



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

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

***CYNTHIA MARA BRITO LINS PEREIRA***

**Avaliação de Características Clínico-Patológicas e Moleculares na Resposta à  
Quimioterapia no Câncer de Mama Localmente Avançado**

**Orientadores: Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano  
Profa. Dra. Samia Demachki**

**RIO DE JANEIRO  
2016**



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

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

***CYNTHIA MARA BRITO LINS PEREIRA***

**Avaliação de Características Clínico-Patológicas e Moleculares na Resposta à  
Quimioterapia no Câncer de Mama Localmente Avançado**

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

**Orientadores: Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano  
Profa. Dra. Samia Demachki**

**RIO DE JANEIRO  
2016**

P439a Pereira, Cynthia Mara Brito Lins

Avaliação de Características Clínico-Patológicas e Moleculares na Resposta à Quimioterapia no Câncer de Mama Localmente Avançado. / Cynthia Mara Brito Lins Pereira. - Rio de Janeiro: INCA, 2016.

155 f.: il. color.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Programa de Pós-graduação em Oncologia, 2016. Orientador: Rommel Mario Rodriguez Burbano. Co-orientador: Samia Demachki.

1. Neoplasias da Mama. 2. Terapia Neoadjuvante. 3. Ciclofosfamida. 4. Antraciclinas. 5. Técnicas de Laboratório Clínico. 6. Genes myc. I. Burbano, Rommel Mario Rodriguez. II. Demachki, Samia. III. Título.

CDD 616.99449



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

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

***CYNTHIA MARA BRITO LINS PEREIRA***

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E  
MOLECULARES NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER DE MAMA  
LOCALMENTE AVANÇADO**

**Orientadores: Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano  
Profa. Dra. Samia Demachki**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

\_\_\_\_\_ **Presidente**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ **Suplente I**

\_\_\_\_\_ **Suplente II**

**RIO DE JANEIRO  
2016**



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

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

### **AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO**

#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Cynthia Mara Brito Lins Pereira**

A quimioterapia neoadjuvante refere-se à administração de quimioterápico antes do tratamento locorregional, e é um tratamento padrão em tumores de mama localmente avançados. O câncer de mama é uma patologia heterogênea, onde tumores apresentam comportamento biológico e diferentes respostas à quimioterapia neoadjuvante, mesmo com estadiamentos iguais. Com base na análise concomitante da expressão do receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (*HER-2/c-erbB-2*), da proteína Ki67 e de receptores hormonais de estrogênio e progesterona, o câncer de mama é dividido subtipos moleculares, os quais são úteis para orientar as decisões de tratamento, porém apresentam ambiguidades. Neste contexto, propusemos que os genes *MYC* e *KRAS* podem ser candidatos a biomarcadores com valor preditivo e prognóstico, visto que as suas proteínas são alvo dos sinais proliferativos dirigidos pela proteína *HER-2* em células de câncer de mama e porque a proteína *MYC* pode ser regulada pelos receptores de estrogênio ou progesterona. Este estudo foi dividido em duas fases, uma retrospectiva e uma prospectiva. Os resultados retrospectivos da análise de 116 amostras tumorais geraram a primeira publicação científica que descreve o significado preditivo e prognóstico das alterações dos genes *MYC* e *KRAS* em pacientes com câncer de mama localmente avançado, tratados com quimioterapia neoadjuvante padrão com antraciclina e ciclofosfamida (AC). A avaliação conjunta da idade da paciente, do grau tumoral, do subtipo molecular e das alterações dos genes *MYC* e *KRAS* revelou que a amplificação do gene *MYC* é um fator preditivo de quimiossensibilidade ao tratamento AC, em pacientes de idade  $\leq 40$  anos, com tumores de grau 1, dos subtipos luminal B e *HER-2*. Enquanto que a mutação do códon 12 do gene *KRAS* foi a única variável independente observada no modelo de regressão logística para avaliar fatores de risco para o grau tumoral e foi interpretada como um biomarcador de mau prognóstico. Na fase prospectiva, avaliamos o papel dos biomarcadores supracitados como fatores preditores de resposta patológica para a quimioterapia neoadjuvante com AC, seguido da utilização do docetaxel (T) (regime AC + T) em 51 tumores. Na análise multivariada, a imunorreatividade de *MYC* e a presença de um número grande de cópias de alelos de *MYC*, foram fatores preditores para resposta patológica parcial. A análise da curva ROC revelou que o melhor ponto de corte, para a previsão de uma resposta patológica completa, é a proporção de 2,5 alelos de *MYC*/centrômeros do cromossomo 8 ou 7 alelos de *MYC*/núcleo. Desta forma, *MYC* tem um papel importante na quimiossensibilidade para AC + T. Adicionalmente, a amplificação de *MYC* pode ser um fator preditor de resposta patológica ao esquema AC + T, visto que os pacientes com um aumento do número de cópias do gene *MYC* mostraram maior frequência de resposta patológica completa para este tratamento. Finalmente, as pacientes jovens, incluídas na fase prospectiva, foram investigadas para a presença de mutações germinativas. As mutações mais frequentes estavam nos genes *BRCA1* e *BARD1*. O tratamento quimioterápico é bastante oneroso e a utilização de mais biomarcadores moleculares permite a criação de um protocolo de triagem que poderá aumentar a acurácia de predição da resposta ao tratamento, beneficiando as pacientes com a determinação mais adequada do prognóstico e o oferecimento de um tratamento seletivo.



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E  
MOLECULARES NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER DE MAMA  
LOCALMENTE AVANÇADO**

**ABSTRACT**

**TESE DE DOUTORADO**

**Cynthia Mara Brito Lins Pereira**

Neoadjuvant chemotherapy refers to the administration of chemotherapy prior to locoregional treatment, being a standard procedure of locally advanced breast cancer. Breast cancer is a heterogeneous disease where tumors with the same histological types and stage have different responses to neoadjuvant chemotherapy. Based on simultaneous analysis of the expression of the receptor-2, the human epidermal growth factor (*HER-2* / *c-erbB-2*), the Ki67 protein and hormone receptors for estrogen and progesterone, breast cancer is divided into molecular subtypes, which are useful to guide treatment decisions, however there are ambiguities. In this context, we propose that *MYC* and *KRAS* may be biomarkers candidates for predictive and prognostic value, since their proteins are targets of proliferative signals driven by *HER-2* protein in breast cancer cells and also, because *MYC* protein can be regulated by estrogen and/or progesterone receptors. This study was divided into two phases; a retrospective and a prospective phase. Retrospective analysis of 116 tumor samples generated the first article describing the predictive and prognostic values on *MYC* and *KRAS* changes in patients with locally advanced breast cancer treated with standard neoadjuvant chemotherapy with anthracycline and cyclophosphamide (AC). The joint assessment of the patient's age, tumor grade, molecular subtype and changes on *MYC* and *KRAS* genes revealed that the amplification of *MYC* gene is a predictor of chemosensitivity to AC treatment, on patients age of  $\leq 40$  years with tumors grade 1, luminal subtypes B and *HER-2+*. Mutation on codon 12 of the *KRAS* gene was the only independent variable observed in the logistic regression model to assess risk factors being interpreted as a biomarker of poor prognosis. In the prospective phase, we evaluated the role of described biomarkers as predictors of response to neoadjuvant chemotherapy with AC followed by docetaxel (T) (T + AC system) in 51 tumors. In multivariate analysis, the immunoreactivity of *MYC* and the presence of a large number of *MYC* allele copies, were predictors of partial response. The ROC curve analysis showed that the best cut off point for prediction of a complete pathological response is the ratio between 2.5 alleles of *MYC* / centromeres of chromosome 8 or 7 alleles of *MYC* / nuclei. Thus, *MYC* plays an important role in chemosensitivity to AC + T. Additionally, the amplification of *MYC* can be a predictor of pathologic response factor to the AC + T scheme, since patients with an increased number of *MYC* copies showed greater complete pathological response to this treatment. Finally, the young patients included in the prospective phase, were investigated for the presence of germline mutations. The most common mutations were in genes *BRCA1* and *BARD1*. The chemotherapy treatment is quite expensive and the use of more molecular biomarkers allows the use of new screening protocols that may increase the accuracy of prediction of response to treatment, benefiting patients with the most appropriate prognosis and offering a selective treatment.

## AGRADECIMENTOS

Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã (Chico Xavier).

Agradeço a **Deus** por me guiar em cada página que escrevo ao longo desta jornada, chamada vida, e por cada nova conquista.

A meu pai **Carlindo Lins**, que sempre foi meu exemplo de seriedade, disciplina, caráter, e me fez despertar o amor pela docência.

A minha mãe **Cezarina Lins**, pois sem ela eu jamais chegaria aqui, essa Tese é dela também. Agradeço por ser essa avó maravilhosa, e por seu auxílio no cuidar dos netos, em minha ausência.

A minha irmã **Cybelle Lins**, amiga de todas as horas, me auxiliando no processo da minha vida acadêmica, me incentivando em todos os momentos da minha vida.

Ao **Edmilson Farias**, meu marido e companheiro, que soube compreender minhas viagens, meus estresses, minhas ansiedades, meus medos, enfim, soube me apoiar na execução desta Tese.

Aos meus filhos **Arthur** e **Ana Laura**, para eles eu peço desculpas. Desculpa pela ausência nas festas da escola, dos campeonatos de futebol, das brincadeiras de boneca, pelas viagens, e pelas noites em que não pude rezar com vocês antes de dormir, enfim por não poder atendê-los sempre que requisitavam. Mas amo vocês profundamente, e esta Tese dedico a minha borboletinha e ao meu rei.

Ao meu orientador **Rommel Burbano**, que sempre soube me tranquilizar nos momentos de tensão; sempre me atendeu, quando solicitei, mantendo sua calma e tranquilidade.

A minha co-orientadora **Samia Demachki**, agradeço por sua dedicação e por sua postura resolutiva e pró-ativa.

A professora **Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay**, por ter me acolhido e acreditado no meu trabalho, por ser esta mulher admirável, que tem a garra para o trabalho, a sabedoria para coordenar e administrar tantos a sua volta, mas ao mesmo tempo tem a simplicidade e a doçura quando necessário, para tomar decisões, acalantar os nossos anseios. É uma mulher que sabe navegar e transitar nas “vias de sinalização dos genes, nas mutações, na proteômica” e logo a seguir viajar nas lembranças de seus filhos e netos com um largo sorriso no rosto. Com ela eu aprendi que a ciência pode andar de mãos dadas com a família, que podemos sim sermos pesquisadoras e mãe, esposa, irmã. Esta aproximação já valeu os meus anos de estudo. Agradeço ainda pelo seu vasto conhecimento e por sua orientação que foi fundamental na construção desta Tese. Saiba que seria sua eterna “fã” e serei muito grata por seu acolhimento.

A **Liz Almeida**, agradeço por ter me acolhido em “sua casa”, de ter me incentivado, me despertado sobre a importância do conhecimento da Epidemiologia para a compreensão e tratamento de qualquer doença. Agradeço ainda, pois me fez prometer que terei que lutar para mudar a realidade das mulheres da minha região. A promessa foi feita e já estamos plantando uma semente incentivada por ela.

A **Miriam Carvalho de Souza**, pelo seu carinho, paciência, amizade, organização, fé, e por

me ceder muitas vezes seu espaço de trabalho. Agradeço ainda por me ensinar uma nova visão de bioestatística.

A **Universidade Federal do Pará** e ao **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, por essa união em prol do estímulo à pesquisa e ao conhecimento na área do Oncologia.

Aos meus **amigos da pós graduação**, pela companhia nesta etapa de aprendizado.

A minha eterna gratidão, àquelas que foram objetos de meu estudo, **minhas pacientes**, que confiaram em mim e acreditaram que através do nosso trabalho a dor do tratamento e os momentos difíceis na luta pelo câncer pudessem ser amenizados. Esta Tese foi feita com um objetivo maior de buscar mais conhecimentos para oferecer as essas guerreiras.

A **Raquel Montenegro**, pelas orientações a mim destinadas

A **Camila Bandeira**, pelo auxílio da revisão da anatomopatológica.

A equipe do **DAME** do Hopsital Ophir Loyola.

Aos funcionários do **UNACON**.

A **Luciene Cavalcante**, por sua competência na organização de minha Tese, e por sua amizade também.

A **Lia Barile**, por sua revisão ortográfica.

Agradeço ainda a equipe do CEMO do INCA, em especial ao **Gerson Ferreira e Diego Coutinho**, que foram fundamentais para a análise genética desta Tese.

**Agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram do desenvolvimento dessa tese.**

*É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia.*

*Clarisse Lispector*

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	MAGNITUDE DO CÂNCER DE MAMA.....	1
1.2	FATORES DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA.....	4
1.3	GENÉTICA DO CÂNCER E CARCINOGENESE MAMÁRIA.....	10
1.4	ESTADIAMENTO CLÍNICO.....	15
1.5	HISTOPATOLOGIA, IMUNOHISTOQUÍMICA E PATOLOGIA MOLECULAR NO CARCINOMA MAMÁRIO.....	18
<b>1.5.1</b>	<b>Diagnóstico histopatológico do carcinoma de mama.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Fatores prognósticos e preditivos em carcinoma de mama.....</b>	<b>21</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Ki-67.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5.4</b>	<b>Receptores hormonais.....</b>	<b>24</b>
<b>1.5.5</b>	<b>HER-2 / c-erbB2.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.6</b>	<b>Classificação molecular do câncer de mama.....</b>	<b>31</b>
1.6	BIOMARCADORES.....	33
<b>1.6.1</b>	<b>Gene MYC.....</b>	<b>36</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Gene KRAS.....</b>	<b>39</b>
1.7	QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE.....	42
1.8	RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA (RNM).....	48
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	52
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS NO TUMOR.....	52
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS NA PACIENTE.....	52
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
3.1	FASE RETROSPECTIVA- ETAPA I.....	54
<b>3.1.1</b>	<b>População do estudo.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Resposta clínica à quimioterapia – Adriamicina e Ciclofosfamida.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Seleção do bloco de parafina.....</b>	<b>56</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Imunohistoquímica.....</b>	<b>56</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Análise citogenética molecular.....</b>	<b>58</b>

3.1.7	<b>Análise da mutação no gene <i>KRAS</i>.....</b>	<b>59</b>
3.1.8	<b>Análise estatística.....</b>	<b>59</b>
3.2	<b>FASE PROSPECTIVA- ETAPA II.....</b>	<b>61</b>
3.2.1	<b>População do estudo .....</b>	<b>61</b>
3.2.2	<b>Resposta clínica e radiológica à quimioterapia – Adriamicina e Ciclofosfamida + Taxane.....</b>	<b>62</b>
3.2.3	<b>Análise anatomopatológica e molecular .....</b>	<b>64</b>
3.2.4	<b>Análise estatística.....</b>	<b>64</b>
3.2.5	<b>Painel genético de genes associados ao risco de câncer de mama .....</b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
4.1	RESULTADOS DO ESTUDO RETROSPECTIVO.....	73
4.2	RESULTADOS DA ETAPA II .....	83
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>106</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>
	<b>APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>123</b>
	<b>APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de sangue para Pesquisa de painel genético de genes de risco para câncer de mama.....</b>	<b>126</b>
	<b>ANEXO A – Artigo Científico – Fase II do Estudo .....</b>	<b>130</b>
	<b>ANEXO B – Artigo Científico – Fase I do Estudo.....</b>	<b>147</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.1</b> – Taxa de incidência estimada para o ano de 2016/100 mil habitantes para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma) em mulheres, no Brasil por regiões geográficas .....	2
<b>Figura 1.2</b> – Taxas de Mortalidade das 5 Localizações Primárias mais Frequentes em 2013, Ajustadas pela Idade, pela População Mundial, por 100.000 Mulheres, Brasil, entre 2003 e 2013 .....	4
<b>Figura 1.3</b> - Incidência de idade ajustada por taxas de câncer de mama, entre 1988-1992, em quatro países: EUA, Suécia, Colômbia e Japão.....	5
<b>Figura 1.4</b> - Conjunto de característica das células no processo de carcinogênese.....	11
<b>Figura 1.5</b> – Cascata Metastática.....	13
<b>Figura 1.7</b> – A Família do Gene HER (erb) .....	28
<b>Figura 1.8</b> - Estrutura, Funções e Ligantes da Proteína <i>MYC</i> .....	37
<b>Figura 1.9</b> - Processo Celular Controlado pelo <i>MYC</i> Durante Condições Normais e Durante a Gênese Tumoral .....	38
<b>Figura 1.10</b> - Via de Sinalização do Gene <i>HER-2</i> na Membrana da Célula .....	41
<b>Figura 4.1</b> - Imunorreatividade de <i>MYC</i> por IHQ .....	75
<b>Figura 4.2</b> - Hibridização de <i>MYC</i> por FISH.....	75
<b>Figura 4.3</b> – Confirmação do sequenciamento genético das mutações encontradas na população pesquisada .....	94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> - Ensaio clínico comparando o mesmo regime de quimioterapia pré e pós-operatório.....	47
<b>Tabela 3.1</b> - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento direto das mutações.....	70
<b>Tabela 4.1</b> - Proteína <i>HER-2</i> e o <i>status</i> gênico no câncer de mama.....	74
<b>Tabela 4.2</b> - Achados clínico-patológicos correlacionados com o <i>status</i> da expressão proteica .....	76
<b>Tabela 4.3</b> - Achados clínico-patológicos e a expressão proteica avaliada através do <i>status</i> dos genes <i>HER-2</i> e <i>MYC</i> .....	78
<b>Tabela 4.4</b> - Achados clínico-patológicos e a expressão da mutação de <i>KRAS</i> .....	81
<b>Tabela 4.5</b> - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e características sociodemográficas, no período de 2012 a 2015.....	84
<b>Tabela 4.6</b> - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e histórico hormonal e reprodutivo.....	85
<b>Tabela 4.7</b> - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e fatores de risco .....	86
<b>Tabela 4.8</b> - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e características anatomopatológicas.....	86
<b>Tabela 4.9</b> - Avaliação do gene <i>HER-2</i> sob os testes usados IHQ e FISH.....	87
<b>Tabela 4.10</b> - Classificação dos subtipos moleculares da amostra pela técnica de IHQ e FISH.....	87
<b>Tabela 4.11</b> - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e biomarcadores.....	88
<b>Tabela 4.12</b> - Resultados do modelo final de regressão logística.....	89
<b>Tabela 4.13</b> - Número de variantes das pacientes sequenciadas e cobertura média para os alvos selecionados.....	91

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.1</b> - Estadiamento do tumor mamário, classificação clínica.....	17
<b>Quadro 1.2</b> - Estadiamento tumoral .....	18
<b>Quadro 3.1</b> - Critérios para interpretação da imunocoloração para <i>HER-2</i> .....	57
<b>Quadro 4.1</b> – Características clínicas das pacientes com mutação patogênica .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
BI-RADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
CAP	Colégio Americano de Patologistas
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CGHFBC	<i>Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer</i>
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexate e 5-Fluoracil
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMA	Antígeno Epitelial de Membrana
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEC	5- Fluoracil, Epirrubicina e Ciclofosfamida
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
HE	Hematoxilina e Eosina
IHC	Imunohistoquímica
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ion PGM	<i>Ion Personal Genome Machine</i>
LS	Linfonodo Sentinela
NGS	<i>Nottingham Grading System</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHs	Hidrocarbono Aromático Plinuclear
PRO	Progressão
QT	Quimioterapia
RCC	Resposta Clínica Completa
RCP	Resposta Clínica Parcial
RE	Receptores de Estrogênio
RH	Receptor hormonal
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RP	Receptores de Progesterona
RPC	Resposta Patológica Completa
SNG	Sequenciamento de nova geração
SR	Sem Resposta
TA	Temperatura ambiente
TAD	Domínio de transativação
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TH	Terapia Hormonal

TNM	Classificação de Tumores Malignos
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
UICC	União Internacional Contra o Câncer
WCRF	<i>World Cancer Research Fund</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MAGNITUDE DO CÂNCER DE MAMA

O processo global de industrialização, ocorrido principalmente no século passado, conduz a uma crescente integração das economias e das sociedades de vários países, desencadeando a redefinição de padrões de vida com uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo. Paralelamente, adveio uma significativa alteração na demografia mundial, devido à redução nas taxas de mortalidade e natalidade, bem como do aumento na expectativa de vida e, por conseguinte, do envelhecimento populacional (GUERRA; MOURA GALLO; MENDONÇA, 2005).

Esse processo de reorganização global determinou grande modificação nos padrões de saúde-doença no mundo. Tal modificação, conhecida como transição epidemiológica, caracteriza-se pela mudança no perfil de mortalidade com diminuição da taxa de doenças infecciosas e o aumento concomitante da taxa de doenças crônico-degenerativas, especialmente as doenças cardiovasculares e o câncer (GUERRA; MOURA GALLO; MENDONÇA, 2005).

O câncer de mama é o tipo mais frequente entre as mulheres no mundo, assim como no Brasil, com exceção do câncer de pele não melanoma, respondendo por cerca de 25% dos casos novos a cada ano. É um tipo raro entre os homens, representando apenas 1% do total de casos da doença.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o número de novos casos do câncer de mama esperados no Brasil para o ano de 2016, é de aproximadamente 57.960. Esse tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. Na região Norte é o segundo mais incidente, sendo esta doença responsável por aproximadamente 14.388 óbitos anualmente (INCA, 2016).

A incidência do câncer de mama no Brasil varia de acordo com a região estudada. Fig. 1.1. Na região Norte, 1.810 novos casos foram estimados para o ano de 2016, correspondendo a uma taxa de incidência de 22,26 casos por 100.000 habitantes (INCA, 2016).

	Brasil	Região Norte	Região Nordeste	Região Centro-Oeste	Região Sudeste	Região Sul
1º	Mama feminina (56,20)	Colo do útero (23,97)	Mama feminina (38,74)	Mama feminina (55,87)	Mama feminina (68,08)	Mama feminina (74,30)
2º	Cólon e Reto (17,10)	Mama feminina (22,26)	Colo do útero (19,49)	Colo do útero (20,72)	Cólon e Reto (22,66)	Cólon e Reto (23,27)
3º	Colo do útero (15,85)	Cólon e Reto (5,89)	Cólon e Reto (8,77)	Cólon e Reto (16,93)	Colo do útero (11,30)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (20,61)
4º	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,54)	Estômago (5,82)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (7,24)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (9,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,55)	Colo do útero (15,17)
5º	Estômago (7,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (5,07)	Estômago (6,73)	Ovário (6,96)	Corpo do útero (9,58)	Estômago (8,71)

**Figura 1.1** – Taxa de incidência estimada para o ano de 2016/100 mil habitantes para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma) em mulheres, no Brasil por regiões geográficas.

