2 na neoadjuvância, fomos motivados a realizar um estudo clínico/translacional voltado para a avaliação da eficácia dessa combinação terapêutica relativamente mais barata e com pouca toxicidade, como alternativa à quimioterapia associada ao duplo bloqueio do HER2.

No presente estudo, Zo-NAnTax, demonstramos a eficácia do tratamento concomitante de ácido zoledrônico com quimioterapia baseada em antraciclina, taxane e trastuzumabe na neoadjuvancia de pacientes com câncer de mama HER2 positivo, através da mensuração da taxa de resposta patológica completa, ao final da neoadjuvancia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Demonstrar a eficácia do tratamento neoadjuvante de ácido zoledrônico associado a quimioterapia que consta de quatro ciclos de antraciclina/ciclofosfamida (AC) seguido pela combinação de quatro ciclos de docetaxel com quatro ciclos de trastuzumabe, em pacientes com câncer de mama estágio IIA a IIIB, HER2 positivo, RH positivo e/ou negativo, através da mensuração da taxa de resposta patológica completa (pRC) ao tratamento.

2.2 Objetivos secundários

- 1- Avaliar possíveis associações entre a taxa de resposta patológica completa e variáveis clinicopatológicas.
- 2- Avaliar a tolerância e segurança ao tratamento com o esquema AC seguido de docetaxel e trastuzumabe associados ao ácido zoledrônico, de acordo com critérios de toxicidade do *Common Terminology Criteria for Adverse Events* versão 4.0.
- 3- Avaliar o *compliance* das pacientes frente ao tratamento proposto.
- 4- Identificar genes diferencialmente expressos nas biópsias pré-tratamento das pacientes que foram a resposta patológica completa *versus* as que não foram e as vias de sinalização e os processos biológicos mais relevantes aos quais estão relacionados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

O Zo-NAnTax é um estudo de fase II, com braço único, unicentrico que foi desenhado para avaliar a eficácia da terapia neoadjuvante com AC + ZOL seguido de Doxetaxel + trastuzumabe + ZOL em pacientes portadoras de câncer de mama estágio IIA a IIIB, RH positivos e ou negativos e HER2 positivo através da mensuração da taxa de resposta patológica completa (Figura 3.1). CEP nº 154/10, *ClinicalTrials.gov* nº NCT01472146.

- Variáveis analisadas:
 - Resposta tumoral: - Resposta patológica completa (pRC) e carga de câncer residual (RCB);
 - Clínicas: - Idade, tamanho do tumor, estadiamento clínico, identidade étno-racial (por autodenominação), *status* de menopausa, história familiar de câncer;
 - Histopatológicas: - Por H&E: Tipo histológico, *status* dos receptores hormonais, grau histológico, presença de necrose tumoral, invasão linfovascular e infiltrado linfocítico. Por imunohistoquímica: Ki-67, p53, E-caderina e β -catenina;
 - Segurança: - Eventos adversos;
 - *Compliance*: - Taxa de modificação da dose (somatório do número de redução de dose, omissão e atraso das doses expresso em percentual);
 - Moleculares: - Expressão gênica.

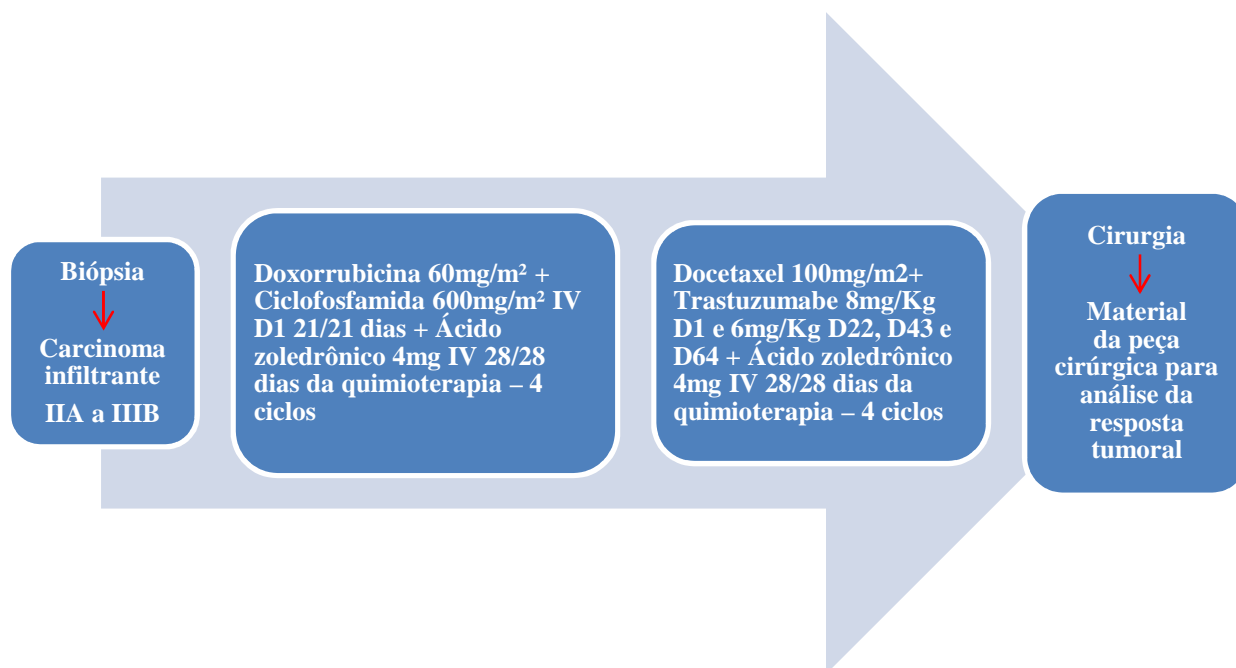


Figura 3.1 – Esquema do tratamento investigacional proposto. As pacientes após terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido realizaram os exames de estadiamento e as que tiveram todos os critérios de inclusão e nenhum de exclusão do estudo foram submetidas a uma biópsia do tumor de mama e posteriormente

iniciaram o tratamento conforme descrito na figura acima. Ao final do tratamento neoadjuvante, a cirurgia da mama foi realizada de acordo com os padrões institucionais e coletado material da peça cirúrgica para estudo de avaliação de resposta terapêutica.

3.2 População Alvo

3.2.1 Consentimento Livre e esclarecido

O Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo 8.4) e protocolo do estudo foram aprovados pelo comitê de ética do INCA (CEP-INCA) (Anexo 8.1), pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 8.2) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Anexo 8.3) antes que qualquer procedimento do estudo fosse realizado.

As pacientes triadas foram esclarecidas sobre todos os procedimentos, riscos e benefícios de participarem do estudo e oferecido o TCLE. As que concordaram voluntariamente em participar, assinaram junto com o investigador o TCLE em duas vias, sendo que uma via foi arquivada no Centro de Pesquisa do HCIII-INCA e a outra entregue à paciente.

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização sobre Boas Práticas Clínicas (GCP) e a Declaração de Helsinki (WHO, 2005).

3.2.2 Critérios de inclusão

- 1- Pacientes do sexo feminino, idade ≥ 18 anos, com câncer de mama invasor, estadios IIA a IIIB, confirmado em estudo histopatológico, com HER-2 positivo ao estudo imuno-histoquímico padrão ou por FISH, RH positivo e/ou negativo e terem assinado o TCLE.
- 2- Estadiamento com tomografia de tórax, abdome e pelve e cintilografia óssea para comprovação da não evidência de doença metastática. Captação suspeita na cintilografia óssea foi avaliada por radiografias simples ou tomografia do segmento suspeito.
- 3- *Performance Status (PS)* do *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)* ≤ 2 .
- 4- Função hematológica adequada, evidenciado através de nível de hemoglobina maior que 9 g/dl, contagem de neutrófilos maior que 1.500/ mm³ e de plaquetas maior que 100.000/ mm³.
- 5- Função hepática adequada, evidenciada por níveis de bilirrubina menores que 1,5 vezes o valor normal e níveis de enzimas hepáticas menores que 2,5 vezes o valor normal.

- 6- Função renal adequada, evidenciada por níveis de creatinina menores que 1,5 vezes o valor normal e/ ou *clearance* estimado de creatinina (Cockcroft) superior a 50 ml/min.
- 7- Função cardíaca dentro dos parâmetros de normalidade da instituição, avaliada por ecocardiograma + Doppler.
- 8- Capacidade de entendimento de um estudo clínico e da necessidade de comparecer regularmente para exames e consultas médicas.

3.2.3 Critérios de exclusão

- 1- Pacientes com história de neoplasia prévia ou atual, exceto câncer de pele não melanoma e carcinoma de colo de útero *in situ*.
- 2- Tratamento prévio do câncer de mama atual com cirurgia, quimioterapia ou hormonioterapia.
- 3- Presença de doença metastática.
- 4- Presença de câncer de mama bilateral.
- 5- Gravidez.
- 6- Presença de neuropatia periférica > Grau 2.

3.3 Tratamento Proposto

Após terem assinado o TCLE (Anexo), as pacientes que tiveram todos os critérios de inclusão e nenhum de exclusão permaneceram no estudo, realizaram biópsia do tumor da mama e após iniciaram esquema de tratamento com doxorrubicina 60mg/m² + ciclofosfamida 600mg/m² por via intravenosa a cada 21 dias por quatro ciclos associados ao ácido zoledrônico 4mg por via intravenosa a cada 28 dias da quimioterapia seguidos de docetaxel 100mg/m² por via intravenosa a cada 21 dias por 4 ciclos associados ao ácido zoledrônico 4mg por via intravenosa a cada 28 dias da quimioterapia e ao trastuzumabe 8mg/Kg na primeira infusão e 6mg/Kg nas outras subsequentes a cada 21 dias por quatro ciclos, com um total de oito ciclos de quimioterapia e quatro de trastuzumabe acrescido de oito ciclos de ácido zoledrônico. Ao final da neoadjuvância as pacientes realizaram cirurgia da mama (Figura 3.1) conforme a rotina institucional do HCIII-INCA (ítem 3.10).

As pacientes que não atenderam aos critérios de inclusão do estudo ou que tinham algum critério de exclusão receberam tratamento conforme a rotina institucional.

3.3.1 Da descontinuação do tratamento/estudo

A paciente pôde sair do estudo e/ou do tratamento a qualquer momento, por quaisquer razões que julgasse correta, sem quaisquer prejuízos no seu cuidado ou na relação com seu médico e a equipe de saúde responsável pelo seu cuidado. Caso viesse a engravidar durante o estudo, seria descontinuada do tratamento do estudo, mas permaneceria no estudo para acompanhamento de riscos e eventuais interferências sobre a fertilidade, a gravidez, o embrião ou o feto, o trabalho de parto e o recém-nascido.

A descontinuidade do estudo só poderia acontecer caso a justificativa apresentada fosse aprovada pelo CEP e não liminarmente pelo pesquisador e/ou o patrocinador, a menos que houvesse um caso de urgência (evidência clínica de progressão de doença, toxicidade limitante), para salvaguardar a proteção das pacientes do estudo e posteriormente, na primeira oportunidade seria comunicado ao CEP.

3.4 Avaliação Clínica, Laboratorial e Radiológica

3.4.1 Avaliação clínica inicial

1 - Exame clínico: avaliação da extensão do tumor por exame físico, ectoscopia, exame da cavidade oral, do sistema pulmonar, cardíaco, gastro-intestinal, urinário, musculo-esquelético e do PS (realizado até 10 dias antes da 1ª infusão da quimioterapia + ZOL e em todas as visitas);

2 - Exames laboratoriais: hemograma completo, bioquímica com prova de função hepática, renal, glicose e eletrólitos, (foram realizados até três semanas antes da 1ª infusão e antes de cada visita); beta-HCG (até uma semana antes da 1ª infusão); FSH, LH e Estradiol foram realizados na triagem. Plasma e soro das pacientes foram armazenados no freezer -80C;

3 - Exames radiológicos: tomografia de tórax, abdome e pelve, cintilografia óssea seguido de raios-X ou tomografia, focado das áreas hipercaptantes (foram realizadas até 60 dias antes da 1ª infusão e na Visita 7, se fosse aplicável), mamografia;

4 - Eletrocardiograma (foi realizado até 60 dias antes da 1ª infusão e na Visita 9).

5 - Ecocardiograma com mensuração de fração de ejeção (foi realizado até 60 dias antes da 1ª infusão e na Visita 5 e 9);

6 – Realização de core biópsia da mama guiada por ultrassonografia para avaliação histopatológica na biópsia;

7 – Avaliação histopatológica na peça cirúrgica após o término do tratamento neoadjuvante;

3.4.2 Avaliação Patológica

Foram realizadas biópsias do tumor de mama e de áreas não tumorais pré tratamento neoadjuvante guiadas por ultra-sonografia nas 60 pacientes que participaram do estudo. Parte do material foi colocada em parafina para análises histológicas e de imuno-histoquímica, e parte foi congelada a -80°C e armazenada no Banco Nacional de Tumores do INCA. O plasma, soro e leucócitos dos pacientes também foi coletado e armazenado.

As análises de histopatologia e imuno-histoquímica (IHC) foram realizadas com biópsia de mama de pré-tratamento e a peça cirúrgica da mama pós-tratamento por dois patologistas experientes em câncer de mama da nossa instituição, que não possuíam nenhuma informação clínica sobre os pacientes.

Avaliação histopatológica para determinar a classificação histológica (LAKHANI *et al.*, 2012), grau histológico (ELSTON *et al.*, 1991), invasão linfovascular (LVI) (ROSEN; OBERMAN, 1993) necrose (GILCHRIST *et al.*, 1993) e infiltração linfocítica estromal (TILs) (LESTER *et al.*, 2009; DENKERT *et al.*, 2010) foram realizadas em lâminas com hematoxilina eosina (H&E).

Os resultados das análises de LVI, TILs e necrose foram classificados como presentes ou ausentes.

Para análise de imunohistoquímica, a coloração foi realizada em seções de tecido de 3 μm de espessura que foram preparadas em lâminas polarizadas. Foi utilizado um controle positivo para cada anticorpo específico nas reações. As seções de tecido foram desparafinadas em xileno e reidratadas com álcool. A recuperação de antigénio foi realizada por um vaporizador em tampão Trilogy a 96°C durante 30 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada usando um Kit de Detecção MaxPolymer MaxPolymer Bloco de Peroxidase (Leica Microsystems) por 5 minutos. Após 3 lavagens durante 5 minutos com solução salina tamponada com Tris com TWEEN-20 (TBST, 0,01%), as lâminas foram incubadas usando um Kit Protein Blocking Novolink Max Polymer Detection (Leica Microsystems) por 5 minutos. As seções foram incubadas com anticorpos para receptores de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RPg), índice de rotulagem Ki-67, p53, HER2, E-caderina (E-CAD) e beta catenina (BCAT) durante a noite em diluições de 1: 1600 RE (clone 1D5), 1: 1600 RPg (clone PgR-636), 1: 600 KI67 (clone MIB-1) e 1: 200 P53 (clone DO-7) e sendo os anticorpos fornecidos pela DAKO Corporation. O 1: 500 HER2 (clone SP2) foi fornecido pela CELL MARQUE e o 1: 1200 E-CAD (clone SPM471) e 1: 100 B-CAT (clone E-5) foram fornecidos pela Santa Cruz Biotechnology. Essas diluições foram determinadas depois de examinar vários esquemas de recuperação e séries de diluição para obter os melhores resultados. No dia seguinte, as seções foram incubadas com um Kit de Detecção de

Polímero de Novolink Máximo de Polímero Primário (Leica Microsystems) Kit por 30 minutos. Após 3 lavagens durante 5 minutos com TBST, as lâminas foram incubadas usando um Kit Polymer Novolink Max Polymer Detection (Leica Microsystems) Kit por 30 minutos. A visualização foi feita com diaminobenzidina (DAB) durante 5 min. As lâminas foram desidratadas, limpas em xileno e montadas com micromount. As marcas foram visualizadas sob um microscópio óptico.

O valor de corte para se considerar RE e RPg positivos foi de 1% das células tumorais positivas com coloração nuclear (DEYARMIN *et al.*, 2013. Receptores hormonais (RH) negativos foram definidos como RE e RPg negativos. Receptor hormonal (RH) positivo foi definido por RE e / ou RPg positivo. O Ki-67 foi classificado como a porcentagem de núcleos de células tumorais positivas contando uma gama de 500 células, incluindo áreas de pontos quentes. A expressão de Ki-67 foi considerada alta quando $\geq 20\%$ das células foram marcadas (BALÁZS *et al.*, 2017).

O status HER2 foi definido de acordo com as diretrizes da ASCO / CAP válidas no momento do diagnóstico. Por diretriz da ASCO / CAP a partir de 2007, a positividade do HER2 por IHC foi definida como pontuação de 3+ com membrana completa e forte e coloração intensa uniforme de $> 30\%$ das células tumorais invasivas. O HER2 duvidoso foi definido como IHC 2+, e a hibridação fluorescente in situ (FISH) deve ser realizada para confirmar a amplificação do gene. O FISH amplificado foi definido como uma relação HER2 / CEP17 de $> 2,2$ ou número médio de cópias do gene HER2 > 6 sinais HER2 / núcleo para sistemas de teste sem uma sonda de controle interno (WOLFF *et al.*, 2013). Para as diretrizes ASCO / CAP a partir de 2013, a positividade de HER2 por IHC foi definida como pontuação 3+ com base na coloração da membrana circunferencial que é completa e intensa. O HER2 duvidoso foi definido como IHC 2+, e a hibridação fluorescente in situ (FISH) deve ser realizada para confirmar a amplificação do gene. O FISH amplificado foi definido como uma relação HER2 / CEP17 ≥ 2 ou número médio de cópias do gene HER2 ≥ 6 sinais / núcleo HER2 para sistemas de teste sem uma sonda de controle interno (WOLFF *et al.*, 2013).

A expressão de p53 foi avaliada de acordo com a proporção estimada de coloração nuclear de células tumorais que foram positivamente coradas e, expressa em porcentagem. Uma pontuação visual de coloração nuclear positiva $\geq 10\%$ nas células do câncer invasivo foi considerado positivo para o p53 (LARA *et al.*, 2011).

A imunopositividade à E-CAD foi determinada comparando a marcação de células tumorais com células epiteliais normais adjacentes e classificadas como expressão positiva se as células tumorais foram coradas tão fortemente quanto as células epiteliais normais e negativas quando a coloração foi muito fraca ou nenhuma (OKA *et al.*, 1993). A intensidade

de coloração para B-CAT foi determinada comparando a marcação de células tumorais com células epiteliais normais adjacentes e classificadas como presente ou ausente para a marcação nuclear e como expressão forte ($> 90\%$ das células tumorais exibiram uniformemente a mesma intensidade e padrão de imunocoloração como as membranas de células epiteliais normais adjacentes), expressão moderada ($\geq 10 \leq 90\%$ das células tumorais exibiu imunocoloração marcada heterogeneamente no citoplasma e membrana) e expressão fraca ($<10\%$ das células tumorais apresentaram imunocoloração), para marcação na membrana plasmática e o citoplasma (KARAYIANNAKIS *et al.*, 2001).

3.5 Avaliação de Resposta patológica

3.5.1 Resposta patológica completa (pRC)

A pRC foi definida como a ausência de carcinoma invasivo residual na mama (no momento da ressecção cirúrgica definitiva) e nos linfonodos sentinelas e/ou linfonodos axilares homolaterais (tumor não invasivo por H&E), ou seja, pacientes com carcinoma *in situ* residual exclusivos, também foram consideradas como tendo uma pRC (CORTAZAR; GEYER, 2015), ao tratamento neoadjuvante padrão associado ao ácido zoledrônico.

3.5.2 Doença residual

Nas pacientes que não atingiram a pRC foi mensurado a carga de câncer de mama residual (RCB) e classificado através da calculadora do *MDAnderson* (Figura 3.2) em: RCB (carga de câncer residual) 0 (pRC), I (doença residual mínima), II (doença residual moderada) e III (doença residual extensa), sendo uma resposta patológica ótima RCB 0 + RCB I (SYMMANS *et al.*, 2007).

THE UNIVERSITY OF TEXAS
MDAnderson
Cancer Center
Making Cancer History®

Request an appointment | You can help: Give now

International Center | English | myMDAnderson | Newsroom | Facebook | Twitter | YouTube | LinkedIn

About Us | Locations | Events | How You Can Help | Careers | Clinical Trials | Contact Us

Patient and Cancer Information | Education and Research | Keyword | Search

Home | E-mail | Print | Text Size

Residual Cancer Burden Calculator

*Values must be entered into all fields for the calculation results to be accurate.

(1) Primary Tumor Bed

Primary Tumor Bed Area: (mm) x (mm)

Overall Cancer Cellularity (as percentage of area): (%)

Percentage of Cancer That Is *In Situ* Disease: (%)

(2) Lymph Nodes

Number of Positive Lymph Nodes:

Diameter of Largest Metastasis: (mm)

Residual Cancer Burden:

Residual Cancer Burden Class:

The following parameters are required from pathologic examination in order to calculate Residual Cancer Burden (RCB) after neoadjuvant treatment:

- The largest two dimensions (mms) of the residual tumor bed in the breast (largest tumor bed if multicentric disease)
- Submission of the entire largest cross-sectional area of the residual tumor bed for histologic mapping, with specific identification of those slides in the pathology report (e.g. "The largest cross-sectional area of primary tumor bed was submitted in cassettes A5 - A9")
 - If the residual tumor is large (i.e. largest diameter > 5 cm), then at least 5 representative cassettes from the largest cross-sectional area are sufficient, but should be identified in the original pathology report (e.g. "representative sections from the largest cross-sectional area of primary tumor bed were submitted in cassettes A5 - A9")
- Histologic assessment of the percentage of the tumor bed area that contains carcinoma (all carcinoma, i.e. invasive and *in situ*), select one of the following:
 - 0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%
 - To assess cellularity it is helpful to scan across the sections of tumor bed and then estimate the average cellularity from the different microscopic fields.
 - When estimating percentage cancer cellularity in any microscopic field, compare the involved area with obvious standards, e.g. more or less than half, one quarter, one fifth, one tenth, one twentieth, etc.
 - Expect there to be variable cellularity within the cross section of any tumor bed, but estimate the overall cellularity from the average of the estimates in different microscopic fields of the tumor bed.
 - e.g. if cellularity in different fields of the tumor bed were estimated as 20%, 10%, 20%, 0%, 20%, 30%, then an average estimate of overall cellularity would be 20%.
- Histologic estimate of the percentage of the carcinoma in the tumor bed that is *in situ*, select one of the following:
 - 0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%
- The number of positive (metastatic) lymph nodes

Figura 3.2 – Calculadora para avaliação da doença residual mínima (DRM), após tratamento neoadjuvante para o câncer de mama. Construída e validada pelo grupo de estudos do *MDAnderson*. Fonte: <http://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3>.

3.6 Avaliação de segurança e ajustes na medicação em função da toxicidade

Para avaliação de segurança, os eventos adversos foram coletados, segundo critérios do *Common Terminology Criteria for Adverse Events* v 4.0, classificados e correlacionados com as drogas utilizadas no estudo, em cada visita agendada e não agendada. Pacientes que apresentaram toxicidade igual ou superior a grau 3 e relacionadas à medicação do estudo suspenderam seu uso até melhora do quadro (recuperação até grau 1 ou nível basal).

O ajuste de dose foi realizado de acordo com as tabelas de correção presentes nas bulas das medicações, incluindo o ajuste para ciclos subsequentes devido a toxicidade hematológica.

Nos casos de neutropenia a redução da dose da quimioterapia nos ciclos subsequentes e/ou o uso de filgrastim 300mcg SC por 3 a 7 dias após, ficou a critério médico.

Nos casos de neutropenia febril foi associado o filgrastim 300mcg SC por 3 a 7 dias após a quimioterapia nos ciclos subsequentes, ficando as reduções de dose da quimioterapia dos ciclos subsequentes a critério médico.

No caso de toxicidade não hematológica, maior ou igual a grau 2 pôde haver ajuste de dose ou suspensão da quimioterapia com antecipação da cirurgia, a critério médico.

3.6.1 Coleta dos eventos adversos

Todos os dados coletados dos EAs foram registrados, armazenados e recuperados por meio de um Formulário de Relato de Caso eletrônico (eCRF), especialmente desenhado para o estudo e monitorado pela Área Representativa de Pesquisa Clínica (ARPC/INCA). Antes do início do estudo, o protocolo e a eCRF foram revisados pelos investigadores e sua equipe. A cada visita das pacientes os investigadores registraram os eventos adversos, eventos adversos sérios e adesão ao tratamento.

3.7 Avaliação do *compliance*

Para explorar o *compliance* com o tratamento do estudo, foram escolhidas três variáveis: número de redução de dose, omissão e atraso de doses das drogas (modificações da dose).

As modificações da dose (DM) foram expressas em porcentagem do tratamento sub-ótimo. O número de doses atrasadas foi considerado para doses com ≥ 3 dias de atraso em relação à programação planejada. O *compliance* foi expresso em porcentagem e considerado tratamento ótimo quando a soma das porcentagens de tratamento sem modificação da dose foi $\geq 85\%$ (CHIRIVELLA *et al.*, 2009).

3.8 Análise do perfil de expressão gênica nos tecidos tumorais

As amostras de tecidos pareadas foram coletadas antes e após os 08 ciclos de quimioterapia neoadjuvante combinada (AC x 4 + ZOL seguidos de DOC x 4 + trastuzumabe x 4 + ZOL x 4). As alíquotas identificadas foram imediatamente congeladas (snap-frozen) em nitrogênio líquido por um técnico, seguindo procedimentos padrões e após, transferidas para armazenamento definitivo em freezer -80C no laboratório do CEMO-INCA.

3.8.1 Extração de RNA total

Para os ensaios de *microarray*, o RNA das biópsias foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, as biópsias foram lisadas com 350 µL de tampão RLT. Posteriormente foi adicionado um volume de etanol 70% e agitado gentilmente com pipeta. Metade dessa solução (350µL) foi transferida para a coluna de purificação que foi centrifugada a 8.000g por 15 segundos e o eluído foi descartado. O restante da amostra (350µL) foi adicionado à coluna de purificação e novamente centrifugado a 8.000g por 15 segundos e o eluído descartado. Adicionamos 700µL de tampão RW1 à coluna de purificação que foi novamente centrifugada a 8.000g por 15 segundos e o eluído descartado. Adicionamos 500µL de tampão RPE à coluna de purificação que foi centrifugada a 8.000g por 15 segundos e o eluído descartado. O processo foi repetido e novamente 500µL de tampão RPE foi adicionado à coluna, centrifugada a 8.000g por 2 minutos e posterior descarte do eluído. Em seguida, a coluna foi centrifugada a 22.000g por um minuto a fim de eliminar todo líquido remanescente. Para eluição do RNA, foram adicionados 25µL de água livre de RNase a coluna e a mesma foi centrifugada a 8.000g por 1 minuto. O eluído correspondente ao RNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific, EUA). A avaliação da integridade do RNA extraído foi realizada com o auxílio do Agilent 2000 Bioanalyzer, de acordo com as instruções do fabricante.

3.8.2 *Microarray*

Para o ensaio de *microarray*, cem nanogramas (100ng) de RNA total foram marcados e hibridizados no Agilent Human GE 4x44K *microarray* (Agilent Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. Os *arrays* foram escaneados utilizando o Agilent *microarray scanner* (Agilent Technologies). Os dados obtidos foram então analisados com o auxílio dos softwares *Feature Extraction* v11.0 e Agilent GeneSpringGX v12.1 (Agilent Technologies).

3.8.3 Análise *in silico*

Para as análises *in silico* utilizamos o software Metacore™ (GeneGO Inc. EUA) no intuito de identificarmos as vias de sinalização e os processos biológicos mais relevantes nas quais os genes diferencialmente expressos estão relacionados.

3.9 Acompanhamento clínico

Após realização dos exames de *screening* e confirmação dos critérios de inclusão e exclusão, as pacientes iniciaram o tratamento de acordo com o esquema de tratamento proposto. A cada consulta médica as pacientes coletaram sangue para avaliação de toxicidade hematológica e armazenamento de amostra, elas também realizaram exame clínico das mamas para acompanhamento do comportamento clínico do tumor e das cadeias de drenagem frente ao tratamento, da cavidade oral, do sistema pulmonar, cardíaco, gastro-intestinal, urinário e musculo-esquelético. Após o término do tratamento neoadjuvante e da realização da cirurgia da mama, as pacientes retornaram à consulta clínica para registro e avaliação da resposta patológica do tumor e seguimento com o tratamento adjuvante padrão.

3.10 Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico realizado após a neoadjuvância foi definido de acordo com o estadiamento inicial do tumor e a resposta clínica ao tratamento sistêmico e foi dividido em tratamento conservador (segmentectomia com esvaziamento axilar e segmentectomia com pesquisa de linfonodo sentinela) e tratamento radical (mastectomia radical com esvaziamento axilar e mastectomia radical com pesquisa de linfonodo sentinela).

3.11 Coleta de dados e dos eventos adversos

Todos os dados coletados para o propósito do estudo foram registrados, armazenados e recuperados por meio de um Formulário de Relato de Caso eletrônico (eCRF), especialmente desenhado para o estudo e monitorado pela Área Representativa de Pesquisa Clínica (ARPC/INCA). Antes do início do estudo, o protocolo e o eCRF foram revisados pelos investigadores e sua equipe. A cada visita das pacientes os investigadores registraram todas as informações requeridas no eCRF, incluindo dados iniciais, dados do tratamento, dados clínicos de seguimento, dados de laboratório e de imagem.

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o SPSS versão 18 (SPSS, Chicago, IL). Para o cálculo do número de pacientes (n) a serem incluídas foi assumido H_0 (hipótese nula) $P = 0,1$ e H_a (a hipótese alternativa) $P = 0,2$ com um nível de significância de 0,1% e 80% de potência e foi usado um método de Fleming de um estágio, resultando em um “n” de 56 pacientes para que fosse detectado um mínimo e uma máxima taxa de pCR de 0,22 e 0,35, respectivamente.