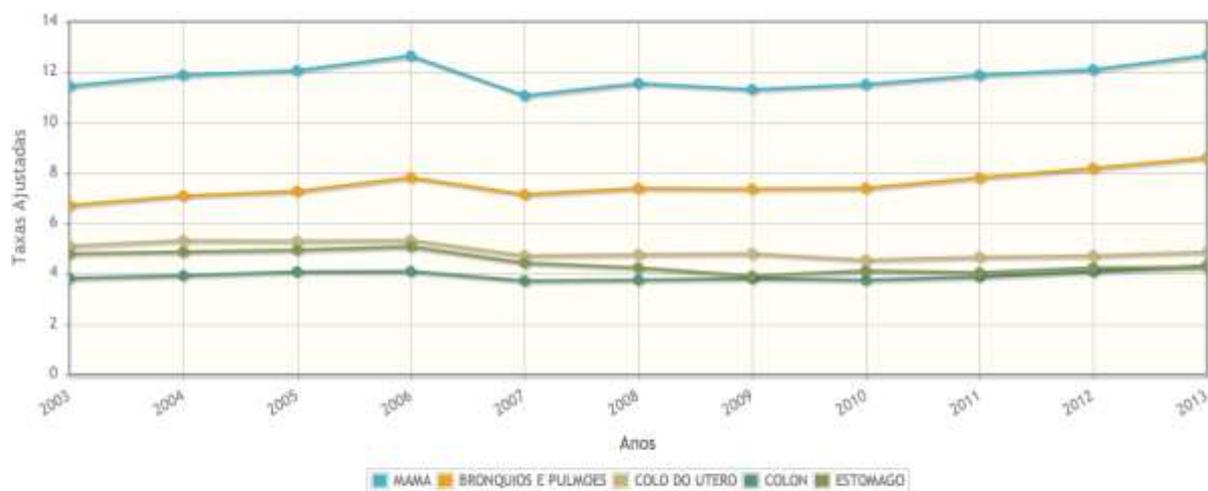
Fonte: INCA, 2016.

O câncer de mama é a principal causa de mortalidade entre os cânceres femininos no mundo. As taxas de mortalidade se mantêm estáveis ou até em queda em alguns países desenvolvidos, e essa mudança é principalmente atribuída a uma diminuição do uso de terapia de reposição hormonal, detecção precoce com mamografias de rastreamento, e técnicas avançadas de tratamento desta doença. Entretanto, esse fenômeno é contrário em muitos países da Europa, Ásia, América Latina e regiões da África, onde se observa um rápido aumento tanto na incidência de tumores, como na taxa de mortalidade do câncer de mama (FREITAS-JÚNIOR *et al.*, 2012).

No Brasil, entre os anos de 1980 a 2000 se identificou um aumento na mortalidade bruta para o câncer de mama, que passou de 6,14% para 9,64% por 100 mil mulheres, resultando no aumento relativo de 57% (PINHO; COUTINHO, 2007). Embora essa variação possa refletir na melhora das técnicas de diagnóstico e no registro de óbitos, esse aumento reflete a ineficiência nas nossas medidas de rastreamento, e no controle da doença, onde cerca de 60% dos nossos casos de neoplasia maligna mamária são diagnosticados em estágios avançados. Até o momento, o Brasil não dispõe de uma estrutura que garanta exames de rastreamento, como a mamografia sistemática a todas as mulheres nas faixas etárias de maior risco. A rede de assistência oncológica no Brasil ainda é insuficiente, inadequada e mal distribuída (PINHO; COUTINHO, 2007).

Nos Estados Unidos da América (EUA), o câncer de mama continua a ser uma doença de grande impacto em saúde pública, com uma estimativa de aproximadamente 236.670 casos novos no ano de 2014, levando a aproximadamente 40.000 óbitos neste mesmo ano (CAPLAN, 2014). No Brasil, embora as taxas de mortalidade por câncer de mama tenham se estabilizado, quando se faz uma análise nas taxas de mortalidade por Estado, individualmente, percebe-se uma desigualdade considerável nessas taxas interestaduais, com declínio ou estabilização naqueles Estados com níveis socioeconômicos mais elevados, e um aumento substancial na taxa de mortalidade em populações com menor nível socioeconômico. Os Estados em desenvolvimento tem uma prevalência no aumento das taxas de mortalidade. Outro dado importante é a falha nos sistemas de registros epidemiológicos de mortalidade presentes em alguns Estados da região Norte e Nordeste, dificultando a obtenção real do retrato deste índice no país (FREITAS-JÚNIOR *et al.*, 2012).

A prevenção primária do câncer de mama não é um evento disponível até os dias atuais, com exceção de medidas extremas como a mastectomia profilática em mulheres que apresentam mutações genéticas. Nestas mulheres essas mutações levam a um aumento substancial para o risco de desenvolverem o câncer de mama; por isso, medidas de diagnóstico precoce continuam a ser o principal foco no combate a esta neoplasia maligna, que visa tanto ao diagnóstico em estágios iniciais da doença, como o tratamento mais precoce (CAPLAN, 2014).



**Figura 1.2** – Taxas de Mortalidade das 5 Localizações Primárias mais Frequentes em 2013, Ajustadas pela Idade, pela População Mundial, por 100.000 Mulheres, Brasil, entre 2003 e 2013.

**Fonte:** INCA, 2016.

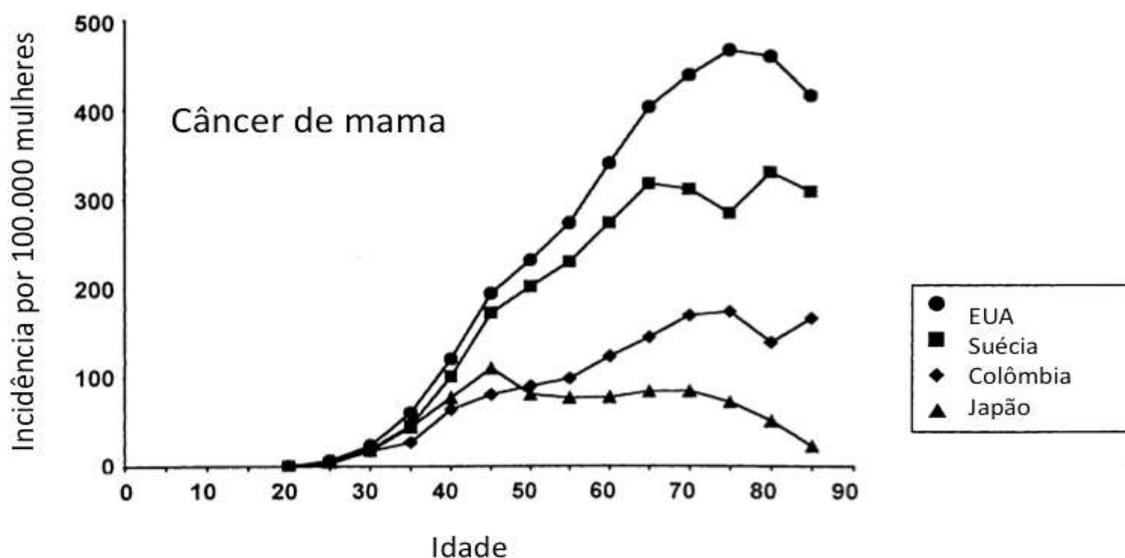
## 1.2 FATORES DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA

Existem alguns fatores já bem estabelecidos na literatura relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama, tais como: idade, história familiar, menarca precoce, nuliparidade, idade tardia da primeira gravidez a termo, e uso de terapia hormonal (TH). Alguns trabalhos sugerem que outros fatores de risco associados aos receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP) positivamente, possam envolver mecanismos relacionados à exposição hormonal endógena, ao passo que a etiologia dos tumores RE e RP negativos pode não estar associada à indução hormonal (TURKOZ *et al.*, 2013).

### Idade

O câncer é considerado uma doença tipicamente da idade, com o aumento das taxas de incidência ao longo da vida. A incidência de câncer de mama inicia mais precocemente do que alguns tipos de tumores, e ocorre já por volta dos 20 anos de idade. Este fato é atribuído a capacidade de resposta do tecido mamário aos estímulos hormonais ovarianos que começam a serem produzidos desde a puberdade e se estendem até a menopausa. As taxas para o aparecimento do câncer mamário são similares em alguns países até os 35 a 40 anos, depois começam a divergir. Estas diferentes formas das curvas de incidência específicas em cada país são consistentes com diferentes interpretações. Alguns estudos atribuem esta diferença, aos níveis de hormônios endógenos, que são característicos de cada população. Em alguns países os níveis hormonais endógenos são mais pronunciados após a menopausa, devido a

característica do peso corporal daquela população, principalmente no período da menopausa. Quando a produção ovariana hormonal cessa, as células adiposas passam a ser importantes sítios de conversão de precursores androgênicos em estrona. Mulheres americanas apresentam níveis de estrogênios aumentados, assim como um início mais tardio da menopausa, quando comparadas por exemplo, com as japonesas, conseqüentemente são mais expostas à ação hormonal endógena (HULKA; MOORMAN, 2008; VO; MILLIS, 2012).



**Figura 1.3** - Incidência de idade ajustada por taxas de câncer de mama, entre 1988-1992, em quatro países: EUA, Suécia, Colômbia e Japão.

**Fonte:** Hulka; Mooman, 2008.

### Menarca e Menopausa

Menarca e menopausa são marcadores de início e cessação, respectivamente, de atividade endócrina ovariana relacionada à reprodução. Durante os anos reprodutivos da mulher, o ovário produz hormônios esteróides que afetam diretamente o desenvolvimento e função das mamas (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2012). Menarca precoce e menopausa tardia são conhecidas por aumentarem o risco das mulheres em desenvolver câncer de mama, devido a maior exposição hormonal. No estudo randomizado realizado pelo Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (CGHFBC), foi evidenciado que esses dois fatores aumentam o risco para câncer de mama, e apresentam efeitos equivalentes, porém o encurtamento de um ano da menarca foi mais expressivo que o aumento em mais de um ano na menopausa, para o risco de câncer de mama,

e que os cânceres estrogênio dependentes são fortemente afetados pela menopausa das mulheres (CGHFBC, 2012).

### **Alcoolismo**

O alcoolismo é usualmente relacionado com o aumento do risco de câncer do trato digestivo alto, fígado, cólon-retal e mama, principalmente quando este uso é crônico. Esta associação, há vários anos é pesquisada, e parece ser mais consistente quando é comparada a outros fatores relacionados à dieta. Em estudos de intervenção, o consumo de aproximadamente dois drinques por dia demonstrou um aumento nos níveis de estrogênio total e biodisponível, e que apenas uma dose de álcool já é capaz de aumentar fortemente os níveis de estradiol no plasma. A redução do consumo alcoólico diário parece ser um dos poucos métodos de redução ativa do risco de câncer mamário. Inúmeros estudos epidemiológicos associando o consumo de bebidas alcólicas com o risco de câncer de mama mostraram uma clara relação dose-resposta com o aumento deste risco (FUCHS *et al.*, 1995; NAGATA *et al.*, 2007; CASTRO; CASTRO, 2014).

### **Dieta**

O papel da dieta na etiologia do câncer é associado, em parte, devido às grandes variações internacionais nas taxas de incidência da doença, e pode ser atribuído às propriedades antioxidantes de alguns nutrientes selecionados, influenciando no reparo e mutação de DNA; na estimulação de fatores de crescimento; e na ação antiestrogênica de alguns nutrientes. O controle alimentar, tanto qualitativo como quantitativo é uma forma de controle de risco das doenças crônicas. No ano de 1997, uma revisão realizada pelo World Cancer Research Fund (WCRF) concluiu que a alta ingestão de frutas e verduras tem a probabilidade de diminuir o risco de câncer de laringe, pâncreas, mama e bexiga. Esta proteção conferida pela ingestão de frutas e vegetais é realizada através da ação de seus antioxidantes, fibras e outros nutrientes (RIBOLI; NORAT, 2003; MICHELS *et al.*, 2007).

### **Obesidade**

Evidências epidemiológicas consistentemente demonstram que o aumento no índice de massa corpórea (IMC), como também, o aumento da circunferência abdominal está relacionado ao aumento de risco para câncer mamário. Esses estudos sugerem que o risco de desenvolvimento de câncer mamário é 30% maior em mulheres na pós-menopausa e que apresentam o IMC > 31 kg/m<sup>2</sup>. A obesidade está relacionada a um número de doenças crônicas,

incluindo diabetes tipo 2, doença cardiovascular, doença hepática gordurosa, e algumas formas de cânceres. Estima-se que 15% a 30% das mortes por câncer na população dos EUA são atribuídas ao excesso de peso, principalmente do câncer endometrial, câncer de mama na pós-menopausa, câncer de cólon e o de células renais (MICHELS *et al.*, 2007; AMARAL, 2010, RAMOS-NINO, 2013).

### **Tabagismo**

O tabagismo é considerado um fator de risco ainda muito controverso na literatura. O hábito de fumar está relacionado ao aumento de risco de cânceres em vários órgãos, mesmos naqueles que não apresentam contato direto com o cigarro. As substâncias carcinogênicas passam através da membrana alveolar para a corrente sanguínea e podem ser transportadas para a mama por meio de lipoproteínas no plasma. Estudos experimentais indicam que o cigarro contém potentes substâncias carcinogênicas como: hidrocarbono aromático policíclico (PAHs), N-nitrosaminas, aminas aromáticas. Existe uma alta prevalência de mutações do gene *TP53* em tabagistas quando comparadas a não tabagistas. A associação entre o hábito de fumar e o risco de câncer de mama foi relatada em aproximadamente 130 estudos epidemiológicos e consensos. Apesar do grande número de informações a respeito deste assunto, ainda não se tem um consenso científico bem definido, em parte devido ao tabagismo estar relacionado também com o etilismo e, os estudos não apresentarem consistência em relação à duração e intensidade do consumo do tabaco. Uma revisão da literatura publicada por cirurgiões dos EUA concluiu que existem evidências limitadas da ação do tabagismo na carcinogênese mamária (TERRY; ROHAN, 2002; GAUDET *et al.*, 2013).

### **Radiação**

A radiação é considerada um fator de risco na carcinogênese mamária, devido a alta sensibilidade da glândula mamária a exposição de radiações, principalmente quando ocorre ainda em idade jovem. O conhecimento sobre radiação e o risco de câncer mamário, se deve principalmente, a estudos epidemiológicos de pacientes expostas à radiação diagnóstica e/ou terapêutica, e em sobreviventes de ataque de bombas atômicas. A exposição à radiação, seja no monitoramento ou tratamento de doenças, é na atualidade, a principal forma de indução à carcinogênese causada pela radiação. Essas exposições ocorrem em monitoramentos com Raios-X em pacientes portadores de escoliose ou tuberculose; crianças submetidas à radioterapia para desordens benignas; sobreviventes de câncer na infância expostas a altas doses de radiação no tórax; adultas tratadas com radioterapia. O risco de câncer mamário é

proporcional a dose da radiação recebida, e também a idade em que o indivíduo é exposto; quanto mais precoce a exposição, maior será o risco (SINGLETERY, 2003; RONCKERS; ERDMANN; LAND, 2005).

### **Histórico Familiar**

O histórico familiar é um dos fatores de risco mais bem estabelecidos no câncer de mama. A presença de parentes de primeiro grau, como mãe ou irmã, com câncer de mama, eleva em duas ou três vezes mais o risco de uma mulher que tenha este parentesco, de desenvolver a doença. Muitos fatores afetam este risco, como o aparecimento de câncer de mama em idade jovem ou a bilateralidade desta neoplasia. Recentes avanços em técnicas de biologia molecular têm contribuído bastante para o entendimento da susceptibilidade da herança para o câncer de mama. Estima-se que aproximadamente 7% de todas estas neoplasias malignas da mama sejam de causas genéticas, podendo chegar até 27% quando associadas a fatores ambientais ou epigenéticos. Nos dias atuais, todos os estudos sobre a susceptibilidade herdada de câncer de mama sugerem que essa susceptibilidade é transmitida por uma forma mendeliana autossômica dominante, e este risco vai ter influência na penetrância dos genes. Os primeiros genes estudados foram o *BRCA-1* e *BRCA-2*, que foram associados a um aumento no risco de desenvolvimento tanto do câncer de mama e ovário; entretanto, outros genes também são associados ao aumento do risco no desenvolvimento do câncer de mama, dentre eles podemos citar o: *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, entre outros. (JAMES *et al.*, 2007; HULKA; MOORMAN, 2008; STRATTON; RAHMAN, 2008).

### **Genes BRCA1 e BRCA2**

Os genes BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumor identificados na década de 1990. Esses genes estão localizados no cromossomo 17q e 13q respectivamente, e codificam fatores que inibem o crescimento celular, regulação da transcrição genética, reparação de danos de DNA, apoptose e outros processos importantes na célula (ZHU *et al.*, 2016).

Estima-se que 5% a 10% de todos os casos de câncer de mama sejam herdados, e a susceptibilidade para esta neoplasia está associada com os genes *BRCA-1* e *BRCA-2* em aproximadamente 20% a 40% dos casos. Mulheres portadora de mutação germinativa em *BRCA-1* tem um risco de desenvolver câncer de mama em até 50% a 85%, e de 12% a 60% de nãcâncer de ovário ao longo da vida. Os tumores de mama onde existe a mutação de *BRCA-1* tem como características o aparecimento em idades jovemse normalmente não expressam receptores hormonais e *HER-2*, e são indiferenciados (JAMES *et al.*, 2007).

Embora os estudos correlacionem muito a susceptibilidade de mutações de *BRCA-1* e *BRCA-2* no câncer de mama, não se pode deixar de lembrar que outras mutações genéticas podem também ser associadas a esta neoplasia, como as que ocorrem nas síndromes de câncer hereditário como p53, PTEN, CDH1, STK11, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Assim como a presença de mutação em *BRCA-2* pode estar associada ao aumento no risco de outros tipos de câncer como: câncer de próstata, melanoma e câncer de pâncreas (PALUCH-SHIMON, 2016).

Os indivíduos que tem familiares portadores de mutações em *BRCA-1* e *BRCA-2* e que tem mais de 25 anos devem ser encorajados para a realização de testes genéticos, e diagnóstico da presença da mutação. Aqueles que já tem o diagnóstico da presença da mutação em um destes genes podem ser seguidos de acordo com o *guideline* que inclui mudança de estilo de vida, através de prática de atividade física, diminuição do consumo de álcool, alimentação balanceada. O exame físico das mamas deve ser feito a cada 6 a 12 meses a partir dos 25 anos ou 10 anos antes da idade do parente mais jovem afetado. A ressonância mamária está bem estabelecida como a melhor ferramenta de seguimento nessa população de risco, e poderá ser realizada anualmente a partir dos 25 anos de idade, e posteriormente ser seguida por mamografia anual a partir dos 30 anos de idade. Podem ser realizadas ainda as cirurgias redutoras de risco, como a adenomastectomia bilateral com preservação do complexo aréolo-papilar e a ooforectomia bilateral (PALUCH-SHIMON, 2016).

### **Densidade mamográfica**

A densidade mamográfica é a expressão usada na avaliação da quantidade dos componentes teciduais: epitelial e tecido conjuntivo mamário, visibilizadas em exame radiológico. Apresenta uma associação positiva entre o aumento na densidade e o risco de câncer mamário. Esta associação foi primeiramente proposta por Wolfe *et al.*, em 1976 (apud HOWELL; CUZICK, 2009). Na ocasião foram descritos quatro diferentes padrões de parênquima mamário. Tecidos mamários com mais de 75% de componente epitelial, apresentam um aumento de quatro a seis vezes o risco no desenvolvimento do câncer de mama, quando comparados com parênquimas lipossustituídos. Os critérios de avaliação da densidade mamográfica podem ser realizados através do *Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS)*, que baseia-se em método visual, como também através da categoria de Wolfe. O mecanismo desta associação ainda é desconhecido, porém o fator de crescimento insulino-like (IGF-1) está associado como uma provável causa. A densidade mamográfica pode ser considerada como um fator prognóstico pois associa-se com: tumores mamários de grande volume, maior grau histológico, invasão linfática e vascular, e estágios clínicos avançados

quando comparados aos de aparecimento em mamas com baixa densidade mamográfica (ATTAM *et al.*, 2008; DOUGLAS *et al.*, 2008; HULKA; MOORMAN, 2008; HOWELL; CUZICK, 2009; HUO *et al.*, 2014).

### **Terapia Hormonal (TH)**

A TH começou a ser utilizada em meados da década 1970, para controle de sintomas climatéricos e prevenção da osteoporose, nas mulheres na pós-menopausa. O objetivo da terapia hormonal é obter um novo equilíbrio no organismo, procurando evitar as consequências da privação dos hormônios reprodutores endógenos. A estrogênio terapia, terapia hormonal apenas com reposição estrogênica, é considerada a terapia mais efetiva no manejo dos sintomas da menopausa. Nas mulheres que não foram submetidas a exérese cirúrgicas do útero, a TH é associada à progesterona natural ou aos progestágenos. Evidências sugerem que uso de estrogênios na menopausa está associado a um modesto aumento no risco para câncer de mama. Quando usado por um longo período (5 anos ou mais) associa-se a um aumento em 30 a 50% neste risco. Este aumento do risco seria um tanto maior em certos subgrupos, como nas mulheres com história familiar de câncer mamário. O estrogênio tem efeito na progressão de alterações celulares nas glândulas mamárias que evoluirão para neoplasias. Este conceito é comprovado nas observações epidemiológicas em que, menarca tardia e menopausa precoce têm efeito protetor para o câncer mamário (SINGLETERY, 2003; RONCKERS; ERDMANN; LAND, 2005; HULKA; MOORMAN, 2008; LIMA; BOTOGOSKI, 2009).

### **1.3 GENÉTICA DO CÂNCER E CARCINOGENESE MAMÁRIA**

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento celular desordenado, resultando do acúmulo de alterações que favorecem a expressão ou repressão de genes vinculados ao controle do ciclo celular (CHIAO *et al.*, 1990). O câncer resulta de alterações genéticas selecionadas a fim de proporcionar às células tumorais vantagens proliferativas (RHYU, 1998).

A biologia dos tumores não pode ser compreendida simplesmente enumerando as características das células cancerosas, mas deve englobar os *hallmarks* das células que contribuem na construção do microambiente tumoral para a tumorigênese. Dessa forma, as características das células tumorais promovem autossuficiência quanto ao sinal de crescimento, insensibilidade aos fatores inibitórios, evasão a apoptose, angiogênese sustentada, potencial replicativo ilimitado, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância imune,

invasão celular e metástase, caracterizando o fenótipo do câncer e individualizando a aplicação de novas terapias (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (Fig. 1.4).



**Figura 1.4** - Conjunto de característica das células no processo de carcinogênese.

Fonte: Adaptado: Hanahan; Weinberg, 2011.