As respostas patológicas foram calculadas como porcentagens de todas as pacientes submetidas à cirurgia após o tratamento neoadjuvante. As características basais, os eventos adversos, o *compliance* e o tipo de cirurgia realizada das pacientes foram apresentados como porcentagens, medianas e intervalos.

A associação entre características clinicopatológicas e pRC (RCB 0) foi calculada pelo teste do qui ao quadrado (X^2) de Pearson ou teste exato de Fisher de acordo com os pressupostos estatísticos.

A análise de eficácia foi realizada para todas as pacientes que foram submetidas à cirurgia da mama e a de segurança para todas as pacientes que fizeram pelo menos um curso de tratamento neoadjuvante.

4 RESULTADOS

4.1 População do estudo

De novembro de 2012 a julho de 2016 setenta e uma pacientes com tumor de mama HER2 positivo assinaram o TCLE para participarem do estudo Zo-NAnTax. Dez pacientes não permaneceram no estudo devido ao diagnóstico de doença metastática nos exames de *screening*, uma paciente foi falha de *screening*, pois era estágio IIIC e duas, ao final do tratamento sistêmico não concordaram em realizar a cirurgia da mama comprometida, porque tinham atingido resposta clínica completa, apesar de terem sido esclarecidas da diferença de resposta clínica completa e resposta patológica completa em relação aos riscos de recidiva e morte pelo câncer de mama. Cinquenta e oito pacientes realizaram o tratamento neoadjuvante investigacional e a cirurgia da mama acometida, de acordo com a rotina institucional (Figura 4.1).

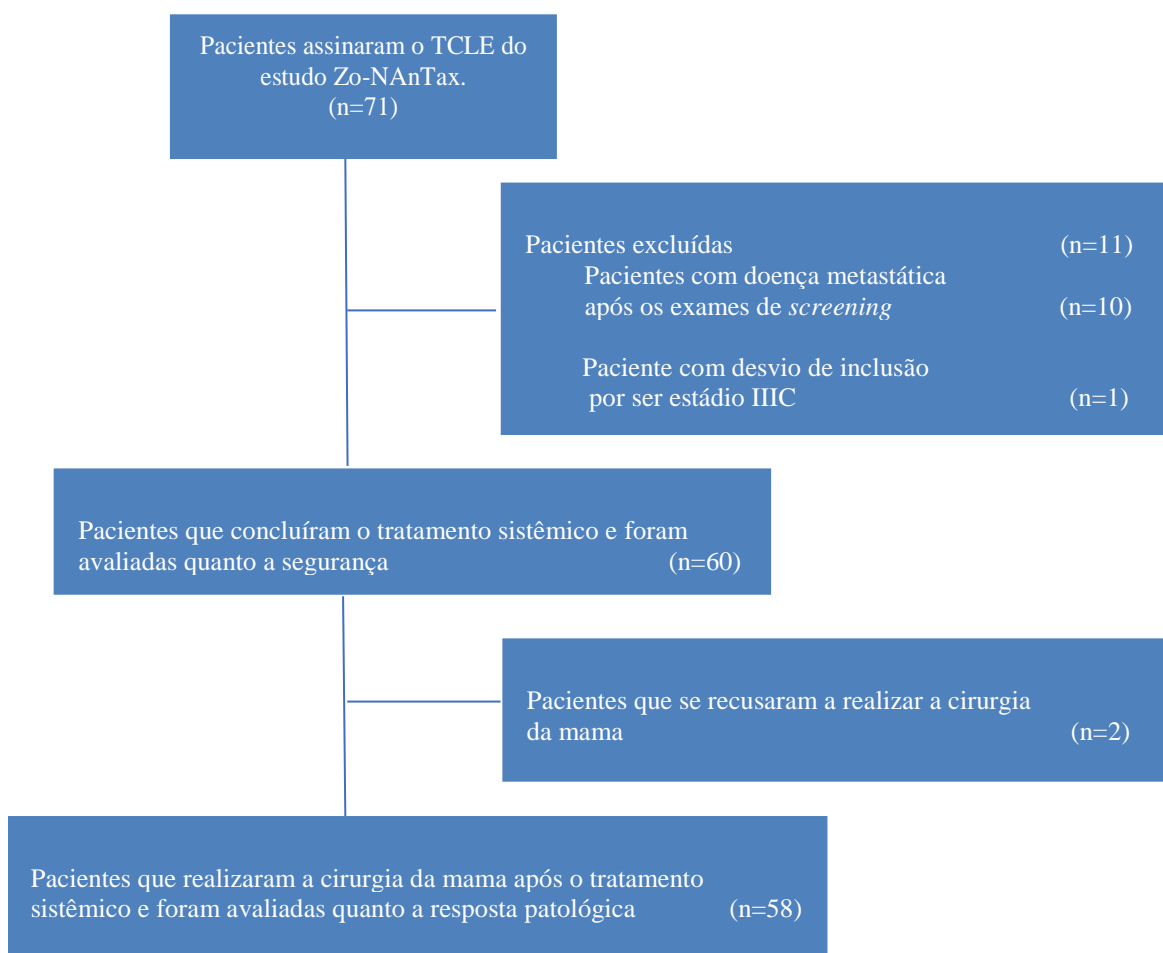


Figura 4.1 – Diagrama de Fluxo das pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Setenta e uma pacientes assinaram o TCLE. Onze pacientes foram *screening failure*, sendo dez por ter doença metastática após ter realizado exames de *screening* e uma por ser estágio IIIC. Das sessenta pacientes restantes, duas, após o término do tratamento sistêmico se recusaram a operar a mama por que tinham atingido resposta clínica completa, mas não retiraram o TCLE.

As características basais estão sumarizadas na Tabela 4.1. Sessenta pacientes foram incluídas, sendo 18% estadio IIA, 37% estadio IIB, 17% estadio IIIA e 28% estadio IIIB. O tamanho do tumor variou de 15 a 120 mm, com mediana de 61mm. Trinta e uma pacientes (52%) tinham axila clinicamente positivas. A idade variou de 26 a 74 anos, com mediana de 54 anos, sendo que 67% estavam na menopausa. Dezesesseis pacientes (27%) tinham história de pelo menos um parente com câncer de mama ou ovário. A maioria das pacientes se autodenominaram brancas (42%), 20% pretas e 38% pardas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Características clínicas basais e demográficas de todas as pacientes tratadas sistemicamente

Características	n%
Número de pacientes incluídas	60 (100)*
Idade, em anos	
Mediana	54 (26 – 74)
≤ 45	15 (25)
>45	45 (75)
Tamanho do tumor inicial em mm	
mediana	61 (15 – 120)
Status de menopausa	
Pré-menopausa	20 (33)
Pós-menopausa	40 (67)
Comprometimento clínico da axila	
N0	29 (48)
N1 + N2	31 (52)
Estadiamento	
IIA	11 (18)
IIB	22 (37)
IIIA	10 (17)
IIIB	17 (28)
História familiar de câncer	
Qualquer tipo de câncer	13 (22)
Câncer de mama/ovário	16 (27)
Sem história	31 (52)
Identidade étnico-racial	
Branca	25 (42)
Preta	12 (20)
Parda	23 (38)

*número de pacientes incluídas e que realizaram o tratamento sistêmico e N é o número de linfonodos axilares comprometidos de acordo com a classificação TNM.

Dados histopatológicos e de imunohistoquímica das sessenta pacientes incluídas demonstraram que todas as pacientes tinham carcinoma do tipo ductal infiltrante (CDI) e eram HER2 positivas e/ou FISH positivo, quarenta e quatro (72%) tinham RE e/ou RPg positivos e

dezesseis (28%) tinham os RE e RPg negativos. O grau histológico predominante foi o grau 2 (53%), não haviam pacientes com tumor grau 1 (Tabela 4.2)

Tabela 4.2 – Características histopatológicas e de imunohistoquímica basais de todas as pacientes tratadas sistemicamente

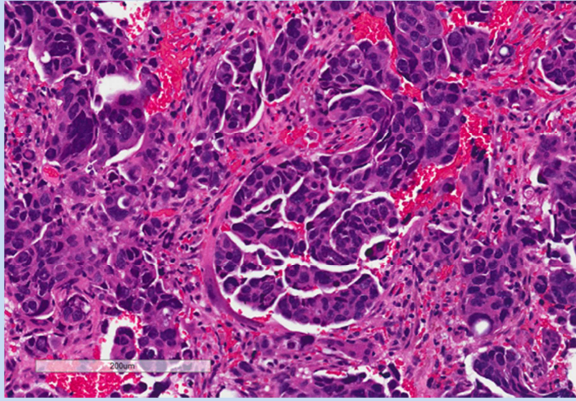
Características	n%
Número de pacientes incluídas	60 (100)*
Tipo Histológico	
CDI	60 (100)
CLI	0
Outros infiltrantes	0
Grau Histológico	
G2	31 (53)
G3	27 (47)
Receptores Hormonais	
RE e/ou RPg positivos	44 (72)
RE e RPg negativos	16 (28)
HER2	
Negativo	0 (0)
Positivo por IHQ/FISH	60 (100)

*número de pacientes incluídas e que realizaram o tratamento neoadjuvante sistêmico. CDI – Carcinoma Ductal Infiltrante, CLI – Carcinoma Lobular Infiltrante; RE – Receptor de Estrogênio, RPg – Receptor de progesterona, HER2- Human Epidermal growth factor Receptor-type 2, IHQ – Imunohistoquímica, FISH - Hibridização *in situ* por fluorescência.

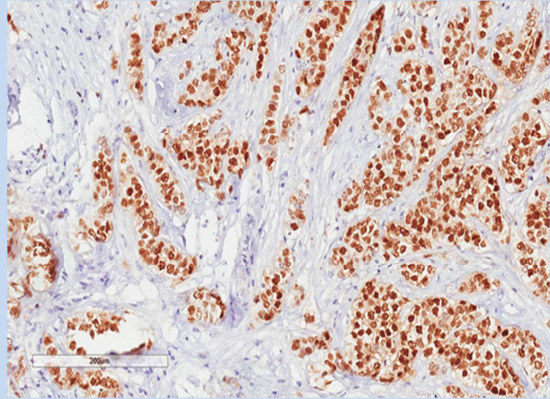
4.1.1 Resultados da avaliação dos marcadores moleculares de prognóstico, por imunohistoquímica, das pacientes que realizaram o tratamento sistêmico e cirúrgico propostos.

Marcadores moleculares de prognóstico foram avaliados nas biópsias das cinquenta e oito pacientes com CDI de mama incluídas no nosso estudo, que realizaram o tratamento sistêmico e o cirúrgico e estão sumarizados na tabela 4.3. Exemplos de imunomarcações positivas, em pacientes do nosso estudo, podem ser vistas na figura 4.2.

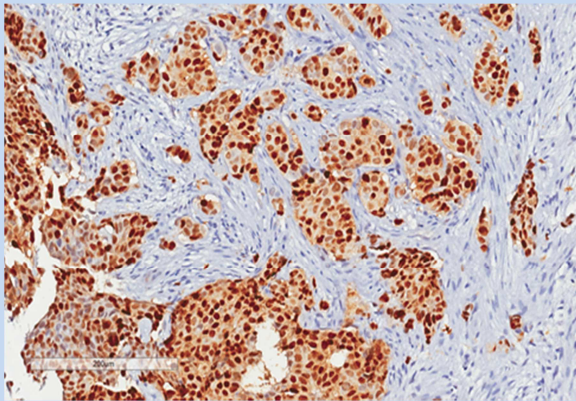
A) CDI de mama H&E



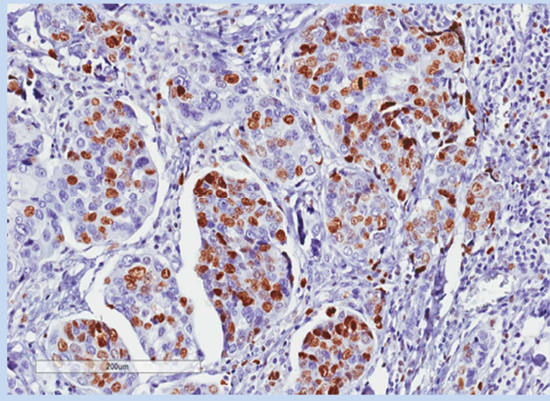
B) Receptor de Estrogênio positivo



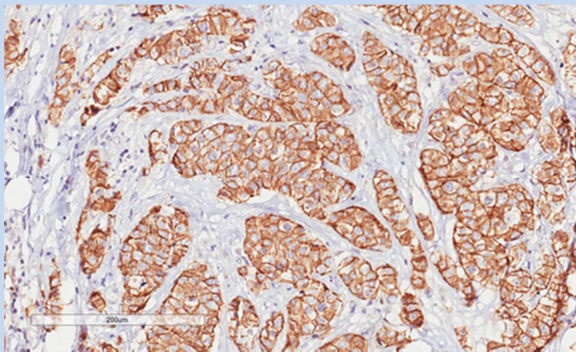
C) Receptor de Progesterona positivo



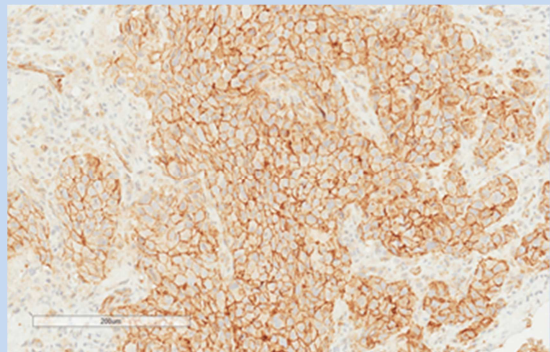
D) ki-67 positivo



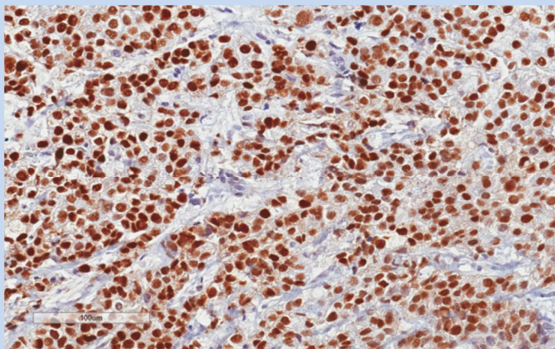
E) E-caderina positiva



F) β -Catenina positiva



G) p53 positivo



H) HER2 positivo

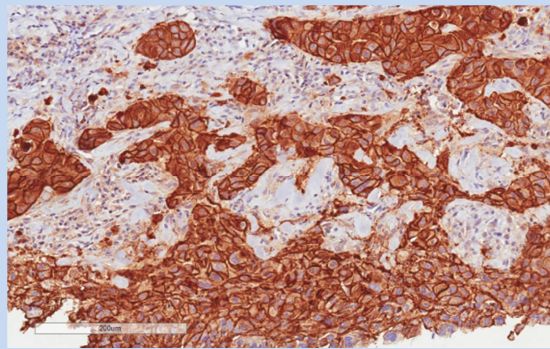


Figura 4.2 – Exemplo do diagnóstico patológico de CDI de mama por H&E e dos marcadores moleculares de prognóstico com marcação positiva por imunohistoquímica de pacientes do estudo. (A) Lamina representando carcinoma ductal infiltrante de mama por H&E e lamina representando imunohistoquímica positiva para o

receptor de estrogênio (B), receptor de progesterona (C), Ki-67 (D), E-caderina (E), β -catenina (F), p53 (G) e HER2 (H) (*aperio scan scope microscope slide scanner*: utilizado escanear as lâminas – x20 + foto com objetiva x10), da biópsia de pacientes do estudo pré-tratamento neoadjuvante.

A análise dos marcadores moleculares de prognóstico evidenciou que três (5%) pacientes tinham invasão linfovascular, onze (19%) tinham necrose, trinta e quatro (59%) tinham infiltrado linfocítico, cinquenta e três (91%) tinham $\text{ki-67} \geq 20$, trinta e três (59%) tinham $\text{p53} \geq 10$, quarenta e sete (84%) tinham marcação forte e moderada da membrana para β -catenina e em todas as pacientes a E-caderina estava presente (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Distribuição das pacientes segundo marcadores moleculares de prognóstico na biópsia da mama, pré-tratamento neoadjuvante

Características	n%
Número de pacientes incluídas	58 (100)*
Invasão linfovascular	
Presente	3 (5)
Ausente	55 (95)
Necrose	
Presente	11 (19)
Ausente	47 (81)
Infiltrado linfocítico	
Presente	34 (59)
Ausente	24 (41)
Ki-67[§]	
< 20%	5 (9)
$\geq 20\%$	53 (91)
p53 (n=56)^{‡,§}	
< 10%	23 (41)
$\geq 10\%$	33 (59)
β catenina (n=56)^{‡,§}	
Marcação positiva:	
Forte e moderada membrana	47 (84)
Positiva núcleo/citoplasma	9 (16)
E-caderina	
Positiva	58 (100)

*número de pacientes incluídas e que realizaram o tratamento neoadjuvante sistêmico. [‡]n=56 porque o material da biópsia de duas pacientes foi consumido. [§]imunohistoquímica foi realizada de acordo com a prática local

4.2 Resultados da Resposta Patológica

Na cirurgia, vinte e quatro (42%) das pacientes alcançaram pRC (RCB 0), nove (15%) doença residual mínima (RCB I), gerando uma resposta patológica ótima (RCB 0 + RCB I) de 57% (Tabela 4.4). Não houve aumento do tumor mamário durante o tratamento neoadjuvante, e todas as pacientes tiveram condições de serem submetidas a cirurgia mamária. Apesar desse

fato, duas pacientes optaram por não se submeter a cirurgia porque tiveram resposta clínica completa, mesmo após terem sido esclarecidas sobre as implicações de suas escolhas.

Tabela 4.4 – Distribuição das pacientes segundo resultados da resposta patológica

Características	n%
Número de pacientes incluídas	58 (100)
Resposta completa – RCB 0	
Sem doença residual	12 (21)
Com CDIS residual	12 (21)
Total de pacientes com Resposta completa	24 (42)
Resposta Parcial	
RCB I	9 (15)
RCB II	20 (34)
RCB III	5 (9)
Total de pacientes com resposta parcial	34 (58)

RCB - carga de câncer residual, CDIS – Carcinoma Ductal *in Situ*.

4.3 Avaliação das possíveis associações entre a taxa de resposta patológica completa e variáveis clinicopatológicas

A análise exploratória da associação entre a taxa de pRC e diferentes subgrupos está sumarizada na tabela 4.5. Pode-se observar que a taxa de pRC é significativamente maior nas pacientes com expressão de β -catenina em núcleo / citoplasmática ($p = 0,030$) e tem uma tendência a superioridade quando o Ki-67 está elevado ($p = 0,070$). Nenhuma das outras variáveis clinicopatológicas avaliadas no estudo mostrou associação com pRC.

Tabela 4.5 – Associação entre resposta patológica completa (RCB 0) e características clinicopatológicas basais

Variáveis	Resposta patológica				Total		p-valor ^a
	Completa		Parcial		n	%	
	n	%	n	%			
	24	(42)	34	(58)	58	(100)	NA
Idade, anos							
≤ 45	4	(17)	10	(29)	14	(24)	0.356
>45	20	(83)	24	(71)	44	(76)	
Status clínico do linfonodo axilar							
N0	14	(58)	14	(41)	28	(48)	0.198
N1 +N2	10	(42)	20	(59)	30	(52)	
Estadiamento clínico*							
IIA + IIB	15	(63)	17	(50)	32	(55)	0.346
IIIA + IIIB	9	(37)	17	(50)	26	(45)	
Grau histológico[†]							
2	13	(54)	18	(53)	31	(53)	0.927
3	11	(46)	16	(47)	27	(47)	
Receptor Hormonal[§]							
RE e/ou RPg positivos	17	(71)	25	(74)	42	(72)	0.821
RE e RPg negativos	7	(29)	9	(26)	16	(28)	
Invasão linfovascular							
Presente	1	(4)	2	(6)	3	(5)	1.000
Ausente	23	(96)	32	(94)	55	(95)	
Necrose							
Presente	5	(21)	6	(18)	11	(19)	0.760
Ausente	19	(79)	28	(82)	47	(81)	
Infiltrado linfocítico							
Presente	15	(63)	19	(56)	34	(59)	0.614
Ausente	9	(37)	15	(44)	24	(41)	
Índice de Ki-67[§]							
< 20	0	(0)	5	(15)	5	(9)	0.070
≥ 20	24	(100)	29	(85)	53	(91)	
p53 (n=56)^{‡,§}							
< 10	7	(30)	16	(48)	23	(41)	0.177
≥ 10	16	(70)	17	(52)	33	(59)	
β-catenina (n=56)^{‡,§}							
Marcação positiva:							
Forte e moderada membrana	17	(71)	30	(94)	47	(84)	0.030
Presente no núcleo/citoplasma	7	(29)	2	(6)	9	(16)	
E-caderina (n=56)^{‡,§}							
Positiva	23	(96)	33	(97)	56	(100)	NA.
Negativa	0	(0)	0	(0)	0	(0)	

RE, receptor de estrogênio; RPg, receptor de progesterona; RCB, carga de câncer residual, pRC, resposta completa patológica; NA, não aplicável.

^a Para idade, invasão linfovascular, índice Ki-67 e β-caderina foi utilizado o teste exato de Fisher.

^{*} Classificação TNM de acordo com a União Internacional Contra o Câncer. [†] Classificação segundo Bloom-Richardson, [§] A imunohistoquímica foi realizada de acordo com a prática local.

[‡] n = 56 porque o material foi consumido em duas pacientes.

4.4 Segurança

A avaliação da segurança ao protocolo proposto foi realizada em todas as pacientes que fizeram pelo menos um curso de tratamento neoadjuvante (n = 60) e demonstrou que os eventos adversos gastrointestinais graus 1 e 2 foram os mais frequentes (Tabela 4.6).

Dezessete (28%) pacientes tiveram eventos adversos relacionados com o ácido zoledrônico sendo, 29% de grau 1 (mialgia; 3 pacientes e febre; 2 pacientes) e 71% de grau 2 (mialgia; 6 pacientes, artralgia; 4 pacientes e febre; 2 pacientes). Nenhuma paciente apresentou disfunção cardíaca ou osteonecrose de mandíbula em qualquer grau.

Não houve evento adverso grau 5 no período da neoadjuvância. Três (5%) pacientes tiveram eventos grau 4 (neutropenia febril; 2 pacientes e neutropenia; 1 paciente). Trinta e nove (65%) pacientes apresentaram eventos adversos grau 3; neutropenia febril (20%, 12 pacientes) e diarreia (12%, 7 pacientes) foram os mais comuns (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Distribuição das pacientes segundo a ocorrência dos eventos adversos

	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Todos os graus
Eventos adversos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Alopecia	0	60 (100)	-	-	60 (100)
Náusea [§]	23 (38)	23 (38)	1 (2)	0	47 (78)
Mialgia	12 (20)	32 (53)	0	0	44 (73)
Mucosite [§]	23 (38)	18 (30)	1 (2)	0	42 (70)
Fadiga	18 (30)	20 (33)	4 (7)	0	42 (70)
Diarreia [§]	12 (20)	15 (25)	7 (12)	0	34 (57)
Prisão de ventre [§]	18 (30)	11 (18)	0	0	29 (48)
Artralgia	11 (18)	17 (28)	0	0	28 (46)
Vômito [§]	14 (23)	10 (17)	1 (2)	0	25 (42)
Febre	17 (28)	4 (7)	1 (2)	0	22 (37)
Afecções dos tecidos subcutâneos e cutâneos [§]	10 (17)	11 (18)	0	0	21 (35)
Distúrbios respiratórios e torácicos	13 (22)	5 (8)	0	0	18 (30)
Infeções e inflamações [*]	8 (13)	6 (10)	3 (5)	0	17 (28)
Neutropenia febril	0	2 (3)	12 (20)	2 (3)	16 (26)
Anemia	2 (3)	14 (23)	0	0	16 (26)
Anorexia	6 (10)	7 (12)	0	0	13 (22)
Dor de estômago [§]	8 (13)	3 (5)	0	0	11 (18)
Sintoma semelhante a gripe	9 (15)	1 (2)	0	0	10 (17)
Dor de cabeça	7 (12)	3 (5)	0	0	10 (17)
Neutropenia	0	4 (7)	4 (7)	1 (2)	9 (16)
Distúrbios gerais [¥]	5 (8)	2 (3)	2 (3)	0	9 (14)
Membros de edema	6 (10)	2 (3)	0	0	8 (13)
Síndrome de eritrodismestesia palmar-plantar	0	1 (2)	0	0	8 (13)
Disgeusia	6 (10)	2 (3)	0	0	8 (13)
Ansiedade e depressão	5 (8)	3 (5)	0	0	8 (13)
Dor no osso	2 (3)	5 (8)	0	0	7 (11)
Hiperglicemia	0	5 (8)	2 (3)	0	7 (11)
Dor abdominal [§]	5 (8)	1 (2)	0	0	6 (10)
Neuropatia motora periférica	5 (8)	1 (2)	0	0	6 (10)
Tontura	4 (7)	0	1 (2)	0	5 (9)
Hipertensão	0	3 (5)	0	0	3 (5)
Sonolência	2 (3)	0	0	0	2 (3)
Perda de peso	1 (2)	0	0	0	1 (2)
Disfunção cardíaca	0	0	0	0	0
Osteonecrose de mandíbula	0	0	0	0	0

[§] Os eventos gastrointestinais incluíram náuseas, mucosas, vômitos, diarreia, constipação, dor estomacal e dor abdominal.

[§] As alterações do tecido subcutâneo e cutâneo incluíram eritema, prurido, acne e alterações nas unhas.

[†] Os distúrbios respiratórios e torácicos incluíram asma brônquica, tosse seca definitiva, dor de garganta e rinite alérgica.

^{*} Infeções e inflamações incluíram infecções e inflamações da pele ou dentes (sem osteonecrose de mandíbula), infecção urinária, pneumonia, amigdalite e infecção respiratória do trato superior.

[¥] Distúrbios gerais incluíram hiperuricemia, distúrbios hepatobiliares e disfunção renal.

4.5 Compliance ao tratamento proposto

Na tabela 4.6 é demonstrado a taxa de *compliance* de acordo com a etapa de tratamento realizada em 59 pacientes, através da verificação da taxa de modificação de dose (MD). Uma paciente não foi incluída na análise por ter desistido do tratamento precocemente (após 4 ciclos de AC + ZOL). No total, foram realizados 226 (96%) ciclos de AC, 202 (86%) ciclos de DOC, 235 (99%) ciclos de trastuzumab e 431 (91%) ciclos de ZOL.

Na fase de tratamento com docetaxel foi onde ocorreu a maior taxa de MD (14%), devido aos eventos adversos (neutropenia febril e fadiga). Em relação ao ácido zoledrônico, a taxa de MD foi de 9% principalmente por efeito dos eventos adversos prolongados do docetaxel, porque, de acordo com o protocolo, o ZOL era infundido 1 semana após a quimioterapia, período no qual as pacientes ainda apresentavam toxicidade ao DOC.

Tabela 4.7 - Taxa de *compliance* distribuída pelo tipo de medicamento utilizado no regime de quimioterapia neoadjuvante

	AC n (%)	Docetaxel n (%)	Trastuzumabe n (%)	ZOL n (%)
Modificações de dose *	236 (100)	236 (100)	236 (100)	472 (100)
Doses de redução	2	15	0	0
Atraso da dose [§]	7	18	0	21
Omissão de dose	1	1	1	20
Total de tratamentos completos	226 (96)	202 (86)	235 (99)	431 (91)

AC, doxorubicina e ciclofosfamida; ZOL, ácido zoledrônico.

* As modificações da dose foram apenas analisadas em 59 pacientes porque uma teve falta de adesão precocemente a quimioterapia.

§ Foi considerada dose de atraso apenas para doses com ≥ 3 dias de atraso em relação ao cronograma planejado.

4.6 Análise da expressão gênica diferencial de pacientes que tiveram pRC ao tratamento *versus* as que ficaram com doença residual

Para avaliarmos a diferença de expressão gênica global entre as pacientes que obtiveram pRC e as que tiveram resposta patológica incompleta após realizarem o protocolo de tratamento investigacional realizamos ensaios de *microarray*.

Neste ensaio foram utilizadas para análise, amostras de biópsias do tumor de mama de dezoito pacientes antes do tratamento, sendo que dessas, quatro pacientes tinham tido pRC (sem componente *in situ* [CDIS]) e quatorze ficaram com doença infiltrante residual na mama, após o tratamento.

Como ponto de corte, selecionamos os genes diferencialmente expressos com expressão diferencial de no mínimo 2 vezes para mais ou para menos. Assim, determinamos os genes aumentados e diminuídos na comparação. Em nossos resultados, encontramos 267 genes diferencialmente expressos sendo que 129 desses genes foram encontrados aumentados

nas pacientes com pRC e 138 diminuídos quando comparados com pacientes com doença residual (Figura 4.3). A lista dos genes diferencialmente expressos encontra-se no anexo 8.6.

GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS TOTAL	n 267
Genes aumentados nas pacientes com pRC	129
Genes diminuídos nas pacientes com pRC	138

Figura 4.3 – Distribuição numérica dos genes diferencialmente expressos (aumentados e diminuídos) nas amostras do tumor das pacientes que obtiveram pRC (sem CDIS) *versus* as que ficaram com doença residual na mama.

Esses resultados foram dispostos em *cluster*, utilizando o programa GeneSpring, e estão apresentados na figura 4.4.

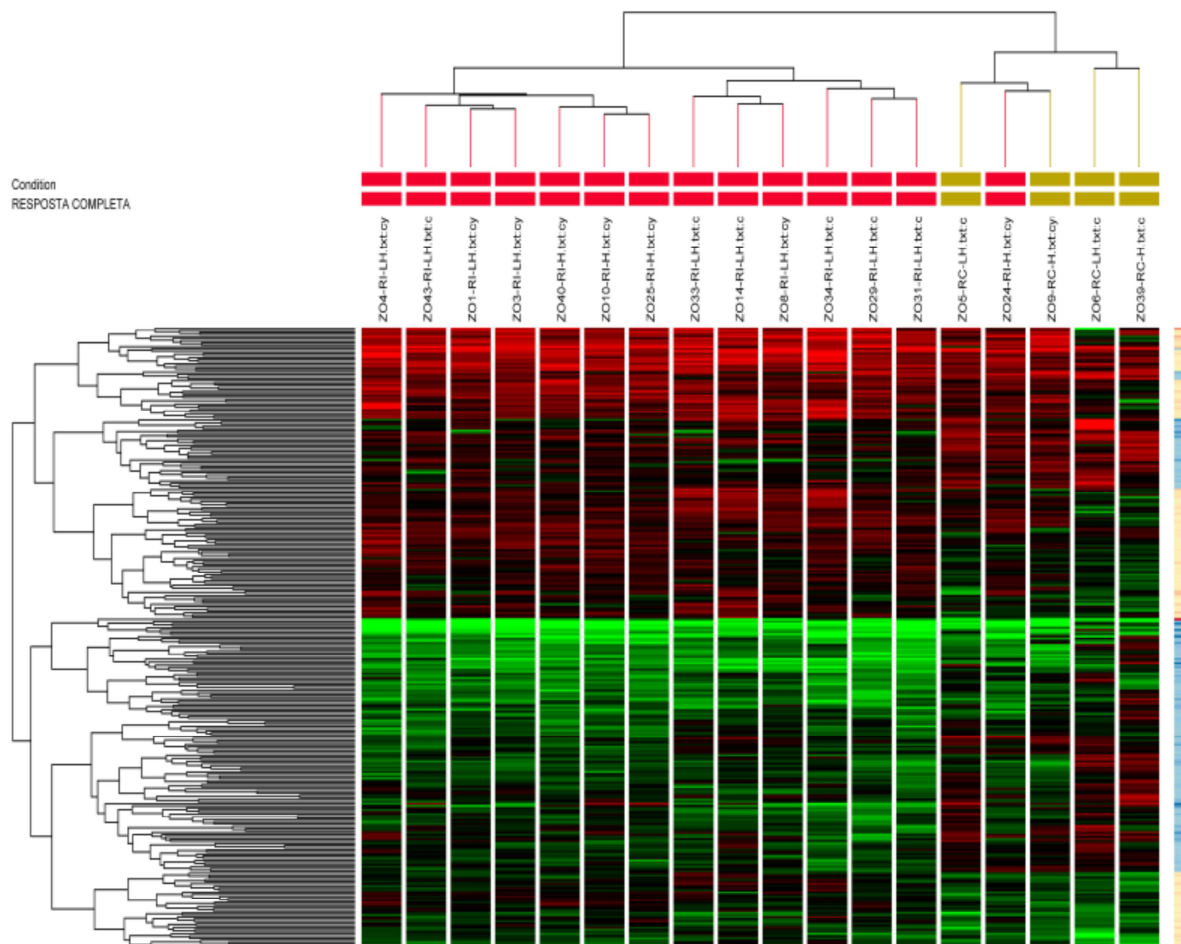


Figura 4.4 - Apresentação em forma de *cluster* dos 267 genes diferencialmente expressos encontrados no ensaio de microarray. Para esse ensaio foram utilizadas dezoito amostras das pacientes do estudo, sendo quatro de pacientes com pRC (sem CDIS) ao tratamento e quatorze de pacientes que ficaram com doença residual. Em **vermelho** os genes aumentados e em **verde** os diminuídos. RC-resposta completa; RI-resposta incompleta; Z-amostras do estudo Zo-NANTax; H-subtipo HER, LH-subtipo luminal HER, CDIS - carcinoma ductal *in situ*.

Nesta análise é possível ver que as pacientes com pRC se separam das que mantiveram doença residual pelo perfil de expressão não importando o grau do tumor e a expressão ou não de RH. No entanto, uma paciente que apresentou doença residual se agrupou com as pacientes com pRC.

Para tentar entender este fato analisamos os dados clínicos desta paciente, que apesar de apresentar doença residual mostrou expressão gênica de pacientes com pRC. Esta paciente tinha tumor grau 2, sem expressão de receptores hormonais (subtipo HER). Por outro lado, entre as quatro pacientes com pRC; duas tinham RH negativo (subtipo HER) e duas tinham RH positivo (subtipo luminal HER) o que indica que a positividade ou não dos RH não pode explicar o porque desta paciente ter se agrupado de forma diferente.

Tendo em vista estes resultados resolvemos incluir as pacientes com CDIS residual no grupo considerado como pRC e comparar com aquelas que tiveram a presença de doença residual invasiva. A clusterização destas análises de expressão gênica, considerando um ponto de corte em 1,5X de diferença de expressão gênica, indica uma separação perfeita entre os dois grupos de pacientes como pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 4.5). Nesta análise foram encontrados 182 genes diferencialmente expressos, sendo 91 aumentados em sua expressão e 91 com expressão diminuída. Para esse ensaio foram utilizadas vinte e três amostras, sendo nove de pacientes com pRC (com CDIS) ao tratamento e quatorze de pacientes que ficaram com doença residual invasiva.

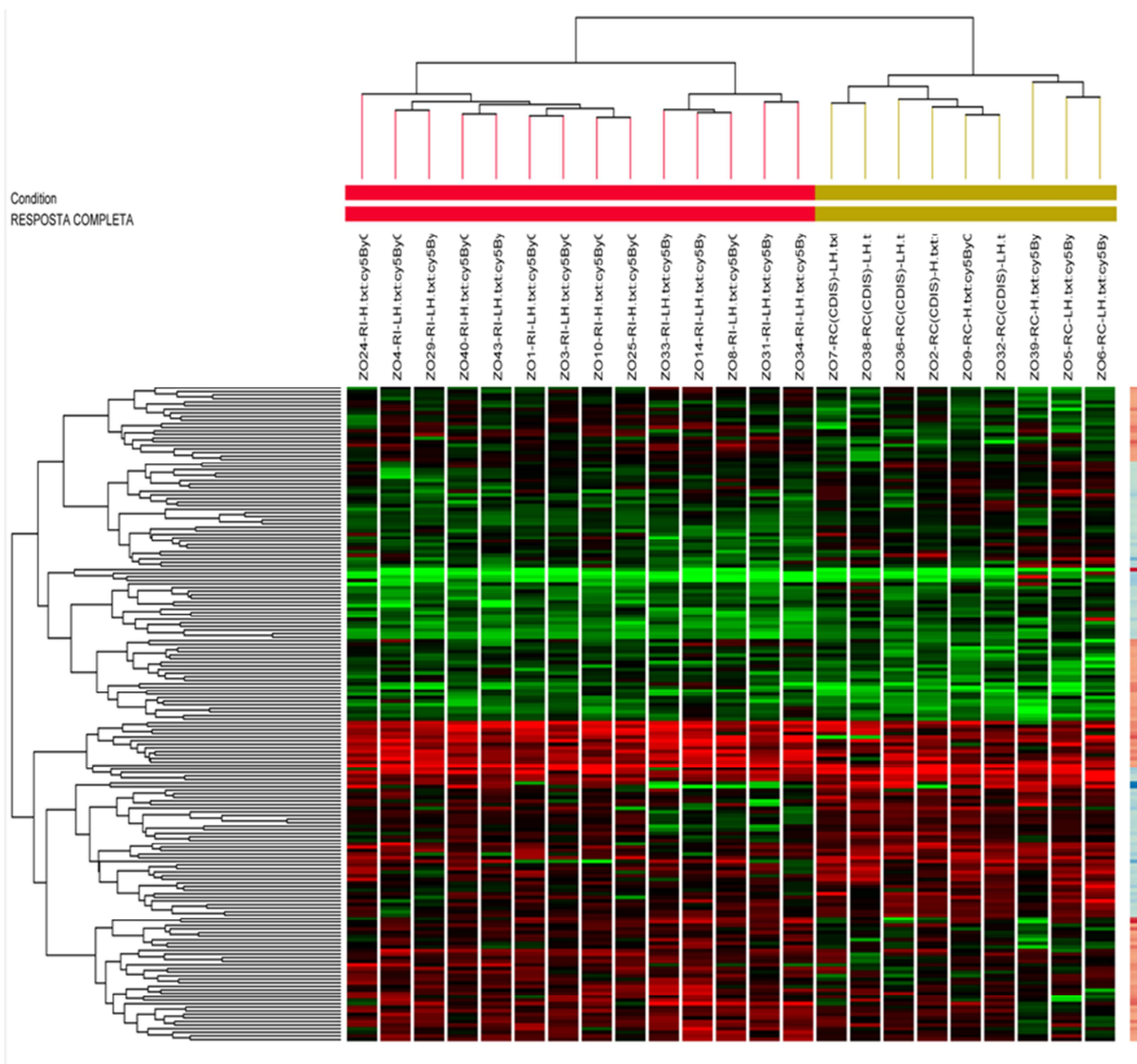


Figura 4.5 - Apresentação em forma de *cluster* dos 182 genes diferencialmente expressos encontrados no ensaio de microarray. Para esse ensaio foram utilizadas vinte e três amostras das pacientes do estudo, sendo nove de pacientes com pRC (incluindo CDIS) ao tratamento e quatorze de pacientes que ficaram com doença residual invasiva. Em **vermelho** os genes aumentados e em **verde** os diminuídos. RC-resposta completa; RI-resposta incompleta; Z-amostras do estudo Zo-NANtax; H-subtipo HER, LH-subtipo luminal HER, CDIS - carcinoma ductal *in situ*.

4.6.1 Vias de sinalização e processos relacionados com os genes diferencialmente expressos encontrados na comparação entre as pacientes que tiveram pRC ao tratamento e as que ficaram com doença residual

No intuito de verificar em quais vias de sinalização e em quais processos biológicos os genes diferencialmente expressos encontrados no *microarray* inicial estavam inseridos, realizamos uma análise *in silico* utilizando o software Metacore™. Interessantemente a mesma análise realizada com todas as amostras consideradas com resposta pRC (sem CDIS) agrupadas como mostrado na figura 4.5 resultou nos mesmos dados *in silico*.

Os resultados dessas análises mostraram que os genes encontrados diferencialmente expressos estão inseridos em diversas vias de sinalização já conhecidas, dentre as quais podemos destacar as vias descritas relacionadas com a Progressão de câncer de pâncreas,

Fatores de crescimento na regulação da proliferação, Diferenciação endotelial durante o desenvolvimento embrionário e Via de NOTCH induzindo transição epitélio-mesênquima (figuras 4.6, 4.7, 4.8, 4.9).

Estes resultados sugerem que as pacientes que melhor responderam são aquelas com maior proliferação celular controlada pela via de receptor de *PDGF*, passando por *Lyn quinase*, *PI3K* e aumento de *c-Fos*; pacientes com menor sinalização de SHH alterando angiogênese e diferenciação celular através da baixa de expressão de *Tie2* e *Notch1*. Finalmente as pacientes com pRC mostram uma inibição da TEM (Transição Epitélio - Mesenquima) devido a diminuição da sinalização de *Notch1*.

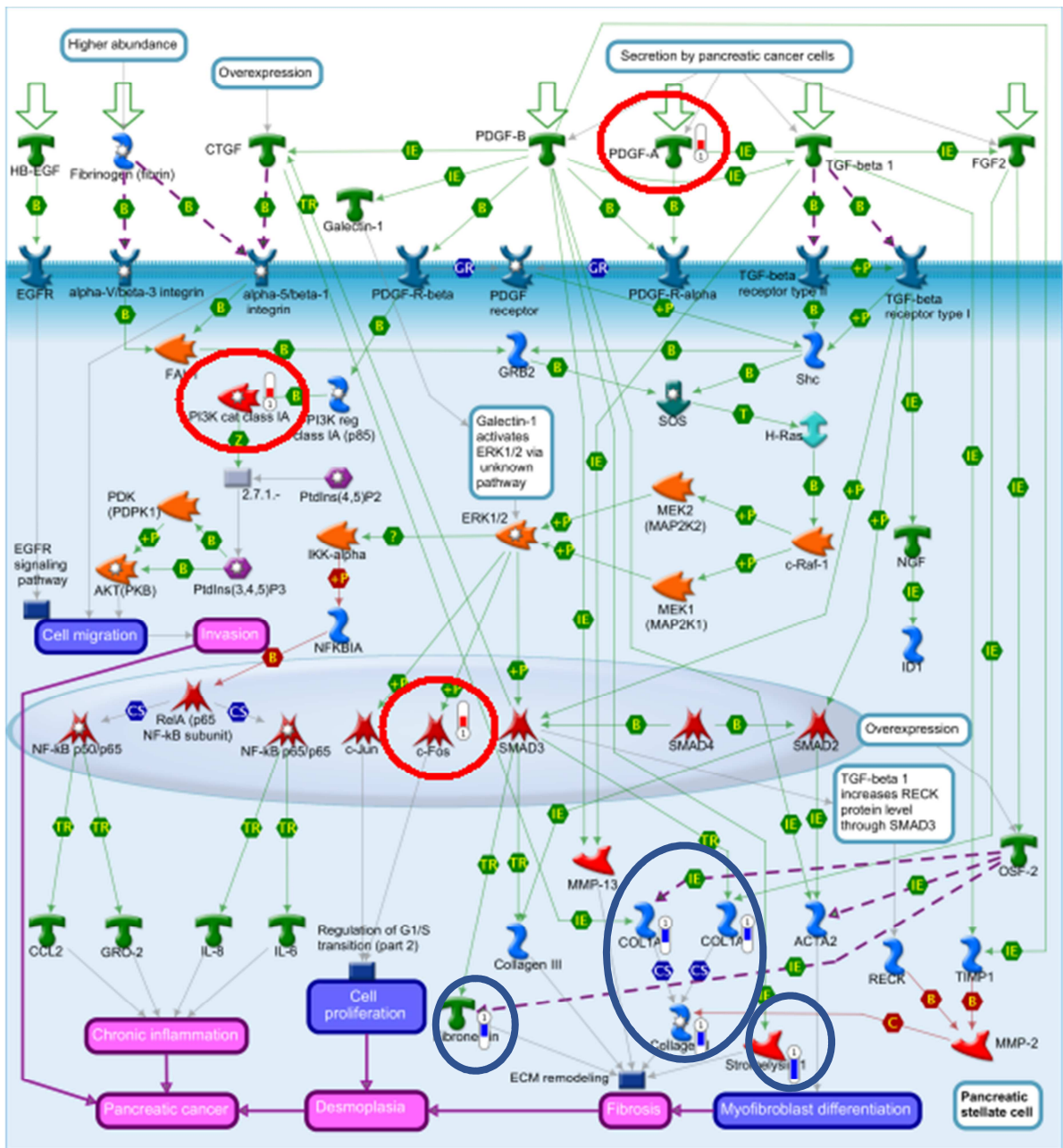


Figura 4.6- Via de sinalização encontrada na análise *in silico* relacionada com os genes diferencialmente expressos. Os genes encontrados no ensaio de *microarray* estão representados com um termômetro ao lado, na cor azul indicando diminuição de expressão nos pacientes que responderam ao tratamento na cor vermelha, indicando aumento de expressão. Nesta via vale destacar o aumento da expressão de *PDGF-A* induzindo um aumento da expressão de *c-Fos*.

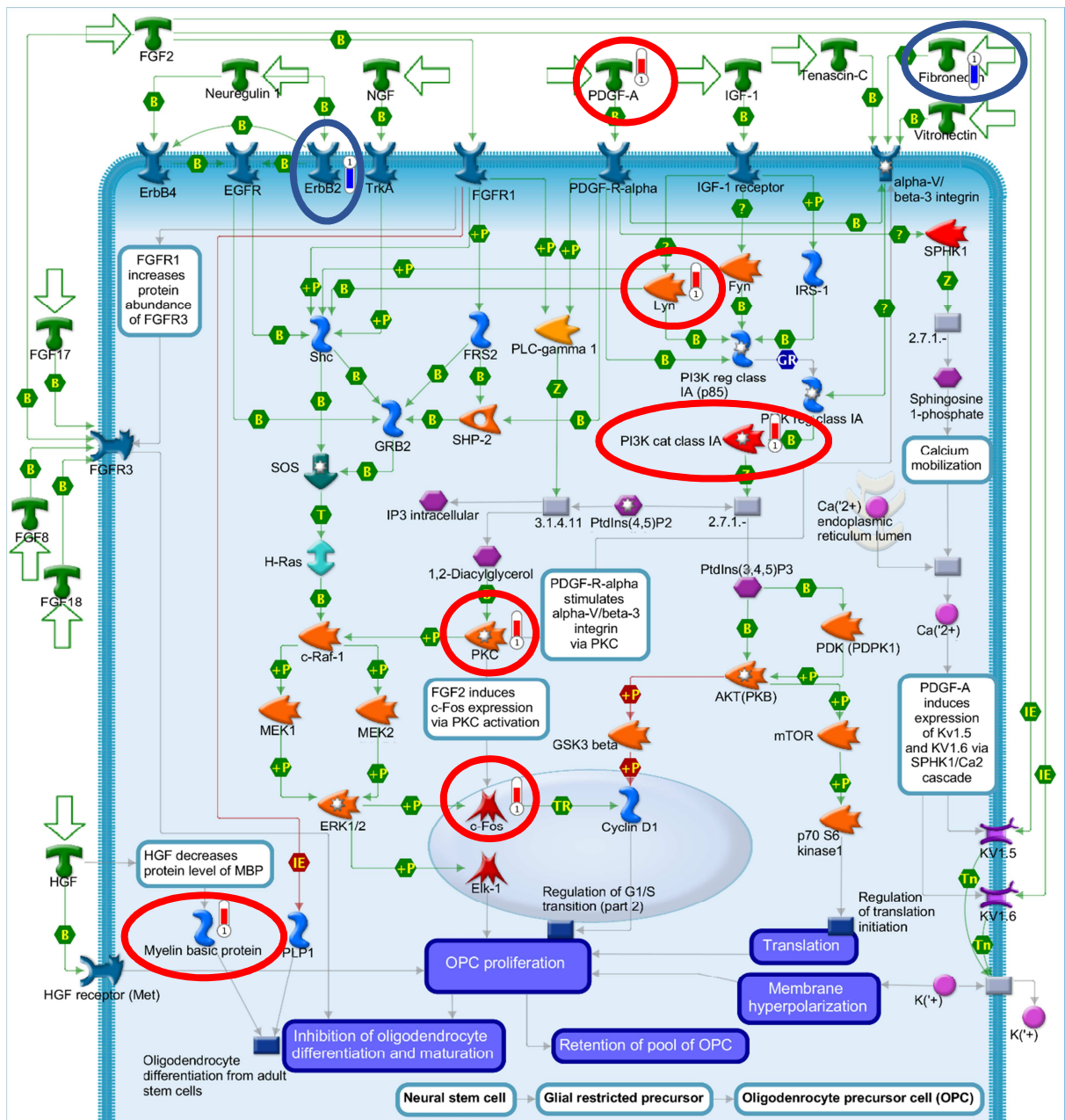


Figura 4.7- Via de sinalização encontrada na análise *in silico* relacionada com os genes diferencialmente expressos. Os genes encontrados no ensaio de *microarray* estão representados com um termômetro ao lado, na cor azul indicando diminuição de expressão nas pacientes que responderam ao tratamento e na cor vermelha, indicando aumento de expressão. Nesta via vale destacar que além dos genes com expressão aumentadas descritas na figura anterior temos o aumento da Lyn quinase e, também uma diminuição de expressão de HER2 nas pacientes com pRC (sem CDIS).

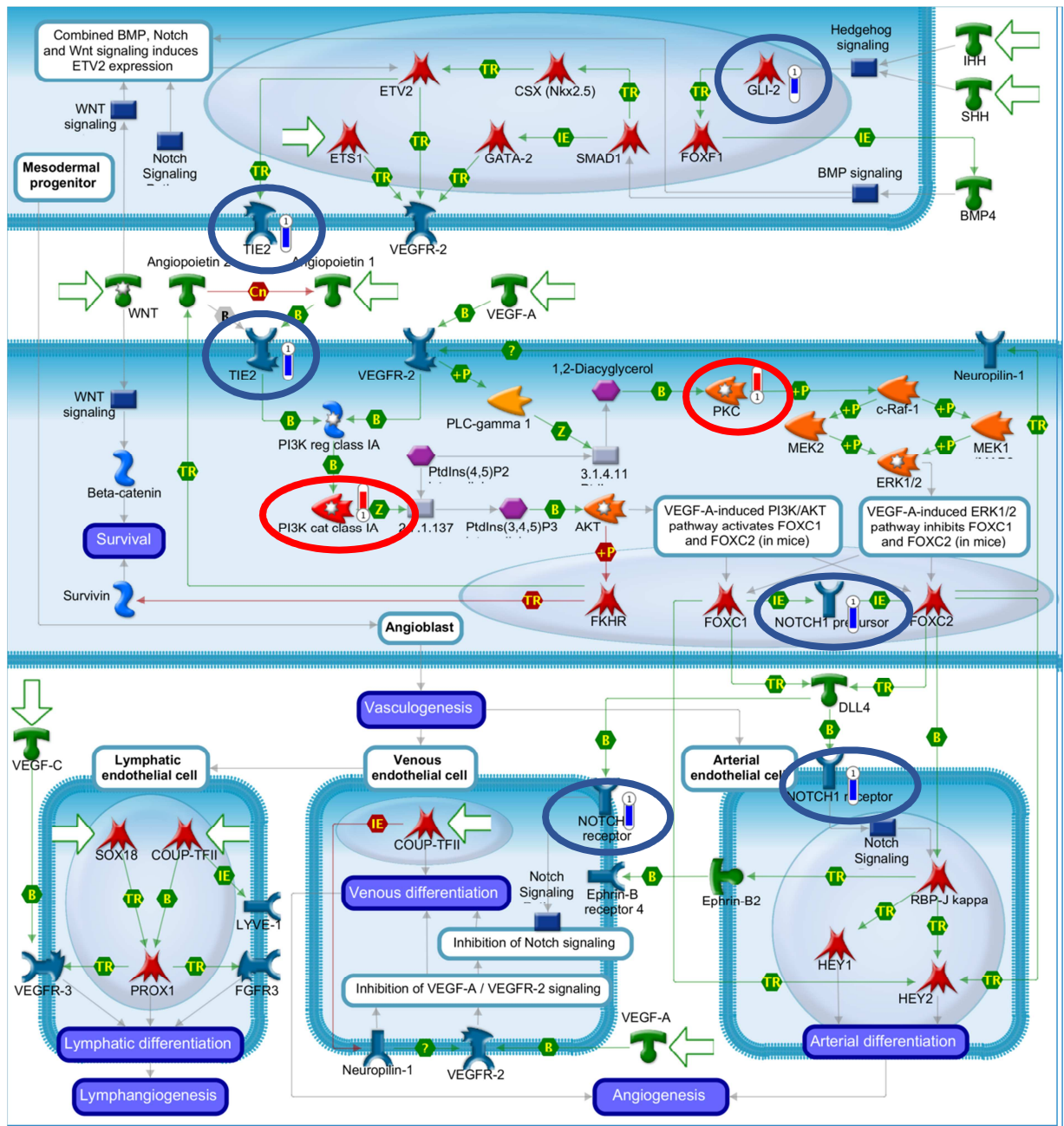


Figura 4.8- Via de sinalização encontrada na análise *in silico* relacionada com os genes diferencialmente expressos. Os genes encontrados no ensaio de *microarray* estão representados com um termômetro ao lado, na cor azul indicando diminuição de expressão nos pacientes que responderam ao tratamento e na cor vermelha, indicando aumento de expressão. Esta via se relaciona com outros processos que não a proliferação celular. Aqui vale destacar a diminuição da via de NOTCH1 em princípio derivada da diminuição da expressão de GLI1, o que significa que a sinalização de SHH (*Sonic Hedgehog*) diminuída altera provavelmente a angiogênese e a diferenciação das células tumorais.

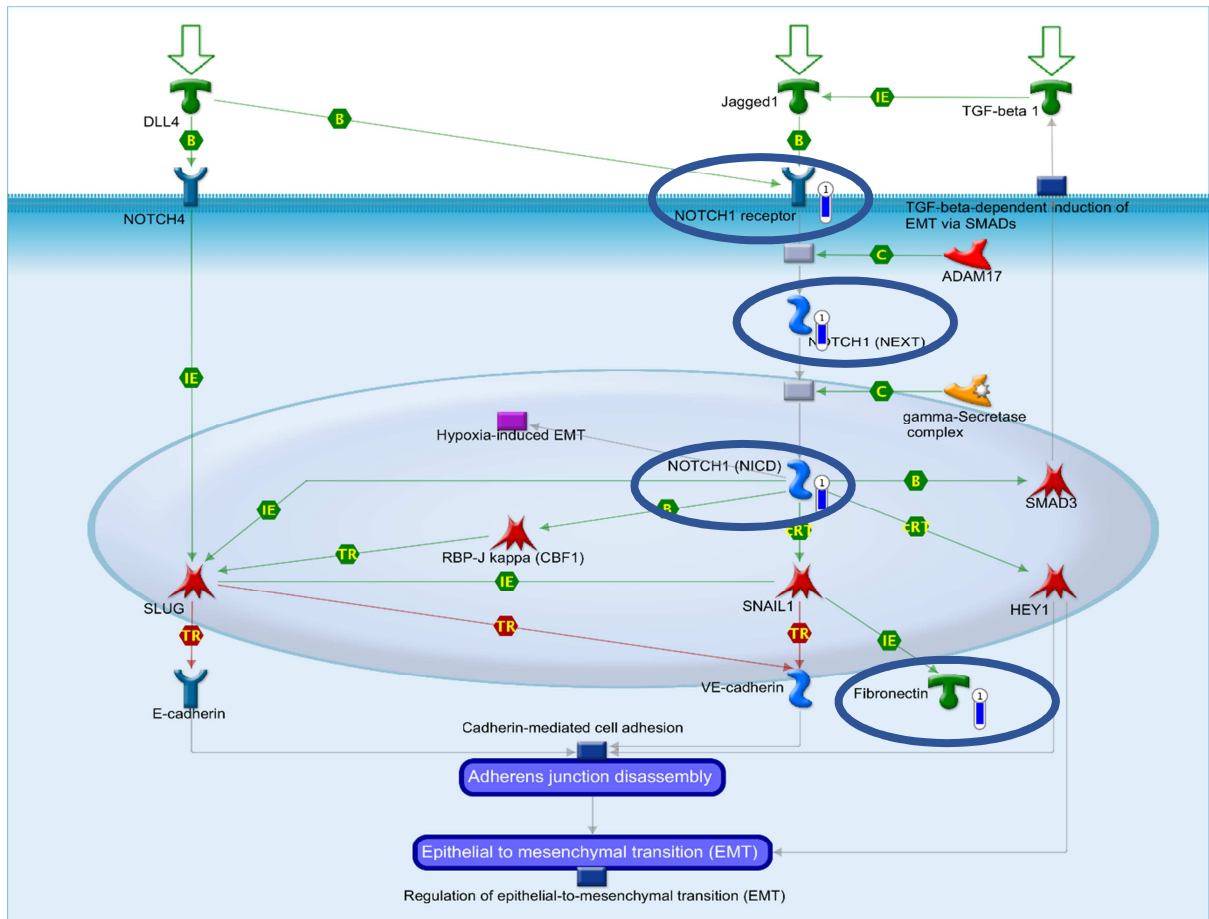


Figura 4.9- Via de sinalização encontrada na análise *in silico* relacionada com os genes diferencialmente expressos. Os genes encontrados no ensaio de *microarray* estão representados com um termômetro ao lado, na cor azul indicando diminuição de expressão nos pacientes que responderam ao tratamento. Nesta via temos novamente o envolvimento da via de Notch neste contexto influenciando a transição epitélio-mesenquimal, com redução da sua expressão.

Os processos biológicos alterados identificados nesta análise assim como os principais genes diferencialmente expressos em cada via estão sumarizados na figura 4.10.

PROCESSOS BIOLÓGICOS	Genes encontrados diferencialmente expressos pRC (sem CDIS) x RI
Adesão celular	Collagen I, COL1A1, COL1A2, Collagen XII, Galectin-8, Versican, Collagen X, Fibronectin, COL9A3, Collagen V, COL5A2, EMILIN-2, Stromelysin-1, MMP-1, MENA, ErbB2, Plexin B2, Semaphori 4D, PI3K cat class IA
Transdução de sinal	NOTCH1, FZD1, Frizzled, PDGF-A, HES6, ErbB2, SFRP2, c-Fos, PI3K cat class IA, Adrenomedullin, C3, RIP140, RARalpha, Brca1, PERC, PERC, XBP1, COMT
Inflamação	C3a, C3b, C3dg, C3, iC3b, MBL2, SAA4, Fibronectin, c-Fos, SERPINA3 (ACT), PI3K cat class IA
Remodelamento de ECM	Collagen I, MTCBP-1, Collagen X, Fibronectin, SERPINA3 (ACT), MMP-11 (Str-3), Stromelysin-1, MMP-1

Figura 4.10 - Principais processos relacionados com os genes diferencialmente expressos das pacientes que responderam encontrados no ensaio de *microarray*. A última coluna da figura se refere aos genes encontrados diferencialmente expressos em cada processo. Os genes destacados estão inseridos nas vias de sinalização alteradas das pacientes, sendo que em vermelho estão representados os genes aumentados e em azul os reduzidos.

Além das vias de sinalização e dos processos biológicos, o software também nos mostra vias de interação relacionadas com os genes encontrados diferencialmente expressos. Nesses resultados nos chamou a atenção o aumento da expressão do gene HLA-B nas pacientes que obtiveram resposta completa (Figura 4.11). Além disso nesta mesma figura podemos destacar a expressão baixa de Activina A indicando que as pacientes que atingiram a pRC apesar de terem células mais proliferativas não tem características de célula tronco indiferenciada.