Um dos mecanismos supressores tumorais importantes é a senescência celular, que impõe limites a capacidade proliferativa das linhagens das células clonais. A senescência pode ser induzida por estímulos múltiplos incluindo processos celulares intrínsecos, tais como, disfunção telomérica e expressão do oncogene, como também por fatores exógenos, tais como agentes que danificam o DNA ou ambientes oxidativos (YASWEN *et al.*, 2015).

Uma das características fundamentais da célula tumoral é a habilidade de sustentação de proliferação crônica, não vista em tecidos saudáveis. Na célula tumoral existe um controle da produção e liberação de sistemas de sinalização que orientam-na em sua divisão, no controle de homeostase, e na manutenção de sua arquitetura e função, fazendo com que a desregulação dessas vias de sinalização tornem-as controladoras de seus próprios destinos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas sinalizações são transportadas em grande parte pelos fatores de crescimento que se ligam à superfície de receptores que normalmente contém domínios da tirosina-quinases intracelular (RAHMATHULLA; TOMS; WEIL, 2012).

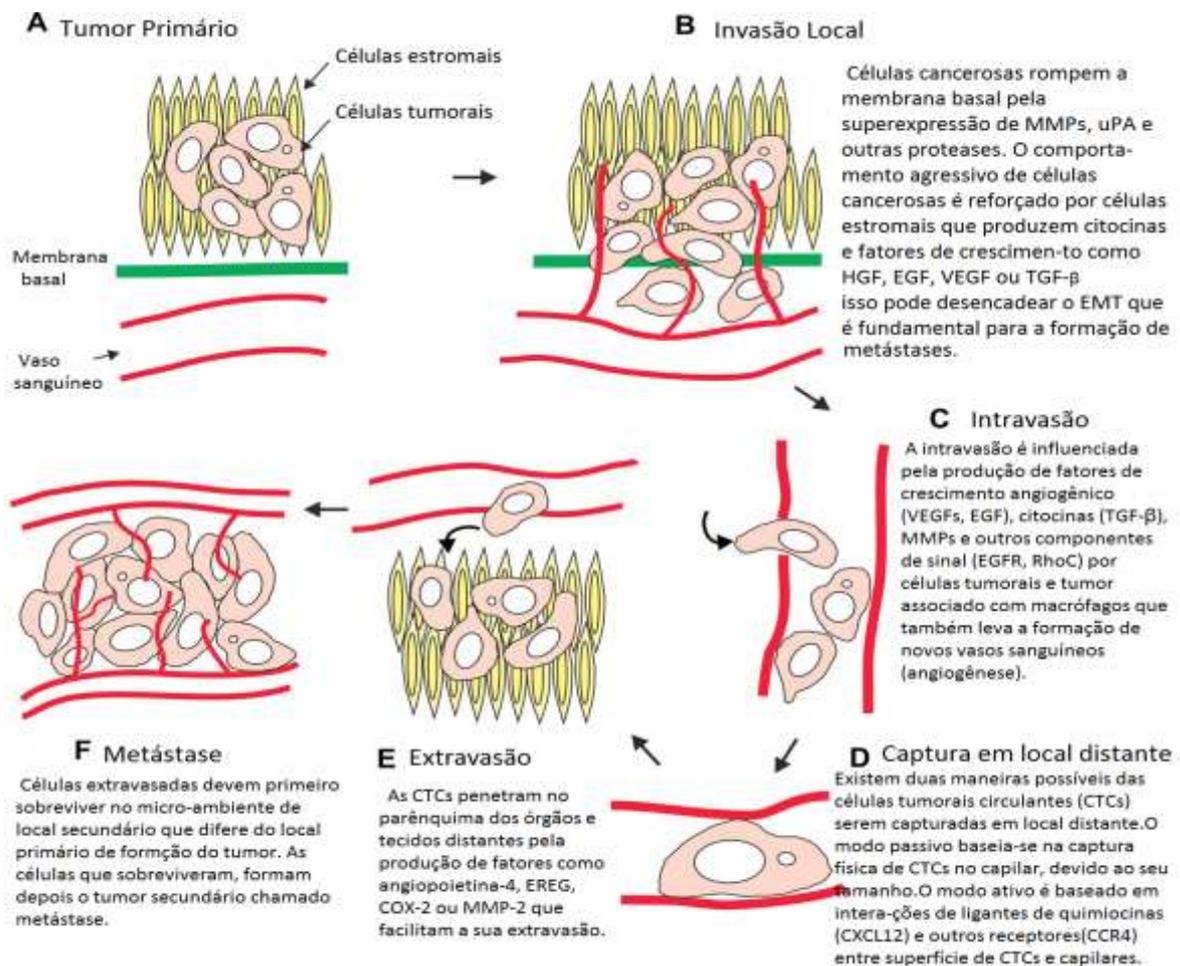
Na presença de tumor, o processo de angiogênese se faz necessário. Durante a embriogênese, o desenvolvimento da vascularização envolve o nascimento de novas células endoteliais e o conjunto de tubos (vasculogênese) em adição a formação de novos vasos (angiogênese). No adulto, o processo fisiológico, como o ciclo reprodutivo feminino ou a

cicatrização de feridas, a angiogênese é acionada, porém durante a progressão tumoral, o estímulo angiogênico quase sempre é ativado e permanece em quiescência para posteriormente iniciar uma formação contínua de novos vasos que auxiliarão na expansão e crescimento tumoral (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Na maior parte dos tumores, a angiogênese é estimulada, porém esses novos vasos são formados de maneira anormal tanto na sua estrutura, como também na sua função, resultando em um microambiente tumoral hostil caracterizado por hipóxia, pH baixo e aumento da pressão do fluido intersticial podendo alterar as características intrínsecas da célula tumoral, de tal modo que a fuga das células tumorais é facilitada pelo aumento na permeabilidade desses vasos. Essa vascularização anômala também dificulta a ação de células imunes sob os tumores, assim como o transporte e distribuição de agentes quimioterápicos e de oxigênio, levando à resistência a tratamentos oncológicos, tanto radioterápicos como os quimioterápicos (HUANG, 2015).

Metástase é uma habilidade que a célula tumoral adquire no seu processo de carcinogênese, e que se constitui como a principal causa de mortalidade entre os pacientes com câncer. Nesta doença existe um crescimento celular e uma migração celular desordenados (CLARK; VIGNJEVIC, 2015).

O processo da invasão e metástase é organizado numa sequência de passos, denominados de cascata de invasão e metástase. Este processo metastático prevê uma série de alterações na biologia da célula, começando com a invasão local; seguida de invasão por células tumorais no sistema linfático e hematopoiético; seguido de evasão destas células do lúmen dos vasos para o parênquima dos tecidos distantes (extravasamento); a formação de pequenos nódulos de células tumorais (micrometástases); e finalmente o crescimento de lesões micrometastáticas para tumores macrometastáticos, sendo esta última etapa denominada de colonização (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O processo de migração das células do tumor primário segue uma sequência de fases como invasão local, intravasão, captura em local distante, extravasão e metástase (MARYÁS *et al.* 2014).



**Figura 1.5 – Cascata Metastática.**

**Nota:** Cascata metastática é o processo que consiste em células de invasão local de tumores primários através da membrana basal e camadas de células do estroma (A e B); sua intravasão em vasos sanguíneos ou linfáticos (C); detenção em tecidos e órgãos distantes (D); extravasamento em parênquima destes tecidos e órgãos (E) liquidação e crescimento neoplásico de tumores metastático (E).

**Fonte:** Adaptado de Maryás *et al.*, 2014.

A instabilidade genômica (IG) é uma característica de quase todos os cânceres humanos. A maioria das IG tem uma forma conhecida como instabilidade cromossômica, que se refere a uma elevação na taxa tanto da estrutura cromossômica, como no número de cromossomos que mudam ao longo do tempo, em células tumorais quando comparadas as células normais, conferindo alteração tanto na estrutura do cromossomo, como no número de mitoses. A instabilidade do genoma é mais frequente, porém outras formas também são identificadas, como exemplo a instabilidade de microssatélites, e a forma caracterizada pelo aumento na frequência de pares de bases com mutação (NEGRINI; GORGOLIS; HALAZONETIS, 2010).

No século XIX, percebeu-se uma ligação entre a inflamação e o câncer. Mais recentemente esta conexão inflamação-câncer vem ganhando maior aceitação baseada em

vários estudos epidemiológicos. Esses estudos revelaram que a inflamação crônica predispõe a diferentes formas de câncer, e que o uso de agentes anti-inflamatórios não esteroides está associado à proteção de alguns tumores. Concordando com os achados epidemiológicos, os patologistas há muito tempo observam que os tumores são densamente infiltrados por células do sistema imune, tanto as inatas como as adaptativas, estando presentes em densidades variadas e muitas vezes sendo detectadas apenas através de anticorpos tipo específicos contra a inflamação (COLOTTA *et al.*, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011) Componente inflamatório se encontra presente no microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos. Características evidentes da relação da inflamação com o câncer incluem: infiltração de células sanguíneas brancas, predominantemente tumores associados a macrófagos; presença de mensageiros polipeptídeos de inflamação, como citocinas (fator de necrose tumoral, interleucina-1, interleucina-6), quimiocinas (CCL2 e CXCL8); ocorrência de tecido de remodelação e angiogênese; fatores de sobrevivência tumoral; e enzimas modificadoras que facilitam tanto a angiogênese, como a invasão e metástase, e induzem sinais que levam a ativação da transição epitélio-mesenquimal, que é um fenômeno temporário, reversível, no qual células adquirem a capacidade de diferenciação, migração para focos distantes, e retornar a sua forma original formando uma nova estrutura, capacidade esta que é adquirida pelas células neoplásicas (COLOTTA *et al.*, 2009; RAHMATHULLA; TOMS; WEIL, 2012).

Defeitos no sistema de reparo do DNA incluem os danos nos pontos de checagem do ciclo celular, conhecidos como “*checkpoint*” ou aqueles que comprometem a manutenção dos telômeros, conferindo uma instabilidade genômica e conseqüentemente, a predisposição ao câncer; essa instabilidade faz com que uma célula normal possa acumular mutações suficientes para o início da transformação maligna, entretanto, a célula possui mecanismos de proteção a esses danos, conferindo a proteína de supressão tumoral p53 o papel de “guardião do genoma” na proteção celular contra o câncer (BROWN; ATTARDI, 2005).

Os telômeros são sequências repetidas de DNA localizadas nas extremidades dos cromossomos que estão vinculados a um processo de proteínas denominadas *shelterin* que previne respostas danosas ao DNA. Estudos mostram que a cada divisão celular parte do telômero é encurtada devido a incapacidade que o maquinário de replicação tem para replicar completamente o final do DNA. O papel do telômero tanto no processo de envelhecimento celular como no câncer tem sido muito pesquisado. A ativação da telomerase pode ser encontrada em quase todos os cânceres humanos, conferindo uma habilidade às células tumorais de apresentar proliferação ilimitada, é um evento inicial do câncer, porém não é necessário para a iniciação tumoral (BERNARDES DE JESUS; BLASCO, 2013).

Os telômeros estão implicados no controle da integridade genômica como também na carcinogênese. Estudos mostram que as células tronco ou progenitoras, expressam níveis detectáveis de telômeros, demonstrando sua participação na formação tumoral, pois essas células são encontradas na formação original do tumor. No processo de supressão tumoral, as células tumorais mostram uma dependência do mecanismo de manutenção do telômero para obter capacidade de imortalidade celular e prevenir o caos genético induzido pela mudança na função do telômero (GÜNES; RUDOLPH, 2013).

A proliferação celular crônica é muitas vezes incontrolada, e representa a essência das doenças neoplásicas que envolve não só a desregulação no controle da proliferação celular, como também, no ajuste do metabolismo energético que alimenta o crescimento celular e sua divisão. Em condições aeróbicas, o processo normal do metabolismo da glicose ocorre primeiramente conversão em piruvato via glicólise, no interior do citosol, e após esse processo, para o dióxido de carbono na mitocôndria. Este processo foi descrito em 1930 por Otto Warburg que observou que na presença de oxigênio, as células tumorais podem reprogramar seu metabolismo de glicose, processo conhecido como Efeito Wanburg (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Estudos recentes sobre a ação de oncogenes demonstram que a amplificação/super-expressão destes genes e suas sinalizações produzem proteínas que levam ao aumento de proliferação celular do câncer e ao seu crescimento tumoral. O aumento na sinalização de algumas oncoproteínas de *RAS*, *MYC* e *RAF* pode provocar neutralização de respostas de células, principalmente aquelas induzidas à senescência e/ou a apoptose (COLLADO; SERRANO, 2010).

#### 1.4 ESTADIAMENTO CLÍNICO

Na primeira metade do século XX, médicos observaram que nem todos os cânceres de mama tinham o mesmo prognóstico ou precisavam do mesmo tratamento e tentaram definir características que poderiam realmente distinguir quais os tumores que necessitariam ou não de um tratamento agressivo. Em 1904, Steinthal médico alemão, propôs a divisão do câncer mamário em três estágios prognósticos: tumores pequenos de localização apenas mamária (Estágio I), tumores grandes que envolviam linfonodos axilares (Estágio II) e tumores que claramente envolviam tecidos ao redor da mama (Estágio III). Esses estágios mais tarde seriam modificados (SINGLETERY; CONNOLLY, 2006).

O sistema tumor, linfonodo, metástase (TNM), foi desenvolvido por Pierre Denoix em 1942, e representa uma tentativa de classificação de câncer baseada nos maiores atributos tumorais que influenciam o prognóstico da doença: tamanho do tumor primário (T), presença e extensão do envolvimento de linfonodo regional (N), e presença de metástase à distância (M). A União Internacional Contra o Câncer (UICC) apresentou a classificação clínica para o câncer de mama baseada no TNM, em 1958 e a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) publicou a classificação de mama em 1977 (BARROS; BUZAID, 2007).

A classificação clínica do Sistema TNM (Quadro 1.1) é utilizada para indicar o tratamento locorregional, baseando-se unicamente em evidências colhidas antes do tratamento inicial do tumor primário. Os exames incluem principalmente exames clínicos, feitos através de anamnese, exame físico das mamas e das cadeias de drenagem linfática, e exames de imagens, tais como: mamografia, ultrassonografia mamária e mais recentemente a ressonância nuclear magnética das mamas (BARROS; BUZAID, 2007).

### Quadro 1.1 - Estadiamento do Tumor Mamário, Classificação Clínica

Tamanho do tumor (cT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis (DCIS)	Carcinoma <i>in situ</i> : carcinoma ductal <i>in situ</i>
Tis (LCIS)	carcinoma lobular <i>in situ</i>
Tis (Paget's)	doença de Paget da papila s/ tumor
T1	Tumor menor ou igual a 2 cm
T1mi	Tumor $\leq 1$ mm na maior dimensão
T1a	Tumor maior que 1mm e menor ou igual a 5 mm na maior dimensão
T1b	Tumor maior que 5 mm e menor ou igual a 10 mm na maior dimensão
T1c	Tumor maior que 10 mm e menor ou igual a 20 mm na maior dimensão
T2	Tumor maior que 20 mm e menor ou igual a 50 mm na maior dimensão
T3	Tumor maior que 50 mm na maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para parede torácica e ou pele (ulceração ou nódulo cutâneo)
T4a	Extensão para parede torácica
T4b	Ulceração e ou nódulo satélite ipsilateral e ou edema (incluindo peau d' orange)
T4c	Ambos T4a e T4b
T4d	Carcinoma inflamatório
Linfonodos Regionais (cN) (Conclusão)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais móveis dos níveis I e II
N2	
N2a	Metástase para linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes dos níveis I e II
N2b	Metástase clinicamente aparente na mama interna na ausência de metástases axilares dos níveis I e II
N3	
N3a	
N3b	Metástase para linfonodo infraclavicular ipsilateral (nível III axilar)
N3c	Metástase para linfonodos da mama interna ipsilateral e linfonodo axilar Metástase para linfonodo supraclavicular ipsilateral
Metástase à Distância (cM)	
M0	Ausência de evidências clínicas ou radiográficas de metástase à distância
cM0 (i+)	Ausência de evidências clínicas ou radiográficas de metástase à distância, mas presença de células tumorais circulando no sangue periférico, ou medula ósea ou outro tecido nodal não regional, detectado molecularmente ou microscopicamente $< 0,2$ mm, em pacientes sem sintomas ou sinais de metástase Metástase à distância detectada clinicamente e radiograficamente e/ou histologicamente $> 0,2$ mm

**Observação:** Parede torácica inclui arcos costais, músculos intercostais e músculos serrátilo anterior, mas não inclui o músculo peitoral. Doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor.

**Fonte:** UICC, 2010.

**Quadro 1.2 - Estadiamento Tumoral**

<b>Estádio 0</b>	<b>Tis</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estádio IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
<b>Estádio IIA</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>Estádio IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>Estádio IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
<b>Estádio IIIB</b>	T3	N2	M0
<b>Estádio IIIC</b>	T4	N0, N1, N2	M0
<b>Estádio IIIC</b>	Qualquer T	N3	M0
<b>Estádio IV</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: UICC, 2010.

Para a decisão terapêutica, deve-se considerar o estadiamento do tumor de acordo com a classificação TNM, como também: o laudo histopatológico, resultado de exame da imunohistoquímica, quadro clínico do paciente e tratamento local porventura já realizado. As opções terapêuticas do câncer de mama incluem a cirurgia do tumor primário, a avaliação do acometimento axilar e radioterapia, como formas de tratamentos locais. O tratamento sistêmico é administrado sob as formas de quimioterapia e hormonioterapia, quando necessárias.

## 1.5 HISTOPATOLOGIA, IMUNOHISTOQUÍMICA E PATOLOGIA MOLECULAR NO CARCINOMA MAMÁRIO

### 1.5.1 Diagnóstico histopatológico do carcinoma de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea, e abrange entidades clínicas com características biológicas e desfechos clínicos distintos. Ao contrário do que ocorre em carcinomas de cólon, por exemplo, não é possível estabelecer uma linha de progressão para os tumores de mama, uma vez que não há marcadores definidores de hiperplasia, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Em vez disso, existem linhas de evidências que sugerem que o câncer de

mama consiste em um grupo de doenças com diferentes fatores de risco, apresentações clínicas e características histológicas, que acometem o mesmo órgão, com origem em uma estrutura comum, a unidade ducto-lobular terminal (MALHOTRA *et al.*, 2010; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010). Apesar da origem comum, o câncer de mama invasivo pode ser classificado em subtipos histológicos, com comportamento clínico e biológico distinto.

O carcinoma ductal infiltrante, atualmente designado carcinoma invasor de tipo não especial (*Non Especial Type* – NST/OMS, 2013) é definido pela presença de arquitetura não especializada em 50% ou mais da área tumoral avaliada. Microscopicamente, tais tumores podem apresentar variações morfológicas, porém sem definição de tipo especial, como padrão trabecular, sólido, em lençol e ninhos, com graus variáveis de diferenciação, necrose e desmoplasia. Carcinomas mamários com 49% ou menos de componente não especial e 50 a 90% de subtipo especial são classificados como tipos mistos. O subtipo especial mais comum é o carcinoma lobular, representando 5 a 15% de todos os carcinomas mamários. É caracterizado microscopicamente por: células discoesas; núcleo regular, redondo ou oval; citoplasma escasso, por vezes com mucina intracitoplasmática; e aspecto em alvo ou anel de sinete. Apresentam negatividade ou expressão reduzida de E-caderina, e raramente são positivos para o gene *HER-2* (PINDER; HARRIS; O'MALLEY, 2011; SINN; KREIPE, 2013).

O carcinoma tubular é um tipo especial de tumor mamário composto de estruturas tubulares bem distintas e por células bem diferenciadas que compreendem ao menos 90% do carcinoma (PINDER; HARRIS; O'MALLEY, 2011). Constituem menos de 2% de todos os carcinomas e tendem a ser diagnosticados em estágios iniciais, em torno de 7% ainda em estadiamento clínico I, compreendendo tumores menores que 1 cm (SHING *et al.*, 2007). Já o carcinoma mucinoso é constituído por grupamentos de células com citoplasma eosinofílico e núcleo intermediário, dispostas em arranjo trabecular, acinar, em ninhos ou lençol, em meio a lagos de mucina extracelular. Tais subtipos estão associados com um menor potencial de malignidade, expressam receptores hormonais e tem reduzida taxa de comprometimento axilar (PINDER; HARRIS; O'MALLEY, 2011).

Outros tipos histológicos associados a um pior prognóstico incluem o carcinoma micropapilífero e o carcinoma metaplásico. O primeiro é caracterizado por ninhos de células epiteliais eosinofílicas cuboidais ou colunares, sem eixo fibrovascular verdadeiro, circundadas por um espaço claro, com inversão da polaridade celular, conferindo marcação característica por antígeno epitelial de membrana (EMA) no contorno externo dos grupamentos celulares. Tal subtipo histológico está associado a maior invasão linfovascular, multifocalidade e maior frequência de metástases linfonodais, que podem chegar a 95% dos casos em algumas séries.

O carcinoma metaplásico apresenta diferenciação fusocelular ou de células escamosas, que pode ser única ou associada a componente de carcinoma ductal, ou outro componente metaplásico, inclusive com elementos heterólogos, como osso ou cartilagem (PINDER; HARRIS; O'MALLEY, 2011).

Subtipos histológicos menos frequentes de carcinoma de mama incluem o carcinoma neuroendócrino, papilífero invasivo, mucoepidermoide, carcinoma secretório, de células claras, tipo glândula salivar e apócrino (PINDER; HARRIS; O'MALLEY, 2011).

Devido à heterogeneidade clínica e genética do câncer de mama, tornou-se necessário o estabelecimento de sistemas de classificação que uniformizassem a linguagem dos tumores e pudesse ser utilizada com fins prognósticos e terapêuticos. Bloom e Richardson (1957) contribuíram para a melhora no sistema de graduação em carcinoma de mama, adicionando uma escala numérica aos critérios histológicos inicialmente descritos por Patey e Scarff (1928), e criando uma nova classificação denominada Scarff, Bloom e Richardson (SBR), adotada oficialmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1968 (SCARFF; TORLONI, 1968). Posteriormente, o grupo de Nottingham introduziu algumas modificações no método de SBR, na tentativa de tornar ainda mais objetivos os padrões de avaliação histológica.

O grau de Nottingham está diretamente relacionado ao potencial de agressividade do tumor, e diz respeito ao grau de diferenciação, no qual são considerados pleomorfismo nuclear, formação tubular e índice mitótico seguindo uma somatória de escala de 3 a 9, em que são atribuídos valores de 1 a 3 para cada variável da classificação, sendo o grau 1 relacionado a maior diferenciação e menor agressividade (ELSTON; ELLIS, 1991). Incorporado a diversos algoritmos prognósticos e de tratamento, o grau histológico também apresenta ampla correlação com estudos de larga escala em genética e transcriptômica (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010).