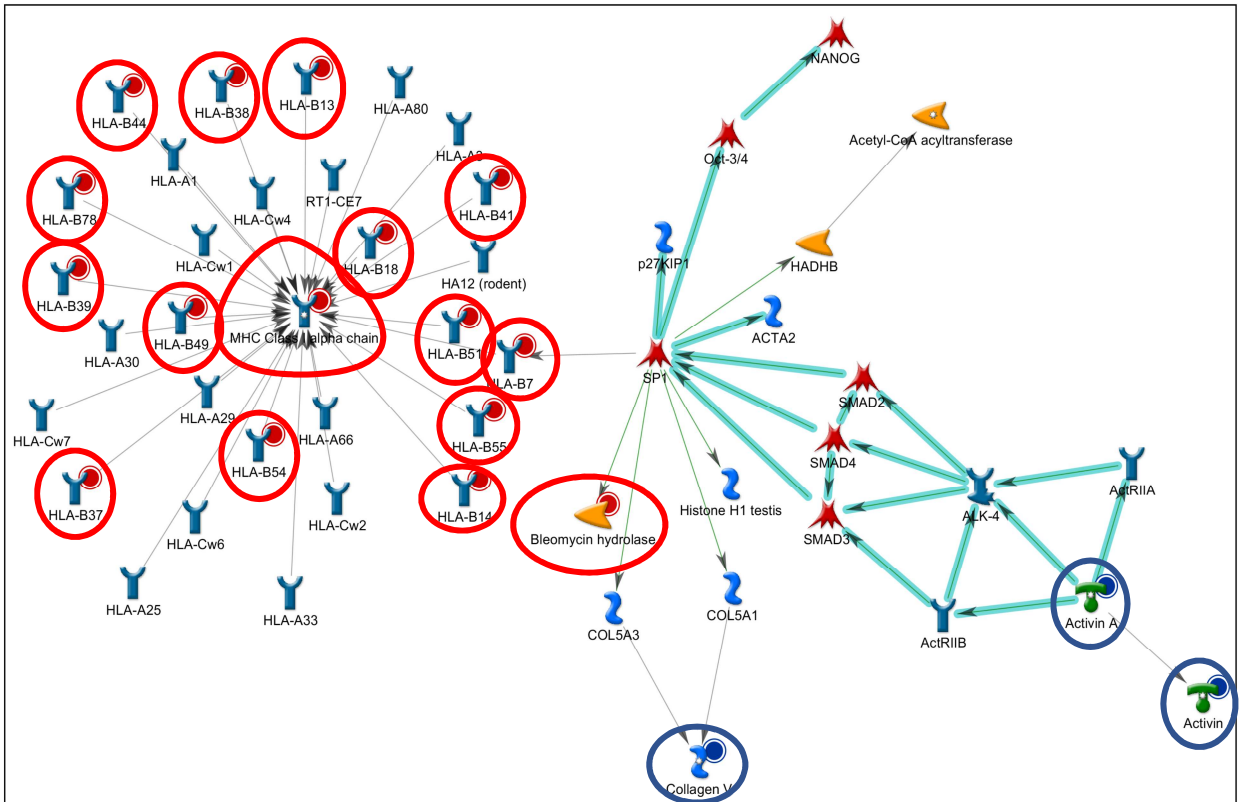


Figura 4.11 - Vias de interação entre os genes diferencialmente expressos. A figura mostra os genes diferencialmente expressos entre as pacientes que alcançaram pRC (sem CDIS) e as que ficaram com doença residual após o tratamento. Os genes encontrados nas vias de interação no ensaio de *microarray* estão representados com um círculo na cor azul indicando diminuição da expressão e, na cor vermelha, indicando aumento de expressão.

4.7 Tratamento cirúrgico realizado

O tratamento cirúrgico foi determinado de acordo com as práticas institucionais na primeira consulta cirúrgica, podendo sofrer alterações ao final do tratamento neoadjuvante de acordo com a resposta terapêutica. A cirurgia mais frequentemente realizada foi a

mastectomia radical modificada com esvaziamento axilar homolateral; vinte e sete (47%) pacientes e a menos realizada foi a segmentectomia com pesquisa de linfonodo sentinela homolateral; cinco (8.6%) pacientes (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 – Tratamento cirúrgico realizado após a neoadjuvância

Características	n%
Número das pacientes incluídas	58 (100)*
Mastectomia radical	
Mastectomia Radical Modificada com EA	27 (47)
Mastectomia Radical Modificada com pesquisa do SLN	10 (17)
Total	37 (64)
Segmentectomia (cirurgia conservadora)	
Segmentectomia com pesquisa de SLN	16 (28)
Segmentectomia com EA	5 (9)
Total	24 (37)

* número de pacientes incluídas na avaliação do tipo de tratamento cirúrgico realizado (duas pacientes optaram por não realizar a cirurgia da mam). EA – esvaziamento axilar e LNS - linfonodo sentinela.

5 DISCUSSÃO

O nosso estudo de fase II prospectivo neoadjuvante Zo-NAnTax, realizado em pacientes com câncer de mama HER2 positivo com tumores grandes (mediana de tamanho do tumor de 61 mm) alcançou uma taxa efetiva de pRC (ypT0 / Tis ypN0) de 42% com o esquema terapêutico de doxorrubicina e ciclofosfamida (AC) mais ácido zoledrônico por quatro ciclos seguido por uma combinação de docetaxel e trastuzumabe mais ácido zoledrônico por quatro ciclos e cirurgia da mama. O protocolo consistiu de um total de oito ciclos de ácido zoledrônico, sendo o primeiro ciclo junto com o primeiro AC e ciclos subsequentes uma semana após cada ciclo de quimioterapia.

Em pacientes com câncer de mama HER2 positivo, já é claro que as taxas de pRC estão associadas a uma melhora significativa na sobrevivência livre de doença e sobrevida global (CORTAZAR *et al.*, 2014; UNTCH *et al.*, 2011; BROGLIO *et al.*, 2016).

A superexpressão/amplificação do HER2 em células epiteliais mamárias humanas induz vantagem proliferativa, características transformadas e crescimento tumorigênico, e o bloqueio de sua via de ativação persistente promove maior sensibilidade à quimioterapia (MARK, 2007).

O trastuzumabe, um anticorpo monoclonal que se liga ao domínio IV do segmento extracelular do receptor HER2/neu, aumentou significativamente a taxa de resposta patológica completa, com conseqüente melhora na sobrevida quando associado à quimioterapia neoadjuvante, conforme demonstrado no estudo NOAH (Neo Adjuvant Herceptin), em que a taxa de pRC melhorou de 19% no braço de quimioterapia sozinha para 38% no braço de quimioterapia com trastuzumab (GIANNI *et al.*, 2010; GIANNI *et al.*, 2014) e no estudo TECHNO (Taxol Epirubicin Cyclophosphamide Herceptin NeOadjuvant), no qual a taxa de pRC foi de 39% com o tratamento combinado (UNTCH *et al.*, 2011).

Mais recentemente, o estudo Neoadjuvante de Pertuzumab e Herceptin em um regime de tratamento primário (NeoSphere) demonstrou que o duplo bloqueio de HER2 através da combinação de pertuzumab, um anticorpo monoclonal que se liga ao domínio II do segmento extracelular do receptor HER2/neu, evitando a sua dimerização, como tratamento neoadjuvante, com trastuzumab e quimioterapia mostrou aumento das taxas de pRC de 29% para 46% (GIANNI *et al.*, 2012) embora tenha aumentado a incidência e a gravidade da diarreia relacionada ao tratamento e aumentado modestamente a frequência de toxicidades hematológicas.

Em agosto de 2016 a ANVISA aprovou o duplo bloqueio do HER2 com pertuzumabe, trastuzumabe e quimioterapia como opção terapêutica neoadjuvante, para pacientes com

câncer de mama localmente avançado HER2 positivo. O estudo Zo-NAnTax começou e terminou antes que o duplo bloqueio do HER2 fosse aprovado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para uso no tratamento neoadjuvante do câncer de mama HER2 positivo.

Mesmo com um duplo bloqueio do HER2, as taxas de resposta patológica completas não excedem mais da metade dos pacientes. Portanto, há necessidade de novas estratégias de tratamento. Tais estratégias poderiam incorporar novos agentes anti-HER2 tais como neratinib, um inibidor oral de Pan-HER, que inibe irreversivelmente a atividade da tirosina quinase dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1), HER2 e HER4, o que leva à redução da fosforilação e ativação de vias de sinalização a jusante. Esta droga pode ser promissora em cenários neoadjuvantes porque o estudo adjuvante, ExteNET, demonstrou uma sobrevida livre de doença invasiva de 2 anos significativamente melhor ao se incluir o neratinib por 12 meses após a quimioterapia e terapia adjuvante à base de trastuzumabe (CHAN *et al.*, 2016).

No entanto, esses novos medicamentos tendem a ser mais caros e mais tóxicos. O ácido zoledronico inibe a síntese de farnesil pirofosfato, uma enzima chave para a manutenção da integridade da via do mevalonato e, em última instância, para a modificação pós-tradução de GTPases, como Ras, Rho e Rac, moléculas envolvidas na regulação da proliferação, sobrevivência, formação de vesículas intracitoplasmáticas e rearranjo da membrana plasmática (LUCKMAN *et al.*, 1998). As proteínas Ras atuam em uma rede complexa de sinalização intracelular (RasKRRK) - Mek (MAPKK) - Erk (MAPK) relacionada à progressão, crescimento e migração do ciclo celular, alterações do citoesqueleto celular, apoptose e senescência (FERNÁNDEZ-MEDARDE; SANTOS, 2011).

Com base nestes dados, o estudo Zo-NAnTax oferece uma oportunidade única para estudar prospectivamente mecanismos biológicos implicados na resposta patológica diferencial em pacientes com câncer de mama HER2 positivos tratados com quimioterapia, trastuzumabe e ácido zoledrônico.

A taxa de pRC (42%) encontrada com Zo-NAnTax no final do tratamento neoadjuvante foi muito semelhante aos resultados obtidos com o duplo bloqueio HER2 com menos custo e menos eventos adversos. A análise exploratória dos subgrupos clinicopatológicos não identificou um subgrupo mais específico que se beneficie.

No presente estudo, a positividade ao HER2 não foi uma característica associada aos receptores hormonais negativos, maior grau histológico ou idade mais nova ao diagnóstico do câncer de mama, como mostrado nas tabelas 4.1 e 4.2, diferente dos resultados observados em outros estudos (HUANG; NEVEN; SANTOS, 2005; KRISHNASWAMY *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos que tentam identificar fatores preditivos de resposta patológica completa em pacientes com câncer de mama HER2 positivos são retrospectivos. Em nosso estudo prospectivo, evidenciou-se uma maior probabilidade de resposta patológica completa em pacientes com Ki-67 elevado, corroborando com os dados retrospectivos de 114 pacientes com tumores HER2 positivos do estudo NOAH (Neoadjuvant Herceptin), que mostrou que os tumores HER2 positivos com um o alto índice de proliferação tiveram maior benefício da quimioterapia baseada em trastuzumabe (PRAT *et al.*, 2014).

A literatura favorece o pRC para subgrupos de pacientes com câncer de mama que são HR negativos em relação aos HR positivos, como visto no estudo CALBG 40601 que demonstrou uma taxa de pRC global de 46% e uma pRC no subgrupo de pacientes HR-negativos de até 69% (CAREY *et al.*, 2016). No estudo NeoALTTO, o braço de trastuzumabe diferiu a taxa de pRC de acordo com o *status* do RH com taxas de pRC de 36,5% versus 22,7% (HR-negativo *versus* HR-positivo) e para a combinação de trastuzumab e lapatinib com 61,3% contra 41,6%, respectivamente (AZMBUJA *et al.*, 2014). No estudo NeoSphere, a taxa global de pRC de 63,2% *versus* 26% foi observada para a doença HR negativo *versus* a HR positivo, respectivamente, e uma diferença de 27,3% *versus* 5,9% no braço combinado de pertuzumabe versus o de trastuzumabe, respectivamente (GIANNI *et al.*, 2012).

A presença de infiltrado linfocítico tem sido objeto de debate, com resultados mais estabelecidos no câncer de mama triplo negativo. Em pacientes com tumor HER2 positivo, os estudos ainda não são unânimes quanto à relação entre infiltrado linfocítico e resposta patológica. No estudo NeoALTTO, os níveis de TILs foram significativamente associados com o aumento da resposta patológica completa (SALGADO *et al.*, 2015), mas no estudo de Heppner *et al.*, as amostras tumorais HER2-positivas dos ensaios Neoadjuvante GeparQuattro e GeparQuinto mostraram que os tumores com níveis maiores de TILs não apresentavam taxas de pRC significativamente diferentes (HEPPNER *et al.*, 2016).

Já os tumores mamários que apresentam imunocoloração para p53 são mais freqüentemente receptores de estrogênio negativos e receptores de progesterona negativos. Eles foram associados a uma alta taxa de proliferação, alto grau histológico, aneuploidia e sobrevivência mais baixa (BERTHEAU *et al.*, 2008).

Chen MB *et al* conduziram a primeira meta-análise para avaliar a utilidade de TP53 (a expressão da proteína ou mutação gênica foi avaliada) para prever a resposta de pacientes com câncer de mama a quimioterapia neoadjuvante. Os dados suportam que o status TP53 pode ser um fator preditivo útil para avaliar a resposta à quimioterapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama, mas as interações de p53 e HER2 positivos permanecem

desconhecidas e devem ser tópicos para uma investigação mais aprofundada (CHEN M-B *et al.*, 2012).

Diferentes abordagens para avaliar p53 em pacientes com câncer de mama, como expressão ou falta ou mutação de TP53 (TROESTER *et al.*, 2006) podem ser realizadas e podem fornecer resultados aparentemente contraditórios quanto ao papel de p53 na resposta patológica. Por exemplo, no estudo CALGB 40601, a assinatura p53 foi associada de forma independente com altas taxas de pRC em 305 pacientes com câncer de mama HER2 positivo, (CAREY *et al.*, 2016) e no estudo GeparSixto, esta associação não foi observada nos subgrupos de pacientes HER2 positivos (DARB-ESFAHANI *et al.*, 2016). Nos nossos resultados, a expressão p53 não foi associado a um aumento de pRC.

Quanto a expressão de β -catenina no núcleo/citoplasmática, em nosso estudo foi associada a uma taxa maior de pRC após o tratamento neoadjuvante com ácido zoledrônico, diferentemente do que Elsamany *et al.* demonstram em um estudo retrospectivo no qual as maiores taxas de pRC estavam presentes quando havia expressão de β -catenina na membrana (ELSAMANY *et al.*, 2016). Talvez por haver poucos pacientes com expressão nuclear /citoplasmática de β -catenina em nosso estudo, esses dados tenham sido controversos e necessitem ser validados em uma coorte maior de pacientes.

A segurança foi um objetivo importante analisado. Os resultados mostram que a associação de antraciclina e taxano com trastuzumabe e ácido zoledrônico na terapia neoadjuvante é segura e nenhum efeito adverso de grau 3 ou superior foi relacionado ao ácido zoledrônico.

Considerando que atrasos e/ou reduções na dose da quimioterapia reduzem a possibilidade de alcançar o benefício máximo do tratamento (CHIRIVELLA, 2006), avaliamos o *compliance* do paciente de acordo com o tipo de medicamento utilizado no tratamento neoadjuvante para quantificar e representar as taxas de tratamento com dose modificada, dose reduzida, dose adiada e dose omitida.

A redução do *compliance* (Tabela 4.7) ocorreu principalmente durante o tratamento com docetaxel (14%). Como esses eventos adversos freqüentemente persistiram por mais de sete dias, o *compliance* com o ácido zoledrônico foi comprometida em 9% dos pacientes. Em geral, o tratamento proposto no estudo teve bom *compliance* a soma das porcentagens de tratamento sem modificação da dose foi $\geq 85\%$ (CHIRIVELLA *et al.*, 2009).

No intuito de tentar entender por que pacientes com características semelhantes responderam de formas diferentes ao tratamento realizamos ensaio de *microarray*. Quando avaliamos os resultados, identificamos 267 genes diferencialmente expressos quando comparamos as pacientes que obtiveram resposta patológica completa (sem componente de

CDIS) e as que não obtiveram resposta completa (Anexo 8.5). Dentre os genes encontrados diferencialmente expressos nos chamou a atenção o aumento da expressão dos genes *PDGF-A*, *PI3K*, *c-FOS* e *HLA-B* e a diminuição da expressão dos genes *NOTCH*, *TIE2*, *GLI2* e *Activina A* nas biópsias pré-tratamento de pacientes que tiveram resposta patológica completa ao término do tratamento neoadjuvante proposto.

É importante ressaltar que esses genes já apresentavam sua expressão alterada antes mesmo do início do tratamento indicando uma predisposição a resposta ao tratamento.

Um dos processos biológicos relacionados com a resposta completa é o processo de proliferação celular. Pacientes com pRC apresentavam genes relacionados com esse processo aumentados em relação aos que não tiveram pRC. A proliferação tem sido relacionada com uma melhor resposta patológica a quimioterapia neoadjuvante em pacientes RE positivo (STOVER *et al.*, 2016). Neste estudo de meta análise foi mostrado que a capacidade preditiva a resposta a quimioterapia neoadjuvante está associada a proliferação. Ainda neste aspecto, a proliferação relacionada à Ki-67 (biomarcador de proliferação celular) > 50% é um fator preditivo para pRC após tratamento neoadjuvante, indicando que a proliferação celular está intimamente relacionada com a quimiosensibilidade (ALBA *et al.*, 2016).

O processo de proliferação depende de vários fatores e pode ser ativado por diversas vias, dentre elas, a via de sinalização de PI3K. A via de sinalização de PI3K é uma via central relacionada com diversos processos com crescimento celular, proliferação, mobilidade, sobrevivência a apoptose (VELLOSO *et al.*, 2017). No câncer de mama, membros desta via são descritos como os mais alterados, sendo *PI3K* o gene mais mutado já descrito nesta patologia (VELLOSO *et al.*, 2017).

Em tumores de mama HER2 positivo, a dimerização de membros da família dos receptores HER ativam a via de PI3K, resultando na fosforilação de AKT e ativação de mTOR (DEY; DE; LEYLAND-JONES, 2017).

Nos nossos resultados, a via de PI3K parece ter sido mais ativada em pacientes com pRC. No entanto, não ficando claro se esta ativação se deve aos parceiros dimerizados da família HER, ou a presença de níveis mais altos de PDGF-A no plasma.

Com esta ativação, *PI3K*, *PKC* e *c-Fos* parecem ser mais expressos, induzindo um aumento na proliferação.

Uma segunda via que se mostrou provavelmente alterada foi a via de sinalização de NOTCH. A sinalização NOTCH é conservada evolutivamente e, durante o desenvolvimento, regula o destino celular (VELLOSO, *et al.*, 2017). Em adultos, esta via participa de vários processos incluindo proliferação, apoptose e manutenção da atividade de células tronco tumorais. Em humanos, a sinalização NOTCH envolve 4 receptores NOTCH e 5 proteínas

transmembrana receptores das famílias JAGGED e DELTA. Apesar de serem proteínas da membrana plasmática, os receptores NOTCH sofrem processamentos que culminam com o domínio NOTCH translocado para o núcleo e funcionando como fatores de transcrição. Alguns genes ativados por NOTCH são conhecidos indutores de tumores, como ciclinas e *SLUG* e irão contribuir para a proliferação (ciclinas) ou Transição Epitélio Mesênquima. (EMT- *SLUG*) (ACAR *et al.*, 2016).

Vários têm sido os relatos nos últimos anos relacionando a ativação da sinalização de NOTCH e o câncer de mama. Em câncer de mama, a alta expressão de NOTCH está relacionada ao mal prognóstico (ACAR *et al.*, 2016). Dentre as suas funções no câncer de mama, NOTCH protege as células epiteliais mamárias da apoptose, ativando AKT. NOTCH pode também regular a auto-renovação das células tronco de câncer de mama (ACAR *et al.*, 2016).

Em particular, vários exemplos existem na literatura que mostram uma associação entre elevada sinalização da via de NOTCH em subtipos particulares e a resposta à terapia direcionada (BAKER; ZLOBIN; OSIPO, 2014).

No entanto, o que nos parece mais relevante é a associação que tem sido feita entre a via de NOTCH e a manutenção/atividade das células tronco tumorais de mama.

Nossas pacientes com pRC mostraram claramente uma diminuição da via de NOTCH ainda ao diagnóstico. É possível então que essas pacientes tivessem menos células tronco tumorais e, por isso, não mostraram resistência imediata ao tratamento, uma vez que sabemos que as células tronco tumorais apresentam resistência a terapias alvo dirigidas e a quimioterapia (MEHTA; OSIPO, 2009; VERWEY *et al.*, 2016).

Esta hipótese fica ainda mais forte ao se verificar que estas mesmas pacientes apresentavam membros das vias de SHH e TGF- β também diminuídos.

Existem 4 vias mais reconhecidas para a manutenção de células tronco, são elas BMP/TGF- β , SHH, NOTCH e WNT (ANGELONI *et al.*, 2015).

Nas nossas análises, tanto *Activina A*, membro da família TGF- β como *GLI2*, membro da via de sinalização SHH estão diminuídos nas pacientes com pRC. Isto reforça a ideia de que menos células tronco tumorais estejam presentes nos dutos mamários destas pacientes.

O terceiro grupo de transcritos alterados que nos parece importante é o aumento de expressão de membros da família HLA classe I - *HLA-B*.

A atividade antitumoral efetivada por linfócitos citotóxicos infiltrantes (TILs) depende da apresentação de antígenos pelas moléculas de HLA classe I presentes nas células tumorais. A perda de HLA classe I é um mecanismo pelo qual o tumor escapa do ataque imune (KANEKO *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2016).

Por outro lado, o alto nível de expressão que alguns alelos de *HLA-B* mostraram nas pacientes com pRC, indica que nestas pacientes os linfócitos citotóxicos estão sendo ativados, aumentando a capacidade das células citotóxicas infiltrantes.

Mais estudos tentando confirmar estas hipóteses devem ser realizados para que as pacientes possam ser sub-classificadas de acordo com algumas características como antígeno nuclear da proliferação celular, expressão de determinadas proteínas além dos subtipos moleculares Luminal HER e HER e, desta forma, aproveitarem a existência de estudos clínicos com inibidores específicos hoje já disponíveis (CHEW *et al.*, 2008, HUDIS *et al.*, 2013; HANUSCH *et al.*, 2015; MURPHY; DICKLER, 2015; TOLANEY *et al.*, 2016)

Apesar das ótimas taxas de resposta patológica (RCB 0 + RCB I= 57%), o número de cirurgias radicais ainda foi superior às cirurgias conservadoras (64% *versus* 37% respectivamente) (Tabela 4.8). É possível que isso seja explicado pelo fato de que as nossas pacientes tinham tumores de mama mais avançados ao início do tratamento (mediana de 61mm), quando a proposta cirúrgica era definida.

Embora houvesse limitações no estudo Zo-NAnTax, porque é um estudo unicêntrico e braço único, sobre o efeito terapêutico da combinação de antraciclina e taxano com trastuzumabe e ácido zoledrônico neoadjuvantes para pacientes com câncer de mama HER2 positivo, os resultados demonstraram que o tratamento foi muito ativo e viável, sem toxicidade agravante. Os fatores clinicopatológicos preditivos de resposta patológica parecem ter um impacto diferente quando as vias HER2 e mevalonato estão sendo bloqueadas e, estudos futuros com ampliação das avaliações moleculares podem fornecer melhores esclarecimentos.

6 CONCLUSÕES

- A associação de ácido zoledrônico ao tratamento neoadjuvante com doxorubicina e ciclofosfamida seguido por uma combinação de docetaxel e trastuzumabe em pacientes com câncer de mama HER2 positivo, estágio IIA a IIIB se mostrou eficaz com uma taxa de resposta patológica completa de 42%, independente do *status* dos receptores hormonais;
- Nenhuma variável clínicopatológica se mostrou estar claramente associada com a resposta patológica completa;
- O tratamento proposto é seguro, não apresentou nenhum efeito colateral de grau 3 ou superior devido a associação do ácido zoledrônico ao esquema de quimioterapia com trastuzumabe;
- O *Compliance* ao tratamento foi considerado muito bom, as modificações de dose que ocorreram foram por toxicidade à quimioterapia e não devido ao ácido zoledrônico, não ultrapassando a taxa segura para que houvesse possibilidade de alterar a eficácia do tratamento;
- Foram identificados 267 genes diferencialmente expressos quando comparamos as amostras das biópsias das pacientes que obtiveram resposta patológica completa (sem componente de CDIS) com as que tiveram resposta patológica incompleta;
- Dentre os genes diferencialmente expressos nos chamou a atenção o aumento da expressão dos genes *PDGF-A*, *PI3K*, *c-FOS* e *HLA-B* e a diminuição da expressão dos genes *NOTCH*, *TIE2*, *GLI2* e *Activina A* nas biópsias pré-tratamento de pacientes que tiveram resposta patológica completa ao término do tratamento neoadjuvante proposto.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, Ahmet et al. A Role for Notch Signalling in Breast Cancer and Endocrine Resistance. **Stem Cells International**, v. 2016, 6 pages, 2016. doi:10.1155/2016/2498764.

ALBA, Emilio et al. High Proliferation Predicts Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Early Breast Cancer. **The Oncologist**, v.21, n. 6, p. 150-155, 2016.

ALBAIN, Kathy S. et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 1, p. 55-65, 2010.

ALBERTINI, John J. et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. **JAMA**, v. 276, n. 22, p. 1818-1822, 1996.

AL-DELAIFY, Wael K. et al. A prospective study of smoking and risk of breast cancer in young adult women. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 13, n. 3, p. 398-404, 2004.

AMIRI-KORDESTANI, Laleh et al. First FDA approval of neoadjuvant therapy for breast cancer: pertuzumab for the treatment of patients with HER2-positive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 21, p. 5359-5364, 2014.

ANDREEVA, Valentina A.; UNGER, Jennifer B.; PENTZ, Mary Ann. Breast cancer among immigrants: a systematic review and new research directions. **Journal of Immigrant and Minority Health**, v. 9, n. 4, p. 307-322, 2007.

ANGELONI, Valentina et al. Implications of stemness-related signaling pathways in breast cancer response to therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 43-51, 2015.

APOSTOLOU, Paraskevi; FOSTIRA, Florentia. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 747318, 11 pages. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/747318>. Acesso em: 27 fev 2017.

AZAMBUJA, Evandro et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2 positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open label, multicentre phase 3

trial and their association with pathological complete response. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 10, p. 1137-1146, 2014.

AZVOLINSKY, Anna 2014 Less Frequent Zoledronic Acid OK in Breast Cancer Patients With Bone Mets, 2014. **CancerNetwork**. Disponível em: < <http://www.cancernetwork.com/asco-2014-breast-cancer/less-frequent-zoledronic-acid-ok-breast-cancer-patients-bone-mets>>. Acesso em: 27 fev 2017.

BAKER, Andrew T; ZLOBIN, Andrei; OSIPO, Clodia. Notch-EGFR/HER2 Bidirectional Crosstalk in Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 4, 15 pages, 2014. doi: 10.3389/fonc.2014.00360.

BALÁZS, Ács et al. Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. **Diagnostic Pathology**, v. 12, n. 20, 12 pages, 2017. doi: 10.1186/s13000-017-0608-5.

BASELGA, Jose et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 2, p. 109-119, 2012.

BASELGA, Jose et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 3, p. 737-744, 1996.

BASELGA, Jose; SWAIN, Sandra M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 7, p. 463-475, 2009.

BEDOGNETTI, Davide et al. Checkpoint inhibitors and their application in breast cancer. **Breast Care**, v. 11, n. 2, p. 108-115, 2016.

BENFORD, Helena L et al. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone**, v. 28, n. 5, p. 465-473, 2001.

BERTHEAU, Philippe et al. TP53 Status and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. **Pathobiology**, n. 75, p. 132–139, 2008.

BHIKOO, Riyaz et al. Systematic review of breast cancer biology in developing countries (part 1): Africa, the Middle East, Eastern Europe, Mexico, the Caribbean and South America. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2358-2381, 2011a.

BHIKOO, Riyaz et al. Systematic review of breast cancer biology in developing countries (part 2): asian subcontinent and South East Asia. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2382-2401, 2011b.

BICALHO, Sérgio Martins; ALEIXO, José Lucas Magalhães. O Programa Viva Mulher: Programa Nacional de Controle de Câncer de Colo Uterino e de Mama. **Revista Mineira de Saúde Pública**, n. 1, Ano 1, jan-jun/2002.

BISHOP, Michael J. Molecular Themes in Oncogenesis. *Cell*, v. 64, n. 2, p. 235-248, 1991.

BONADONNA, Gianni et al. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 294, n. 8, p. 405-410, 1976.

BOTTOMLEY, Andrew. The cancer patient and quality of life. **The Oncologist**, v. 7, n. 2, p. 120-125, 2002.

BREASTED, James Henry (Ed.). **The Edwin Smith Surgical Papyrus: published in facsimile and hieroglyphic transliteration with translation and commentary in two volumes**. Chicago. UP, 1930.

BRIERLEY, James. The evolving TNM cancer staging system: an essential component of cancer care. **Canadian Medical Association Journal**, v. 174, n. 2, p. 155-156, 2006.

BROGLIO, Kristine R et al: Association of Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Therapy in HER2-Positive Breast Cancer With Long-Term Outcomes: A Meta-Analysis. **JAMA Oncology**, v. 2, n. 6, 751-760, 2016.

BRUFISKY, Adam M. et al. Final 5 year results of ZOFAST trial. **Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1192-1201, 2012.

BRYAN, Jenny; TWELVES, Chris. How bark from the Pacific yew tree improved the treatment of breast cancer. **Pharmaceutical Journal**, 2011. Disponível em: <https://www.pharmaceutical-journal.com/news-and-analysis/how-bark-from-the-pacific-yew-tree-improved-the-treatment-of-breast-cancer/11084729.article>. Acesso em: 03 set. 2016.

BURSTEIN, Harold J. et al. Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 8, p. 1301-1307, 2010.

BUZDAR, Aman U. et al. Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2–positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 228-233, 2007.

CALY, Martial et al. Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. **Anticancer Research**, v. 24, n. 5B, p. 3283-3288, 2004.

CAMERON, David et al. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 112, n. 3, p. 533-543, 2008.

CANONICI, Alexandra et al. Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancer. **Oncotarget**, v. 4, n. 10, p. 1592-1605, 2013.

CAREY, Lisa A. et al. Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 6, p. 542–549, 2016.

CARTER, Christine L.; ALLpratEN, Carol; HENSON, Donald E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer**, v. 63, n. 1, p. 181-187, 1989.

CARTER, Paul et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 10, p. 4285-4289, 1992.

CHAN, Arlene et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 3, p. 367-377, 2016.

CHANG, Jenny C. HER2 inhibition: from discovery to clinical practice. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 1-3, 2007.

CHAREHBILI, Ayoub et al. NEOZOTAC: Efficacy results from a phase III randomized trial with neoadjuvant chemotherapy (TAC) with or without zoledronic acid for patients with HER2-negative large resectable or stage II or III breast cancer (BC)—A Dutch Breast Cancer Trialists' Group (BOOG) study. **Journal Clinical of Oncology** v. 31, 2013 <http://meetinglibrary.asco.org/content/114337-132>.

CHAVEZ-MACGREGOR, Mariana et al. Bisphosphonates and pathologic complete response to taxane and anthracycline based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. **Cancer**, v. 118, n. 2, p. 326-332, 2012.

CHEANG, Maggie C.U. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHEN, Min-Bin et al. Value of TP53 Status for Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Meta-Analysis. **PLoS One** v. 7, n. 6, e39655, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0039655.

CHEW, Helen K. et al. A Phase II Study of Imatinib Mesylate and Capecitabine in Metastatic Breast Cancer: Southwest Oncology Group Study 0338. **Clinical Breast Cancer**. v. 8, n. 5, p. 511-515, 2008.

CHIRIVELLA, Isabel et al. Impact of chemotherapy doserelated factors on survival in breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, S18, [Abstract 668], 2006. doi: 10.1200/jco.2006.24.18.

CHIRIVELLA, Isabel et al. Optimal delivery of anthracycline-based chemotherapy in the adjuvant setting improves outcome of breast cancer patients. **Breast Cancer Reserch Treatment**, v. 114, n.3, p. 479–484, 2009.

COATES, Alan S. et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1533-1546, 2015.

COLE, Moya P.; TODD, Ian D. H.; WILKINSON, Peter M. A preliminary trial of doxorubicin in advanced breast cancer and other malignant disease. **British Journal of Cancer**, v. 29, n. 2, p. 114, 1974.

COLEMAN, Robert E. et al. Breast-cancer adjuvant therapy with zoledronic acid. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 15, p. 1396-1405, 2011.

COLEMAN, Robert E. et al. Zoledronic acid (zoledronate) for postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole (ZO-FAST study): final 60-month results. **Annals of oncology**, v. 24, n. 2, p. 398-405, 2013.

COLEMAN, Robert. E. et al. AZURE (BIG01/04) Investigators: The effects of adding zoledronic acid to neoadjuvant chemotherapy on tumour response: exploratory evidence for direct anti-tumour activity in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 7, p. 1099-1105, 2010.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER et al. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. **The Lancet**, v. 358, n. 9291, p. 1389-1399, 2001.

COLOMBO, Miriam et al. HER2 targeting as a two-sided strategy for breast cancer diagnosis and treatment: Outlook and recent implications in nanomedical approaches. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 150-165, 2010.

CONNOLLY, Roisin; STEARNS, Vered. Epigenetics as a therapeutic target in breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 17, n. 3-4, p. 191-204, 2012.

CORTAZAR, Patricia et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **The Lancet**, v. 384, n. 9938, p. 164-172, 2014.

CORTAZAR, Patricia; GEYER, Charles E. Jr. Pathological Complete Response in Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 5, p. 1441-1446, 2015.

COSCIA, Marta et al. Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 12, p. 2803-2815, 2010.

DARB-ESFAHANI, Silvia et al. Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 67686-67698, 2016.

DENKERT, Carsten et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 105-113, 2010.

DENOYELLE, Christophe et al. New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and-independent effects. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 10, p. 1631-1640, 2003.

DEY, Nandini; DE, Pradip; LEYLAND-JONES, Brian. PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: From tumor cell signaling to clinical trials. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 175, p. 91-106, 2017.

DEYARMIN, Brenda et al. Effect of ASCO/CAP guidelines for determining ER status on molecular subtype. **Annals of Surgical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 87-93, 2013.

DI SALVATORE, Marianonietta et al. Anti-tumour and anti-angiogenic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. **Cell Proliferation**, v. 44, n. 2, p. 139-146, 2011.

DRAKE, Matthew T.; CLARKE, Bart L.; KHOSLA, Sundeep. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, p. 1032-1045, 2008.

DUFFY, Michael J. et al. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 4, p. 428, 2014.

DUNFORD, James E. et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 2, p. 235-242, 2001.

DUNPHY, J. Englebert. Modified radical mastectomy. **Cancer**, v. 28, n. 6, p. 1624-1627, 1971.

EASTON, Douglas F.; FORD, Deborah; BISHOP, D. Timothy. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. **American Journal of Human Genetics**, v. 56, n. 1, p. 265-271, 1995.

EDGE, Stephen B. et al (eds). **AJCC cancer staging manual (7th ed)**. New York, NY, Springer-Verlag, 2010, p. 347-377, 2010.

ELSAMANY, Shereef et al. Predictive Value of the Pattern of β -Catenin Expression for Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 8, p. 4089-4093, 2016.

ELSTON, Christopher W; ELLIS, Ian O. Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, n. 19, p. 403–410, 1991.

FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto; SANTOS, Eugenio. Ras in cancer and developmental diseases. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 344-358, 2011.

FILIPITS, Martin et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 18, p. 6012-6020, 2011.

FILIPITS, Martin et al. The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 5, p. 1298-1305, 2014.

FISCHER, Bernard A. A summary of important documents in the field of research ethics. **Schizophrenia Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 69-80, 2006.

FISHER, Bernard et al. Eight-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 13, p. 822-828, 1989.

FISHER, Bernard et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. **Journal of Clinical Oncology**, v. 6, n. 7, p. 1076-1087, 1988.

FISHER, Bernard; MAMOUNAS, Eleftherios P. Preoperative chemotherapy: a model for studying the biology and therapy of primary breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 13, n. 3, p. 537-540, 1995.

FITZMAURICE, Christina et al. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 505–527, 2015.

Food and Drug Administration (FDA). **Pathologic complete response in neoadjuvant treatment of highrisk early-stage breast cancer**: Use as an endpoint to support accelerated approval; guidance for industry; availability. Fed Regist 79:60476-60477, 2014. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm305501.pdf>>. Acesso em: 01 nov 2017.

FRANKEN, Bas et al. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. R133, 2012. doi: 10.1186/bcr3333.

FREDHOLM, Hanna et al. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7695, doi: 10.1371/journal.pone.0007695. 2009.

FREED-PASTOR, William A. et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. **Cell**, v. 148, n. 1, p. 244-258, 2012.

GIANNI, Luca 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 Oncology**, n.13, p. 5-32, 2012.

GIANNI, Luca et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled

superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 6, p. 640-647, 2014.

GIANNI, Luca et al. Neoadjuvant Pertuzumab (P) and Trastuzumab (H): Antitumor and Safety Analysis of a Randomized Phase II Study ('NeoSphere'). [Abstract S03-02] In: **San Antonio, TX: San Antonio Breast Cancer Symposium**. 2010.

GILCHRIST, Kennedy W. et al. Tumor necrosis is a prognostic predictor for early recurrence and death in lymph node positive breast cancer: a 10-year follow up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. **Journal of Clinical Oncology**, n.11, p. 1929-1935, 1993.

GNANT, Michael et al. Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 7, p. 679-691, 2009.

GNANT, Michael et al. The Carry-Over Effect of Adjuvant Zoledronic Acid: Comparison of 48- and 62-Month Analyses of ABCSG-12 Suggests the Benefits of Combining Zoledronic Acid with Adjuvant Endocrine Therapy Persist Long after Completion of Therapy [Abstract P5-11-02] In: **San Antonio, TX: San Antonio Breast Cancer Symposium**. 2010.

GNANT, Michael et al. Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 2, p. 313-320, 2015.

GOEL, Shom et al. Overcoming therapeutic resistance in HER2-positive breast cancers with CDK4/6 inhibitors. **Cancer Cell**, v. 29, n. 3, p. 255-269, 2016.

GOLDSTEIN, Joseph L.; BROWN, Michael S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, n. 6257, p. 425, 1990.

HAMILTON, Erika P. et al. Zoledronic acid induces an immune response through increased central memory and effector memory gamma/delta T cells in early and metastatic breast cancer patients. **Clinical Communications-Oncology**, v. 2, doi:10.4103/2393-8633.153998, 2015.

HANUSCH, Claus et al. Dual Blockade with AFinib and Trastuzumab as NEoadjuvant Treatment for Patients with Locally Advanced or Operable Breast Cancer Receiving

Taxane–Anthracycline Containing Chemotherapy—DAFNE (GBG-70). **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 13, 10 pages, 2015. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2774.

HASEGAWA, Yoshie et al. Randomized controlled trial of zoledronic acid plus chemotherapy versus chemotherapy alone as neoadjuvant treatment of HER2-negative primary breast cancer (JONIE Study). **PLoS one**, v. 10, n. 12, p. e0143643, doi: 10.1371/journal.pone.0143643, 2015.

HEIMANN, Ruth et al. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. **Cancer Research**, v. 60, n. 2, p. 298-304, 2000.

HENNESSY, Bryan T. et al. Outcome after pathologic complete eradication of cytologically proven breast cancer axillary node metastases following primary chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9304-9311, 2005.

HEPPNER, Barbara I. et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 23, p. 5747-5754, 2016.

HILLNER, Bruce E. et al. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 6, p. 1378-1391, 2000.

HIRAGA, Toru et al. Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 13, p. 4559-4567, 2004.

HIRANO, Akira et al. Allelic losses of loci at 3p25. 1, 8p22, 13q12, 17p13. 3, and 22q13 correlate with postoperative recurrence in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 4, p. 876-882, 2001.

HOLMES, Michelle D. et al. Physical activity and survival after breast cancer diagnosis. **Journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 20, p. 2479-2486, 2005.

HORTOBAGYI, Gabriel N. et al. Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery, and radiation therapy. **Cancer**, v. 62, n. 12, p. 2507-2516, 1988.

HOUOT, Roch et al. T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 10, p. 1115-1122, 2015.

HUDIS, Clifford A. et al. A phase 1 study evaluating the combination of an allosteric AKT inhibitor (MK-2206) and trastuzumab in patients with HER2-positive solid tumors. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. R110, 2013. doi: 10.1186/bcr3577.

HUDIS, Clifford A. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 1, p. 39-51, 2007.

HURVITZ, Sara A. et al. Pathologic complete response (pCR) rates after neoadjuvant trastuzumab emtansine (T-DM1 [K]) + pertuzumab (P) vs docetaxel + carboplatin + trastuzumab + P (TCHP) treatment in patients with HER2-positive (HER2+) early breast cancer (EBC) (KRISTINE). In: Asco Annual Meeting 2016 Chicago, Illinois. **Journal Clinical Oncology**, v. 34, 2016 (suppl; abstr 500).

IQBAL, Nida; IQBAL, Naveed. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **Molecular Biology International**, v. 2014, 9 pages, 2014. doi: 10.1155/2014/852748.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA. **Atlas on-line de mortalidade**. Rio de Janeiro, 2014a. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>>. Acesso em: 03 set 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA. Agência de notícias. **Brasil registra queda da taxa de mortalidade por alguns tipos de câncer**. Rio de Janeiro, 2014b. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2014/brasil_registra_queda_taxa_mortalidade_por_alguns_tipos_cancer>. Acesso em 03 set 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA. Ações e Programas no Brasil - **Controle do Câncer de Mama**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/deteccao_precoce> Acesso em: 21 jan. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA. Agência de notícias. **INCA estima cerca de 600 mil casos novos de câncer para 2018.** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inca-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018>>. Acesso em 05 fev 2018.

JAGDEV, Satinder P. et al. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 8, p. 1126-1134, 2001.

JANKOWITZ, Rachel C. et al. Safety and efficacy of neratinib in combination with weekly paclitaxel and trastuzumab in women with metastatic HER2-positive breast cancer: an NSABP Foundation Research Program phase I study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 1205-1212, 2013.

JARDINES, Lori et al. Breast cancer overview. Risk factors, screening, genetic testing, and prevention. **Cancer management—a multidisciplinary approach**, 2002. Disponível em: <http://www.cancernetwork.com/handbook/contents.htm>. Acesso: em 07 set. 2016.

JEMAL, Ahmedin et al. Global cancer statistics. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JEREVALL, Piiha-Lotta et al. Prognostic utility of HOXB13: IL17BR and molecular grade index in early-stage breast cancer patients from the Stockholm trial. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 11, p. 1762-1769, 2011.

JORDAN, Craig V. Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata. **European Journal of Cancer (1965)**, v. 12, n. 6, p. 419-424, 1976.

KANEKO Koichi et al. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. **BioMed Central Cancer**, v. 11, 6 pages, 2011. doi: 10.1186/1471-2407-11-454.

KARAYIANNAKIS, Anastasios J. et al. Expression patterns of β -catenin in in situ and invasive breast cancer. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 27, n. 1, p. 31-36, 2001.

KAUFMANN, Manfred et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 12, p. 1927-1934, 2007.

KENNY, Frances S., et al. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 8, p. 2069-2076, 1999.

KIANG, David T.; KENNEDY, B. J. Tamoxifen (antiestrogen) therapy in advanced breast cancer. **Annals of Internal Medicine**, v. 87, n. 6, p. 687-690, 1977.

KIKUCHI, Shoichi et al. Definition of p53 overexpression and its association with the clinicopathological features in luminal/HER2-negative breast cancer. **Anticancer Research**, v. 33, n. 9, p. 3891-3897, 2013.

KIM, Samuel W.; GOEDEGEBUURE, Peter; GILLANDERS, William E. Mammaglobin-A is a target for breast cancer vaccination. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 2, p. e1069940, 2016.

KING, Madeleine et al. Quality of life three months and one year after first treatment for early stage breast cancer: influence of treatment and patient characteristics. **Quality of Life Research**, v. 9, n. 7, p. 789-800, 2000.

KONECNY, Gottfried E. et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 3, p. 1630-1639, 2006.

KOTO, Kazutaka et al. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis and shows combined effects with other anticancer agents. **Oncology Reports**, v. 24, n. 1, p. 233, 2010.

KRISHNASWAMY, Uma et al. Correlation of HER-2 neu over-expression with clinicopathological features of carcinoma breast. **Apollo Medicine**, v. 10, n. 2, p. 313-317, 2013.

KYU, Hmwe H. et al. Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **British Journal of Cancer**, v. 354, p. i3857, 2016.

LAKHANI, Sunil R. (Ed.). **WHO Classification of Tumours of the Breast**. International Agency for Research on Cancer, 2012.

LARA, Jonathan F. et al. p53 Expression in node-positive breast cancer patients: results from the Cancer and Leukemia Group B 9344 Trial (159905). **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 15, p. 5170-5178, 2011.

LEE, Hee J et al. Differential expression of major histocompatibility complex class I in subtypes of breast cancer is associated with estrogen receptor and interferon signaling. **Oncotarget**, v. 7, n. 21, p. 30119-30132, 2016.

LEE, Joycelyn X.; LOH, Kiley; YAP, Yoon-Sim. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. **Cancer Biology & Medicine**, v. 12, n. 4, p. 342-354, 2015.

LEE, Kyung H.; KOH, Minsoo; MOON, Aree. Farnesyl transferase inhibitor FTI-277 inhibits breast cell invasion and migration by blocking H-Ras activation. **Oncology Letters**, v. 12, n. 3, p. 2222-2226, 2016.

LESTER, Susan C. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, n. 10, p. 1515–1538, 2009.

LEVY-LAHAD, E.; FRIEDMAN, E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 1, p. 11-15, 2007.

LEYLAND-JONES, Brian; SMITH, Brian R. Serum HER2 testing in patients with HER2-positive breast cancer: the death knell tolls. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 3, p. 286-295, 2011.

LIN, Shiaw-Yih et al. β -catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 4262-4266, 2000.

LISS, Michaelann et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 is elevated in early-stage breast cancers with accelerated progression and poor clinical course. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 3, p. 940-946, 2009.

LIVRAGHI, Luca; GARBER, Judy E. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and prospects. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 188, 2015.

LLOMBART, Antonio et al. Immediate administration of zoledronic acid reduces aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with early breast cancer: 12-month analysis of the E-ZO-FAST trial. **Clinical Breast Cancer**, v. 12, n. 1, p. 40-48, 2012.

LUCKMAN, Steven P. et al. Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 11, p. 1668-1678, 1998.

LUO, Juhua et al. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. **British Medical Journal**, v. 342, p. d1016, 2011.

LUQMANI, Yunus A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Medical Principles and Practice**, v. 14, n. Suppl. 1, p. 35-48, 2005.

MATTIOLI, Rodolfo et al. Long-survival in Responding Patients with Metastatic Breast Cancer Treated with Doxorubicin-Docetaxel Combination: A Multicentre Phase II Trial. **Anticancer Research**, v. 24, n. 5B, p. 3257-3262, 2004.

MEHTA, K.; OSIPO, Clodia. Trastuzumab Resistance: Role for Notch Signaling. **The Scientific World Journal**, V. 9, p. 1438-1448, 2009.

MOASSER, MARK M. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 45, p. 6469-6487, 2007.

MÖNKKÖNEN, Hannu et al. A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 4, p. 437-445, 2006.

MOURIDSEN, Henning et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 10, p. 2596-2606, 2001.

MUENST, Simone et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 139, n. 3, p. 667-676, 2013.

MURPHY, Conleth G.; DICKLER, Maura N. The Role of CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 20, n. 5, p. 483-490, 2015.

National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). **Breast Cancer**. versão 4.2017. Estados Unidos da América, 2018. Disponível em: <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx> Acesso em: 21 jan 2018.

NEVILLE-WEBBE, Helen; COLEMAN, Robert E.; HOLEN, Ingunn. Combined effects of the bisphosphonate, zoledronic acid and the aromatase inhibitor letrozole on breast cancer cells in vitro: evidence of synergistic interaction. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 6, p. 1010-1017, 2010.

NIELSEN, Torsten O. et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 21, p. 5222-5232, 2010.

OKA, Hiroshi et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. **Cancer Research**, v. 53, n. 7, p. 1696-1701, 1993.

OLIVIER, Magali et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1157-1167, 2006.

OTTEWELL, Penelope D. et al. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 16, p. 1167-1178, 2008.

PAIK, Soonmyung et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 27, p. 2817-2826, 2004.

PEROU, Charles M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PICCART-GEBHART, Martine et al. The association between event-free survival and pathological complete response to neoadjuvant lapatinib, trastuzumab or their combination in HER2-positive breast cancer. Survival follow-up analysis of the NeoALTTO study (BIG 1-06) [Abstract S1-01]. In: **San Antonio, TX: San Antonio Breast Cancer Symposium**. 2013.

PIERGA, Jean-Yves et al. A multicenter randomized phase II study of sequential epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel with or without celecoxib or trastuzumab according to HER2 status, as primary chemotherapy for localized invasive breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 2, p. 429-437, 2010.

PINHEIRO, Paulo S. et al. Cancer incidence in first generation US Hispanics: cubans, Mexicans, Puerto Ricans, and new Latinos. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 18, n. 8, p. 2162-2169, 2009.

PRAT, Aleix et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, v. 24, p. S26-S35, 2015.

PRAT, Aleix et al. Research-based PAM50 subtype predictor identifies higher responses and improved survival outcomes in HER2-positive breast cancer in the NOAH study **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 2, p. 511-521, 2014.

RABINOW, Paul. **Making PCR: A story of biotechnology**. University of Chicago Press, 2011.

RAKHA, Emad A. et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 19, p. 3153-3158, 2008.

REED, Casey E.; FENTON, Suzanne E. Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 99, n. 2, p. 134-146, 2013.

ROSEN, Paul P. et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 11, p. 2090-2100, 1993.

ROSEN, Paul P. et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. **Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 9, p. 1239-1251, 1989.

ROSSI, Lorena et al. Prognostic impact of discrepant Ki67 and mitotic index on hormone receptor-positive, HER2-negative breast carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 7, p. 996-1002, 2015.

SALGADO Roberto et al: Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 448-454, 2015.

SANGER, Frederick; COULSON Alan R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441-448, 1975.

SANTISTEBAN, Marta. **Trial With Autologous Dendritic Cell Vaccination in Patients With Stage II-III HER2 Negative Breast Cancer**, 2016. Identificação no Clinicaltrials.gov: NCT01431196. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01431196>>. Acesso em: 21 jan 2018.

SARDANELLI, Francesco et al. Multicenter surveillance of women at high genetic breast cancer risk using mammography, ultrasonography, and contrast-enhanced magnetic resonance imaging (the high breast cancer risk italian 1 study): final results. **Investigative Radiology**, v. 46, n. 2, p. 94-105, 2011.

SCHECHTER, Alan L. et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. **Nature**, v. 312, n. 5994, p. 513-516, 1984.

SCHNEEWEISS, Andreas et al. Neoadjuvant Pertuzumab and Trastuzumab Concurrent or Sequential with an Anthracycline-Containing or Concurrent with an Anthracycline-Free Standard Regimen: A Randomized Phase II Study (TRYPHAENA) [abstract S5-06]. In: **San Antonio, TX: San Antonio Breast Cancer Symposium**. 2011.

SESTAK, Ivana et al. Factors predicting late recurrence for estrogen receptor–positive breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, p. djt244, 2013.

SEVENICH, Lisa et al. Analysis of tumour-and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 876-888, 2014.

SHAPIRO, Sam; STRAX, Philip; VENET, Louis. Periodic breast cancer screening in reducing mortality from breast cancer. **Journal of the American Medical Association**, v. 215, n. 11, p. 1777-1785, 1971.

SINGLETARY, Eva S. Rating the risk factors for breast cancer. **Annals of Surgery**, v. 237, n. 4, p. 474-482, 2003.

SLAMON, Dennis J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 11, p. 783-792, 2001.

SLAMON, Dennis J. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177-182, 1987.

SØRLIE, Therese et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

STAGG, John et al. Anti–ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti–PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 17, p. 7142-7147, 2011.

STOVER, Daniel G et al. The Role of Proliferation in Determining Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Gene Expression-Based Meta-Analysis. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 24, p. 6039-6050, 2016.

SWAIN, Sandra M. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 8, p. 724-734, 2015.

SYMMANS, Fraser W. et al. Long-term prognostic value of residual cancer burden (RCB) classification following neoadjuvant chemotherapy [abstract S6-02]. In: **San Antonio, TX: San Antonio Breast Cancer Symposium**. 2013.

SYMMANS, Fraser W. et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 28, p. 4414-4422, 2007.

TAO, ZiQi et al. Breast cancer: epidemiology and etiology. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333-338, 2015.

TASHIMA, Rumiko et al. Evaluation of an optimal cut-off point for the Ki-67 index as a prognostic factor in primary breast cancer: a retrospective study. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0119565, 2015.

TEPLINSKY, Eleonora; JHAVERI, Komal. **Antibody-Drug Conjugates and T-DM1**. 2014. Disponível em: <http://www.onclive.com/publications/contemporary-oncology/2014/february-2014/antibody-drug-conjugates-and-tdm1/#sthash.AEcESYHK.dpuf>. Acesso em 26 fev.2017.

TOLANEY, Sara M. et al. **A phase II randomized study to compare abemaciclib plus trastuzumab with or without fulvestrant to standard of care chemotherapy plus trastuzumab in hormone receptor positive, HER2-positive advanced breast cancer (monarcHER)**, 2016. Identificação no Clinicaltrials.gov: NCT02675231. Disponível em <<https://clinicaltrials.gov/show/NCT02675231>>. Acesso em: 21 jan 2018.

TROESTER, Melissa A. et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. **BioMed Central Cancer**, n. 6, 13 pages, 2006. doi:10.1186/1471-2407-6-276.

UNTCH, Michael et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 12, p. 2024-2031, 2010.

UNTCH, Michael 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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 25, p. 3351-3357, 2011.

US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for Industry: Pathological complete response in neoadjuvant treatment of high-risk early-stage breast cancer: Use as an endpoint to support accelerated approval.** 2014. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm305501>. Acesso em: 21 jan. 2017.

VAN DEN BRANDT, Piet A. et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 6, p. 514-527, 2000.

VANT VEER, Laura J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530-536, 2002.

VELLOSO Fernando J. et al. The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways. **OncoTargets and Therapy**, n.10, p. 5491-5524. 2017.

VENTER, Craig J. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, p. 1304-1351, 2001.

VERMA, Sunil et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1783-1791, 2012.

VERWEY, Marcel et al. Chemoresistance in breast cancer stem cells. **Biomedical Research**, v. 27, n. 1, p. 16-23, 2016.

VON MINCKWITZ, Gunter et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 15, p. 1796-1804, 2012.

WATSON, James D.; CRICK, Francis H. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953. **Annals of Internal Medicine**, v. 137, n. 7, p. 581-582, 2003.

WEIGELT, Britta; GEYER, Felipe C.; REIS-FILHO, Jorge S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Molecular oncology**, v. 4, n. 3, p. 192-208, 2010.

WINSTANLEY, John H.R. et al. The long-term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 63, n. 3, p. 447-450, 1991.

WOLFF, Antonio C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, n.1, p.18-43, 2007.

WOLFF, Antonio C. et al. 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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, 2013.

WOOSTER, Richard et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 789, 1995.

World Health Organization (WHO). **Handbook For Good Clinical Research Practice (GCP): Guidance For Implementation**, 2005. Published by the World Health Organization, Geneva, Switzerland, 132 pages, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/43392>> Acesso em: 01 nov 2017.

WORSHAM, Maria J. et al. Multiplicity of benign breast lesions is a risk factor for progression to breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 18, p. 5474-5479, 2007.

ZDUNIAK, Krzysztof et al. Nuclear osteopontin-c is a prognostic breast cancer marker. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 4, p. 729-738, 2015.

ZIEGLER, Regina G., et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 22, p. 1819-1827, 1993.

ZODY, Michael C. et al. DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage. **Nature**, v. 440, p. 1045-1049, 2006.

8 ANEXOS

8.1 Carta do CEP de aprovação do estudo Zo-NAnTax



Memo 48/11-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 18 de abril de 2011.

A(o): Dra. Susanne Crocamo
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 154/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
CAAE - 0007.0.007.000-11

Título do Estudo: Zo-Nantax – Estudo clínico de fase II de tratamento com ácido zolendrônico neoadjuvante associado ao esquema baseado em antraciclina seguido de taxane, em pacientes com câncer de mama localmente avançado

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprovou** após re-análise o estudo intitulado: **Estudo clínico de fase II de tratamento com ácido zolendrônico neoadjuvante associado ao esquema baseado em antraciclina seguido de taxane, em pacientes com câncer de mama localmente avançado (protocolo versão 2.0 de 15/4/11)**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão versão 2.0 de 15/4/11)**, em 18 de abril de 2011.

A documentação será enviada à CONEP para análise e registro do estudo.

Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: outubro/2011 e abril/2012.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

C/c – Dr. César Augusto Lasmar – Diretor do HC III

8.2 Parecer da CONEP de aprovação do estudo Zo-NANTax



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº. 039/2012

Registro CONEP 16488 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0007.0.007.000-11

Processo nº 25000.079699/2011-22

Projeto de Pesquisa: *"Estudo clínico de fase II de tratamento com ácido zolendrônico neoadjuvante associado ao esquema baseado em antraciclina seguido de taxane, em pacientes com câncer de mama localmente avançados"*. Protocolo Versão 2.0 de 15/4/2011; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Versão 2.0 de 15/4/2011.

Pesquisador Responsável: Susanne Crocimo Ventilari da Costa
Instituição: Instituto Nacional de Câncer - INCA (CENTRO ÚNICO)

CEP de origem: Instituto Nacional de Câncer - INCA

Área Temática Especial: Novos Procedimentos

Patrocinador: Instituto Nacional de Câncer - INCA

Sumário geral do protocolo

O câncer de mama é considerado um problema de saúde pública devido a sua alta incidência no mundo. No Brasil é a segunda causa de câncer em mulheres, perde somente para o câncer de pele não melanoma. Para 2010, estimou-se 49.240 novos casos o que corresponderia a uma incidência de 49,27% por 100.000 habitantes.

A escolha do tratamento inicial cirúrgico radical ou conservador, de quimioterapia associada ou não a uma droga alvo molecular neoadjuvante versus adjuvante e/ou hormonioterapia e radioterapia depende do estágio ou da extensão da doença. O tratamento sistêmico é parte integrante do tratamento multimodal do câncer de mama, reduzindo de forma significativa o risco de recorrência e morte pela doença. A busca de drogas ou esquemas que sejam capazes de aumentar a resposta patológica completa é uma tônica fundamental, porque o tipo de resposta patológica tem valor prognóstico em câncer de mama, traduzido por ganho de sobrevida.

Os benefícios em se optar por realizar quimioterapia neoadjuvante, incluem a possibilidade de realização de um maior número de mastectomias conservadoras, eliminar micrometástases, converter um tumor primário inoperável em operável e avaliar a sensibilidade do tumor ao tratamento instituído.

Priya Rastogi e colaboradores publicaram em 2008 os resultados do seguimento de 16 anos de dois estudos emblemáticos no tratamento do câncer de mama; o NSABP B18 e o B27. O NSABP B18 avaliava a diferença de resultados em termos de sobrevida global e sobrevida livre de doença, em mulheres portadoras de câncer de mama operáveis, utilizando tratamento com doxorubicina e ciclofosfamida (AC) adjuvante versus o mesmo tratamento neoadjuvante, mas os resultados provaram que não havia diferenças entre os grupos tratados.

O NSABP B27 também avaliava a possibilidade de diferença de benefício entre o tratamento neoadjuvante versus adjuvante com a diferença que o esquema era acrescido ou não de um taxane. Os resultados foram favoráveis à introdução do taxane a um esquema com antraciclina, tomando-se então uma opção padrão para o tratamento neoadjuvante. Os bifosfonatos são inibidores da reabsorção óssea e tornaram-se o padrão atual de cuidados para prevenção de complicações ósseas associadas a

metástases ósseas. Entre eles o ácido zoledrônico (ZOL) tem a maior atividade de anti-reabsorção óssea e mostra diversos efeitos diretos anti-tumorais *in vitro* como demonstraram Jagdev S.P. e col. Algumas características químicas e biológicas do ZOL indicam o potencial para inibição do crescimento tumoral também *in vivo*.