Entre os fatores aceitos como indicadores de prognóstico, a determinação do grau histológico é um dos principais fatores, e de fácil execução a serem acessados na rotina diagnóstica. A avaliação do grau histológico, conhecida como *Nottingham Grading System* (NGS) é um sistema recomendado por vários grupos internacionais, como a OMS, Comitê Americano de Câncer, União Européia e o Colégio Real de Patologia. O valor prognóstico do NGS no câncer de mama vem ao longo dos anos sendo aperfeiçoado. Quando o NGS é associado a outros fatores como o tamanho do tumor e o *status* do linfonodo sentinela, forma índices prognósticos, como o índice Prognóstico de Nottingham. Por ser um valor de prognóstico importante, o NGS também está incorporado em alguns algoritmos e *guidelines*, como o de St. Gallen (RAKHA *et al.*, 2010).

### 1.5.2 Fatores prognósticos e preditivos em carcinoma de mama

Os fatores prognósticos do câncer de mama são conceituados como parâmetros verificados por ocasião do diagnóstico ou tratamento, que influenciam no curso natural da doença, e ajudam a antever o intervalo livre de doença e sobrevida. Os fatores preditivos de resposta, por outro lado, são parâmetros que auxiliam na previsão da obtenção de sucesso com determinada modalidade terapêutica. Muitos dos fatores prognósticos são também preditivos de resposta e vice-versa (BARROS; BUZAID, 2007).

A história natural do câncer de mama e o risco de uma lesão bem estabelecida são avaliados através das características anatomopatológicas. A categorização correta dessas lesões é ferramenta importante na prática clínica e se aplica na identificação de subgrupos de pacientes com riscos diferenciados para o desenvolvimento de câncer de mama (BOFF; WISINTAINER, 2006). Indivíduos que têm história pregressa de carcinoma invasor, carcinoma *in situ* ou hiperplasia atípica na mama tem aumento significativo no risco de um futuro desenvolvimento de carcinoma invasivo mamário (SINGLETERY, 2003).

A incidência de um segundo câncer invasivo, para um indivíduo que apresentou uma lesão invasora anteriormente, aumenta próximo de 1% ao ano (SINGLETERY, 2003). Pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) tem risco aumentado para recorrências de nova lesão de CDIS, carcinoma invasor e até metástase à distância. Anteriormente, as lesões de alto risco apresentavam pouca incidência no seu diagnóstico, porém nos últimos 20 anos, houve aumento no número neste diagnóstico baseada na melhoria de métodos de detecção (PARTRIDGE *et al.*, 2008).

A avaliação de fatores prognósticos e preditivos confiáveis para o manejo do câncer de mama se faz importante para a orientação na decisão terapêutica. Três fatores principais são aplicados na rotina clínica: tamanho do tumor, *status* do linfonodo e grau histológico. O tamanho tumoral é considerado fator prognóstico de maior importância após o *status* dos linfonodos. As chances de recorrência da doença aumentam com o aumento do tamanho tumoral, e sua repercussão clínica tem maior impacto nos casos de axila sem comprometimento neoplásico, já que nesses casos, passa a ser o fator prognóstico de maior relevância, e rotineiramente usado nas decisões da terapia adjuvante (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004; BARROS; BUZAID, 2007).

Um estudo realizado por Rosen *et al.* (1993 apud CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004), que correlacionou o tamanho do tumor com a sobrevida livre de doença num período de

20 anos, verificou que a sobrevida de pacientes foi de 88% para aqueles pacientes que apresentavam tumores menores ou iguais a 1,0 cm; 72% para aqueles com tumores entre 1,1 cm e 3,0 cm, e 59% para os que apresentavam tumores entre 3,1 cm e 5,0 cm. A média de tempo para o desenvolvimento de metástases à distância foi menor, quanto maior o tamanho tumoral (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

A presença de metástases para os linfonodos axilares ainda é considerada o maior indicador prognóstico de pacientes com câncer mamário invasivo. Quanto maior for o número de linfonodos comprometidos, maior será a chance do surgimento de metástases, por isso, a avaliação do *status* axilar é um procedimento aplicado na rotina oncológica no tratamento da neoplasia mamária. É bem conhecido que a avaliação clínica realizada manualmente apresenta uma sensibilidade e especificidade pobre, e por isso, a dissecação dos gânglios axilares se faz necessária para determinar o comprometimento axilar (BARROS; BUZAID, 2007; LEE *et al.*, 2010).

Estudos clínicos que avaliam o comprometimento dos linfonodos axilares têm estratificado os pacientes em três grupos: os com linfonodos negativos, com um a três linfonodos positivos e com quatro ou mais linfonodos positivos. Vários estudos demonstram uma relação direta entre o número de linfonodos acometidos e o prognóstico clínico e também com o tamanho tumoral, onde tumores maiores que dois centímetros têm maior chance de comprometimento no momento do diagnóstico (WILLETT *et al.*, 2002; MARINHO *et al.*, 2008). A sobrevida em cinco anos de pacientes com ausência de comprometimento linfonodal é de 82,8% comparada com 73,0% dos que apresentam um a três linfonodos positivos, 45,7% dos com quatro a doze linfonodos e 28,4% com mais de 13 linfonodos acometidos (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

O estudo do linfonodo sentinela (LS) foi introduzido na prática clínica em 1990, é considerado um método extremamente sensível e específico na predição de algumas neoplasias malignas, tais como a mamária. De acordo com Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) a biópsia do linfonodo sentinela é um método seguro na identificação nos casos de tumores mamários precoces e sem comprometimento axilar clínico (CARVALHO *et al.*, 2010).

Os métodos de análise para avaliação do LS estão sendo aperfeiçoados, no intuito de aumentar a acurácia e reduzir as taxas de falso-negativos, e basicamente consistem na multissecação e coloração com a hematoxilina e eosina (HE) do LS, ou ainda no uso da imunohistoquímica, nos casos em que o resultado com o HE for negativo e se queira afastar a presença de pequenos depósitos. A maioria dos casos é classificada como positivos ou negativos, de acordo com a presença ou ausência de macrometástases. A edição de 2003 da

classificação de TNM para tumores malignos (tumor, linfonodo e metástase) usou a medida de dois milímetros como corte para distinguir entre a presença de micro ou macrometástase (CARVALHO *et al.*, 2010).

A avaliação do LS é importante na decisão cirúrgica da dissecação axilar (DA). De acordo com o Consenso de St Gallen (2015), este procedimento deve ser realizado em casos onde não há programação de radioterapia. Na atualidade, a pesquisa de linfonodo sentinela se confirma como padrão de cuidado cirúrgico, sendo obrigatória em cirurgias radicais, como a mastectomia, por exemplo, onde não será aplicada a radioterapia. A DA, pode entretanto, ser omitida após resultado de LS positivo, nos casos em que o tratamento cirúrgico será conservador (quadrantectomia) e neste caso, aplicada radioterapia utilizando campos tangentes com inclusão de axila inferior (nível I e II de Berg). Nos casos com axila clinicamente positiva, que apresente resposta clínica completa à quimioterapia neoadjuvante, considerou-se apropriada a realização de biópsia do LS, no entanto, qualquer positividade nesses casos deverá ser seguida de dissecação axilar. Vale ressaltar que falsos negativos permanecem frequentes, a menos que três ou mais sentinelas sejam avaliados (COATES *et al.*, 2015).

### 1.5.3 Ki-67

A expressão do Ki-67 tem relação direta com o tamanho tumoral, grau histológico, invasão vascular e *status* axilar na neoplasia maligna de mama. Por outro lado, tem relação inversa com a expressão proteica dos receptores hormonais (BOFF; WISINTAINER, 2006).

Esforços na padronização da avaliação foram feitas recentemente para melhorar a reprodutibilidade da imunohistoquímica quantitativa do Ki-67 entre os diferentes laboratórios e observadores; e tem ajudado na distinção entre o perfil molecular luminal A e luminal B (PATANI; MARTIN; DOWSETT, 2013). Em um estudo realizado no Hospital Universitário de Modena (Itália), onde se avaliou a expressão do Ki-67, *status* axilar e doença residual, em pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante para tratamento de neoplasia maligna mamária, demonstraram que pacientes com alta expressão do Ki-67 após tratamento quimioterápico apresentam tempo livre de doença e sobrevida global diminuída, e que níveis de Ki-67 após tratamento sistêmico pode ser usado como um marcador substituto para avaliação de eficácia de tratamento (GUARNERI *et al.*, 2009). O Ki-67 é usado na classificação do subtipos moleculares na diferenciação entre luminal A e luminal B, porém no Consenso de St Gallen a maioria dos autores definiu que o Ki-67 só deve ser levado em consideração para essa classificação caso seu resultado venha de um laboratório validado. Embora 20% desses autores

acredite que mesmo os resultados da imunocoloração deste gene tenha boa prodecência técnica, os seus valores por si só, não seriam capazes de definir esta classificação, havendo a necessidade de testes genéticos com investigação de um maior número de genes e determinação de *scores* de risco, tendo como exemplo o PAM50, MammaPrint (GNANT; THOMSEN; HARBECK, 2015).

O Ki-67 é usado de rotina em aplicação clínica, para classificação molecular, e faz parte do painel imunohistoquímico, porém quando se estuda fatores prognósticos associados a tempo livre de doença, recidiva locorregional, e sobrevida global, vemos que os fatores que realmente interferem nestas respostas são os receptores hormonais e *HER-2* (SWISHER, 2016).

#### **1.5.4 Receptores hormonais**

Os dois fatores preditivos mais amplamente usados em câncer de mama são os RE e RP. Ambos RE e RP são fatores de transcrição ligante-acionada pertencente à família de receptores nucleares hormonais (DUFFY, 2005). A ação de estrogênio tem sido implicada no desenvolvimento e progressão do câncer mamário desde o início do século XIX. O receptor de estrogênio foi identificado no início de 1950 e purificado alguns anos mais tarde. Entretanto, só em 1980 a primeira molécula de RE foi clonada, e só em meados de 1990 clonaram a segunda molécula. Estes dois receptores relatados anteriormente são agora denominados RE $\alpha$  e RE $\beta$ , respectivamente (HERYNK; FUQUA, 2004).

Receptores de estrogênio (RE)  $\alpha$  e  $\beta$ , são codificados por genes independentes, e são localizados nos braços cromossômicos 6q e 14q, respectivamente. Os REs apresentam estruturas com grande homologia entre si (56%). Ambos os receptores apresentam um domínio central responsável pela ligação do receptor com seqüências de DNA em regiões reguladoras de genes alvos, uma região de dimerização; um domínio de ligação, que se liga com o hormônio; e dois domínios de transativação localizados próximo a porção N terminal e a C terminal (BARROS; BUZIAD, 2007; CHAN; PETROSSIAN; CHEN *et al.*, 2015).

Estudos indicam que RE $\alpha$  estão implicados na promoção do crescimento e sobrevivência de células epiteliais mamárias, tanto tumorais como não tumorais, enquanto os RE $\beta$  estão envolvidos em propriedades de inibição do crescimento (CHAN; PETROSSIAN; CHEN *et al.*, 2015).

O RE, receptor nuclear tem sua principal função no núcleo, onde ativa a transcrição de genes regulados por esse receptor e sua atividade depende da ligação com o estradiol. Este receptor também pode ser encontrado no citosol em estado não ligante, mas pode entrar no

núcleo pela ativação ligante dependente ou não dependente. No citosol o RE é ligado a proteínas Chaperones, tais como HSP90 e HSP70. Essas proteínas são essenciais para a estabilidade de proto-oncogenes e dos receptores hormonais (CHAN; PETROSSIAN; CHEN *et al.*, 2015).

Os RE tem funções que podem ser classificadas como genômicas ou não genômicas. Na via genômica, o RE forma um dímero de ligação com o estradiol, este dímero após ativado e translocado para o interior do núcleo, se vincula nas regiões promotoras e inicia a ativação ou repressão de transcrições, esta etapa é conhecida como forma “clássica”. Os RE podem também interagir com outros fatores de transcrição para ligar-se ao DNA e levar a ativação ou repressão de genes alvos, forma “não clássica”. Um terceiro mecanismo envolve a ativação de fator ligante independente do RE através da fosforilação de quinases de fator de crescimento em vias de sinalização do receptor. Com o auxílio das vias, os RE e seus coativadores podem ser fosforilados independentes de ligantes, através dos mecanismos de DNA genômico ou não genômico, o que pode conduzir a resistência endócrina (BUNONE *et al.*, 1996).

Estudos observacionais e ensaios clínicos em mulheres, tem correlacionado o risco de câncer de mama com a exposição ao estrógeno, e esses resultados demonstram que a prolongada exposição de níveis elevados de estrógenos endógenos, reposição hormonal usando estrogênios equinos conjugados associado ao acetato de progesterona, e contraceptivos orais que contém etinil estradiol podem ser associados com um aumento significativo no risco relativo do desenvolvimento do câncer de mama de aproximadamente 1,2-2,5 (YAGER, 2014).

A determinação de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) é uma estratégia fundamental para estabelecer um tratamento adequado para pacientes com câncer mamário (BOFF; WISINTAINER, 2006). Análises multivariadas demonstram que os receptores de estrogênio e progesterona são fortes fatores prognósticos em câncer mamário, principalmente em pacientes com linfonodos axilares negativos (RAVAIOLI *et al.*, 1998). Nas amostragens em que estes receptores encontram-se positivos, observa-se um grande benefício ao uso de hormonioterapia (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

O aumento da expressão da proteína do RE $\alpha$  é um fator prognóstico bem estabelecido em pacientes com câncer mamário, estes receptores normalmente são associados com tamanhos tumorais pequenos, baixo grau tumoral, diploidia do DNA e um melhor prognóstico no geral, porém o significado prognóstico do RE $\beta$  ainda não está bem definido (TANEJA *et al.*, 2010).

A análise do *status* dos receptores hormonais orienta o melhor regime terapêutico quimioterápico e a hormonioterapia avaliando também a sobrevida global, onde se observa uma associação entre *status* de receptores negativos com maior grau histológico tumoral (G3 ou tumores indiferenciados) e também com a presença de linfonodos positivos (BARNES *et al.*,

2004). O método imunohistoquímico tem na prática, gradativamente, substituído o método bioquímico, antes tido como o “padrão-ouro”, para a avaliação dos receptores hormonais, principalmente após o desenvolvimento de anticorpos capazes de reconhecer epítomos que não se degradam durante o processamento histológico (ARIAS; MAZZA; FUNKE, 2003).

No câncer de mama os receptores de estrogênio estão presentes em quase 80%, e os receptores de progesterona em quase 65% dos tumores, então a terapia endócrina é considerada tratamento complementar a cirurgia na maioria dos pacientes, levando a remissão tumoral e a consideráveis benefícios clínicos. Esta terapia consiste em supressão da função ovariana, uso de moduladores seletivos de receptores estrogênicos, receptores de regulação seletiva de estrogênio, inibidores de aromatases ou a combinação de drogas (LUMACHI; SANTEUFEMIA; BASSO, 2015).

A avaliação de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) por imunohistoquímica é uma estratégia fundamental para estabelecer um tratamento adequado para pacientes com câncer mamário, estando estes receptores presentes em aproximadamente 70% dos tumores mamários (BOFF; WISINTAINER, 2006). Análises multivariadas demonstram que os receptores de estrogênio e progesterona são fortes fatores prognósticos em câncer mamário, principalmente em pacientes com linfonodos axilares negativos (RAVAIOLI *et al.*, 1998). Nas amostragens em que estes receptores encontram-se positivos, observa-se um grande benefício ao uso de hormonioterapia, em relação às amostras com *status* negativo. (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

### **1.5.5 HER-2 / c-erbB2**

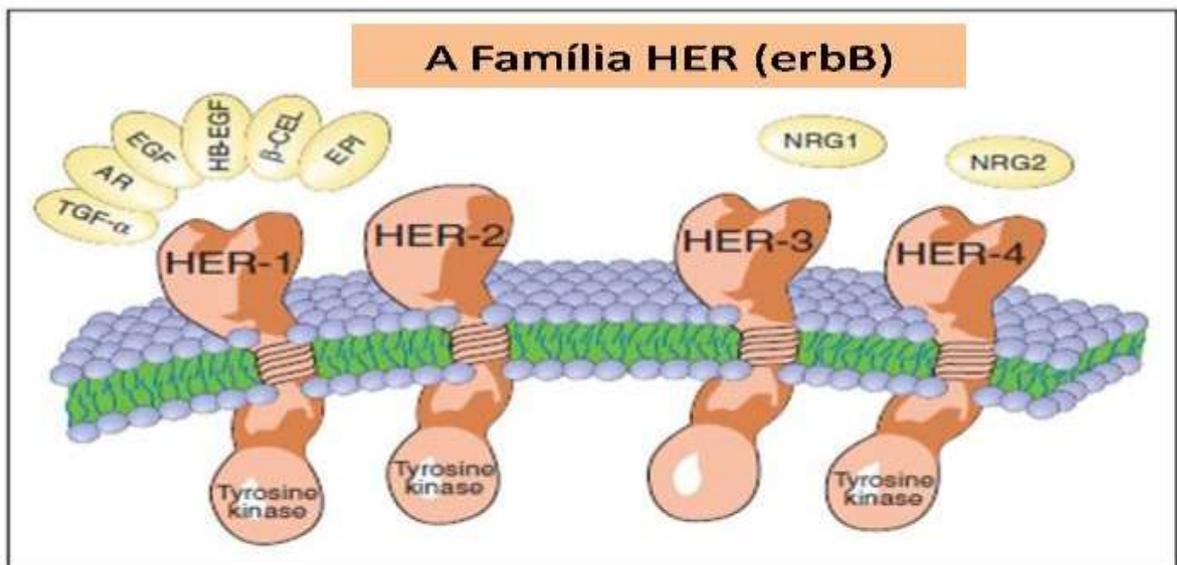
O gene *HER-2* (receptor de crescimento epidérmico 2) localizado no cromossomo 17q21, codifica um receptor transmembrana tirosina-quinase, membro da família dos receptores de crescimento epidérmico (EGFR) ou família *HER* (ROSS *et al.*, 2003). Não apresenta um ligante conhecido e foi inicialmente identificado em um modelo de glioblastoma em rato (ARTEAGA *et al.*, 2012).

O *HER-2* é o gene mais frequentemente amplificado no câncer de mama; o aumento da expressão proteica do *HER-2*, geralmente atribuídos a amplificação deste gene, é identificado em 15% a 20% das neoplasias malignas das mamas (SEOL *et al.*, 2012).

Esta família de receptores está envolvida na inter-relação célula-célula e célula-estroma, primariamente através da tradução de sinal, no qual fatores de crescimento epiteliais, ou

ligantes, afetam a transcrição de vários genes pela fosforilação ou desfosforilação de uma série das proteínas transmembranas; e intermediários de sinalização intracelular, onde por diversas vias culminará em alterações nos processos de proliferação, sobrevivência, motilidade e aderência celular (ZHOU; HUNG, 2003). Outros membros desta família incluem: receptor de fator de crescimento epidérmico *HER-1*; *HER-3* e *HER-4* (DUFFY, 2005) (Fig. 1.7).

Estes genes estão envolvidos na regulação de crescimento celular, sobrevivência e diferenciação através da transdução de sinais interligados envolvendo ativação do PI3k/Akt, Ras, Raf MEK e MAPK (ARTEAGA *et al.*, 2012).



**Figura 1.7** – A Família do Gene HER (erb).

**Nota:** *HER-2/neu* não tem ligantes conhecidos e que o *HER-3* não tem atividade intrínseca tirosina-quinase. Abreviações: TGF- $\alpha$ = fator de crescimento alfa transformante; AR= anfiregulina; EGF= fator de crescimento epidérmico; HB-EGF= ligante de heparina EGF;  $\beta$ -CEL= beta celulina; EPI= epinefrina; NRG1= neuregulina; NRG2= nereugulina 2.

**Fonte:** Adaptado de Ross *et al.*, 2003.

O gene *HER-2* é considerado um marcador tanto prognóstico como de predição de resposta ao tratamento. Os tumores malignos da mama que apresentam a amplificação do *HER-2* são associados com fenótipo mais agressivo, alto grau histológico, maior tamanho tumoral, aumento da atividade mitótica, alta proliferação celular, níveis baixos de receptores hormonais e um pior prognóstico tanto em pacientes com linfonodos positivos, como também nos negativos, observando-se uma diminuição nas taxas de sobrevivência global (SLAMON *et al.*, 1987; CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004; BRAVATÀ *et al.*, 2013).

Técnicas baseadas na morfologia celular e análises moleculares têm sido usadas para avaliação do *status* do *HER-2* em amostras de câncer de mama. A análise imunohistoquímica (IHC) da proteína é o método predominantemente utilizado. Na interpretação do *HER-2*, pelo método imunohistoquímico, se faz necessário estabelecer a relação entre o número de receptores de *HER-2* na superfície das células, e a distribuição e intensidade da coloração na amostra de tecido examinada (WOLFF *et al.*, 2013). Este procedimento foi normatizado, e de acordo com a percentagem de células coradas (ou marcadas) se classifica o material examinado em zero (ausência de marcação ou imunocoloração da membrana incompleta e fraca/difícilmente perceptível em  $\leq 10\%$  das células tumorais) 1+ (presença de imunocoloração de membrana incompleta que é fraca/difícilmente perceptível em  $> 10\%$  das células tumorais), 2+ (imunocoloração de membrana circunferencial completa e intensa em  $\leq 10\%$  das células

tumorais), ou 3+ (presença de imunocoloração de membrana circunferencial completa e intensa em > 10% das células tumorais) (WOLFF *et al.*, 2013).

Outras formas de avaliação é a hibridização *in situ* cromogênica ou hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Essas técnicas permitem visualizar diretamente o número de cópias do gene *HER-2* nos núcleos das células neoplásicas.

A concordância entre os testes de FISH ou reação de IHC é de 90%, quando a IHC mostrar aumento da expressão 3+. Apenas em reações por IHC em que os resultados forem 2+, recomenda-se o método de FISH (BARROS; BUZAID, 2007). Nos casos da presença de *HER-2* (3+), ou FISH positivo para os resultados de *HER-2* (2+), o uso do anticorpo monoclonal Trastuzumab tem indicação com uma combinação de quimioterapia (HATAKE; TOKUDOME; ITO, 2007).

A amplificação/supereexpressão no gene *HER-2* são responsáveis pela transformação celular *in vitro*, pelo desenvolvimento de neoplasias experimentais, assim como o surgimento de tumores em humanos (TEWARI; KRISHNAMURTHY; SHUKLA, 2008).

O aumento da expressão do gene *HER-2* é associada com aumento no número de mitoses, transformação maligna, aumento da motilidade celular, invasão e metástases em linhagens de células mamárias e sistemas de modelos tumorais (OLAYIOYE *et al.*, 2000).