O ácido zoledrônico inibe a farnesil pirofosfato sintase, uma enzima chave na via do mevalonato. Por isso é capaz de inibir a prenilação de pequenas proteínas G, como Ras, Rap1, Rho e Rab e os sinais mediados por elas, impedindo o crescimento, a adesão/disseminação e invasão das células tumorais.

Em relação ao tratamento neoadjuvante uma análise de subgrupo do estudo AZURE mostrou aumento significativo da resposta patológica completa nas pacientes tratadas com ZOL. Nós postulamos que o ZOL possa aumentar o efeito neoadjuvante da quimioterapia também em mulheres portadoras de câncer de mama HER2 positivo, desta forma propomos o presente estudo para avaliar a resposta patológica e radiológica ao tratamento e analisar parâmetros moleculares capazes de traduzir este efeito.

O objetivo primário do estudo é mensurar a carga de câncer de mama residual (RCB) após tratamento neoadjuvante com FAC (Doxorrubicina+Ciclofosfamida+5-Fluorouracil) X 3 + ZOL seguidos de TXT (docetaxel) X 3 +trastuzumabe+ ZOL, em pacientes do sexo feminino com câncer de mama estágio IIA a IIIB HER-2 positivo, RH positivo e/ou negativo.

Os objetivos secundários incluem: Avaliar a tolerância e segurança ao tratamento com o esquema FAC e docetaxel associados ao ácido zoledrônico, de acordo com critérios de toxicidade do *Common Terminology Criteria for Adverse Events* versão 3.0.; Avaliar a expressão gênica diferencial em tumores de pacientes responsivas e não-responsivas ao tratamento; Avaliar a presença de VEGF sérico; Correlacionar a resposta patológica com a expressão gênica; Analisar o efeito da associação terapêutica, na biópsia antes do tratamento sistêmico e na amostra do tumor na ocasião do tratamento cirúrgico, através da quantificação da apoptose e alteração da adesividade e Avaliação de predição de resposta patológica através da ressonância nuclear magnética.

As pacientes receberão esquema de tratamento com Doxorrubicina 50mg/m²; Ciclofosfamida 500mg/m² e 5-Fluorouracil 500mg/m² por via intravenosa a cada 21 dias por 3 ciclos associados ao ácido zoledrônico 4mg por via intravenosa a cada 28 dias, seguidos de docetaxel 100mg/m² por via intravenosa a cada 21 dias por 3 ciclos associados ao ácido zoledrônico 4mg por via intravenosa a cada 28 dias e ao trastuzumabe (H) 8mg/Kg na primeira infusão e 6mg/Kg nas duas outras subseqüentes a cada 21 dias por 3 ciclos, com um total de 06 ciclos de quimioterapia acrescido do ácido zoledrônico. O tratamento será interrompido em caso de evidência clínica de progressão de doença, toxicidade limitante, saída voluntária da paciente do estudo clínico ou não adesão ao protocolo.

Os critérios de inclusão são os seguintes: Pacientes do sexo feminino com câncer de mama estágio IIA a IIIB, confirmado em estudo anátomo-patológico, com HER-2positivo ao estudo imuno-histoquímico padrão ou Fish e RH positivo e ou negativo; Estadiamento com radiografia de tórax, ultrassonografia de abdome e cintilografia óssea sem evidência de doença metastática. Captação em cintilografia óssea deve ser avaliada por radiografias simples; *Performance Status (PS)* do *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)* ≤2; Função hematológica adequada, evidenciado através de nível de hemoglobina maior que 9 g/dl, contagem de neutrófilos maior que 1.500/ mm³ e de plaquetas maior que 100.000/ mm³; Função hepática adequada, evidenciada por níveis de bilirrubina menores que 1,5 vezes o valor normal e níveis de enzimas hepáticas menores que 2,5 vezes o valor normal; Função renal adequada, evidenciada por níveis de creatinina menores que 1,5 vezes o valor normal e/ ou *clearance* estimado de creatinina (Cockcroft) superior a 50 ml/min; Função cardíaca dentro dos parâmetros de normalidade

da instituição, avaliada por ecocardiograma + Doppler; Capacidade de entendimento de um estudo clínico e da necessidade de comparecer regularmente para exames e consultas médicas e Ressonância Nuclear Magnética com seqüência de difusão antes do início do tratamento.

Quanto aos critérios de exclusão pode-se citar: Pacientes com história de neoplasia prévia ou atual, exceto câncer de pele não melanoma e carcinoma de colo de útero *in situ*; Tratamento do câncer de mama previamente com cirurgia, quimioterapia ou hormonioterapia; Presença de doença metastática; Presença de câncer de mama bilateral; Presença de doença cardíaca, renal ou pulmonar descompensadas; Presença de diabetes *melitus* descontrolado; Gravidez e Presença de neuropatia periférica > G2.

A toxicidade será avaliada em cada consulta médica, segundo critérios do *Common Terminology Criteria for Adverse Events* v 3.0. Pacientes que apresentarem toxicidade igual ou superior a grau 3 e relacionadas à medicação em estudo deverão suspender seu uso até melhora do quadro (recuperação até grau 1 ou nível basal). O ajuste de dose será realizado de acordo com tabelas de correção definidas, incluindo ajuste para ciclo subsequente considerando toxicidade hematológica.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico. O referido estudo está previsto para envolver a participação de 1 centro de pesquisa no Brasil. Todas as amostras serão armazenadas e coletadas no Banco Nacional de Tumores (BNT) do INCA.

Ao todo serão 56 sujeitos de pesquisa, todos serão recrutados no Brasil, no centro em tela.

Apresentação do protocolo

Foram apresentados os seguintes documentos: Folha de Rosto, cronograma e orçamento financeiro, currículo, declaração de responsabilidades do pesquisador, de confidencialidade e de publicação dos resultados (tais declarações não vieram à parte, e sim, inseridas no projeto de pesquisa) e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Versão 2.0 de 15/4/2011.

Comentários as respostas ao parecer CONEP 393/11

1. Com relação à Folha de Rosto:

- a. A área temática do estudo foi preenchida como "Novos Procedimentos", entretanto, a Resolução CNS 251/97 em seus termos e definições afirma: "Depois que um medicamento e/ou especialidade medicinal tenha sido comercializado, as pesquisas clínicas desenvolvidas para explorar novas indicações, novos métodos de administração ou novas combinações (associações) etc. são consideradas como pesquisa de novo medicamento e/ou especialidade medicinal". Tais pesquisas, portanto, devem atender aos requisitos dispostos no item IV.1 dessa Resolução. Além disso, ainda referente ao tema, não foi apresentada a Brochura do Investigador. Solicita-se adequação.

Resposta: "Como não foi possível corrigir a folha de rosto fiz uma nova folha de rosto considerando o estudo como de um novo medicamento, ficando em acordo com a Resolução CNS 251/97 item IV.1."

Análise: Pendências atendidas.

- b. O campo da assinatura do responsável pela instituição proponente está ilegível, dificultando a identificação do mesmo. Solicita-se adequação.

Resposta: Na nova Folha de Rosto isso foi corrigido.

Análise: Pendência atendida.

2. O item "Descontinuação do Tratamento/Estudo" não foi especificado, o mesmo deve ser adequado ao disposto no item III.3.z da Resolução CNS 196/96: "descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou" e não liminarmente pelo pesquisador e ou o patrocinador. Ressalta-se ainda o item VII.13.f da Resolução 196/96 "Considera-se como anti-ética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou". Conforme o item III.2.e da Resolução CNS 251/97, a interrupção do estudo poderá ser feita em caso de urgência, para salvaguardar a proteção dos sujeitos da pesquisa, devendo ser comunicado ao CEP, *a posteriori*, na primeira oportunidade. Solicita-se adequação.

Resposta: "Incluído o item 'Descontinuação do Tratamento/Estudo' na pág. 25 e acrescentado o parágrafo 'A descontinuidade do estudo só poderá acontecer caso a justificativa em questão seja aprovada pelo CEP e não liminarmente pelo pesquisador e ou o patrocinador, a menos que haja um caso de urgência, para salvaguardar a proteção dos pacientes do estudo, devendo ser posteriormente comunicado ao CEP, na primeira oportunidade'."

Análise: Pendência atendida.

3. Com relação ao orçamento é apresentado que o INCA arcará com todas as despesas e a página onde apresentam-se os valores está registrado OPAS. Isso configura participação internacional. Além disso, não foi localizado nenhum documento em que a instituição (INCA) assumia tal responsabilidade. Solicitam-se esclarecimentos e que, caso seja confirmada tal participação, adequação da Folha de Rosto.

Resposta: "Pendência atendida.

4. No cronograma a previsão de inclusão da primeira paciente é em maio de 2011. Como o protocolo encontra-se ainda sob análise da CONEP, solicita-se que tal planejamento seja feito e que o estudo somente se inicie após a aprovação em todas as instâncias.

Resposta: "No anexo III pág. 31, feito o planejamento."

Análise: Pendência atendida.

5. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Versão 2.0 de 15/4/2011:

- a. Se por questões de configuração tal página continuar constituindo-se uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do sujeito de pesquisa nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do sujeito bem como do pesquisador (Resolução CNS 196/96 itens IV.2.c). O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apondo sua assinatura na última página do referido Termo. O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Solicita-se adequação.

Resposta: "Adequação da solicitação incluindo-se no rodapé de todas as folhas um espaço pré determinado para a rubrica do sujeito de pesquisa ou o seu representante e para o investigador."

Análise: Pendência atendida.

- b. Deve ser excluído onde consta que a paciente será retirada do estudo se engravidar, pois considera-se que continuarão no estudo pelo fato de terem que ser acompanhadas para avaliação de riscos e eventuais interferências sobre a fertilidade, a gravidez, o embrião ou o feto, o trabalho de parto e o recém-nascido, recebendo assistência quando

necessário, assim como o bebê. O que ocorrerá é a descontinuação do tratamento do estudo, ou seja, o uso do produto que está sendo pesquisado. Solicita-se correção.

Resposta: "Modificado o parágrafo da pág. 6 para 'A senhora entende que caso venha a engravidar durante o estudo será descontinuada do tratamento do estudo e que a senhora e seu filho podem ser expostos a riscos desconhecidos, mas permanecerá em acompanhamento para avaliação de riscos e eventuais interferências sobre a fertilidade, a gravidez, o embrião ou o feto, o trabalho de parte e o recém-nascido, recebendo assistência quando necessário, assim como o bebê'."

Análise: Pendência atendida.

- c. Afirma-se que "Os investigadores se comprometem a publicar os dados do estudo independentemente dos resultados obtidos" (grifo nosso). O compromisso deve ser com a publicação dos resultados, sejam eles satisfatórios ou não ao pesquisador; os dados são informações colhidas, que não traduzem a análise realizada e não devem ser divulgados. Solicita-se adequação.

Resposta: "Feito a correção na pág. 7 para 'Os investigadores se comprometem a publicar os resultados do estudo independentemente dos resultados obtidos'."

Análise: Pendência atendida.

- d. Foi apresentado o número de telefone do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital do Câncer III, sem código de área e também sem identificação de qual pessoa deve ser procurada nestes casos; também foi apresentado o nome da Coordenadora do CEP, com número de telefone sem código de área e sem identificação de horário em que possa ser utilizado. Todos os esforços e todas as informações devem ser dadas à participante da pesquisa para que ela possa entrar em contato sempre que desejar e precisar, seja para elucidar dúvidas, seja para informar eventos e situações de risco. Dessa forma, solicita-se que tais informações sejam registradas no TCLE de modo claro (código, horário, incluindo endereço do CEP).

Resposta: "Tanto no item 'DIREITOS DOS PARTICIPANTE DO ESTUDO' na pág.8 quanto no item 'GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS' na pág. 9 foram incluídos os códigos de área aos números de telefone com os respectivos horários de atendimento e endereço do CEP."

Análise: Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 02 de fevereiro de 2012.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

8.3 Carta da ANVISA de aprovação do estudo Zo-NANTax

Ministério da Saúde
Agência Nacional de Vigilância Sanitária
www.anvisa.gov.br

Caixa Postal

Institucional Anvisa Dredge Serviços Áreas de Atuação Legislação Espaço Cidadão Profissional de Saúde Saneamento

DE: COPEM
ASSUNTO: Ofício em Branco [DE] nº 0480427129

ENVIADA EM: 14/06/2012 16:53:05

Ofício nº 0480427129/2012, COORDENAÇÃO DE PESQUISAS E ENSAIOS CLÍNICOS/ANVISA

Brasília, 12/06/2012

Ao(À) Senhor(a)
JOSE GOMES TEMPORÃO
INSTITUTO NACIONAL DO CANCER
PRACA DA CRUZ VERMELHA, 23 CENTRO
CEP 250660000. RIO DE JANEIRO/RJ

Ref.: Processo: 25351.597852/2011-18

Assunto: CE 114/2012

Gerência Geral de Medicamentos - GGMed
Gerência de Avaliação da Segurança e Eficácia - GESEF

COMUNICADO ESPECIAL EM PESQUISA CLÍNICA

Nº 114/2012
Expediente do CE: 0480313/12-2

Brasília, 12/06/2012

Empresa: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER
Fax:

Prezado(a) Senhor(a),

O Projeto de Pesquisa Clínica, foi analisado e aprovado por esta gerência. Considerando que o mesmo está de acordo com a RDC 39/08, autorizamos a sua execução no(s) centro(s) abaixo especificado(s):

Local de Realização do Estudo	Investigador	Expediente
MS INCA HC III HOSPITAL DO CANCER III	SUSANNE CROCAMO VENTILARI DA COSTA	838969111

ESTUDO
Protocolo Clínico: 154/10 - Zo-NANTAX
Processo: 25351597852201118
Expediente da Anuência: 838969111
Título do Estudo: ESTUDO CLÍNICO DE FASE II DE TRATAMENTO COM ÁCIDO ZOLENDRÔNICO NEOADJUVANTE ASSOCIADO AO ESQUEMA BASEADO EM ANTRACICLINA SEGUIDO DE TAXANE, EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO.
Assunto da Anuência: ENSAIOS CLÍNICOS - Anuência em Processo de Pesquisa Clínica -

8.4 1º Termo de Consentimento Livre Esclarecido, aprovado pelo CEP, do estudo Zo-NAnTax



Prot 154/10 – Aprovado em 25/2/11



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TÍTULO DO ESTUDO: ESTUDO CLÍNICO DE FASE II, DE TRATAMENTO COM ÁCIDO ZOLENDRÔNICO NEOADJUVANTE ASSOCIADO AO ESQUEMA BASEADO EM ANTRACICLINA SEGUIDO DE TAXANE, EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO – Zo-Nantax

NOME COMPLETO DA PACIENTE:

INICIAIS DA PACIENTE:

NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO:

CENTRO: Instituto Nacional de Câncer

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Susanne Crocamo Ventilari da Costa

TELEFONE DE CONTATO DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: 21 3207-3810

INFORMAÇÕES GERAIS

A senhora está sendo convidada para participar de um estudo clínico por ter sido diagnosticada com câncer de mama e por necessitar fazer quimioterapia antes do tratamento cirúrgico. A quimioterapia é administrada em situação como a sua, com objetivo de diminuir o tamanho do tumor na mama e facilitar a cirurgia. Ao mesmo tempo diminui a chance do tumor voltar em outra parte do corpo. O tratamento que a senhora irá receber é o tratamento padrão associado a um remédio que já é utilizado nas pacientes que têm osteoporose ou metástase nos ossos.


Dra. Adriana Schelga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

INCA
Consentimento informado
Versão 2.0 de 15/4/11

Página 1 de 10

PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Antes de decidir a respeito de sua participação, a senhora receberá informações para compreender o estudo e poder fazer a sua escolha. Este documento, denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), contém todas as informações sobre o estudo, seus objetivos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções. Caso a senhora decida, poderá sair do estudo a qualquer momento, por qualquer razão que julgue correta, sem qualquer prejuízo no seu cuidado ou na relação com seu médico e a equipe de saúde responsável pelo seu cuidado.

As informações abaixo deverão ser lidas, e a senhora poderá esclarecer todas as dúvidas que tiver. Apenas quando entender e quando decidir participar do estudo, a senhora e o médico delegado para aplicar este termo deverão assinar duas vias deste documento. Uma via ficará com você e a outra com o médico responsável pelo estudo.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO

OBJETIVOS DO ESTUDO:

Este estudo tem o objetivo de avaliar a resposta do tratamento padrão quando associado ao medicamento ácido zolendrônico.

Além disso, este estudo tem o objetivo de avaliar as toxicidades (efeitos indesejáveis) dessa associação e também estudar marcadores presentes no tumor, através da biópsia realizada antes do tratamento e do tumor retirado na hora da cirurgia, e marcadores no sangue, que possam identificar quais as pacientes têm maior chance de resposta com o tratamento e porque houve resposta. Também será avaliado se o exame da ressonância magnética das mamas será capaz de prever resposta ao tratamento antes que ele termine. A biópsia inicial (do diagnóstico), e a da cirurgia (peça de tumor) serão analisadas, assim como as amostras de sangue no início, durante o tratamento de quimioterapia, e antes da cirurgia.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:

Para se fazer o diagnóstico de câncer, um fragmento do tumor é retirado por cirurgia ou biópsia. Na ocasião dessa coleta, e só após a sua autorização, uma pequena amostra excedente do seu tumor poderá ser armazenada no Banco Nacional de Tumor e DNA (BNT) no INCA. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico uma vez que uma parte do tumor será encaminhada ao Serviço de Anatomia Patológica do INCA como é rotina para o diagnóstico de todos os pacientes. O seu material coletado e armazenado no BNT só poderá ser utilizado em estudos futuros caso a senhora seja notificada, concorde e um novo termo de consentimento seja oferecido.

Se a senhora concordar em participar deste projeto de pesquisa, os pesquisadores participantes consultarão seus registros médicos e poderão utilizar parte do material da biópsia e da cirurgia assim como do material de arquivo do Serviço de Patologia do INCA que foi utilizado para o diagnóstico (isto é: blocos de parafina, lâminas, amostras de sangue).

O TRATAMENTO DO ESTUDO:

É a combinação de FAC (5-Fluorouracil 500 mg/m² + Doxorrubicina 50 mg/m² e Ciclofosfamida 500 mg/m²) mais ácido zolendrônico 4mg por 3 ciclos a cada 3 semanas, seguido Docetaxel 100 mg/m² mais ácido zolendrônico 4mg por 3 ciclos a cada 3 semanas mais trastuzumabe 8mg/Kg na primeira infusão e 6mg/Kg nas duas outras subsequentes a cada 21 dias (total de 3 ciclos do trastuzumabe).

Após a assinatura deste termo de consentimento serão realizados: uma consulta médica, exames de sangue de rotina, ressonância magnética das mamas, radiografia de tórax, ultrassonografia do abdome, cintilografia óssea e radiografias das áreas positivas na cintilografia óssea, para definir corretamente a localização da doença no seu organismo, além de um eletrocardiograma e ecocardiograma para avaliar o funcionamento do coração. Uma amostra do tumor e do exame de sangue coletado antes do início do tratamento será utilizada no estudo Zo-Nantax e outra parte armazenada, no Banco Nacional de Tumores.

Página 3 de 10



Caso a senhora não tenha uma biópsia do tumor disponível neste banco de tumores, um termo adicional para coleta e armazenamento deste material vai ser oferecido para a senhora. Após os exames iniciais, será avaliado se a senhora está apta a realizar a quimioterapia do estudo.

Antes de cada consulta é necessária a realização de novos exames de sangue, para avaliação da existência de algum efeito indesejável (como anemia ou queda das defesas do organismo) e para dar continuidade ao tratamento. Após o terceiro ciclo de quimioterapia deverá ser feita outra ressonância nuclear magnética das mamas. Ao final do tratamento, antes da cirurgia, a senhora deverá repetir os exames: de sangue, radiografia de tórax, eletrocardiograma, ecocardiograma (exames pré-operatórios) e a ressonância nuclear magnética das mamas. Parte desse sangue e uma amostra de tecido do tumor, coletada no momento da cirurgia serão também armazenadas, no Banco Nacional de Tumores e utilizados no estudo.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

O tratamento disponível para pacientes com câncer de mama no seu hospital, caso não queira participar do estudo, é o tratamento padrão com quimioterapia FAC (5-Fluorouracil 500 mg/m² + Doxorubicina 50 mg/m² e Ciclofosfamida 500 mg/m²) por 3 ciclos a cada 3 semanas, seguido de Taxotere 100 mg/m² por 3 ciclos a cada 3 semanas mais trastuzumabe 8mg/Kg na primeira infusão e 6mg/Kg nas duas outras subsequentes a cada 21 dias (total de 3 ciclos do trastuzumabe). Toda a rotina de exames de sangue e exames radiológicos deve ser feita, assim como a cirurgia ao final da quimioterapia.

RISCOS

Os riscos de toxicidade (efeitos indesejáveis) do tratamento com quimioterapia incluem:

5-fluorouracil+doxorubicina+ciclofosfamida - náuseas, vômitos, feridas na boca (mucosite), diarreia, reações na pele, queda de cabelo, cansaço, anemia, diminuição das

defesas contra infecções, piora da função do coração e dos rins e parada da função dos ovários (menopausa).

Docetaxel - náuseas, vômitos, feridas na boca (mucosite), diarreia, reações na pele, queda de cabelo, cansaço, anemia, diminuição das defesas contra infecções, piora da função dos rins e parada da função dos ovários (menopausa), formigamento das mãos e pés (neuropatia), dores musculares, aumento das enzimas do fígado (hepatite leve) e fraqueza.

Trastuzumabe – problemas no funcionamento do coração, infecção e efeitos causados pela infusão, como febre calafrio e raramente enjôo, vômitos, dor de cabeça, tontura e quadro de alergia.

Ácido zolendrônico – dor óssea, febre, dor muscular, arrepios e necrose de mandíbula e/ou maxila.

A senhora realizará coleta de sangue para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular e podem resultar em dor no local da punção, ou mancha roxa transitória chamada de equimose. A senhora também será exposta a quantidades controladas de radiação ao realizar radiografias ou cintilografias.

A biópsia no início do estudo faz parte da rotina comum no hospital, a menos que a senhora já tenha realizado uma biópsia em outro hospital, terá que fazer uma nova biópsia aqui no INCA, antes do início do tratamento. Pode ocorrer dor, sangramento ou hematoma após o procedimento.

As equipes médicas que participam deste estudo se responsabilizam por oferecerem acompanhamento e tratamento adequado para qualquer efeito tóxico dos medicamentos em estudo.

GRAVIDEZ

Este é um tratamento que não permite a inclusão de mulheres na gravidez devido aos riscos de malformação fetal, por isso a senhora será solicitada a fazer um teste de gravidez antes de iniciar o tratamento, e caso a senhora esteja grávida, não poderá participar do estudo. Além disso, não deverá engravidar durante o estudo, deste modo para



participar a senhora deve concordar em utilizar um método seguro de controle de gravidez, como:

- Métodos de barreira (por exemplo, camisinha ou diafragma);
- Dispositivo intra-uterino (DIU), que é um pequeno aparelho colocado dentro do útero;
- Abstinência sexual.

O método contraceptivo indicado e escolhido pelo seu médico em conjunto com a senhora será fornecido gratuitamente.

A senhora deverá aceitar o risco de que a gravidez ainda assim possa ocorrer mesmo se estiver utilizando um método contraceptivo confiável, e concordar em notificar o médico do estudo, o mais rápido possível caso tenha ocorrido alguma falha em relação ao uso adequado do método contraceptivo, ou se engravidar a qualquer momento do estudo ou em até 120 dias do término da última dose dos tratamentos do estudo. A senhora será orientada pela Dra Susanne Crocama Ventilari da Costa ou sua equipe sobre os possíveis riscos para o feto e as opções disponíveis para a senhora.

A senhora entende que caso venha a engravidar durante o estudo será retirada do estudo e que a senhora e seu filho podem ser expostos a riscos desconhecidos.

Nós nos comprometemos a acompanhar a sua gravidez até a conclusão, em conjunto com uma unidade hospitalar especializada em gravidez de alto risco, garantindo assistência integral à senhora e ao seu filho até o nascimento e após, caso tenha ocorrido algum evento não comum (evento adverso), com a senhora ou com seu filho devido a algum procedimento ou da medicação do estudo.

A senhora não deve amamentar nenhuma criança enquanto estiver no estudo, porque os remédios do estudo podem passar para o leite materno e causar danos para a criança amamentada.

BENEFÍCIOS

O maior benefício que a senhora pode ter com o estudo é conseguir uma boa resposta com o tratamento de quimioterapia para o câncer de mama, atingindo uma

Página 6 de 10



Prot 154/10 – Aprovado em 25/2/11



resposta completa e desaparecimento do tumor na peça da cirurgia, o que aumenta muito as chances de cura. Os médicos do estudo acreditam que o tratamento em investigação poderá aumentar essa chance de sucesso, apesar disso a senhora deve saber que este benefício pode não acontecer. Entretanto, sua participação contribuirá para a aquisição de novos conhecimentos sobre o tratamento do câncer de mama.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

A senhora será acompanhada durante o estudo por médicos do hospital aonde a senhora já vem realizando o seu tratamento. Os responsáveis pelo seu tratamento são o investigador principal do estudo e os sub-investigadores. Além disso, coordenadores de estudos clínicos estarão em contato com a senhora para auxiliar na realização dos exames e orientações sobre as consultas médicas.

CONFIABILIDADE E PRIVACIDADE DOS DADOS

A senhora tem o direito à privacidade de forma integral, respeitando as leis estaduais e federais. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste hospital antes de estar disponível para aplicação aos pacientes.

Além da equipe de saúde que cuidará de a senhora, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética deste hospital e pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação. Os investigadores se comprometem a publicar os dados do estudo independentemente dos resultados obtidos.

DIREITOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

A senhora tem o direito fazer perguntas relacionadas ao seu tratamento e a esse estudo. Sua participação no estudo é voluntária e isso significa que se a senhora não quiser participar do estudo, nenhum dos seus direitos como paciente serão perdidos por conta disso. A senhora tem o direito de se retirar em qualquer momento do estudo e sem uma

Página 7 de 10

INCA
Consentimento informado
Versão 2.0 de 15/4/11


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



razão específica. Isso não afetará a assistência futura que a senhora recebe junto a este hospital. Qualquer conhecimento novo a respeito do tratamento em pacientes com câncer de mama será informado à senhora, que terá o direito de definir se irá permanecer ou não no estudo.

A senhora não será paga para participar desse estudo, mas será ressarcida das despesas de alimentação e transporte, dos procedimentos que serão necessários fora da rotina de tratamento institucional (ressonância nuclear magnética das mamas). Caso necessite de qualquer esclarecimento ou haja dúvidas sobre o tratamento ou a forma de condução do estudo, entre em contato com o Centro de Pesquisa Clínica, com os coordenadores do estudo, com seu médico ou com a Dra Susanne Crocamo (investigador principal), através do telefone 3207-3810; ou em caso de emergência, no telefone 3207-4050 (pronto Atendimento do Hospital do Câncer III)

Se a senhora for participar do estudo, receberá uma via desse documento e outra ficará com o investigador responsável.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo. Caso a senhora tenha algum problema procure imediatamente seu médico ou o serviço de emergência deste hospital.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que a senhora entenda que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que a senhora pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais a senhora tem direito.



Prot 154/10 – Aprovado em 25/2/11



GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a senhora ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o Centro de Pesquisa Clínica do Hospital do Câncer III no telefone 3207-3810. Se a senhora tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, a Coordenadora do Comitê de Ética do INCA, a Dra. Adriana Scheliga, no telefone 3207-6565.

8.5 Artigo submetido ao Journal of Clinical Oncology

Phase II study of zoledronic acid plus anthracycline, taxane and trastuzumab as neoadjuvant treatment in patients with locally advanced HER2-positive breast cancer: Zo-NanTax

Susanne Crocamo¹, Renata Binato¹, Giselle Vignal¹, Lídia Magalhães¹, Roberta Sarmiento¹, Maria Theresa Accioly¹, Isabele Small¹, Sandra Gioia¹, Pedro Maroun¹, Pamela Moutinho¹, Vivianne Freitas¹, Karuline Catein¹, Eliana Abdelhay¹.

¹National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding author: Susanne Crocamo

Department of Clinical research in breast cancer, Cancer Hospital III/NCI

Rua Visconde de Santa Isabel n° 274, Vila Isabel

Rio de Janeiro-RJ, Brazil, CEP 20.560-120.

Phone: 55-21-3207-3810; Fax: 55-21-2509-2121

E-mail: crocamo@inca.gov.br

Running head: Neoadjuvant chemotherapy with zoledronic acid in HER2+ BC:Zo-NANTax

The authors have no conflicts of interest to declare.

Clinicaltrials.gov information: NCT01472146.

ABSTRACT

Purpose - The aim of the present study was to evaluate the efficacy and safety of zoledronic acid plus anthracycline, docetaxel and trastuzumab as neoadjuvant treatment in patients with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) –overexpressing locally advanced breast cancer (LABC).

Patients and Methods - LABC patients who were HER2-positive were included in the study and received four cycles of anthracycline/cyclophosphamide (AC) with zoledronic acid (ZOL) followed by four cycles of docetaxel with trastuzumab and zoledronic acid before surgery. The primary end-point was pathologic response defined by the residual cancer burden index (RCB). Adjuvant treatment was completed with one year of trastuzumab with or without radiotherapy and hormone therapy according to the characteristics of the tumor.

Results - Seventy-one patients were included, and 60 and 58 were eligible for safety and efficacy evaluations, respectively. The median tumor size was 61 mm (range, 15 to 120 mm). Twenty-four patients (42%) achieved RCB 0 (complete pathological response). Adverse event (AE) were mainly grades 1 and 2 (nauseas, 76%; myalgia, 73%). Grade 3 febrile neutropenia (20%, 12 patients), diarrhea (12%, 07 patients) and grade 4 febrile neutropenia (3%, 2 patients) were the most commonly observed events. Mandible osteonecrosis was not observed in any patient.