O gene *HER-2* é considerado um marcador tanto prognóstico como preditor de resposta ao tratamento. Os tumores malignos da mama que apresentam a amplificação do *HER-2* são associados com fenótipo mais agressivo, alto grau histológico, maior tamanho tumoral, aumento da atividade mitótica, alta proliferação celular, níveis baixos de receptores hormonais e um pior prognóstico tanto em pacientes com linfonodos positivos e também em negativos, observando-se uma diminuição nas taxas de sobrevida global (SLAMON *et al.*, 1987; CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004; BRAVATÀ *et al.*, 2013). Estudos revelam que o efeito prognóstico do *HER-2* é forte tanto para a sobrevida global como para a recorrência local (ROSS *et al.*, 2003; SCHLOTTER *et al.*, 2003; TEWARI; KRISHNAMURTHY; SHUKLA, 2008).

O gene *HER-2* é um biomarcador de predição de resposta a terapêutica em câncer de mama. Vários estudos comparam diferentes métodos de testes na avaliação de *HER-2* na tentativa de descobrir a técnica mais acurácia e precisa. Nesses estudos foram demonstradas uma alta correlação entre o nível de expressão da proteína *HER-2* e a amplificação gênica (NOSKE, 2011).

Relatos na literatura demonstram a associação da positividade do gene *HER-2* em tumores mamários com a resposta ao esquema quimioterápico ciclofosfamida, metotrexate e 5-

fluoracil (CMF) e aos regimes de quimioterapia contendo antracíclicos. Nestes, a resposta ao tratamento foi mais eficaz quando comparada com o esquema CMF (CIANFROCCA; GOLDDSTEIN, 2004; PUSZTAI, 2008). Dois amplos estudos randomizados para adjuvância associou o achado de amplificação do *HER-2* com maior resistência aos regimes quimioterápicos baseados no esquema CMF (RAVAIOLI *et al.*, 1998).

Com base nas evidências avaliadas a respeito dos esquemas quimioterápicos, a ASCO concluiu que altos níveis de expressão do gene *HER-2* pode individualizar aqueles pacientes que irão se beneficiar do regime terapêutico contendo antracíclicos; porém que a expressão normal de *HER-2* não poderia ser usada isoladamente na exclusão do tratamento com os antracíclicos (HARRIS *et al.*, 2007, PUSZTAI, 2008).

O aumento da expressão do gene *HER-2* é considerado como um dos principais fatores prognósticos de fase II e III em pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante em esquema combinado entre antracíclicos e taxanes (EL-SAYED *et al.*, 2012).

Várias terapias dirigidas aos tumores que apresentam aumento da expressão gênica ou amplificação do gene *HER-2* foram desenvolvidas. A primeira droga foi o Trastuzumab (Herceptin®), que é um anticorpo monoclonal aprovado para o tratamento de câncer de mama com expressão proteica *HER-2*, esta droga liga-se a este gene em seu domínio extracelular. O Pertuzumab (Perjeta®) foi desenvolvido posteriormente e é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado que se liga ao *HER-2* em um domínio extracelular, porém diferente do domínio do Trastuzumab, e impede a hetero-dimerização resultando em um potente inibidor de crescimento. O Adotrastuzumab emtansine (Kadcyla®) também dirigido ao *HER-2* é uma conjugação de trastuzumab com um potente agente inibidor de microtúbulos derivado de maitansina (DM-1). Esta molécula tem três propriedades anti-*HER-2*: inibição por trastuzumab, efeito citotóxico pelo DM-1 e certo grau de especificidade pois dirige a ação da droga apenas as células que expressam o gene *HER-2* (RECONDO *et al.*, 2014). O Kadcyla® foi recentemente aprovado para tratamento de metástase refratária. O Lapatinib é um bloqueador intracelular que age simultaneamente nos receptores de tirosina-quinase do *HER-2* e no EGFR levando a um maior efeito inibitório (RECONDO *et al.*, 2014).

Melhorias nas taxas de tempo livre de doença e sobrevida global em um terço das pacientes são relatadas nas adjuvâncias com trastuzumab, por isso a orientação publicada pela ASCO a respeito da necessidade da pesquisa deste gene pela imunohistoquímica (PATANI; MARTIN; DOWSETT, 2013).

### 1.5.6 Classificação molecular do câncer de mama

Mesmo sendo reconhecidamente um preditor de prognóstico, a classificação histopatológica clássica não capta completamente todos os cursos clínicos do câncer de mama. O tipo histológico, grau e tamanho do tumor, comprometimento dos linfonodos, *status* de receptores de estrogênio e progesterona e do gene *HER-2*, todos estes achados influenciam o prognóstico e a resposta terapêutica. As maiores diferenças moleculares clínicas são observadas entre os tumores receptores de estrogênio positivos e negativos (IWAMOTO, 2011).

Através de técnicas de *microarray*, foi possível o estudo da diversidade de expressão gênica do câncer de mama, as quais proporcionariam posteriormente, o surgimento dos subtipos moleculares atualmente conhecidos. No ano 2000, Perou *et al.* propuseram a correspondência genética da diversidade morfológica dos tumores de mama. Foram analisados 42 casos, entre carcinomas ductais, lobulares, carcinoma ductal *in situ*, fibroadenoma e amostras de mama normal, onde observou-se, pela primeira vez, uma correspondência entre perfil de expressão gênica e características fenotípicas. Posteriormente, Sorlie e colaboradores (2003), em estudo com um tamanho amostral maior, ratificaram a correspondência genotípica dos tumores mamários, estabelecendo cinco subtipos iniciais: luminal subtipo A, semelhante a mama normal e com maior sobrevida; luminal subtipo B, ainda com expressão de receptores hormonais, porém com sobrevida menor comparada ao luminal subtipo A; ERBB2 positivo, um subgrupo peculiar, caracterizado pela amplificação/superexpressão do gene *HER-2*; subtipo basal, com perfil gênico semelhante a células basais; e o subtipo semelhante a mama normal, o qual posteriormente foi retirado da classificação.

Atualmente, o câncer de mama é subdividido em diferentes subtipos moleculares, através de estudo imunohistoquímico, em correspondência com os ensaios de expressão gênica. Os consensos de St. Gallen contribuíram para a consolidação da classificação dos tumores para fins terapêuticos com base nos “subtipos intrínsecos” luminal A, caracterizado por receptor de estrogênio positivo, e ausência de amplificação de *HER-2* e Ki-67 abaixo de 14%, luminal B/*HER-2* negativo, com as mesmas características do luminal A, porém com Ki-67 acima de 14%; luminal B/*HER-2* positivo, *HER-2* positivo, e triplo negativo. Essa divisão de subtipos é importante na avaliação de resposta patológica à quimioterapia e sobrevida que dependem fortemente dos subtipos do tumor (LIPS *et al.*, 2013). A partir de 2015, com base no novo consenso de St. Gallen, a distinção entre o grupos luminal A e luminal B através do Ki-67 foi ainda mais discutida, sendo a maioria a favor de que a definição do grupo luminal B-like deveria contar com um ponto de corte de Ki-67 entre 20 e 29%. Vale ressaltar que uma minoria

considerou que o Ki-67 não deveria ser utilizado para este tipo de distinção entre grupos prognósticos (COATES *et al.*, 2015).

Com o intuito de orientar a decisão terapêutica por meio de avaliação de fatores prognósticos e preditivos, foram desenvolvidos testes de perfil de expressão gênica para estimar o índice de recorrência tumoral em pacientes com doença em estágio inicial. O *Oncotype Dx* (Genomic Health, Inc., Redwood City, CA) consiste na análise da assinatura genética de 21 genes, em fragmentos de tumores mamários, de paciente com linfonodo sentinela negativo e com expressão gênica positiva para receptores hormonais. Este teste orienta a decisão de tratamento adjuvante, e fornece uma estimativa de recorrência do tumor em 10 anos. Para isso, é estabelecida uma escala de 1 a 100, que posteriormente é convertida em uma das categorias de risco: baixo (RS menor que 18), intermediário (RS entre 18 e 30) e alto (RS maior que 30). As pacientes de baixo risco se beneficiam apenas de hormonioterapia, nestes casos não haveria o benefício do emprego de quimioterapia adjuvant, nas pacientes HER-2 positiva ou triplo negativa este teste não tem aplicabilidade (PAIK *et al.*, 2004; CANADIAN AGENCY FOR DRUGS AND TECHNOLOGIES IN HEALTH, 2014).

Um outro estudo contendo um número expressivo de pacientes, totalizando 1600, foi desenvolvido para avaliar fatores prognósticos de tumores mamários com o intuito de prever o risco de recorrência do câncer de mama em 10 anos. A pesquisa consiste na avaliação da expressão de 70 genes, em tumores de pacientes afetadas. Esses genes foram selecionados previamente a partir de dados de expressão de todo o genoma, tornando-se um método com alta sensibilidade. Este método possibilitou o conhecimento de genes cujas funções eram desconhecidas no processo da tumorigênese da mama, como exemplo o gene MTDH, que é essencial no desenvolvimento de metástase e contribui para a resistência à quimioterapia; e o gene TSPYL5 que é um regulador negativo da proteína TP53. Este teste é conhecido como MammaPrint e tem como aplicabilidade pacientes com expressão positiva para receptores hormonais e HER-2 negativo no câncer de mama, e não devem ser aplicados nas pacientes HER-2 positiva como também nas triplo negativo (VAN de VIJVER *et al.*, 2002).

Vários biomarcadores clínicos são usados para direcionar o uso de terapias alvos no câncer de mama, incluindo o aumento da expressão de *HER-2*, e a expressão de receptores de estrogênio e progesterona. Diversas estratégias de terapias alvo foram desenvolvidas para tumores mamários que apresentam aumento da expressão dessas proteínas. Estas terapias incluem pequenas moléculas inibidoras de quinases, tratamentos com anticorpos monoclonais e terapias hormonais. No entanto, esses biomarcadores não podem prever respostas a terapias num grupo de tumores mamários, como por exemplo, os tumores triplo negativos (HORIUCHI,

2012). Assim, mais estudos envolvendo carcinoma mamário, pesquisa de biomarcadores, e terapias alvo são necessários com o intuito de direcionar tratamentos e obterem melhores respostas clínicas nos pacientes.

O painel básico para estratificação em subtipos moleculares, atualmente, deve incluir o *status* hormonal, avaliação da expressão de HER-2 e o índice de proliferação celular. Quando necessário, sobretudo em tumores triplo negativos, pode-se proceder a avaliação de marcadores de células basais, EGFR e Claudina, a fim de se estabelecer melhor estratificação em outros subgrupos mais específicos relacionados a prognóstico e resposta terapêutica.

## 1.6 BIOMARCADORES

Biomarcadores em oncologia buscam informações, com o auxílio de biologia molecular, importantes para a personalização do tratamento. Os biomarcadores de diagnósticos, também conhecidos como preditivos (alvos na intervenção diagnóstica) são identificados através da caracterização de mutações chaves e vias moleculares envolvendo o desenvolvimento tumoral e sua proliferação. Biomarcadores de prognósticos identificam mutações somáticas germinativas, mudanças na metilação de DNA, elevação de níveis de microRNA e célula tumoral circulante no sangue (KALIA, 2015).

No manejo clínico do câncer de mama, a identificação de biomarcadores prognósticos e preditivos de resposta a terapias alvo têm um importante impacto nas decisões e indicações de tratamento, como também na avaliação dos desfechos clínicos, onde várias variáveis biológicas estão sendo estudadas ao longo dos anos (RAVAIOLI *et al.*, 1998).

Os pacientes tratados com quimioterapia são submetidos a severas toxicidades no tratamento, as doses de terapia anticancerígena são muitas vezes perto ou até mesmo sobrepõem-se as doses tóxicas. As taxas de respostas clínicas a estas terapias são inferiores a de algumas doenças, por esses motivos se faz importante a identificação da população de doentes que serão ou não, susceptíveis a determinada terapia para o câncer. Para enfrentar este desafio, vários biomarcadores estão sendo estudados na atualidade. O objetivo do desenvolvimento de biomarcadores serve para determinar as vias de predição da eficácia dos agentes moléculas-alvo, incluindo taxas de respostas, de progressão, de tempo livre de doença e da sobrevida global (SAIJO, 2012).

A neoplasia maligna mamária representa um grupo heterogêneo de lesões em termos de apresentações clínicas, achado anatomopatológico e desfechos, refletindo sua complexidade molecular e diversidade biológica. A classificação histopatológica clássica não capta

completamente todos os cursos clínicos da doença. O tipo histológico, grau e tamanho do tumor, comprometimento dos linfonodos, *status* de receptores de estrogênio e progesterona e do gene *HER-2*, todos estes achados influenciam o prognóstico e a resposta terapêutica. As maiores diferenças moleculares clínicas são observadas entre os tumores receptores de estrogênio positivos e negativos (IWAMOTO, 2011).

A ASCO desenvolveu diretrizes para o auxílio de oncologistas e outros especialistas para o uso apropriado de biomarcadores no auxílio da decisão na aplicação de terapias sistêmicas adjuvantes em estágios iniciais de câncer de mama invasivo. Neste perfil de pacientes onde o tumor está em estágios iniciais e se tem o conhecimento do *status* dos receptores hormonais e de *HER-2* alguns painéis genéticos tem tido uma aplicabilidade importante nas decisões da terapia a ser aplicada. O oncotype DX, Mammaprint, PAM50, Mammostrat, Breast Cancer Index são exemplos de testes genéticos aplicados em pacientes receptores hormonais positivo e *HER-2* negativo, demonstrando que esses seriam os biomarcadores comprovadamente importantes na decisão terapêutica em câncer de mama (HARRIS *et al.*, 2016).

O perfil da expressão gênica por microarray nos deu um panorama da complexidade e heterogeneidade do câncer de mama, e pode ser usado para fornecer informações prognósticas e na avaliação clínica. Em um estudo comparativo onde um painel de 50 genes e sua expressão, em amostras de câncer de mama foram pesquisados com o objetivo de mensurar a utilidade desses subtipos intrínsecos sozinhos, ou como preditor de recidiva da doença em dois grupos: um de pacientes que não receberam quimioterapia adjuvante e outro grupo de pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante com esquema FAC + paclitaxel (PARKER *et al.*, 2009). Cada vez mais novos estudos tem analisado interações entre subtipos intrínsecos de câncer de mama, prognóstico, alterações genéticas e resposta a drogas. Uma importante descoberta desta análise é que todos os subtipos intrínsecos estão presentes e com significância clínica para prever resultados em coortes de pacientes diagnosticados com tumores com RE positivos ou RE negativos. Os subtipos *HER-2* não mostraram significância em prever desfecho clínico, no entanto houve uma clara separação nas curvas entre os tumores enriquecidos com *HER-2* (pior prognóstico) com os luminais (melhor prognóstico). Em resumo os subtipos de risco e preditores intrínsecos baseados no conjunto de genes PAM50 adicionou valor prognóstico e preditivo para o estadiamento patológico, grau histológico e marcadores moleculares clínicos (PARKER *et al.*, 2009).

Devido à heterogeneidade biológica, apenas uma parte de pacientes com características particulares de malignidade, se beneficiam com um tratamento específico. Assim, as taxas de respostas a pacientes com diferentes tipos de cânceres avançados variam de 10% a mais de

90%. Estas terapias específicas são chamadas de “terapias alvo” e têm eficácia em uma minoria de pacientes. A capacidade de identificar prospectivamente pacientes susceptível de responder a um tratamento específico é de grande valor clínico (DUFFY, O’DONOVAN; CROWN, 2011).

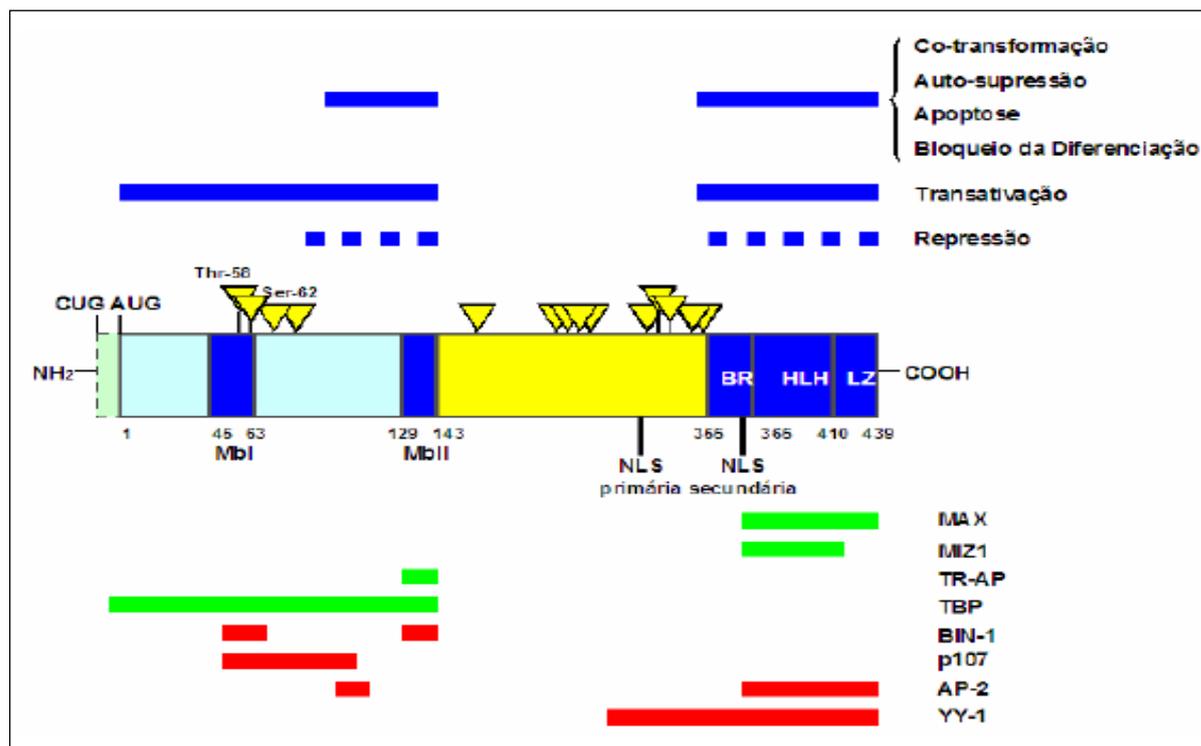
### 1.6.1 Gene *MYC*

O gene *MYC* localiza-se na região cromossômica 8q24, estende-se por 5359 pares de bases nucleotídicas e é constituído por três éxons e codifica uma fosfoproteína nuclear que age como fator de transcrição (Entrez Gene, 2014; TU *et al.*, 2014). A sua transcrição é controlada por quatro promotores. Os dois maiores promotores, P1 e P2 contribuem em 75%-90% e 10%-25%, respectivamente, para a formação de mRNAs citoplasmáticos de *MYC* (STEWART; BELLVE *et al.*, 1984). Enquanto que P3 contribui em apenas 5% (RAY, ROBERT-LÉZNÉS, 1989). O quarto promotor P0 possui atividade similar, mas somente está presente no gene *MYC* de humanos (BENTLEY, GROUDINE, 1988).

Em neoplasias humanas, a amplificação/superexpressão de *MYC* é atribuída à sua capacidade de amplificação gênica e às translocações dos cromossomos (TANSEY, 2014).

A estrutura do *MYC* contém duas sequências de localização nuclear (NLS) e domínios estruturais que caracterizam a proteína como um fator de transcrição. Os primeiros 143 aminoácidos da porção N-terminal da proteína *MYC* compreendem o domínio de transativação (TAD), e contêm regiões chamadas *MYC* boxes (MB) I e II (PELENGARIS KHAN; EVAN, 2002).

A porção terminal contempla três importantes domínios: a região básica, que está implicada no reconhecimento específico da sequência do DNA; hélice-alça-hélice; e o zipper de leucina, estas duas últimas responsáveis pela formação de heterodímeros específicos entre a proteína *MYC* e seus ligantes. Esta estrutura é comum às três isoformas (PELENGARIS; KHAN; EVAN, 2002) (Fig. 1.8).



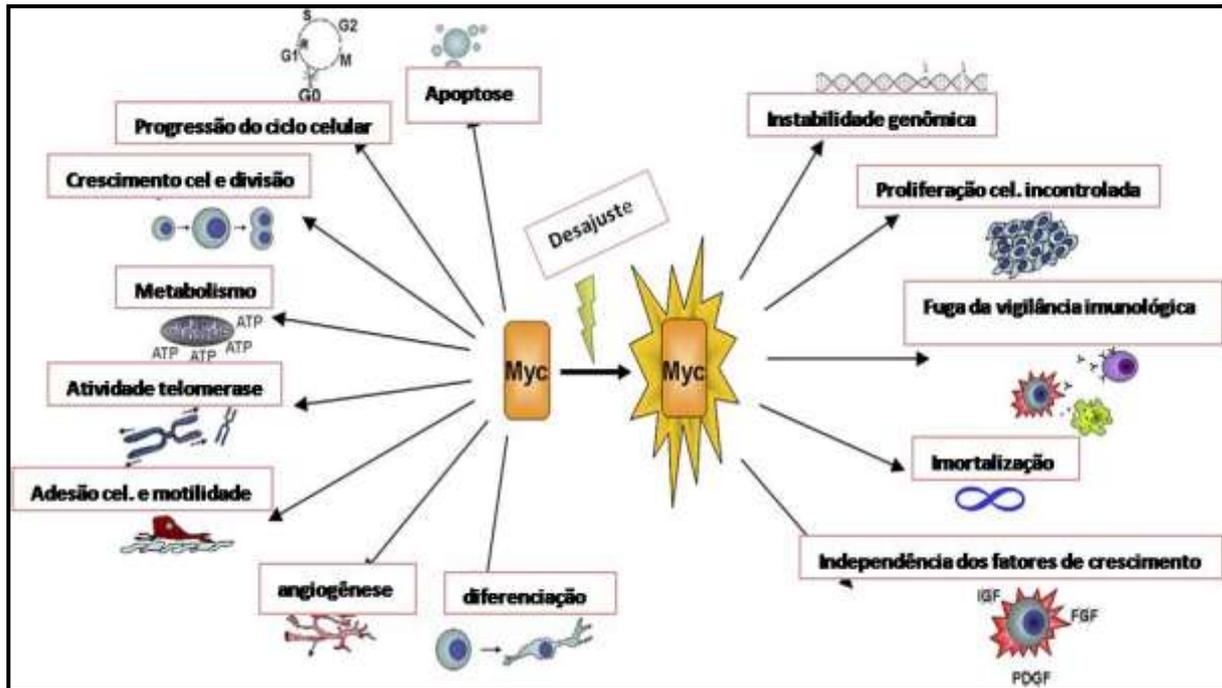
**Figura 1.8** - Estrutura, Funções e Ligantes da Proteína MYC.

**Nota:** Os maiores domínios funcionais e os sítios de fosforilação estão representados na estrutura protéica central (cores azuis e amarelas). As regiões responsáveis pelas atividades biológicas são indicadas acima da estrutura protéica e as envolvidas na ligação com outras proteínas são enumeradas logo abaixo. A faixa descontínua (azul) indica os domínios relacionados à repressão transcricional, ainda não completamente definidos. Exemplos de proteínas ligantes que promovem a função da proteína MYC são mostrados abaixo (cor verde e vermelha). BR, região básica; HLH, hélice-loop-hélice; LZ, zipper de leucina; MBI, MYC Box I; MYC BOX II, NLS, seqüência de localização nuclear.

**Fonte:** Adaptado de Faria e Rabenhorst, 2006.

Muitas evidências indicam que a proteína MYC funciona como fator de transcrição, formando complexos com DNA celular em altas concentrações, porém essa interação não tem significância fisiológica, requerendo sua interação com outra proteína, denominada MAX, que contém estrutura semelhante a da MYC, com hélice-alça-hélice e zíper de leucina sendo considerada como um par na dimerização. Os heterodímeros MYC/MAX ligam-se a regiões específicas de DNA que contenham a seqüência CACGTG, chamado de *E-box* (RYAN; BIRNIE, 1996).

O gene MYC controla a transcrição de aproximadamente 15% dos genes de vários organismos, incluindo o genoma humano (FERNANDEZ *et al.*, 2003). Os genes alvos de MYC geralmente são genes envolvidos na progressão do ciclo celular, proliferação, metabolismo, adesão, diferenciação e apoptose (SINGHI *et al.*, 2012) (Fig. 1.9).



**Figura 1.9** - Processo Celular Controlado pelo *MYC* Durante Condições Normais e Durante a Gênese Tumoral.

**Nota:** *MYC* é um regulador de muitas atividades biológicas incluindo crescimento celular e divisão; progressão do ciclo celular; apoptose; diferenciação celular; metabolismo celular; angiogênese; adesão celular e motilidade. Desajuste do *MYC* pode resultar em apoptose, instabilidade genômica, proliferação celular incontrolada, fuga da vigilância imunológica, independência do fator de crescimento, e imortalidade.

**Fonte:** Adaptado de Henriksson e Vita, 2006.

*MYC* está desregulado em muitos cânceres humanos. A ativação ectópica deste gene em muitos tecidos engaja e mantém diversos programas intracelulares (crescimento celular, progressão do ciclo celular, metabolismo biossintético, ribogênese e translação) e programas extracelulares (recrutamento de células inflamatórias, remodelação de estroma, liberação de citocinas, invasão e angiogênese) (MEYER; PENN, 2008).

O grau de envolvimento do *MYC* na tumorigênese do câncer de mama tem sido muito debatido. Vários estudos examinaram a amplificação do gene *MYC* e o aumento da expressão de sua proteína nos diversos tipos de câncer de mama. No entanto, os dados foram conflitantes, em que as frequências entre os diferentes relatos variam de 50-100% e de 1- 94% no aumento da proteína e amplificação deste gene, respectivamente. A fonte desta variação pode ser devido a inconsistências nas pesquisas e nos reagentes usados para a sua detecção (SINGHI *et al.*, 2012).

Em uma meta-análise realizada por Deming (2000), observou-se uma ampla variação entre a amplificação do gene *MYC* no câncer mamário. Nesta revisão, o gene *MYC* se

encontraria amplificado entre 1-94% (média de 15,5%) das biópsias de neoplasia mamária. Esta heterogeneidade pode ser atribuída à baixa sensibilidade dos métodos de pesquisa usados em alguns estudos, ao grau tumoral estudado e/ou ao pequeno número de casos avaliados em muitas análises (LIAO; DICKSON, 2000).

No câncer de mama, a amplificação do gene *MYC* pode estar correlacionada, positivamente ou negativamente, com alterações de outros genes. A região 8q24, também pode apresentar nas suas sequências o gene *HER-2*, através de um evento de translocação, embora a frequência da co-localização destes dois genes e sua amplificação em comum, não seja um evento frequente descrito na literatura. Poucos estudos relatam que a amplificação dos genes *MYC* e *HER-2* apresentam uma correlação positiva e ocorrência simultânea em certas biópsias de câncer mamário (LIAO; DICKSON, 2000; SCHLOTTER *et al.*, 2003).

O gene *MYC* tem um papel importante na carcinogênese, e sua amplificação pode estar associada com a progressão do carcinoma *in situ* para o estágio invasivo do tumor mamário, com biologia tumoral desfavorável, resultando em carcinomas com pior prognóstico. Segundo estudo realizado por Corzo *et al.* (2006), a amplificação do *MYC* foi encontrada apenas em tumores mamários invasivos, e não em espécimes benignas ou lesões pré-invasivas. A amplificação deste gene poderia refletir um avanço na progressão tumoral, podendo ser um método citológico usado para diferenciar lesões pré-invasivas das realmente invasivas em casos de difícil diagnóstico (CORZO *et al.*, 2006).

A amplificação/superexpressão do *MYC* apresenta correlação com o tipo histológico ou grupo molecular, estando presente em 70% dos carcinomas ductais, 10% dos lobulares e 1% dos medulares (EFSTRATIADIS; SZABOLCS; KLINAKIS, 2007).

Parâmetros bem estabelecidos da doença mamária mostram que a amplificação/superexpressão do *MYC* pode ser um forte fator preditivo da progressão da doença. Nos casos em que o *status* axilar encontra-se negativo e os receptores de estrogênio e progesterona positivos e há uma ausência na amplificação do gene *MYC*, estes pacientes podem apresentar até 0% de taxa de recorrência. Análises multivariadas indicaram que a amplificação/superexpressão do *MYC* é um indicador de prognóstico, independente de recorrência precoce, mais eficaz que o *status* de receptor de estrogênio e o tamanho tumoral (NESBIT; TERSAK; PROCHOWNIK, 1999).

### **1.6.2 Gene *KRAS***

Os proto-oncogene RAS compõe uma família de genes estruturalmente relacionados e expressos em vários tipos de células normais, que codificam uma pequena família de proteínas

com alto poder transformante. Essa família de proteínas compreende, ao menos 5 subfamílias classificadas estruturalmente em: ras, rho, rab, sarl/arf e ran. A proteína kras possui duas isoformas; a principal com 189 resíduos de aminoácidos, e a forma secundária, que exibe discreta atividade transformante e contém 188 aminoácidos (BOQUETT, FERREIRA, 2010).

As ativações de mutações pontuais em genes que codificam a subfamília *RAS* de proteínas de ligação de GTP contribuem para a formação de uma grande parte de tumores humanos, onde 20% de amostras destes tumores realizam mutações ativadoras nos genes *KRAS*, *NRAS* ou *HRAS* (STECKEL *et al.*, 2012). As proteínas GTP atuam como interruptores moleculares para traduzir sinais extracelulares para o núcleo, onde regulam um conjunto de respostas celulares. A ativação descontrolada de *RAS* é uma das alterações genéticas mais comuns associadas ao câncer em humanos, onde mutações pontuais de genes de *RAS* levam a abolição da proteína de ativação de GTPase dependente da atividade de hidrólise GTP de *RAS* levando a uma proteína *RAS* ativada (KIM, 2013).

A ativação de um oncogene *KRAS* (12q2.1) estimula grande variedade de vias de sinalização, perturbando o equilíbrio entre as diversas vias de sinalização existentes na célula, como também na diferenciação, no crescimento, na sobrevivência, na progressão do ciclo celular, na migração e na alteração do citoesqueleto. E ativações aberrantes da cascata de *KRAS* direcionam as células cancerosas para um fenótipo mais agressivo, e por esta razão o *KRAS* é conhecido como um alvo atrativo para terapias do câncer (KIM, 2013).

Devido a importância da ativação *KRAS* para a seleção de terapias alvos, é crucial que bons métodos sejam desenvolvidos para medir o estado de ativação do *RAS* em tumores. Em decorrência das alterações genéticas nos tumores e a complexidade de mecanismos subjacentes envolvidos na ativação de uma via, o meio mais abrangente para avaliar estas alterações seria o conhecimento das vias de sinalização. E a forma que permite esta leitura mais ampla da atividade das vias de sinalização consiste em identificar perfis de expressão de genes que são indicativos do estado da expressão destes genes (LOBODA *et al.*, 2010).

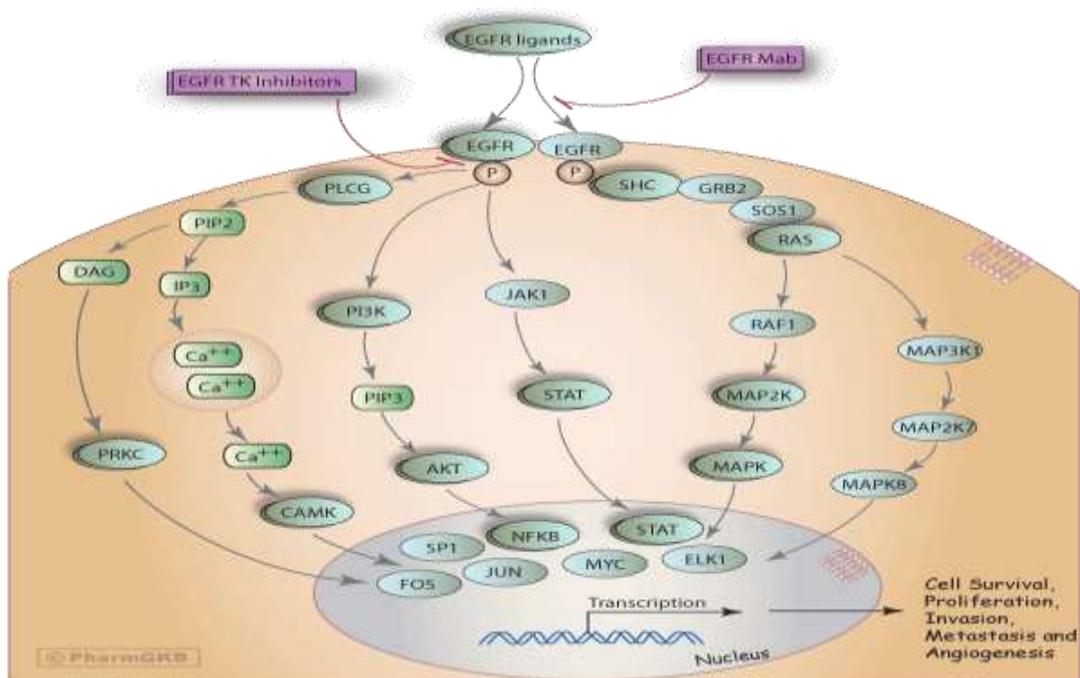
Em um estudo realizado no ano de 2011 foi demonstrado que existe uma variante de *KRAS* enriquecida em câncer de ovário e está mais frequentemente associada com os pacientes de famílias com síndrome de câncer de mama e ovário hereditário; e com base nestas evidências esse mesmo estudo buscou avaliar o papel da variante *KRAS* no risco de câncer de mama e sua biologia tumoral (PARANJAPE *et al.*, 2011).

Modelos experimentais de cânceres humanos realizados em murinos que avaliam a regulação transgênica dos oncogenes mimetizam hipoteticamente as situações de terapias nestes cânceres humanos, para os quais a terapia alvo é altamente eficaz, e que pode ser usada

para bloquear a ação de um ou mais oncogenes. Estes modelos de estudo são indispensáveis para avaliar o efeito bloqueador de dois oncogenes humanos comuns que são o *MYC* e *KRAS*, para os quais existem terapias alvos. Nesta abordagem, a regressão tumoral após a retirada destes oncogenes tem sido observada em vários tipos de tumores como: linfomas, leucemias, insulinomas, pulmão, fígado, osso e tumores mamários (PODSYPANINA *et al.*, 2008).

A presença de mutações na família de oncogenes *RAS* é associada com a falta de respostas as terapias alvo nos carcinomas de pulmão e cólon-retal, e tumores não responsivos com tratamento com agentes anti-EGFR. Alguns trabalhos publicados mostram que a mutação de *KRAS* quando presente, leva a uma condição de maior agressividade tumoral, como também, torna-se refratário ao tratamento quimioterápico e conseqüentemente a um prognóstico desfavorável (PEREIRA *et al.*, 2013; MAGLIACANE *et al.*, 2015, PARK *et al.*, 2015).

Os oncogenes *MYC*, *HER-2* e *KRAS* são elementos chaves na carcinogênese de diferentes tumores humanos, incluindo o câncer de mama, podendo ser usados como biomarcadores. O gene *HER-2*, assim como os receptores hormonais são biomarcadores consolidados no tratamento do câncer de mama. A inclusão dos genes *MYC* e *KRAS* obedece ao fato de suas proteínas sofrerem influência da via de sinalização iniciada por *HER-2* na membrana da célula. Adicionalmente, os receptores hormonais podem regular a proteína *MYC* no núcleo da célula, sendo também um elemento chave nesta via de sinalização (Fig. 1.10).



**Figura 1.10** - Via de Sinalização do Gene *HER-2* na Membrana da Célula.

**Nota:** A via de sinalização controlada pelo gene *HER-2* influenciando os genes *MYC* e *KRAS*

**Fonte:** Gong; Lou, 2016.

## 1.7 QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

Ao longo do século passado, o manejo do câncer mamário foi governado por um paradigma que propunha o uso de cirurgias radicais e a radioterapia como formas de tratamento para esta doença. Entretanto, entre os anos de 1950 a 1960 a quimioterapia (QT) sistêmica, e a terapia hormonal começaram a ser aplicadas nas doenças avançadas da mama (FISHER *et al.*, 1997). Anos depois, já na década de 70, novos paradigmas surgem com a QT adjuvante: um direcionado ao controle locorregional da doença, e outro braço para a eliminação de micrometástases. Neste período, a quimioterapia já se mostrava promissora no controle sistêmico da doença, como também na redução da incidência de recorrência de câncer de mama após cirurgias conservadoras, como a quadrantectomia (FISHER *et al.*, 1997; REDDEN; FUHRMAN, 2013). Com base nessa nova fronteira, surge atual interesse em oferecer esta terapia sistêmica que antes era administrada após o tratamento cirúrgico, agora o será, previamente a cirurgia. Terapia essa conhecida como quimioterapia neoadjuvante, primária ou de indução (FISHER *et al.*, 1997; CLEATOR, PARTON; DOWSETT, 2012).

Apesar de historicamente a QT neoadjuvante ser reservada para pacientes com doença tida inoperável, as condutas atuais no câncer de mama envolvem o tratamento neoadjuvante para pacientes com: câncer de mama inflamatório, doença localmente avançada, e pacientes selecionadas com estágios iniciais da doença. Levando agora a um novo horizonte de tratamento, esta terapia pode beneficiar as pacientes com doenças consideradas operáveis. Essa modalidade terapêutica tornou-se uma poderosa ferramenta, com significância prognóstica individualizada baseada nas respostas clínicas e patológicas do tumor (TESHOME; HUNT, 2014).

A mudança no paradigma do tratamento adjuvante para o neoadjuvante se baseia em observações na cinética tumoral, e na hipótese da presença de micrometástases em estágios iniciais da doença. Estudos em animais realizados por Fisher (1983 apud TESHOME; HUNT, 2014) mostrou que existe uma mudança da cinética tumoral com o aumento da proliferação celular em sítios de metástases após ressecção do tumor primário. Uma preocupação adicional é a resistência à quimioterapia no aumento do crescimento tumoral, sugerindo que a administração desta terapia deve ser feita logo após o diagnóstico da neoplasia mamária.

Na abordagem multidisciplinar do câncer de mama, a administração de quimioterapia neoadjuvante foi inicialmente sustentada em estudos realizados no Hospital MD Anderson, onde pacientes em estágios IIB, IIIA, IIIB e IV regionais da doença, foram tratados com terapia

sistêmica, acompanhado de cirurgia e radioterapia. Este grupo foi comparado com pacientes que historicamente recebiam apenas tratamento cirúrgico e radioterapia. Neste última abordagem, com terapia sistêmica, uma diminuição em 50% no tamanho do tumor (resposta parcial) foi alcançado em 67% dos pacientes e, resposta completa em 17% dos pacientes. As taxas de tempo livre de doença entre 5 a 10 anos foram de 71% (IIB), 40% (IIIA), 33% (IIIB) e 30% (IV) respectivamente (REDDEN; FUHRMAN, 2013). Em uma meta-análise comparando momentos de administração da terapia sistêmica, se prévia ou posterior a cirurgia, não foi observado diferenças estatisticamente significativas na sobrevida global, na progressão da doença e, na recorrência de doenças à distância nos pacientes do estudo (MAURI; PAVLIDIS; IOANNIDIS *et al.*, 2005).

A QT neoadjuvante refere-se à administração de drogas quimioterápicas antes do início do tratamento locorregional, isto é, antes da realização de procedimento cirúrgico ou de radioterapia, terapias estas, que são padrões no manejo de tumores localmente avançados de mama e nos tumores inflamatórios (TEWARI; KRISHNAMURTHY; SHUKLA, 2008).

A quimioterapia neoadjuvante tem como objetivos e/ou vantagens: primeiro, ter a oportunidade de monitorar a resposta tumoral durante o tratamento permitindo mudanças ou descontinuidade do mesmo, caso o tumor não seja responsivo. A mudança no tratamento ainda não foi comprovada como eficaz, porém a toxicidade de um tratamento ineficaz pode ser evitada. Um segundo objetivo é aumentar as taxas de cirurgias conservadoras. Terceiro, a carga de câncer residual é um poderoso marcador prognóstico, mudando o perfil prognóstico de acordo com a resposta do tumor à droga. A quarta vantagem é que nos estudos randomizados com neoadjuvância, marcadores preditivos, biologia tumoral, mecanismos de resistência e novas abordagens terapêuticas podem ser investigadas mais rapidamente e com menor número de pacientes do que os estudos com adjuvância (MAKRIS *et al.*, 1997; AMADORI *et al.*, 2002; PENAULT-LLORCA *et al.*, 2008; GAMPENRIEDER; RINNERTHALER; GREIL, 2013).

Em 1988, teve início um estudo randomizado coordenado pelo NSABP (estudo B-18), um dos primeiros e maiores estudos em neoadjuvância *versus* adjuvância, nas mulheres com câncer de mama operável. Foram randomizadas 1523 mulheres que receberam 4 ciclos de AC (doxorubicina 60 mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup>) previamente ou posteriormente à cirurgia. A finalidade do estudo era inicialmente determinar se a quimioterapia neoadjuvante levaria a um aumento na sobrevida global (SG) e/ou do tempo livre de doença (TLD) e, *a posteriori* avaliar a resposta do tumor primário e dos linfonodos axilares à QT. Nesta randomização não houve diferença na SG ou TLD entre os braços estudados. Entretanto, o braço das pacientes que receberam QT neoadjuvante, apresentou um aumento na incidência de

linfonodos axilares negativos ao exame anatomopatológico pós cirúrgico, como também, nas taxas de cirurgias conservadoras (FISHER *et al.*, 1997).

Um novo ensaio clínico semelhante ao anterior foi realizado pela Organização Europeia (Trial 10902), neste estudo um outro esquema de quimioterapia (fluoracil 600 mg/m<sup>2</sup>, epirrubicina 60 mg/m<sup>2</sup>, ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup>) foi administrado. As respostas observadas foram: 49% das pacientes respondera à QT neoadjuvante, com 6,6 % de resposta clínica completa e 3,7% de resposta patológica completa no grupo estudado. Neste ensaio clínico também não houve aumento na SG e TLD com a neoadjuvância (VAN der HAGE *et al.*, 2001).

Posteriormente um novo ensaio, iniciado em 1995, e que randomizou 2.411 mulheres com câncer de mama operável, e teve como objetivo principal avaliar se a adição de um taxane (docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup>) ao esquema já preconizado naquele momento (AC), teria um impacto no aumento do TLD e na SG. Como objetivos secundários incluía, o efeito no controle locorregional da doença, a resposta patológica completa do tumor e linfonodos axilares, e no aumento das cirurgias conservadoras. Este ensaio clínico também foi em neoadjuvância. O estudo mostrou que a adição desta nova droga levou a um aumento nas taxas de resposta clínica de 86% para 91%, e na resposta patológica de 13% para 26%, e também no número de cirurgias conservadoras. Embora o TLD e SG não tiveram apresentado influência em suas respostas. Entretanto, as pacientes que apresentaram resposta patológica completa continuaram mostrando benefício na sobrevida global (BEAR *et al.*, 2006).

Outras drogas quimioterápicas foram randomizadas em regimes de neoadjuvância para obter melhores taxas de resposta patológica completa. No estudo TOPIC foi avaliada a eficácia de infusão contínua de 5-fluoracil durante 18 semanas e a integração de cisplatina. Este estudo não mostrou ganho nas respostas patológicas, apenas aumento nas taxas de toxicidade, assim como outros estudos como o TOPIC-II investigando epirrubicina mais vincristina comparando ao esquema AC, também sem benefício (SMITH *et al.*, 2004; CHUA *et al.*, 2005).

Por vários anos, antes da descoberta, ou melhor do emprego dos biomarcadores em câncer de mama, os estudos incluíam todos os subtipos tumorais numa análise única de resposta, muitas vezes obtendo respostas contraditórias entre eles, e esses conflitos se devia a heterogeneidade do câncer de mama. Esta heterogeneidade levou a busca de terapias específicas para cada característica tumoral ou subtipo (IWAMOTO *et al.*, 2011).

O estudo NOAH foi desenhado para avaliar a eficácia da QT neoadjuvante baseada em antracíclicos e taxanes associada a uma droga alvo, o Trastuzumab (anticorpo monoclonal recombinante humanizado), seguido de adjuvância com trastuzumab *versus* a administração apenas de QT neoadjuvante, em pacientes com tumores localmente avançados ou inflamatórios

com amplificação do gene *HER-2*. Como resultado se demonstrou o benefício da administração de trastuzumab (iniciando em neoadjuvância e continuando em adjuvância), com melhora nas taxas de respostas clínicas, e quase dobrando as respostas patológicas completas, além de diminuindo o risco de recidiva da doença, progressão ou morte, quando comparados com as pacientes que não receberam a terapia alvo (GIANNI *et al.*, 2010).