Conclusion - A neoadjuvant combination of zoledronic acid and chemotherapy based on anthracycline and taxane with trastuzumab in HER2-positive LABC resulted in high pathological complete response (pCR) rates (RCB 0) with good tolerance and without increasing chemotherapy toxicity.

INTRODUCTION

Neoadjuvant therapy is the standard treatment for patients with locally advanced breast cancer as it allows tumor reduction and increases the chances of eliminating micro-metastases. Moreover, it is a perfect in vivo system to evaluate chemosensitivity and allows the study of cellular signaling pathways and their interactions with the performed treatment.^{1,2}

For HER2-positive breast cancer, neoadjuvant treatment, even in early tumors, has become standard because the pathological complete response (pCR) translates into survival.^{3,4} Trastuzumab increases the pCR rate compared with isolated chemotherapy in HER2-positive breast cancer patients when associated with neoadjuvant chemotherapy.⁵⁻⁷

More recently, new therapeutic strategies⁸ have been developed with the aim of broadening the benefit of trastuzumab. One of them is pertuzumab that prevents the occurrence of dimerization of HER2 with another activated ligand of the HER family.⁹

The neoadjuvant combination of trastuzumab and pertuzumab results in a complementarity effect for HER2 blockade and increases the complete pathologic response rates when combined with chemotherapy compared to neoadjuvant treatment with trastuzumab and chemotherapy, without increased toxicity.^{10, 11}

New interactions of other drugs with trastuzumab in order to increase the complete pathological response rate could facilitate treatment management and reduce costs.

Zoledronic acid (ZOL) is a third-generation bisphosphonate that has demonstrated a reduction in local recurrence and distant metastases, as well as a tendency to reduce the risk of death, in HER2 negative breast cancer adjuvant clinical trials.¹²⁻¹⁴ In preclinical studies, the use of ZOL demonstrated inhibition of the proliferation of tumor cells,¹⁵ induction of apoptosis, inhibition of angiogenesis,¹⁶ reduction of the invasion and migration of tumor cells,^{17,18} activation of specific cellular antitumor immune responses¹⁹ and a synergistic / additive effect with anthracycline, paclitaxel and letrozole.²⁰⁻²²

The Zo-NAnTax phase II clinical study investigated the efficacy and toxicity of neoadjuvant therapy with ZOL with anthracycline and taxane plus trastuzumab (Zo-NanTax) in women with HER2-positive locally advanced non-metastatic breast cancer and identified possible clinicopathological features predictive of complete pathological response.

PATIENTS AND METHODS

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, with the guidelines of the local Ethics Committee and was approved by the National Cancer Institute Ethics Committee (CEP n° 154/10, NCT01472146), and by the National Health Surveillance Agency (ANVISA). All participants signed informed consent forms.

Eligibility

This study was a single-center, prospective, phase II clinical trial. Eligible patients without any treatment had confirmed non-inflammatory breast cancer HER2-positive stage IIA to IIIB. The initial tumor size was determined based on clinical examination of the breasts or by mammography. Distant metastases were excluded by thorax, abdomen and pelvis tomography and bone scintigraphy. The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status had to be ≤ 2 , and patients were required to have adequate organ function (bilirubin ≤ 1.5 x upper limits of normal, transaminases ≤ 2.5 of the upper limit of normal, hemoglobin ≥ 9 g/dl, neutrophils $\geq 1,500$ / mm³ and platelets $\geq 100,000$ /mm³, serum creatinine < 1.5 mg/dL, left ventricular ejection fraction (LVEF) $\geq 50\%$ and negative serum test for pregnancy) and the ability to understand and adhere to treatment. Cardiac function was monitored after the fourth AC cycle, at the time of surgery and every 3-months during adjuvant trastuzumab therapy. Fertile women had to use non-hormonal contraceptives. Exclusion criteria were a previous history of malignant neoplasm, active infection, peripheral neuropathy grade ≥ 2 , any decompensated comorbidity, bilateral breast cancer or lactation.

Collection of baseline samples and clinical dates

Core biopsies from the breast tumor and non-tumor areas were performed and were guided by ultrasonography. Part of the material was paraffin-embedded for histological and immunohistochemistry (IHC) analysis, and part was frozen and stored at -80°C.

The patient's clinical variables collected were race, age, menopausal status, family history of cancer, clinical stage at diagnosis and histopathological and immunohistochemical tumor characteristics.²³

Pathology Assessment

Histopathology and IHC analyses were performed with pretreatment breast biopsy and post-treatment surgery by two experienced breast cancer pathologists from our institution who did not have any clinical information about the patients.

Histopathology valuation to determine histological classification,²⁴ histological tumor grade,²⁵ lymphovascular Invasion (LVI),²⁶ necrosis,²⁷ and stromal lymphocytic infiltration (sTIL)^{28,29} were performed on hematoxylin and eosin stained (HES) slides.

The results from LVI and necrosis analyses were classified as present or absent.

Tumors' stromal lymphocyte infiltrate (sTIL) was classified as mild (<30%), moderate ($\geq 30\% < 60\%$) or lymphocyte predominant breast cancer (LPBC) if they consisted of $\geq 60\%$ sTIL as described by Denkert et al.²⁹

For immunohistochemistry analysis, staining was performed on 3- μ m-thick tissue sections that were prepared on polarized slides. A positive control for each specific antibody was used in the reactions. Sections were incubated with estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), Ki-67 labeling index, p53, HER2, E-cadherin (E-CAD) and beta catenin (B-CAT) antibodies overnight in dilutions of 1:1600 ER (clone 1D5), 1:1600 PR (clone PR-636), 1:600 KI67 (clone MIB-1) and 1:200 P53 (clone DO-7) supplied by DAKO

Corporation. The 1:500 HER2 (clone SP2) was supplied by CELL MARQUE. The 1:1200 E-CAD (clone SPM471) and 1:100 B-CAT (clone E-5) were supplied by Santa Cruz Biotechnology. The markings were visualized under an optical microscope.

The cut-off value for ER and PgR positivity was 1% positive tumor cells with nuclear staining.³⁰ Ki-67 expression was considered high when $\geq 20\%$ of cells were stained.³¹

HER2 status was defined according to the ASCO/CAP guidelines 2007 and 2013.³² A positive nuclear staining visual score of 10% or greater for invasive cancer cells was considered p53-positive.³³

Immunopositivity to E-CAD was determined by comparing the labeling of tumor cells with adjacent normal epithelial cells and classified as positive expression if the tumor cells that were stained as strongly as adjacent normal and negative epithelial cells had a much weaker or no color.³⁴ The staining intensity for B-CAT was determined by comparing the labeling of tumor cells with adjacent normal epithelial cells and classified as strong expression ($> 90\%$), moderate expression ($\geq 10 \leq 90\%$) or weak expression ($< 10\%$).³⁵

Study Design and Treatment Regimen

Patients received four 3-week cycles of 60 mg/m² doxorubicin and 600 mg/m² cyclophosphamide followed by a combination of four 3-week cycles of 100 mg/m² docetaxel (DOC) with 6 mg/kg trastuzumab every 3-weeks (8 mg/kg as a loading dose). They received eight cycles of 4 mg/dose ZOL, and the first cycle was administered together with the first AC and subsequent cycles one week after each chemotherapy cycle (AC + ZOL → DOC + Trastuzumab + ZOL), followed by surgery.

The use of granulocyte colony stimulating factor was allowed in case of febrile or afebrile neutropenia and then continued for each consecutive cycle. The cycle was delayed and 25% dose reduction of chemotherapy was permitted if toxicity greater than grade 2 was observed.

Once the treatment was discontinued due to toxicity to chemotherapy, patients could terminate the proposed treatment using only trastuzumab and ZOL or be referred for surgery.

After surgery, radiotherapy was performed according to the institutional guidelines, and trastuzumab continued as a single agent or combined with adjuvant endocrine therapy in patients with hormone-sensitive tumors through 1-year of treatment.

Study End Points and Statistical Considerations

The primary end point was to measure residual disease by quantifying the residual cancer burden (RCB) index, as an independent prognostic marker of distant relapse-free survival in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.³⁶ Pathological complete response (pCR) was defined as no residual invasive disease in the breast and axillary lymph nodes, regardless of non-invasive disease after neoadjuvant treatment.

The secondary end points included were the possible associations between pCR and clinicopathological variables, safety and compliance.

For safety evaluation, adverse events (AE) were collected according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0, graded and correlated with study drugs at each scheduled and non-scheduled visit.

To explore study treatment compliance, three variables were chosen: numbers of reduction, omission and delay of doses (dose modifications).

The number of delayed doses was considered for doses with ≥ 3 days of delay with respect to the planned schedule. Dose modifications (DM) were expressed as a percentage of sub-optimal treatment. Compliance was expressed as a percentage and considered optimal treatment when the sum of the treatment percentages without dose modification was $\geq 85\%$.³⁷

Efficacy analysis was performed for all patients who underwent breast surgery, and safety analysis was conducted for all patients who did at least one course of neoadjuvant treatment.

Statistical analyses were performed using SPSS version 18 (SPSS, Chicago, IL). Assuming H_0 (the null hypothesis) P.1 and H_a (the alternative hypothesis) P.2 with a significance level of 0.1% and 80% power using a one-stage Fleming method, a total of 56 patients were needed to detect a minimum and a maximum pCR rate of 0.22 and 0.35, respectively. Responses were calculated as percentages of all patients who underwent surgery after neoadjuvant treatment. Baseline patient characteristics and AE were presented as percentages, medians and ranges. Association between clinic-pathological features and pCR (RCB 0) were calculated by Pearson's chi-square test or Fisher's Exact test according to the statistical assumptions.

RESULTS

Patients

Between November 2012 and July 2016, 71 patients with HER2-overexpressing tumors signed the TCLE to participate in the study, and 60 of them were eligible and were treated in HCIII/INCA. All 60 patients who received at least one cycle of chemotherapy were included in the safety analyses. Two patients who had complete clinical response refused to undergo surgery after neoadjuvant treatment, even though the implications of their choices had been explained and were excluded from the efficacy analysis (Fig. 1).

Baseline characteristics are summarized in Table 1. The median age was 54 years (range, 26-74). Breast tumors were large (median size, 61 mm). Forty patients (67%) were post-menopausal. Most patients had stage IIB (37%), tumor grade 2 (52%) and were ER and/or PgR positive (73%). All sixty patients were HER2-positive through IHQ and/or fluorescent in situ hybridization (FISH).

Thirty-one patients had a family history of breast/ovary cancer, and 42% were white.

Pathological response rate and baseline clinicopathological features association analysis

At surgery, pCR (RCB 0) was achieved in 24 (42%) patients, and minimal residual disease (RCB I) was achieved in 15%, generating an optimal pathological response (RCB 0 plus RCB I) of 57% (Table 2). All patients were able to undergo breast surgery.

We explored the pCR in different subgroups. As shown in Table 3, there was a significantly higher pCR rate in patients with nuclei/cytoplasmic β -catenin expression ($p=0.030$) and probable improvement in Ki67 expression ($p=0.070$). None of the other clinicopathological variables evaluated in the study showed an association with pCR.

Safety

The safety evaluation for all patients who did at least one course of neoadjuvant treatment ($n=60$) demonstrated that grades 1 and 2 gastrointestinal AE were the most frequent (Table 4). Seventeen (28%) patients had ZOL-related AE, with 29% grade 1 (myalgia, 3 patients; fever, 2 patients) and 71% grade 2 (myalgia, 6 patients; arthralgia, 4 patients; fever, 2 patients). No patient showed cardiac dysfunction or jaw osteonecrosis in any grade.

There was no grade 5 adverse event in the neoadjuvant period. Three (5%) patients had grade 4 events and thirty-nine (65%) patients had grade 3 (Table 4).

Compliance

Table 5 presents the compliance rate according to the treatment step performed in 59 patients. One patient was not included in analysis for having discontinued treatment early. In all, 226 (96%) AC cycles, 202 (86%) DOC cycles, 235 (99%) trastuzumab cycles and 431 (91%) ZOL cycles were performed.

The dose reduction and delay were necessary in docetaxel treatment step doses (33-doses) due to AE (febrile neutropenia and fatigue) and in ZOL step doses (41-doses) mainly

due to docetaxel AE because according to protocol, the ZOL was infused 1-week after chemotherapy.

DISCUSSION

The prospective phase 2 neoadjuvant trial of Zo-NANTax, conducted in HER2-positive breast cancer patients with large tumors (median tumor size of 61 mm) effectively achieved a 42% pCR (ypT0/Tis ypN0) rate with AC plus ZOL for four cycles followed by a combination of DOC and trastuzumab plus ZOL for four cycles. It was a schedule with a total of eight ZOL cycles, with the first cycle together with the first AC and subsequent cycles one week after each chemotherapy cycle.

In patients with HER2-positive breast cancer, it is already clear that pCR achievement is associated with highly significant improved rates of disease-free and overall survival.³⁸⁻⁴¹

Trastuzumab has significantly increased the pCR rate, with consequent improvement in survival when associated with neoadjuvant chemotherapy, as demonstrated in The NOAH (Neo Adjuvant Herceptin) trial, in which the pCR rate improved from 19% in the chemotherapy alone arm to 38% in the chemotherapy with trastuzumab arm, and in the TECHNO (Taxol Epirubicin Cyclophosphamide Herceptin NeOadjuvant) trial, in which the pCR rate was 39%.^{7,39,42}

More recently, the Neoadjuvant Study of Pertuzumab and Herceptin in an Early Regimen Evaluation (NeoSphere) trial demonstrated that a combination of pertuzumab with neoadjuvant treatment with trastuzumab and chemotherapy showed increased pCR rates from 29% to 46%,¹⁰ even though it increased the incidence and severity of treatment-related diarrhea and modestly increased the frequency of hematologic toxicities.

Even with a double HER2 blockade, pCR rates do not exceed more than half of patients. Therefore, there is a need for new treatment strategies. Such strategies could incorporate novel anti-HER2 agents such as neratinib, an oral pan HER inhibitor. This drug can be promising in neoadjuvant scenarios because the ExteNET trial demonstrated

significantly improved 2-years invasive disease-free survival when giving neratinib for 12 months after chemotherapy and trastuzumab-based adjuvant therapy.⁴³ However, these new drugs tend to be more expensive and more toxic.

ZOL inhibits farnesyl pyrophosphate synthetize, a key enzyme for the maintenance of the integrity of the mevalonate pathway and ultimately for the post-translational modification of GTPases such as Ras, Rho and Rac, molecules involved in the regulation of proliferation, survival, formation of intracytoplasmatic vesicles and plasma membrane rearrangement.^{44,45}

The pCR (42%) found with Zo-NAnTax at the end of neoadjuvant treatment was very similar to the results obtained with HER2 double blockade with less cost and less AE. The exploratory analysis of clinicopathological subgroups has not identified a more specific subgroup that benefits.

In the present study, HER2 positivity was not an associated feature of negative hormonal receptors, higher tumor grade, or younger age at diagnosis as shown in Table 1 and 3, which was different from results seen in other studies.^{46,47}

Most studies that attempt to identify predictive factors of complete pathological response in HER2-positive breast cancer patients are retrospective. In our prospective study, an increased probability of pCR was evidenced for patients with higher Ki67, corroborating retrospective data from 114 patients with HER2-positive tumors enrolled in the NOAH (Neoadjuvant Herceptin) trial, which showed a high proliferation score received the greatest benefit from trastuzumab-based chemotherapy.⁴⁸

The literature favors pCR for breast cancer patient subgroups that are Hormone Receptor (HR)-negative compared to HR-positive, as seen in the CALBG 40601 study with an overall pCR of 46% and a pCR in the HR-negative group of up to 69%.⁴⁹ In the NeoALTTO study, the trastuzumab arm differed according to HR status with pCR rates of 36.5% versus 22.7% (HR-negative versus HR-positive) and for the combination of trastuzumab and lapatinib with 61.3% versus 41.6%, respectively.⁵⁰ In the NeoSphere study,

an overall pCR rate of 63.2% versus 26% was seen for HR-negative versus HR-positive disease, respectively, and a difference of 27.3% versus 5.9% in the combination arm of pertuzumab and trastuzumab, respectively.¹⁰

The presence of lymphocytic infiltrate has been the subject of debate, with more established results in triple negative breast cancer. In HER2-positive patients, the studies are not yet unanimous regarding the relation between lymphocytic infiltrate and pathological response. In the NeoALTTO study, levels of TILs were significantly associated with improved pCR,⁵¹ but in Heppner et al's study, HER2-positive tumor samples of the neoadjuvant GeparQuinto trial showed that tumors with higher TILs levels did not have statistically significantly improved pCR rates,⁵² the same occurring in our protocol.

Breast tumors showing immunostaining for p53 are more frequently ER-negative and PgR-negative. They have been associated with a high proliferation rate, high histological grade, aneuploidy and poorer survival.⁵³

Chen MB et al conducted the first meta-analysis to assess the usefulness of TP53 status for predicting the response of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy. Their data support TP53 status as a useful predictive factor for assessing treatment response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients, but the interactions of p53 and HER2-positive status remain unknown and should be topics for further investigation.⁵⁴

Different approaches to assess p53 in breast cancer patients,⁵⁵ can be performed and may provide apparently contradictory results regarding the role of p53 in pathological response. For example, in CALGB 40601, the p53 signature was independently associated with high pCR rates in 305 patients with HER2-positive breast cancer,⁴⁹ and in the GeparSixto study this association was not observed in subgroups of HER2-positive patients.⁵⁵ In our analysis, p53 expression was not associated with a pCR increase.

In our study, nuclei/cytoplasmic β -catenin expression was associated with a higher rate of pCR after neoadjuvant treatment with ZOL, which was different from Elsamany et al.⁵⁶

Safety was an important objective analyzed. The results show that the association of anthracycline and taxane with trastuzumab and ZOL in neoadjuvant therapy is safe, and no adverse effect of grade 3 or higher was related to ZOL.

Considering that delays and/or reductions in chemotherapy reduce the possibility of achieving the maximal benefit, we evaluated the patients' compliance. The compliance reduction (Table 5) occurred mainly during treatment with docetaxel (14%). Because these AE often persisted for more than seven days, compliance with ZOL was compromised in 9% of patients. In general, the treatment proposed in the study had good patient compliance.

In conclusion, although there were limitations in the Zo-NanTax study, because it is a single-center and single-arm study of the combination of anthracycline and taxane with trastuzumab and ZOL in neoadjuvant HER2-positive breast cancer, the results demonstrated the treatment was active and feasible, without aggravating toxicity. Clinicopathological factors predictive of pathological response seem to have a different impact when the HER2 and mevalonate pathways are being blocked, and future studies with molecular evaluation may provide better clarification.

FINANCIAL SUPPORT

Brazilian National Cancer Institute, Ministry of Health

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Susanne Crocamo, Eliana Abdelhay

Provision of study materials or patients: Susanne Crocamo, Renata Binato, Giselle Vignal, Lídia Magalhães, Roberta Sarmiento, Maria Theresa Accioly, Sandra Gioia, Pedro Maroun, Pamela Moutinho, Vivianne Freitas, Karuline Catein, Eliana Abdelhay

Collection and assembly of data: Susanne Crocamo, Roberta Sarmiento, Isabele Small, Eliana Abdelhay

Data analysis and interpretation: Susanne Crocamo, Isabele Small, Renata Binato, Eliana Abdelhay

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

Accountable for all aspects of the work: All authors

REFERENCES

1. Mamounas EP, Fisher B: Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy in patients with breast cancer. *Semin Oncol* 28:389–399, 2001
2. 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* 30:96–102, 2001
3. Corben AD, Abi-Raad R, Popa I, et al: Pathologic response and long-term follow-up in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy: a comparison between classifications and their practical application. *Arch Pathol Lab Med* 137:1074–1082, 2013
4. Minckwitz von 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* 30:1796–1804, 2012
5. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al: Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 23:3676–3685, 2005
6. Untch M, Rezai M, Loibl S, et al: Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol* 28:2024–2031, 2010
7. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al: Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomized controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 375:377–384, 2010
8. Burstein HJ: Novel agents and future directions for refractory breast cancer. *Semin Oncol* 38:S17-S24, 2011 (Suppl 2)
9. Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, et al: Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 5:317-328, 2004
10. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, 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* Jan 13:5-32, 2012
11. 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* 24:2278-2284, 2013
12. Coleman R, de Boer R, Eidtmann H, et al: Zoledronic acid (zoledronate) for postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole (ZO-FAST study): final 60-month results. *Ann Oncol* 24:398-405, 2013
13. Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W, et al: Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 360:679-691, 2009

14. Gnant M, Mlineritsch B, Stoeger H, et al: Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12. *Ann Oncol* 26:313-320, 2015
15. Koto K, Murata H, Kimura S, et al: Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Oncol Rep* 24:233-239, 2010
16. Di Salvatore M, Orlandi A, Bagalà C, et al: Anti-tumour and anti-angiogenic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. *Cell Prolif* 44:139-146, 2011
17. Denoyelle C, Hong L, Vannier JP, et al: New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and-independent effects. *Br J Cancer* 88:1631-1640, 2003
18. Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, et al: Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res* 10:4559-4567, 2004
19. Coscia M, Quaglino E, Lezzi M, et al: Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med*, 14:2803-2815, 2010
20. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, et al: The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 84:1126-1234, 2001
21. Ottewell PD, Mönkkönen H, Jones M, et al: Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 100:1167-1178, 2008
22. Neville-Webbe HL, Coleman RE, Holen I: Combined effects of the bisphosphonate, zoledronic acid and the aromatase inhibitor letrozole on breast cancer cells in vitro: evidence of synergistic interaction. *Br J Cancer* 102:1010-1017, 2010
23. Edge Stephen B, Byrd, DR, Compton, CC, et al (eds): *AJCC cancer staging manual* (7th ed). New York, NY, Springer-Verlag, 2010, pp 347-377
24. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403-410, 1991
25. Rosen PP, Oberman HA: Tumors of the mammary gland. In: *Atlas of tumor pathology*, 3rd ser., fasc. 7. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1993, 158-160
26. Gilchrist KW, Gray R, Fowble B, et al: Tumor necrosis is a prognostic predictor for early recurrence and death in lymph node positive breast cancer: a 10-year follow up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. *J Clin Oncol* 11:1929-1935, 1993
27. Lester SC, Bose S, Chen-Yi C, et al: Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med* 133:1515-1538, 2009
28. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, et al: Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without Carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol* 33:983-991, 2015
29. Deyarmin B, Kane JL, Valente AL, et al: Effect of ASCO/CAP guidelines for determining ER status on molecular subtype. *Ann Surg Oncol* 20:87-93, 2013
30. Balázs A, Veronika Z, Laura V, et al: Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Diagn Pathol* 12:20, 2017. 10.1186/s13000-017-0608-5

31. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al: 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* 31:3997–4013, 2013
32. Lara JF, Thor AD, Dressler LG, et al: p53 Expression in node-positive breast cancer patients: results from the Cancer and Leukemia Group B 9344 Trial (159905). *Clin Cancer Res* 17:5170-5178, 2011
33. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, et al: Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53:1696-1701, 1993
34. Karayiannakis AJ, Nakopoulou L, Gakiopoulou H, et al: Expression patterns of β -catenin in in situ and invasive breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 27:31-36, 2001
35. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, et al: Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 25:4414-4422, 2007
36. Chirivella I, Bermejo B, Insa A, et al: Optimal delivery of anthracycline-based chemotherapy in the adjuvant setting improves outcome of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 114:479–484, 2009
37. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al: Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 384:164-172, 2014
38. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, 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* 29:3351-3357, 2011
39. Broglio KR, Quintana M, Foster M, et al: Association of Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Therapy in HER2-Positive Breast Cancer with Long-Term Outcomes: A Meta-Analysis. *JAMA Oncol* 2:751-760, 2016
40. Mark MM: The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26:6469–6487, 2007
41. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al: Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol* 15:640-647, 2014
42. Chan A, Delaloue A, Holmes FA, et al: Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17:367-377, 2016
43. Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FK, et al: Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure–activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res* 13:1668-1678, 1998
44. Fernández-Medarde A, Santos E: Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & Cancer* 2: 344-358, 2011
45. Huang HJ, Neven P, M Drijckoningen M: Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. *J Clin Pathol* 58: 611–616, 2005
46. Krishnaswamy U, Balachandran I, Rajakumar I, et al: Correlation of HER-2 neu over-expression with clinicopathological features of carcinoma breast *Apollo Med* 10:313-317, 2013
47. Prat A, Bianchini G, Thomas M, et al: Research-based PAM50 subtype predictor identifies higher responses and improved survival outcomes in HER2-positive breast cancer in the NOAH study *Clin Cancer Res*, 20:511-521, 2014

48. Carey LA, Berry DA, Cirincione CT, et al: Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. *J Clin Oncol* 34:542-549, 2016
49. Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, et al: Lapatinib with trastuzumab for HER2 positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open label, multicentre phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol* 15: 1137-1146, 2014
50. Salgado R, Denkert C, Campbell C, et al: Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations with Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated with Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol* 1:448-454, 2015
51. Heppner BI, Untch M, Pfitzner BM, et al: Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 22:5747-5754, 2016
52. Bertheau P, Espié M, Turpin E, et al: TP53 Status and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. *Pathobiology* 75:132–139, 2008
53. Chen M-B, Zhu Y-Q, Xu J-Y, et al: Value of TP53 Status for Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 7:e39655, 2012. 10.1371/journal.pone.0039655
54. Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS, et al: Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer* 6:276, 2006. 10.1186/1471-2407-6-276
55. Darb-Esfahani S, Denkert C, Stenzinger A, et al: Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Oncotarget* 7:67686-67698, 2016
56. Elsamany S, Elemam O, Elmorsy S, et al: Predictive Value of the Pattern of β -Catenin Expression for Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 17:4089-4093, 2016

FIGURE LEGEND

Figure 1 – CONSORT diagram for Zo-NanTax study. Seventy-one patients were enrolled. Eleven patients were screening failures. Ten of them had metastatic disease after having screening exams, and one was in stage IIIC. * After neoadjuvant treatment, two patients refused surgery because they had achieved complete clinical response but did not withdraw ICF.

TABLES

Table 1. Patients and disease characteristics at baseline.

Table 2. Pathological response rate.

Table 3. Association between pathological complete response (RCB 0) and baseline clinicopathological features.

Table 4. Adverse Events in 60 Patients.

Table 5. Compliance rate distributed by type of drug used in the neoadjuvant chemotherapy regimen.

8.6 Lista de genes diferencialmente expressos nas biópsias das amostras pré-tratamento de 18 pacientes do estudo Zo-NAnTax

Abreviatua do nome do gene	Resposta Completa (sem CDIS) X Resposta Incompleta	Regulação	Descrição
C15orf48	9,86	up	Homo sapiens chromosome 15 open reading frame 48 (C15orf48), transcript variant 2, mRNA [NM_032413]
ROPN1	6,32	up	Homo sapiens raphilin associated tail protein 1 (ROPN1), mRNA [NM_017578]
OLIG1	5,17	up	Homo sapiens oligodendrocyte transcription factor 1 (OLIG1), mRNA [NM_138983]
FAM13A	4,44	up	Homo sapiens family with sequence similarity 13, member A (FAM13A), transcript variant 1, mRNA [NM_014883]
DMKN	4,22	up	Homo sapiens dermokine (DMKN), transcript variant 1, mRNA [NM_001035516]
TRIM7	4,02	up	Homo sapiens tripartite motif containing 7 (TRIM7), transcript variant 6, mRNA [NM_033342]
CD5	3,85	up	Homo sapiens CD5 molecule (CD5), mRNA [NM_014207]
PM20D2	3,59	up	Homo sapiens peptidase M20 domain containing 2 (PM20D2), mRNA [NM_001010853]
C3	3,44	up	Homo sapiens complement component 3 (C3), mRNA [NM_000064]
KCNN4	3,41	up	Homo sapiens potassium channel, calcium activated intermediate/small conductance subfamily N alpha, member 4 (KCNN4), mRNA [NM_002250]
AIF1L	3,40	up	Homo sapiens allograft inflammatory factor 1-like (AIF1L), transcript variant 3, mRNA [NM_001185095]
FAM20A	3,40	up	Homo sapiens family with sequence similarity 20, member A (FAM20A), transcript variant 1, mRNA [NM_017565]
TUSC3	3,33	up	Homo sapiens tumor suppressor candidate 3 (TUSC3), transcript variant 2, mRNA [NM_178234]
PLCL2	3,30	up	Homo sapiens phospholipase C-like 2 (PLCL2), transcript variant 2, mRNA [NM_015184]
PLK2	3,24	up	Homo sapiens polo-like kinase 2 (PLK2), transcript variant 1, mRNA [NM_006622]
APCDD1	3,24	up	Homo sapiens adenomatosis polyposis coli down-regulated 1 (APCDD1), mRNA [NM_153000]
ARHGEF4	3,10	up	Homo sapiens Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 (ARHGEF4), transcript variant 2, mRNA [NM_032995]
CD82	3,05	up	Homo sapiens CD82 molecule (CD82), transcript variant 1, mRNA [NM_002231]
SAA4	3,02	up	Homo sapiens serum amyloid A4, constitutive (SAA4), mRNA [NM_006512]
FAM129A	3,00	up	Homo sapiens family with sequence similarity 129, member A (FAM129A), mRNA [NM_052966]
ITGB1BP1	3,00	up	Homo sapiens integrin beta 1 binding protein 1 (ITGB1BP1), transcript variant 1, mRNA [NM_004763]
WDR86	2,97	up	Homo sapiens WD repeat domain 86 (WDR86), transcript variant 1, mRNA [NM_001284260]
GPM6B	2,91	up	Homo sapiens glycoprotein M6B (GPM6B), transcript variant 2, mRNA [NM_001001996]
RNF166	2,91	up	Homo sapiens ring finger protein 166 (RNF166), transcript variant 1, mRNA [NM_178841]
SEMA4D	2,88	up	Homo sapiens sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain,

			(semaphorin) 4D (SEMA4D), transcript variant 2, mRNA [NM_001142287]
DFNA5	2,84	up	Homo sapiens deafness, autosomal dominant 5 (DFNA5), transcript variant 1, mRNA [NM_004403]
ZNF503	2,84	up	Homo sapiens zinc finger protein 503 (ZNF503), transcript variant 1, mRNA [NM_032772]
CXCL16	2,76	up	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 16 (CXCL16), transcript variant 2, mRNA [NM_001100812]
CLIP4	2,73	up	Homo sapiens CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4 (CLIP4), transcript variant 1, mRNA [NM_024692]
RASL10A	2,68	up	Homo sapiens RAS-like, family 10, member A (RASL10A), mRNA [NM_006477]
SAP30L	2,66	up	Homo sapiens SAP30-like (SAP30L), transcript variant 1, mRNA [NM_024632]
MANBA	2,64	up	Homo sapiens mannosidase, beta A, lysosomal (MANBA), mRNA [NM_005908]
HLA-B	2,64	up	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), mRNA [NM_005514]
ANKS6	2,62	up	Homo sapiens ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6 (ANKS6), mRNA [NM_173551]
HS3ST3B1	2,61	up	Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1 (HS3ST3B1), transcript variant 1, mRNA [NM_006041]
RGN	2,60	up	Homo sapiens regucalcin (RGN), transcript variant 2, mRNA [NM_152869]
C2CD2	2,60	up	Homo sapiens cDNA FLJ26009 fis, clone HRT03250, [AK129520]
LDLRAP1	2,59	up	Homo sapiens low density lipoprotein receptor adaptor protein 1 (LDLRAP1), mRNA [NM_015627]
RNASET2	2,58	up	Homo sapiens ribonuclease T2 (RNASET2), mRNA [NM_003730]
GFPT1	2,55	up	Homo sapiens glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1 (GFPT1), transcript variant 1, mRNA [NM_001244710]
ADI1	2,53	up	Homo sapiens acireductone dioxygenase 1 (ADI1), mRNA [NM_018269]
ANXA1	2,50	up	Homo sapiens annexin A1 (ANXA1), mRNA [NM_000700]
PRNP	2,48	up	Homo sapiens prion protein (PRNP), transcript variant 1, mRNA [NM_000311]
ERAP1	2,47	up	Homo sapiens endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1), transcript variant 2, mRNA [NM_001040458]
ARMCX6	2,47	up	Homo sapiens armadillo repeat containing, X-linked 6 (ARMCX6), transcript variant 3, mRNA [NM_001184768]
ETV5	2,46	up	Homo sapiens ets variant 5 (ETV5), mRNA [NM_004454]
LINC00842	2,45	up	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 842 (LINC00842), long non-coding RNA [NR_033957]
BLMH	2,44	up	Homo sapiens bleomycin hydrolase (BLMH), mRNA [NM_000386]
KCNQ1	2,44	up	Homo sapiens potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (KCNQ1), transcript variant 1, mRNA [NM_000218]
KIF1B	2,44	up	Homo sapiens kinesin family member 1B (KIF1B), transcript variant 2, mRNA [NM_183416]
RNF145	2,40	up	Homo sapiens ring finger protein 145 (RNF145), transcript variant 2, mRNA [NM_144726]
S100B	2,38	up	Homo sapiens S100 calcium binding protein B (S100B), mRNA [NM_006272]
CD97	2,36	up	Homo sapiens CD97 molecule (CD97), transcript variant 1, mRNA [NM_078481]
PRKD3	2,36	up	Homo sapiens protein kinase D3 (PRKD3), mRNA [NM_005813]
CCDC88B	2,35	up	Homo sapiens coiled-coil domain containing 88B (CCDC88B), mRNA [NM_032251]
TMPRSS2	2,35	up	Homo sapiens transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2), transcript variant 2, mRNA [NM_005656]
lnc-TARDBP-2	2,35	up	LNCipedia lincRNA (lnc-TARDBP-2), lincRNA [lnc-TARDBP-2:2]
C1QTNF4	2,33	up	Homo sapiens C1q and tumor necrosis factor related protein 4 (C1QTNF4), mRNA [NM_031909]
RILP	2,33	up	Homo sapiens Rab interacting lysosomal protein (RILP), mRNA

			[NM_031430]
CARD6	2,33	up	Homo sapiens caspase recruitment domain family, member 6 (CARD6), mRNA [NM_032587]
VASN	2,33	up	Homo sapiens vasorin (VASN), mRNA [NM_138440]
LXN	2,32	up	Homo sapiens latexin (LXN), mRNA [NM_020169]
RAB12	2,32	up	Homo sapiens RAB12, member RAS oncogene family (RAB12), mRNA [NM_001025300]
NOP9	2,31	up	Homo sapiens NOP9 nucleolar protein (NOP9), transcript variant 1, mRNA [NM_174913]
CDKN2C	2,30	up	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4) (CDKN2C), transcript variant 2, mRNA [NM_078626]
LYN	2,29	up	Homo sapiens LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase (LYN), transcript variant 1, mRNA [NM_002350]
ADM	2,28	up	Homo sapiens adrenomedullin (ADM), mRNA [NM_001124]
GLIPR2	2,28	up	Homo sapiens GLI pathogenesis-related 2 (GLIPR2), transcript variant 1, mRNA [NM_022343]
RIC8B	2,27	up	Homo sapiens RIC8 guanine nucleotide exchange factor B (RIC8B), mRNA [NM_018157]
HAPLN3	2,27	up	Homo sapiens hyaluronan and proteoglycan link protein 3 (HAPLN3), mRNA [NM_178232]
ODAM	2,27	up	Homo sapiens odontogenic, ameloblast associated (ODAM), mRNA [NM_017855]
MBP	2,27	up	Homo sapiens myelin basic protein (MBP), transcript variant 8, mRNA [NM_001025100]
KCTD9	2,26	up	Homo sapiens potassium channel tetramerization domain containing 9 (KCTD9), mRNA [NM_017634]
PLEKHA2	2,25	up	Homo sapiens pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2 (PLEKHA2), mRNA [NM_021623]
PIK3CD	2,24	up	Homo sapiens phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta (PIK3CD), mRNA [NM_005026]
FOS	2,23	up	Homo sapiens FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), mRNA [NM_005252]
UBA7	2,23	up	Homo sapiens ubiquitin-like modifier activating enzyme 7 (UBA7), mRNA [NM_003335]
DCTD	2,23	up	Homo sapiens dCMP deaminase (DCTD), transcript variant 1, mRNA [NM_001012732]
PTGS1	2,21	up	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS1), transcript variant 1, mRNA [NM_000962]
RRAGD	2,21	up	Homo sapiens Ras-related GTP binding D (RRAGD), mRNA [NM_021244]
TMEM8B	2,20	up	Homo sapiens transmembrane protein 8B (TMEM8B), transcript variant 3, mRNA [NM_016446]
PPARGC1B	2,20	up	Homo sapiens peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta (PPARGC1B), transcript variant 1, mRNA [NM_133263]
APCDD1L	2,19	up	Homo sapiens adenomatosis polyposis coli down-regulated 1-like (APCDD1L), mRNA [NM_153360]
SLC9A6	2,18	up	Homo sapiens solute carrier family 9, subfamily A (NHE6, cation proton antiporter 6), member 6 (SLC9A6), transcript variant 1, mRNA [NM_001042537]
TYSND1	2,17	up	Homo sapiens trypsin domain containing 1 (TYSND1), transcript variant 1, mRNA [NM_173555]
AP1B1	2,17	up	Homo sapiens adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit (AP1B1), transcript variant 1, mRNA [NM_001127]
AP5B1	2,17	up	Homo sapiens adaptor-related protein complex 5, beta 1 subunit (AP5B1), mRNA [NM_138368]
MSRA	2,16	up	Homo sapiens methionine sulfoxide reductase A (MSRA), transcript variant 1, mRNA [NM_012331]
PLXNB2	2,15	up	Homo sapiens plexin B2 (PLXNB2), mRNA [NM_012401]
IMPA2	2,15	up	Homo sapiens inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2 (IMPA2), mRNA [NM_014214]

OSBPL1A	2,15	up	Homo sapiens oxysterol binding protein-like 1A (OSBPL1A), transcript variant 2, mRNA [NM_080597]
PNPLA7	2,14	up	Homo sapiens patatin-like phospholipase domain containing 7 (PNPLA7), transcript variant 1, mRNA [NM_001098537]
TMBIM1	2,14	up	Homo sapiens transmembrane BAX inhibitor motif containing 1 (TMBIM1), mRNA [NM_022152]
HADHA	2,14	up	Homo sapiens hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit (HADHA), mRNA [NM_000182]
RASGRP1	2,13	up	Homo sapiens RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated) (RASGRP1), transcript variant 1, mRNA [NM_005739]
TRABD2A	2,12	up	Homo sapiens TraB domain containing 2A (TRABD2A), transcript variant 1, mRNA [NM_001277053]
ATP1A4	2,12	up	Homo sapiens ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 4 polypeptide (ATP1A4), transcript variant 1, mRNA [NM_144699]
ZFYVE28	2,12	up	Homo sapiens zinc finger, FYVE domain containing 28 (ZFYVE28), transcript variant 2, mRNA [NM_020972]
ZC3H12C	2,12	up	Homo sapiens zinc finger CCCH-type containing 12C (ZC3H12C), mRNA [NM_033390]
ALOX12-AS1	2,12	up	Homo sapiens cDNA FLJ90099 fis, clone HEMBA1006016, [AK074580]
ZMYND15	2,11	up	Homo sapiens zinc finger, MYND-type containing 15 (ZMYND15), transcript variant 2, mRNA [NM_032265]
SLC25A37	2,11	up	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29786] [ENST00000519973]
PTPRN2	2,11	up	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2 (PTPRN2), transcript variant 1, mRNA [NM_002847]
COMT	2,11	up	Homo sapiens catechol-O-methyltransferase (COMT), transcript variant 1, mRNA [NM_000754]
PPIE	2,10	up	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E) (PPIE), transcript variant 2, mRNA [NM_203456]
EMR2	2,10	up	Homo sapiens egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2 (EMR2), transcript variant 1, mRNA [NM_013447]
SLC31A2	2,10	up	Homo sapiens solute carrier family 31 (copper transporter), member 2 (SLC31A2), mRNA [NM_001860]
NFIX	2,10	up	Homo sapiens nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor) (NFIX), transcript variant 2, mRNA [NM_002501]
CPSF1	2,10	up	Homo sapiens cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa (CPSF1), mRNA [NM_013291]
KIF13B	2,09	up	Homo sapiens kinesin family member 13B (KIF13B), mRNA [NM_015254]
CREG1	2,09	up	Homo sapiens cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1), mRNA [NM_003851]
HNRNPDL	2,08	up	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRNPDL), transcript variant 2, mRNA [NM_031372]
LRRN4CL	2,08	up	Homo sapiens LRRN4 C-terminal like (LRRN4CL), mRNA [NM_203422]
PDGFA	2,07	up	Homo sapiens platelet-derived growth factor alpha polypeptide (PDGFA), transcript variant 2, mRNA [NM_033023]
TESC	2,07	up	Homo sapiens tescalcin (TESC), transcript variant 1, mRNA [NM_017899]
IGF2BP2	2,07	up	Homo sapiens insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2 (IGF2BP2), transcript variant 1, mRNA [NM_006548]
CLIC3	2,07	up	Homo sapiens chloride intracellular channel 3 (CLIC3), mRNA [NM_004669]
Inc-PABPC4-2	2,07	up	Homo sapiens cDNA FLJ36340 fis, clone THYMU2006468, [AK093659]
H2AFY2	2,06	up	Homo sapiens H2A histone family, member Y2 (H2AFY2), mRNA [NM_018649]
FZD1	2,05	up	Homo sapiens frizzled class receptor 1 (FZD1), mRNA [NM_003505]
TMCO4	2,05	up	Homo sapiens transmembrane and coiled-coil domains 4 (TMCO4), mRNA [NM_181719]
TRIM50	2,05	up	Homo sapiens tripartite motif containing 50 (TRIM50), transcript variant 1, mRNA [NM_178125]
GBA2	2,04	up	Homo sapiens glucosidase, beta (bile acid) 2 (GBA2), mRNA [NM_020944]

GP1R1	2,04	up	Homo sapiens G protein-coupled estrogen receptor 1 (GP1R1), transcript variant 3, mRNA [NM_001039966]
RPL41	2,04	up	Homo sapiens ribosomal protein L41 (RPL41), transcript variant 2, mRNA [NM_001035267]
EMILIN2	2,03	up	Homo sapiens elastin microfibril interfacier 2 (EMILIN2), mRNA [NM_032048]
RNF125	2,02	up	Homo sapiens ring finger protein 125, E3 ubiquitin protein ligase (RNF125), mRNA [NM_017831]
TNFRSF14	2,02	up	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (TNFRSF14), transcript variant 1, mRNA [NM_003820]
CLMP	2,02	up	Homo sapiens CXADR-like membrane protein (CLMP), mRNA [NM_024769]
ENAH	-2,01	down	Homo sapiens enabled homolog (Drosophila) (ENAH), transcript variant 1, mRNA [NM_001008493]
LGALS8	-2,01	down	Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (LGALS8), transcript variant 1, mRNA [NM_006499]
SNORA28	-2,01	down	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 28 (SNORA28), small nucleolar RNA [NR_002964]
ZNF692	-2,02	down	zinc finger protein 692 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26049] [ENST00000533976]
STK26	-2,02	down	Homo sapiens serine/threonine protein kinase 26 (STK26), transcript variant 1, mRNA [NM_016542]
SH3BP4	-2,03	down	Homo sapiens SH3-domain binding protein 4 (SH3BP4), mRNA [NM_014521]
GLI2	-2,04	down	Homo sapiens GLI family zinc finger 2 (GLI2), mRNA [NM_005270]
CILP2	-2,04	down	Homo sapiens cartilage intermediate layer protein 2 (CILP2), mRNA [NM_153221]
MLF1	-2,04	down	Homo sapiens myeloid leukemia factor 1 (MLF1), transcript variant 1, mRNA [NM_022443]
STX2	-2,04	down	Homo sapiens syntaxin 2 (STX2), transcript variant 1, mRNA [NM_001980]
UBE2T	-2,05	down	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2T (UBE2T), mRNA [NM_014176]
BAGE4	-2,05	down	Homo sapiens B melanoma antigen family, member 4 (BAGE4), mRNA [NM_181704]
HIST1H2AM	-2,05	down	Homo sapiens histone cluster 1, H2am (HIST1H2AM), mRNA [NM_003514]
SCAMP5	-2,05	down	Homo sapiens secretory carrier membrane protein 5 (SCAMP5), transcript variant 3, mRNA [NM_138967]
SNORD17	-2,06	down	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 17 (SNORD17), small nucleolar RNA [NR_003045]
RUNX1	-2,06	down	Homo sapiens runt-related transcription factor 1 (RUNX1), transcript variant 2, mRNA [NM_001001890]
GRB10	-2,06	down	Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 10 (GRB10), transcript variant 4, mRNA [NM_001001555]
CELSR1	-2,06	down	Homo sapiens cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (CELSR1), mRNA [NM_014246]
EMP2	-2,07	down	Homo sapiens epithelial membrane protein 2 (EMP2), mRNA [NM_001424]
AEBP1	-2,07	down	Homo sapiens AE binding protein 1 (AEBP1), mRNA [NM_001129]
THBD	-2,07	down	Homo sapiens thrombomodulin (THBD), mRNA [NM_000361]
HMGB3P1	-2,08	down	Homo sapiens high mobility group box 3 pseudogene 1 (HMGB3P1), non-coding RNA [NR_002165]
TUFT1	-2,08	down	Homo sapiens tuftelin 1 (TUFT1), transcript variant 1, mRNA [NM_020127]
INMT	-2,08	down	Homo sapiens indolethylamine N-methyltransferase (INMT), transcript variant 2, mRNA [NM_001199219]
EME1	-2,09	down	Homo sapiens essential meiotic structure-specific endonuclease 1 (EME1), transcript variant 2, mRNA [NM_152463]
FAM72D	-2,10	down	Homo sapiens family with sequence similarity 72, member D (FAM72D), mRNA [NM_207418]
TOB2P1	-2,10	down	Homo sapiens transducer of ERBB2, 2 pseudogene 1 (TOB2P1), non-coding RNA [NR_002936]

LOC644656	-2,10	down	Homo sapiens uncharacterized LOC644656 (LOC644656), long non-coding RNA [NR_036539]
CDKL5	-2,11	down	Homo sapiens cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5), transcript variant 1, mRNA [NM_003159]
HIST1H4K	-2,11	down	Homo sapiens histone cluster 1, H4k (HIST1H4K), mRNA [NM_003541]
SLC17A9	-2,11	down	Homo sapiens solute carrier family 17 (vesicular nucleotide transporter), member 9 (SLC17A9), transcript variant 2, mRNA [NM_001302643]
NRIP1	-2,11	down	Homo sapiens nuclear receptor interacting protein 1 (NRIP1), mRNA [NM_003489]
BRCA1	-2,12	down	Homo sapiens breast cancer 1, early onset (BRCA1), transcript variant 2, mRNA [NM_007300]
SNORD116-19	-2,15	down	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 116-19 (SNORD116-19), small nucleolar RNA [NR_001290]
C1QTNF5	-2,15	down	Homo sapiens C1q and tumor necrosis factor related protein 5 (C1QTNF5), transcript variant 1, mRNA [NM_015645]
LOC101928433	-2,16	down	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101928433 (LOC101928433), ncRNA [XR_241982]
IQCD	-2,19	down	Homo sapiens IQ motif containing D (IQCD), mRNA [NM_138451]
RNU12	-2,19	down	Homo sapiens RNA, U12 small nuclear (RNU12), small nuclear RNA [NR_029422]
SLC25A21	-2,21	down	Homo sapiens solute carrier family 25 (mitochondrial oxoadipate carrier), member 21 (SLC25A21), transcript variant 1, mRNA [NM_030631]
PXDN	-2,23	down	Homo sapiens peroxidasin (PXDN), mRNA [NM_012293]
RN7SL1	-2,24	down	Homo sapiens RNA, 7SL, cytoplasmic 1 (RN7SL1), SRP RNA [NR_002715]
GALNT6	-2,24	down	Homo sapiens polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GALNT6), mRNA [NM_007210]
COL9A3	-2,24	down	Homo sapiens collagen, type IX, alpha 3 (COL9A3), mRNA [NM_001853]
MPHOSPH9	-2,26	down	Homo sapiens M-phase phosphoprotein 9 (MPHOSPH9), transcript variant 1, mRNA [NM_022782]
HIST1H4L	-2,26	down	Homo sapiens histone cluster 1, H4l (HIST1H4L), mRNA [NM_003546]
SNORA81	-2,26	down	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 81 (SNORA81), small nucleolar RNA [NR_002989]
ST8SIA5	-2,26	down	Homo sapiens ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5 (ST8SIA5), mRNA [NM_013305]
COL8A1	-2,27	down	Homo sapiens collagen, type VIII, alpha 1 (COL8A1), transcript variant 1, mRNA [NM_001850]
SNORA73B	-2,27	down	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 73B (SNORA73B), small nucleolar RNA [NR_004404]
VWA2	-2,28	down	von Willebrand factor A domain containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24709] [ENST00000298715]
HIST1H2AI	-2,28	down	Homo sapiens histone cluster 1, H2ai (HIST1H2AI), mRNA [NM_003509]
LSM14B	-2,29	down	Homo sapiens LSM14B, SCD6 homolog B (S, cerevisiae) (LSM14B), mRNA [NM_144703]
PALLD	-2,29	down	Homo sapiens palladin, cytoskeletal associated protein (PALLD), transcript variant 2, mRNA [NM_016081]
PGM2L1	-2,30	down	Homo sapiens phosphoglucomutase 2-like 1 (PGM2L1), mRNA [NM_173582]
CLPSL2	-2,31	down	Homo sapiens colipase-like 2 (CLPSL2), transcript variant 1, mRNA [NM_001286550]
HIST1H4J	-2,32	down	Homo sapiens histone cluster 1, H4j (HIST1H4J), mRNA [NM_021968]
CACNG4	-2,32	down	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4 (CACNG4), mRNA [NM_014405]
HES6	-2,33	down	Homo sapiens hes family bHLH transcription factor 6 (HES6), transcript variant 1, mRNA [NM_018645]
VCAN	-2,35	down	Homo sapiens versican (VCAN), transcript variant 1, mRNA [NM_004385]
CHML	-2,35	down	Homo sapiens choroideremia-like (Rab escort protein 2) (CHML), mRNA [NM_001821]

PRICKLE1	-2,35	down	Homo sapiens prickle homolog 1 (Drosophila) (PRICKLE1), transcript variant 1, mRNA [NM_153026]
RAP2C	-2,35	down	Homo sapiens RAP2C, member of RAS oncogene family (RAP2C), transcript variant 2, mRNA [NM_021183]
CPNE5	-2,37	down	Homo sapiens copine V (CPNE5), mRNA [NM_020939]
SCARNA5	-2,39	down	Homo sapiens small Cajal body-specific RNA 5 (SCARNA5), guide RNA [NR_003008]
FAP	-2,40	down	Homo sapiens fibroblast activation protein, alpha (FAP), transcript variant 1, mRNA [NM_004460]
LOC286071	-2,41	down	Homo sapiens cDNA FLJ34440 fis, clone HLUNG2001214, [AK091759]
SNORA73A	-2,41	down	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 73A (SNORA73A), small nucleolar RNA [NR_002907]
SBK1	-2,46	down	Homo sapiens SH3 domain binding kinase 1 (SBK1), mRNA [NM_001024401]
MYB	-2,46	down	Homo sapiens v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog (MYB), transcript variant 2, mRNA [NM_005375]
MSI2	-2,47	down	Homo sapiens musashi RNA-binding protein 2 (MSI2), transcript variant 2, mRNA [NM_170721]
ARSG	-2,48	down	arylsulfatase G [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24102] [ENST00000448504]
XBP1	-2,48	down	Homo sapiens X-box binding protein 1 (XBP1), transcript variant 1, mRNA [NM_005080]
ALCAM	-2,49	down	Homo sapiens activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), transcript variant 1, mRNA [NM_001627]
ETNK2	-2,50	down	Homo sapiens ethanolamine kinase 2 (ETNK2), transcript variant 2, mRNA [NM_001297760]
MEST	-2,53	down	Homo sapiens mesoderm specific transcript (MEST), transcript variant 1, mRNA [NM_002402]
SSC5D	-2,54	down	Homo sapiens scavenger receptor cysteine rich family, 5 domains (SSC5D), transcript variant 1, mRNA [NM_001144950]
PDP1	-2,55	down	Homo sapiens pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1 (PDP1), transcript variant 2, mRNA [NM_001161779]
HECW2	-2,59	down	Homo sapiens HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (HECW2), mRNA [NM_020760]
NEK2	-2,61	down	Homo sapiens NIMA-related kinase 2 (NEK2), transcript variant 1, mRNA [NM_002497]
COL5A2	-2,61	down	Homo sapiens collagen, type V, alpha 2 (COL5A2), mRNA [NM_000393]
METRNL	-2,62	down	Homo sapiens meteorin, glial cell differentiation regulator (METRNL), mRNA [NM_024042]
INHBA	-2,62	down	Homo sapiens inhibin, beta A (INHBA), mRNA [NM_002192]
HIST1H3B	-2,63	down	Homo sapiens histone cluster 1, H3b (HIST1H3B), mRNA [NM_003537]
TEK	-2,63	down	Homo sapiens TEK tyrosine kinase, endothelial (TEK), transcript variant 1, mRNA [NM_000459]
C11orf96	-2,64	down	Homo sapiens chromosome 11 open reading frame 96 (C11orf96), mRNA [NM_001145033]
HN1	-2,65	down	Homo sapiens hematological and neurological expressed 1 (HN1), transcript variant 3, mRNA [NM_001002033]
FBXL20	-2,65	down	Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 20 (FBXL20), transcript variant 1, mRNA [NM_032875]
PLA2G16	-2,67	down	Homo sapiens phospholipase A2, group XVI (PLA2G16), transcript variant 1, mRNA [NM_007069]
RNFT2	-2,68	down	Homo sapiens ring finger protein, transmembrane 2 (RNFT2), transcript variant 2, mRNA [NM_032814]
RHOB	-2,70	down	ras homolog family member B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:668] [ENST00000272233]
GPRC5A	-2,72	down	Homo sapiens G protein-coupled receptor, class C, group 5, member A (GPRC5A), mRNA [NM_003979]
COL1A2	-2,72	down	Homo sapiens collagen, type I, alpha 2 (COL1A2), mRNA [NM_000089]
HOXC9	-2,74	down	Homo sapiens homeobox C9 (HOXC9), mRNA [NM_006897]
FN1	-2,77	down	Homo sapiens fibronectin 1 (FN1), transcript variant 7, mRNA [NM_054034]
UBE2C	-2,77	down	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C), transcript

			variant 4, mRNA [NM_181801]
COL12A1	-2,78	down	Homo sapiens collagen, type XII, alpha 1 (COL12A1), transcript variant long, mRNA [NM_004370]
RDM1	-2,78	down	Homo sapiens RAD52 motif containing 1 (RDM1), transcript variant 2, mRNA [NM_001034836]
HIST2H3A	-2,79	down	Homo sapiens histone cluster 2, H3a (HIST2H3A), mRNA [NM_001005464]
HIST1H1B	-2,85	down	Homo sapiens histone cluster 1, H1b (HIST1H1B), mRNA [NM_005322]
MSX2P1	-2,85	down	Homo sapiens msh homeobox 2 pseudogene 1 (MSX2P1), non-coding RNA [NR_002307]
HIST1H4A	-2,86	down	Homo sapiens histone cluster 1, H4a (HIST1H4A), mRNA [NM_003538]
TMEM63C	-2,88	down	Homo sapiens transmembrane protein 63C (TMEM63C), mRNA [NM_020431]
ERBB2	-2,92	down	Homo sapiens erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2), transcript variant 2, mRNA [NM_001005862]
HIST1H3H	-2,97	down	Homo sapiens histone cluster 1, H3h (HIST1H3H), mRNA [NM_003536]
TUBB3	-2,98	down	Homo sapiens tubulin, beta 3 class III (TUBB3), transcript variant 1, mRNA [NM_006086]
COL1A1	-2,98	down	Homo sapiens collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA [NM_000088]
RASL11B	-2,99	down	Homo sapiens RAS-like, family 11, member B (RASL11B), mRNA [NM_023940]
DHDH	-3,01	down	Homo sapiens dihydrodiol dehydrogenase (dimeric) (DHDH), mRNA [NM_014475]
CENPF	-3,01	down	Homo sapiens centromere protein F, 350/400kDa (CENPF), mRNA [NM_016343]
RARA	-3,03	down	Homo sapiens retinoic acid receptor, alpha (RARA), transcript variant 2, mRNA [NM_001024809]
P2RY2	-3,04	down	Homo sapiens purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2 (P2RY2), transcript variant 1, mRNA [NM_176072]
ARL4D	-3,04	down	Homo sapiens ADP-ribosylation factor-like 4D (ARL4D), mRNA [NM_001661]
PLAC1	-3,10	down	Homo sapiens placenta-specific 1 (PLAC1), mRNA [NM_021796]
SLC16A2	-3,11	down	Homo sapiens solute carrier family 16, member 2 (thyroid hormone transporter) (SLC16A2), mRNA [NM_006517]
PPAPDC1A	-3,12	down	Homo sapiens phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A (PPAPDC1A), mRNA [NM_001030059]
LAMP5	-3,15	down	Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein family, member 5 (LAMP5), transcript variant 1, mRNA [NM_012261]
CLGN	-3,16	down	Homo sapiens calmegin (CLGN), transcript variant 1, mRNA [NM_004362]
SFRP2	-3,18	down	Homo sapiens secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2), mRNA [NM_003013]
GREB1	-3,19	down	Homo sapiens GREB1 protein, mRNA (cDNA clone IMAGE:6729261), partial cds, [BC071853]
EFHD1	-3,23	down	Homo sapiens EF-hand domain family, member D1 (EFHD1), transcript variant 1, mRNA [NM_025202]
SNORD3B-1	-3,31	down	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 (SNORD3B-1), small nucleolar RNA [NR_003271]
FAR2	-3,34	down	Homo sapiens fatty acyl CoA reductase 2 (FAR2), transcript variant 2, mRNA [NM_018099]
MEX3A	-3,46	down	Homo sapiens mex-3 RNA binding family member A (MEX3A), mRNA [NM_001093725]
CLDN3	-3,51	down	Homo sapiens claudin 3 (CLDN3), mRNA [NM_001306]
SNORA23	-3,52	down	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 23 (SNORA23), small nucleolar RNA [NR_002962]
CEP55	-3,55	down	Homo sapiens centrosomal protein 55kDa (CEP55), transcript variant 1, mRNA [NM_018131]
MTL5	-3,59	down	Homo sapiens metallothionein-like 5, testis-specific (tesmin) (MTL5), transcript variant 1, mRNA [NM_004923]
CACNA1H	-3,69	down	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit (CACNA1H), transcript variant 1, mRNA [NM_021098]
MATN3	-3,87	down	Homo sapiens matrilin 3 (MATN3), mRNA [NM_002381]

CYP2B6	-3,89	down	Homo sapiens cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6 (CYP2B6), mRNA [NM_000767]
LINC01116	-4,23	down	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 1116 (LINC01116), long non-coding RNA [NR_040001]
TRIM58	-4,23	down	Homo sapiens tripartite motif containing 58 (TRIM58), mRNA [NM_015431]
MMP3	-4,54	down	Homo sapiens matrix metallopeptidase 3 (stromelysin 1, progelatinase) (MMP3), mRNA [NM_002422]
COL10A1	-5,09	down	Homo sapiens collagen, type X, alpha 1 (COL10A1), mRNA [NM_000493]
MMP11	-5,10	down	Homo sapiens matrix metallopeptidase 11 (stromelysin 3) (MMP11), mRNA [NM_005940]
FOXA1	-5,21	down	Homo sapiens forkhead box A1 (FOXA1), mRNA [NM_004496]
SERPINA3	-6,87	down	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3 (SERPINA3), mRNA [NM_001085]
MGP	-6,87	down	Homo sapiens matrix Gla protein (MGP), transcript variant 1, mRNA [NM_001190839]