Novas terapias alvo são estudadas associadas a terapia neoadjuvante. O Pertuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido a dimerização do domínio de *HER-2*. O trastuzumab e pertuzumab apresentam diferentes sítios de ligação e por isso tem mecanismos complementares de ação. Em vista da melhora substancial nas taxas de RPC entre a combinação de QT neoadjuvante com trastuzumab, um novo estudo foi desenhado (NeoSphere) para comparar os efeitos terapêuticos da combinação de trastuzumab e pertuzumab, com ou sem a associação de neoadjuvância. O estudo foi dividido em quatro braços: grupo A (trastuzumab + docetaxel), grupo B (pertuzumab + trastuzumab + docetaxel), grupo C (pertuzumab + trastuzumab) e grupo D (pertuzumab + docetaxel). As taxas de RPC foram de 29% no grupo A, 45,8% no grupo B, 24% no grupo D e de 16,8% no grupo C. A associação de agentes anti-*HER-2* com a terapia neoadjuvante melhorou as taxas de tumor responsivo (BASELGA *et al.*, 2012).

Nos tempos atuais, ocorreu um aumento do interesse em particular de pesquisadores, nos tumores de mama quinases, também conhecidos como proteínas tirosino quinase 6 (PTK6), tornando-se um alvo terapêutico desejável no que diz respeito a inibição de tirosino quinase, bem como a interrupção da atividade independente de quinase. A atividade desta proteína é significativamente aumentada em tecidos mamários malignos em comparação ao tecido mamário normal, e apresenta uma superexpressão em mais de 80% dos tumores ductais invasivos de mama. Alguns quimioterápicos já são empregados em tumores mamários tanto em forma terapêutica como paliativamente, e temos como exemplos de inibidores de tirosina quinase aplicados em câncer de mama, o Lapatinib, Erlotinib e Gefitinib (HUSSAIN; HARVEY, 2014).

O Lapatinib é um inibidor oral de tirosina quinase, alvo para EGFR e *HER-2* com poderosa ação em pacientes com tumores mamários e, carcinomas metastáticos de mama que superexpressam *HER-2*. Apresentam uma melhora na sobrevida global, quando associados a capecitabine. Desfechos favoráveis também são encontrados na associação desta droga ao paclitaxel ou inibidores da aromatase. Um estudo foi desenhado comparando as taxas de RPC com a administração de QT neoadjuvante associada ao trastuzumab ou ao lapatinib concomitantemente. As taxas de RPC foram significativamente menores com o anticorpo lapatinib demonstrando uma menor capacidade deste inibidor, em bloquear a via do *HER-2* quando comparado com o anticorpo trastuzumab (UNTCH *et al.*, 2012).

O Gefitinib é um inibidor de EGFR que tem uma ação em células mamárias com superexpressão de *HER-2*, provavelmente agindo na redução na fosforilação do heterodímero *HER-2/EGFR*. Esta droga tem ação especialmente em tumores mamários com receptores hormonais positivos, onde as pacientes apresentam resistência ao Tamoxifeno. O Erlotinib tem uma via de ação semelhante ao do Gefitinib, como um inibidor de EGFR. Clinicamente tem indicação em tumores localmente avançados e metastáticos de pequenas células no pulmão, porém só recentemente os seus benefícios em câncer de mama começaram a ser esclarecidos. Esta droga tem algumas indicações em tumores de mama triplo negativos (UENO; ZHANG, 2011; HUSSAIN, HARVEY, 2014).

Em geral 60% a 90% dos pacientes que recebem QT neoadjuvante tem resposta clínica, porém a resposta patológica completa é observada apenas em 3 a 30% dos ensaios clínicos em câncer de mama. E esta discrepância ocorre pois não há um consenso entre eles do que seria uma RPC (resposta no tumor primário e não resposta em linfonodos e vice-versa). Sendo a RPC o fator preditor no desfecho da sobrevida global, cada vez mais se busca este desfecho (TEWARI; KRISHNAMURTHY; SHUKLA, 2008).

Um grande número de substâncias bem conhecidas, assim como novas substâncias estão sendo testadas, neste momento, em fase II e fase III de ensaios clínicos. O objetivo desses estudos é não apenas melhorar as taxas de RPC e SG, como também reduzir a toxicidade e individualizar o tratamento (GAMPENRIEDER; RINNERTHALER; GREIL, 2013).

Uma modalidade de imagem que pudesse ser uma ferramenta de resposta tumoral à QT neoadjuvante teve que ser desenvolvida, e este exame seria benéfico caso mostrasse tumores residuais após o tratamento quimioterápico, ou identificasse as respostas tumorais clínicas completas (LOBBES *et al.*, 2013).

A Ressonância Nuclear Magnética (RNM) foi proposta e tem papel importante na orientação do manejo cirúrgico do câncer de mama através de mensuração de tumor residual após a QT neoadjuvante. Este método apresentou boa sensibilidade, auxiliando na estimativa do tamanho do tumor e sua localização; presença de focos adicionais ou de lesões contralaterais, o que proporciona a decisão cirúrgica, seja para cirurgias conservadoras ou radicais (LOBBES *et al.*, 2013; MARINOVICH, 2013). Esta ferramenta diagnóstica é aplicada com frequência aumentada em dias atuais, por ter uma alta sensibilidade na detecção de tumores mamários, comparado a mamografia e ultrassonografia, como também na habilidade na avaliação de respostas patológicas completas após a terapia neoadjuvante (De LOS SANTOS, 2013).

**Tabela 1.1** - Ensaios clínicos comparando o mesmo regime de quimioterapia pré e pós-operatório

Ensaio Clínico	Fase do estudo (n)	Tumor	Neoadjuvante X adjuvante	Objetivo principal
<b>IBBGS</b>	III (272)	T2 > 3 cm T3 N0-1	3 x EVM + 3x ETV	TC 63% (33% apenas RT, 30% C+RT) versus 0%
<b>Instituit Curie</b>	III (390)	T2 -3, N0 -1	4 x FAC	TC 82 versus 77%
<b>Royal Marsden</b>	III (293)	T0-4, N0-1	4 x 2MT	TC 89 versus 78%
<b>NSABP B-18</b>	III (149)	T1-3 N0-N1	4 x AC	SG – 5a : 80 versus 81% TLD – 5a : 67 versus 67%
<b>EORTC 10902</b>	III (698)	T1c-T4b	4 x FEC	SG – 4a : 82 versus 84%
<b>ABCSG-7</b>	III (423)	T1-3, N0-1 RH- + alto risco RH+	3 x CMF	TRL melhor com adjuvância, sem diferença na SG
<b>ACCOG</b>	III (363)	≥ 3 cm ou T4d	6 x AC versus 6 x A + Doc	RPC 24 versus 21%
<b>Metanálise</b>	IV (2455)	7 ensaios clínicos	Terapia baseada em Antracíclico + Taxane	RPC melhor com Taxane sequencial

**Fonte:** Adaptado de Gampenrieder; Rinnerthaler e Greil, 2013.

## 1.8 RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA (RNM)

A detecção precoce e o diagnóstico do câncer de mama são essenciais no sucesso do tratamento. Exames radiológicos tais como mamografia e ultrassonografia mamária são usados rotineiramente como técnicas de detecção e localização de tumores, porém esses exames são ferramentas com baixa especificidade. A RNM mamária surge como um método de diagnóstico importante, aumentando a detecção do câncer de mama e, favorecendo diagnóstico em situações especiais em lesões da mama como: na avaliação de tumores multifocais e multicêntricos, doença em mama contralateral, nos carcinomas lobulares mamários, detecção de tumores em mamas densas, tumores ocultos, e avaliação de resposta à quimioterapia neoadjuvante (MENEZES *et al.*, 2014).

As cirurgias conservadoras que anteriormente eram indicadas apenas em tumores mamários com estágios iniciais, passaram a ser aplicadas em estágios mais avançados, como os estágios II e III de mama, principalmente após respostas clínicas satisfatórias a neoadjuvância. Em um estudo multicêntrico realizado em oito Centros Nacionais de Câncer nos EUA, observou-se uma tendência no aumento das taxas de cirurgias radicais mamárias e foi levantada a hipótese da associação entre os achados da RNM mamária e sua influência na decisão cirúrgica após o tratamento com QT neoadjuvante. A conclusão mostrou que imagens de tumores residuais ou respostas incompletas pós QT tiveram um impacto neste aumento das taxas de cirurgias radicais. No entanto, alguns parâmetros como: o estadiamento clínico ao diagnóstico; pacientes jovens; e os protocolos de cada instituição, foram mais determinantes na decisão cirúrgica do que os próprios resultados das imagens obtidas pelo método empregado, neste caso, a RNM mamária (McGUIRE *et al.*, 2015).

Apesar da maior sensibilidade deste método de imagem, a RNM realizada previamente a cirurgia pode estar sujeita a erros potenciais. Processo inflamatório reativo do tumor, fibrose e necrose pós QT neoadjuvante podem se apresentar como áreas de reforço em imagens, dificultando a distinção entre o que é achado inflamatório, ou o que é fibrose de tumores residuais. A diminuição do tumor em fragmentos, formando depósitos tumorais pode levar a confusão na avaliação do diâmetro final do tumor. Carcinomas ductais *in situ* em alguns exames são mal visualizados ou podem não ser distinguido do carcinoma invasivo. Outra dificuldade do método são os artefatos de imagem (MARINOVICH, 2013).

As taxas de resposta clínica após QT neoadjuvante variam entre 60% a 80%, e 10% a 20% quando se obtém resposta patológica completa. A identificação precoce da resposta ao tratamento faz-se importante para o planejamento subsequente. Técnicas de RNM mamária

funcional servem para quantificar mudanças na microcirculação tumoral, na densidade celular, hipóxia, metabolismo, e assim se tornar um marcador biológico substituto de predição de resposta à quimioterapia neoadjuvante (O'FLYNN; DESOUZA, 2011).

A relação entre a aparência fenotípica das imagens de RNM do câncer de mama e a respostas à QT neoadjuvante vem sendo bastante pesquisada. Embora exista no geral pouca variação fenotípica, os estudos vem focando a separação entre os tumores de consistência sólidas e unifocais, mais delimitados ao exame; dos tumores multifocais, onde nesses o comportamento é mais difuso, e se valoriza a infiltração tumoral. Pode-se perceber que tumores com massas mais bem definidas e mais compactos apresentam melhor resposta à QT, permitindo maior conservação mamária, demonstrando que a característica fenotípica tem impacto na resposta à QT neoadjuvante. Tumores mamários com massa bem definidas também apresentam maior concordância entre os achados da RNM com os do anatomopatológico, principalmente aqueles que não expressam receptores hormonais. Nos casos em que se apresentam como um tumor difuso percebe-se uma maior discordância entre a RNM e o estudo anatomopatológico (PRICE *et al.*, 2015).

Estudos comparativos entre o fenótipo da RNM e o perfil molecular dos tumores mamários tem detectado uma associação entre tumor triplo negativo e presença de imagem unifocal. Massa multifocais são mais comuns entre tumores *HER-2* positivos. Os tumores com expressão de receptores hormonais não tem uma característica fenotípica bem definida, mas são mais susceptíveis de visualização de realce difuso sem presença de massa tumoral (MUKHTAR *et al.*, 2013).

Até os dias atuais, não há consenso na avaliação precoce da resposta do câncer de mama na terapia neoadjuvante. A palpação, provavelmente é o método mais amplamente utilizado na prática clínica, entretanto é imprecisa para prever resposta patológica e é pouco adequada para a avaliação de tumores pequenos. Biópsia seriada de tumores é um método invasivo e está associada a uma amostragem heterogênea do tumor. Técnicas de imagem são métodos não invasivos, incluindo mamografia, ultrassonografia e RNM convencional, e muitas vezes são utilizadas na prática clínica como ferramentas, solucionando os problemas, já que são métodos não invasivos (CHEN *et al.*, 2012). Existe uma divergência na literatura em relação à avaliação por exame físico e RNM mamária nas respostas a quimioterapia, pois a RNM pode superestimar tumores residuais pós tratamento. De acordo com a revisão de Chen *et al.* (2012), a RNM com realce foi a maneira mais precisa para avaliar tamanho do tumor residual (com realce) de fibrose (sem realce), porém subestimação ou superestimação da doença residual depois de QT neoadjuvante, e os falsos negativos foram também notados neste estudo (CHEN *et al.*, 2012).

Por mais de cinquenta anos, os estudos histopatológicos tem reconhecido o câncer de mama como uma doença heterogenea com variabilidade inter e intra tumoral. Porém, mais recentemente, os avanços nas análises moleculares e sequenciamentos genéticos vem descrevendo a diversidades dos tumores mamários através de combinações de análises de microarray e sequenciamento de DNA de nova geração (BARNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015).

Atualmente, vários biomarcadores clínicos são usados para direcionar o uso de terapias alvos no câncer de mama, incluindo o aumento da expressão de *HER-2*, e a expressão de receptores de estrogênio e progesterona. Várias estratégias de terapias alvo foram desenvolvidas para tumores mamários que apresentam aumento da expressão dessas proteínas. Estas terapias incluem pequenas moléculas inibidoras de quinases, tratamentos com anticorpos monoclonais e terapias hormonais. No entanto, esses biomarcadores não podem prever respostas a terapias num grupo de tumores mamários, como os tumores triplo-negativos (HORIUCHI *et al.*, 2012). Assim, mais estudos envolvendo carcinoma mamário, pesquisa de biomarcadores, e terapias alvo são necessários com o intuito de direcionar tratamentos e obterem melhores respostas clínicas nos pacientes.

O câncer de mama é uma afecção relativamente rara em mulheres jovens, entretando estima-se que 14.000 mulheres abaixo de 40 anos são diagnosticadas anualmente, só nos EUA, ocasionando 3.000 mortes. É responsável pela principal causa de óbito em jovens naquele país. O diagnóstico desta neoplasia vem ampliando suas taxas em mulheres com idade entre 25 a 39 anos. Normalmente essas mulheres desenvolvem tumores com maior agressividade, maior indiferenciação celular, menor expressão de receptores hormonais e, maior expressão de gene *HER-2*, todavia as razões deste comportamento biológico peculiar é pouco compreendida, entretanto, a mutação do gene *BRCA1* pode explicar alguns casos de tumores triplo negativos ou outros achados clinico-patológicos de maior agressividade (FREEDMAN; PARTRIDGE, 2013).

A era da avaliação de risco para o câncer de mama foi introduzida após o desenvolvimento de modelos estatísticos como o modelo de Gail e o de Claus, de maneira que possibilitasse uma melhor identificação de mulheres que portavam um risco aumentado para o desenvolvimento desta doença, e também, com o objetivo de aplicação de estratégias preventivas. O câncer de mama hereditário é responsável por 5 a 10% dos casos ocorridos. Estudos moleculares e de análises de ligação levaram a primeira correlação entre a susceptibilidade genética com o câncer de mama. Os genes pesquisados foram o *BRCA1* e o *BRCA2*, e posteriormente novos estudos revelaram outros genes também associados a maior

risco de desenvolvimento desta neoplasia quando apresentavam mutação genética. Os genes pesquisados foram: *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *ATM*, *PALB2*, *BRIP1* E *CASP8* (NJIAJU; OLOPADE, 2012).

Pelo que foi exposto anteriormente, é importante a investigação genética em pacientes que desenvolvam o câncer mamário em idade jovem (até 40 anos), mesmo que estas mulheres não apresentem histórico familiar de câncer mamário. A investigação genética de genes de risco para câncer de mama tem como objetivo orientar a elaboração de terapia para essas mulheres e aconselhamento de seus familiares próximos. de elucidar se esta mutação, quando presente, influenciaria o papel dos biomarcadores que classificam o câncer de mama, assim como nos diversos subgrupos moleculares nos casos de câncer hereditário.

Toda essa heterogeneidade do câncer de mama, faz com que cada vez mais novas pesquisas sejam necessárias para individualizar o comportamento biológico do tumor, e auxiliar na estratégia terapêutica adequada. Esta tese foi desenhada com a proposta de avaliar a influencia dos biomarcadores e dos achados clínico-patológicos de câncer de mama localmente avançado na resposta clínica, como também na resposta patológica do tumor frente ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, com regime contendo antracíclicos e taxanes. E avaliar se a presença de mutações genéticas em genes de risco para o câncer de mama influenciaria o papel dos biomarcadores do câncer de mama, e a resposta a terapia aplicada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das características clínicas, patológicas e moleculares de pacientes com carcinoma mamário localmente avançado, na resposta clínica e patológica ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, com uso de antracíclicos e ciclofosfamida (AC) e com a adição de taxanes (AC + T).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS NO TUMOR

1. Investigar o valor preditivo dos biomarcadores *C-MYC*, *HER-2*, *KRAS* e receptores de estrogênio e progesterona através de sua expressão protéica e amplificação gênica em pacientes com carcinoma mamário localmente avançado, na resposta clínica e patológica ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, com uso de antracíclicos e ciclofosfamida (AC) e com adição de taxane;
2. Investigar o número de cópias dos gene *HER-2* e *C-MYC*, como também os centrômeros dos cromossomos 17 e 8, em pacientes com carcinoma mamário localmente avançado, submetidas aos esquemas de quimioterapia neoadjuvante com uso de antracíclicos e ciclofosfamida (AC) e com adição de taxane;
3. Investigar o *status* da mutação do gene *KRAS* em pacientes com carcinoma mamário localmente avançado, na resposta clínica e patológica ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, com uso de antracíclicos e ciclofosfamida (AC) e com adição de taxane.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS NA PACIENTE

4. Correlacionar fatores sóciodemográficos, histórico hormonal e reprodutivo, fatores de risco e características anatomopatológicas, das pacientes com carcinoma mamário localmente avançado, com a resposta clínica e patológica ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, com uso de antracíclicos e ciclofosfamida (AC) e com adição de taxane;
5. Investigar painel genético das pacientes incluídas no trabalho, que tiveram o diagnóstico de câncer de mama localmente avançado em idade jovem (até 40 anos)

e relacionar os resultados com a resposta clínica e patológica ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, com uso de antracíclicos e ciclofosfamida (AC) e com adição de taxane.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Esta tese foi desenvolvida em duas etapas:

- Na primeira etapa foi realizado uma avaliação do efeito das características clínico-patológicas e moleculares na resposta à quimioterapia neoadjuvante, com o esquema de Adriamicina e Ciclofosfamida (AC), em pacientes com carcinoma mamário, tratadas no Hospital Ophir Loyola, no período de 2006 a 2011;
- Na segunda etapa foi realizado uma avaliação do efeito das características clínico-patológicas e moleculares na resposta à quimioterapia neoadjuvante, com o esquema de Adriamicina e Ciclofosfamida (AC) e adição de Taxane (AC + T), em pacientes com carcinoma mamário, tratadas no Hospital Ophir Loyola, no período de 2012 a 2015.

#### **3.1 FASE RETROSPECTIVA- ETAPA I**

Para uma melhor avaliação do efeito das características clínico-patológicas e moleculares na resposta à quimioterapia neoadjuvante no carcinoma mamário localmente avançado, em pacientes tratadas no Hospital Ophir Loyola, no período de 2006 a 2011, foi elaborado em estudo retrospectivo observacional de base hospitalar.

##### **3.1.1 População do estudo**

Na primeira fase do estudo (estudo retrospectivo), foram selecionados 194 prontuários para análise, destes 57 foram excluídos por não apresentarem todas as informações necessárias para o estudo, como: medidas do tumor antes e após a quimioterapia, grau tumoral, comprometimento de linfonodos. Restaram 137 prontuários, porém 7 pacientes não completaram o esquema de quimioterapia neoadjuvante, 10 apresentaram metástase à distância após o término dos exames de estadiamento e 4 pacientes não apresentavam em seu prontuário informações sobre o resultado da análise do perfil molecular no produto da biópsia antes da realização da quimioterapia. Ao final, restaram 116 pacientes que foram incluídas no trabalho.

Na primeira fase do estudo, foram então selecionadas 116 pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma invasivo mamário com Estadiamento clínico III (IIIa, IIIb ou IIIc) e que foram tratadas no Hospital Ophir Loyola, hospital de referência oncológica da cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil, no período de 2006 a 2011.

As pacientes foram orientadas sobre o estudo e aquelas que aceitaram participar do mesmo, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram incluídas. (Apêndice A). Aquelas pacientes que já haviam ido à óbito no início da pesquisa foram incluídas, seguindo as orientações do Comitê de Ética do hospital.

Seguindo o protocolo de estadiamento tumoral do serviço, exames de imagens, como: Tomografia computadorizada (TC) de abdome total, TC de tórax e Cintilografia óssea foram realizados para afastar possíveis metástases à distância. Exames laboratoriais e ecocardiograma foram realizados previamente ao início do tratamento de quimioterápico, com a finalidade de avaliação clínica e da função cardíaca.

Os critérios de exclusão foram: gestantes, lactantes e cardiopatas ou outra comorbidade que contra indicasse o esquema quimioterápico preconizado.

A confirmação anatomopatológica foi realizada através da análise de amostra tumoral obtida por uma biópsia incisional do tumor, e o resultado, confirmado por dois médicos patologistas. As pacientes que eram encaminhadas ao hospital, com biópsias prévias, realizadas em outros serviços, os blocos de parafina dessas biópsias eram solicitados para revisão de lâmina e novo estudo anatomopatológico era realizado para confirmação do resultado.

### **3.1.2 Resposta clínica à quimioterapia – Adriamicina e Ciclofosfamida**

O tratamento quimioterápico neoadjuvante administrado consistiu de quatro (04) ciclos de uma associação de Adriamicina (60 mg/m<sup>2</sup> de área corpórea) com a Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup> de área corpórea), esquema esse conhecido como AC e administrado em intervalos de 21 dias obedecendo ao protocolo do Serviço de Oncologia do Hospital Ophir Loyola, de acordo com ensaios clínicos relatados na literatura (FISHER *et al.*, 1997, VON MINCKWITZ *et al.*, 2005).

A resposta clínica ao tratamento foi assim classificada: a) resposta clínica completa (RCC) quando houve o desaparecimento completo do tumor; b) resposta clínica parcial (RCP) quando houve redução de  $\geq 50\%$  no tamanho do tumor; c) sem resposta clínica (SR) quando foi observado uma redução  $<$  que 50% no tamanho do tumor; d) progressão (PRO) quando foi observado aumento  $\geq 25\%$  no tamanho do tumor ou aparecimento de uma nova lesão.

Os tumores foram considerados como responsivos ao esquema quimioterápico quando apresentaram resposta clínica completa ou parcial; e não responsivos, quando não houve resposta clínica do tumor ou houve progressão no tamanho tumoral.

O tamanho do tumor mamário era baseado em medidas bidimensionais (súpero-inferior e látero-lateral) com o auxílio de um paquímetro antes da quimioetapia e entre 3 a 5 semanas após o término do último ciclo de quimioterapia.

### 3.1.3 Seleção do bloco de parafina

As amostras fixadas em formol e incluídas em parafina foram utilizadas para a rotina diagnóstica, incluindo a análise anatomopatológica do tumor por Hematoxilina e Eosina (HE), e o perfil imunohistoquímico com avaliação da expressão de receptor de estrogênio e progesterona, *HER-2*, e *Ki-67* e completado o estudo com hibridização *in situ* por fluorescência nos casos de *HER-2* IHC 2+. Estas amostras foram processadas no laboratório de anatomia patológica do Hospital Ophir Loyola e Laboratório de imunohistoquímica da Universidade Federal do Pará (Hospital Universitário João de Barros Barreto).

Foi feita uma leitura microscópica das lâminas com cortes histológicos corados pela Hematoxilina-Eosina, para escolher a amostra, contendo tumor, para os procedimentos de imunohistoquímica (IHC), hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e biologia molecular.

Os blocos de parafina, com materiais processados foram cortados em micrótomos rotativos, onde foram obtidos cortes histológicos de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de espessura, utilizando-se navalhas descartáveis próprias para este fim. As fitas de parafina obtidas no processo de corte pela microtomia foram cuidadosamente colocadas em banho maria histológico e os cortes depositados em lâminas silanizadas.

### 3.1.4 Imunohistoquímica

–**Recuperação Antigênica** - As novas secções de 3  $\mu\text{m}$  foram submetidas ao pré-tratamento, tido como três em um, pois possibilita, a desparafinização, re-hidratação e recuperação do epítipo induzida por calor no equipamento PT Link (DAKO®).

–**Bloqueio da Peroxidase Endógena** - Após a recuperação antigênica, os cortes histológicos foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por 5 minutos (DAKO®).

–**Incubação com o Anticorpo Primário** - Foi demarcado o corte com o uso da *DakoPen*, (Dako®), e em seguida colocado sobre cada lâmina o anticorpo primário específico *HER-2*, RE, RP e *Ki-67* (-DAKO®) diluídos em *Antibody Diluent with Background Reducing Components* (DAKO®). O tempo de incubação foi de 20 minutos em temperatura ambiente.

–**Incubação com o Anticorpo Secundário e Reação do Conjugado** - Para o procedimento técnico de imunohistoquímica foi utilizado o Kit Envision™ Flex Dako, cujo polímero à base de Dextrano é associado a várias moléculas de peroxidase.

–**Revelação e Montagem** - A revelação da reação foi feita por solução substrato-cromogênica (Diaminobenzidina DAB 60 mg%), durante 5 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A contra-coloração foi Hematoxilina (DAKO®) e as lâminas foram montadas com lamínulas e Bálsamo do Canadá, para leitura em microscopia óptica comum.

- **CrITÉrios para interpretação da imunocoloração para receptores hormonais de estrogênio e progesterona** - De acordo com o consenso da ASCO e Colégio Americano de Patologistas (CAP) de 2010, os receptores de estrogênio e de progesterona devem ser considerados positivos quando há expressão nuclear em  $\geq 1\%$  das células neoplásicas, independentemente da intensidade da imunocoloração. Quando não há expressão nuclear ou a expressão nuclear é observada em  $< 1\%$  das células neoplásicas, o resultado deve ser considerado negativo, independentemente da intensidade da imunocoloração (HAMMOND; HAYES; DOWSETT, 2010).

### Quadro 3.1 - Critérios para interpretação da imunocoloração para *HER-2*

Padrão de Coloração	Escore	Conclusão
Ausência de imunocoloração de membrana citoplasmática ou imunocoloração de membrana incompleta e fraca/difícilmente perceptível em $\leq 10\%$ das células tumorais.	Escore 0	Negativo
Imunocoloração de membrana incompleta que é fraca/difícilmente perceptível em $> 10\%$ das células tumorais.	Escore 1 +	Negativa
Imunocoloração de membrana circunferencial que é incompleta e/ou fraca/moderada em $> 10\%$ das células tumorais ou imunocoloração circunferencial completa e intensa em $\leq 10\%$ das células tumorais.	Escore 2 +	Duvidoso/Inconclusivo Esse resultado indica a necessidade de confirmação por FISH ou CISH
Imunocoloração de membrana circunferencial completa e intensa em $> 10\%$ das células tumorais	Escore 3+	Positivo

Fonte: Wolff *et al.*, 2013.

A pesquisa imunohistoquímica da oncoproteína *HER-2* foi realizada utilizando-se o anticorpo monoclonal de coelho SP3 (Dako®).

Para a interpretação de *MYC* foram considerados positivos os casos com imunocoloração  $> 10\%$ , nas células neoplásicas. Para o Ki-67 foram considerados positivos os casos com imunocoloração e foram estabelecidos seus percentuais de positividade.

### 3.1.5 Hibridação *in situ* fluorescente

Neste trabalho, foi utilizada sonda *dual-color* diretamente marcada para a região alfa-satélite do cromossomo 8 (8q11) e região do gene *MYC* (8q24) (Dako A/S, Denmark) e ERBB2 FISH PharmDX™ Kit para avaliar a amplificação do gene *MYC* e *HER-2*, respectivamente. O procedimento teve os seguintes passos:

a) **Pré-tratamento das lâminas** – as lâminas foram colocadas em solução de 2xSSC (pH7.0) a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram transferidas para uma bateria de três boréis com etanol (70%, 80% e 95% respectivamente) para desidratação, por dois minutos em cada borel, em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram submetidas a uma solução de 70% formamida/2xSSC (pH 7,0) a 70°C durante 2 minutos, para a desnaturação do DNA e novamente transferidas para uma série de desidratação em etanol: 70%, 80% e 95% por dois minutos em cada a -20°C, para impedir o re-anelamento das fitas de DNA. Após esse procedimento, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C para a secagem.

b) **Preparo da sonda e incubação** – uma alíquota de 10 µL da sonda foi aplicada na lâmina, coberta com lamínula e selada com cola especial. A amostra (gotejada em lâmina) e a sonda foram desnaturadas em placa quente a 80°C por 2 minutos. A incubação ocorreu em câmara úmida e escura por 16 horas a 37°C.

c) **Lavagem pós-hibridação** – após o período de incubação, a lamínula foi removida e as lâminas foram lavadas em solução 0,4xSSC por cinco minutos a 72°C. Em seguida, imersas em solução 1xPBD por cinco minutos à temperatura ambiente.

d) **Contra-coloração** – sobre a lâmina foram aplicados 10 µL de DAPI/*antifade* (concentração final de 0,02 µg/ml). Em seguida, cobriu-se a lâmina com lamínula e foi mantida a 4°C em caixa de lâmina fosca por aproximadamente 1 hora antes da análise.

### 3.1.6 Análise citogenética molecular

A análise citogenética molecular foi realizada em microscópio de fluorescência ZEISS AXIOPHOT e OLYMPUS BX41, ambos com filtro triplo DAPI/FITC/TRICT. Os sistemas de captura e análise de imagens utilizadas foram *Isis* e *Applied Spectral Imaging*, respectivamente.

O estudo somente foi realizado em lâminas de boa qualidade e com hibridação *in situ* superior a 70% (TAYLOR *et al.*, 1994). Para cada amostra, foram analisados 60 células tumorais. Para detecção da amplificação do gene *HER-2* as taxas de sinalização do cromossomo 17 (CEP17) foram calculadas de acordo com o padrão estabelecido. Pacientes foram classificados dependendo do *status* do gene *HER-2*, onde: amplificação positiva quando a razão

$HER2/CEP17 \geq 2,2$ ; a amplificação foi considerada negativa quando a razão foi  $< 1,8$  e duvidosa quando a razão ficou entre  $<1,8$  a  $<2,2$  (WOLFF *et al.*, 2013).

A amplificação de *MYC* não tem um padrão estabelecido publicado na literatura, então foram determinados pontos de corte como critérios prévios: 1- a taxa de sinais de *MYC* no cromossomo 8 (CEP8) $>2.2$  foi aplicada para detecção da amplificação de *HER-2*; 2-  $MYC/CEP8 \geq 1.3$  ou  $MYC/CEP8 < 1.3$  com polissomia de 8 (3 ou mais cópias de CEP8); 3-  $>5$  cópias *MYC*/núcleo (alto ganho de *MYC*); 4-  $\geq 2.5$  *MYC* cópias/núcleo, no qual inclui baixo ganho de *MYC*.

As amostras foram analisadas seguindo as recomendações da Associação Americana de Oncologia. Como controle negativo foi utilizado linfócitos do sangue periférico de um indivíduo hígido.

### **3.1.7 Análise da mutação no gene *KRAS***

A purificação de DNA foi feita através de MagMAX™ FFPE Kit para isolar DNA (Life Technologies, USA). O ponto da mutação do códon 12 foi avaliado pela técnica de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP-PCR) (DOBRYZCKA *et al.*, 2009). O produto do PCR foi digerido com endonuclease *BstUI*, e o produto dessa digestão foi submetido à análise por eletroforese com gel de poliacrilamina com SYBR® Safe DNA GEL Stain (Life Technologies, USA) e visualizado usando luz azul.

O tipo mutante (produção de PCR não restrita) foi de 189bp, enquanto o produtos dos tipos selvagens foram de 160 bp. O produto de PCR mutado de *KRAS* foi sequenciado para confirmação da mutação usando um ABI Prism® 377 sequenciador de DNA (Life Technologies, USA).

Um produto de um tipo selvagem de linfócitos periféricos sanguíneos de um indivíduo saudável e, em amostra de câncer colo-retal com mutações do códon 12 foram usadas com controles negativos e positivos, respectivamente. Os controles foram incluídos em todos os experimentos. Todas as reações foram realizadas em duplicado.

### **3.1.8 Análise estatística**

O teste de Cohen Kappa ( $\kappa$ ) foi usado na avaliação de concordância entre o *status* de *HER-2* pelas técnicas de análise pela imunohistoquímica e FISH. Estas taxas foram calculadas considerando casos negativos, escores 0 a 1+ e sem amplificação; e positivos nos casos de

escores 3+ de amplificação. Pacientes com escores ambíguo nos resultados de IHC ou FISH foram excluídas. A concordância foi acessada pela equação de Fleiss, na qual caracteriza valores de k acima de 0.75, como excelente; 0.40 a 0.75, como bom; e abaixo de 0.40 é considerado resultado ruim.

Nas análises remanescentes, amostras com *HER-2/cep17*>2.2 foi classificada como presença de amplificação de *HER-2* e com escores de 2+ e 3+ com expressão gênica positiva para *HER-2*.

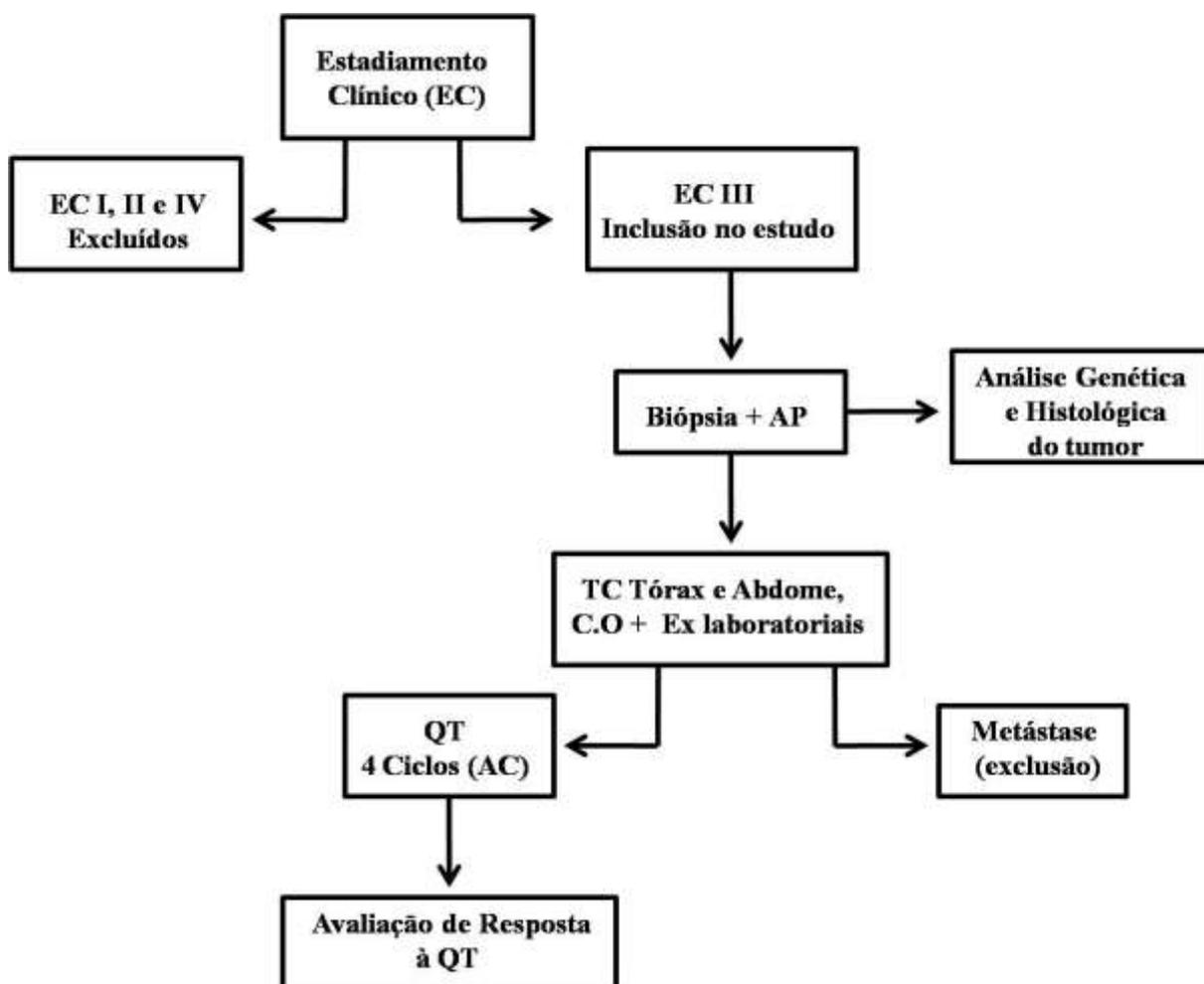
A regressão logística foi usada para avaliar a relação entre a imunorreatividade da proteína, a amplificação gênica ou mutação, e achados clínicos-patológicos. Os resultados de IHC, FISH ou RFLP-PCR, assim como os fenótipos moleculares, foram considerados variáveis independentes.

A idade das pacientes não foi adicionada como uma co-variável, onde a idade não variava entre os grupos (Teste T *Student*).

A regressão logística multivariada foi usada para identificar variáveis que poderiam ajudar na predição de resposta a resistência à quimioterapia e identificar os fatores de risco em tumores grau histológico 3. A idade foi adicionada como uma variável independente na análise multivariada.

Em todas as análises, o p valor abaixo de 0.05 foi considerado significativo. O *odds ratio* com 95% de intervalo de confiança foi mostrado.

**Fluxograma 3.1 – Fase retrospectiva do estudo**



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

### 3.2 FASE PROSPECTIVA- ETAPA II

Para avaliar o efeito das características clínico-patológicas e moleculares na resposta à quimioterapia neoadjuvante (esquema com Adriamicina e Ciclofosfamida + Taxane) no carcinoma mamário localmente avançado em pacientes tratadas no Hospital Ophir Loyola, no período de 2012 a 2015 foi elaborado em estudo prospectivo observacional de base hospitalar.

#### 3.2.1 População do estudo

Nesta fase foram selecionadas as pacientes que apresentavam carcinoma localmente avançados. Das pacientes selecionadas, quatro apresentaram metástases após os exames de estadiamento, uma não completou o exame de RNM mamária, e duas pacientes abandonaram

o tratamento não completando o esquema quimioterápico preconizado. Restando ao final 52 pacientes.

Na segunda fase do estudo, foram incluídas 52 pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma invasivo mamário com Estadiamento clínico III e que foram tratadas no Hospital Ophir Loyola, hospital de referência oncológica da cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil, no período de 2012 a 2015.

As pacientes foram orientadas sobre o estudo e aquelas que aceitaram participar do mesmo, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram incluídas. (Apêndice A).

Seguindo o protocolo de estadiamento tumoral do serviço, exames de imagens, como: tomografia computadorizada (TC) de abdome total, TC de tórax e cintilografia óssea foram realizados para afastar possíveis metástases a distância. Exames laboratoriais e ecocardiograma foram realizados previamente ao início do tratamento de quimioterapia, com a finalidade de avaliação clínica e da função cardíaca.

Foram excluídas as pacientes gestantes, lactantes e cardiopatas ou com outras comorbidades que contra indicassem o esquema quimioterápico preconizado.

A confirmação anatomopatológica foi realizada por meio da análise de amostra tumoral obtida por biópsia incisional do tumor, e o resultado confirmado por dois médicos patologistas.

As pacientes que chegavam ao hospital já biopsiadas em outro serviço, e com resultado de biópsia mamária prévia, nesta situação, os blocos de parafina referente a essas biópsias eram requisitados, com a finalidade de realização de revisão de lâmina e confirmação histopatológica do resultado já existente.

### **3.2.2 Resposta clínica e radiológica à quimioterapia – Adriamicina e Ciclofosfamida + Taxane**

O tratamento quimioterápico neoadjuvante administrado consistiu de quatro (04) ciclos de uma associação de Adriamicina (60 mg/m<sup>2</sup> de área corpórea) com a Ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup> de área corpórea), esquema esse conhecido como AC associado a mais 04 ciclos de Docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup> de área corpórea) administrado em intervalos de 21 dias de acordo com protocolo vigente no Serviço de Oncologia do Hospital Ophir Loyola que foi baseado em ensaios clínicos, de acordo com ensaios clínicos relatados na literatura (VON MINCKWITZ *et al.*, 2005; BEAR *et al.*, 2006).

A resposta clínica ao tratamento foi assim classificada: a) resposta clínica completa (RCC) quando houve o desaparecimento completo do tumor; b) resposta clínica parcial (RCP) quando houve redução de  $\geq 50\%$  no tamanho do tumor; c) sem resposta clínica (SR) quando foi observado uma redução  $<$  que  $50\%$  no tamanho do tumor; d) progressão (PRO) quando foi observado aumento  $\geq 25\%$  no tamanho do tumor ou aparecimento de uma nova lesão.

Os tumores foram considerados como responsivos ao esquema quimioterápico quando apresentaram resposta clínica completa ou parcial; e não responsivos, quando não houve resposta clínica do tumor ou houve progressão no tamanho tumoral.

O tamanho do tumor mamário era aferido em duas dimensões (súpero-inferior e látero-lateral) com o auxílio de um paquímetro antes no início da quimioterapia e entre 3 a 5 semanas após o término do último ciclo de quimioterapia.

Nesta segunda fase, além das medidas bidimensionais do tumor antes e após a quimioterapia neoadjuvante, foi também realizado RNM das mamas em dois momentos, antes do tratamento quimioterápico e após 3 a 5 semanas do término do último ciclo de quimioterapia.

O exame foi realizado em aparelho GE Healthcare Brivo MR355 1.5 Tesla. Foram feitas sequências de pulso sagital FSE T2 com supressão de gordura, sequência VIBRANT dinâmica pré e pós gadolínio, assim como sequência GE T1 3D, pós gadolínio, difusão (B0, B650, B700) e processamento em work-station dedicada.

Os parâmetros analisados na RNM mamária foram: tamanho do tumor, velocidade de *whashing*, curva de captação do contraste, comportamento da lesão na difusão, medida do coeficiente de difusão aparente e o tipo de curva observada após administração do contraste.

Ao fazermos a análise dos resultados da RNM mamária, foram feitas associações entre o padrão de comportamento da imagem visibilizada ao exame, com os subtipos moleculares daquele tumor pesquisado. Apesar de não ser objeto de nosso estudo, achamos importante fazer essa correlação, já que estudos prévios já vêm observando padrões de imagens característicos de determinado subtipo molecular (McGUIRE *et al.*, 2011; MUKHTAR *et al.*, 2013; PRICE *et al.*, 2015).

A resposta ao tratamento foi classificada da mesma forma que na primeira fase do estudo.

### 3.2.3 Análise anatomopatológica e molecular

A análise dos achados anatomopatológicos, assim como dos genes e das expressões proteicas hormonais, foi realizada obedecendo os mesmos protocolos da primeira etapa do estudo, de acordo com os itens (3.1.3; 3.1.4; 3.1.5; 3.1.6), anteriormente descritos.

Em nosso estudo consideramos como resposta patológica completa a ausência de tumor residual, incluindo os tumores *in situ*, em mama e linfonodos axilares (ypT0ypN0).

### 3.2.4 Análise estatística

Nesta etapa para a determinação do tamanho da amostra (n), levou-se em consideração o quantitativo médio de pacientes atendidas no Hospital Ophir Loyola com câncer de mama em estágio clínico III, registrado no Sistema de Registro Hospitalar de Câncer desta unidade entre os anos de 2001 a 2009; um grau de confiabilidade de 95%; uma precisão relativa de 5% e uma prevalência de 15% a 20% dos genes *HER-2* (SEOL *et al.*, 2012), de 10% da mutação de *KRAS* (BOQUETT, FERREIRA, 2010) e de 15,5% de amplificação de *MYC* (LIAO; DICKSON, 2000), que maximiza o tamanho da amostra.

Ao final dos procedimentos para o cálculo do tamanho da amostra foi estimado que para atingir os objetivos do presente estudo era necessário incluir no mínimo de 54 pacientes. A inclusão das pacientes nesta segunda fase requereu a realização de exame de alto custo, como a RNM da mama, totalizando dois exames para cada paciente (pré e pós-quimioterapia); e após uma negociação extensa com um patrocinador externo foi autorizada a realização de 100 RNM, no total. Por questões de limitações de recursos financeiros propusemos a inclusão de 50 pacientes para o estudo.

Os dados foram analisados comparando-se os tumores responsivos e não responsivos segundo as variáveis que caracterizavam: a) perfil sócio demográfico; b) histórico hormonal e reprodutivo; c) fatores de risco ; d) características anatomopatológicas; e e) biomarcadores. A seguir uma descrição das variáveis analisadas.

#### Características sócio demográficas

–**Idade ao diagnóstico:** Incluída por considerá-la como característica que pode influenciar na resposta ao tratamento, pois tumores em idades mais jovens, normalmente são mais agressivos. Categorias usadas: (25 a 40 anos, 41 a 50 anos e 51 a 62 anos).

- Cor:** Pode ser abordada sobre dois aspectos, correlação com o nível sócioeconômico que poderia influenciar no tempo do diagnóstico e na resposta ao tratamento, já que alguns trabalhos correlacionam a raça negra como mais resistente à quimioterapia. Categorias utilizadas: branca, parda e negra.
- Localidade da residência:** esta categoria foi pesquisada para verificar se a distância entre a residência da paciente e o hospital de referência, teria influência na demora para o início do tratamento. Categorias usadas: Belém (capital); outros municípios do Estado do Pará e outras localidades em outros Estados.

### **Características do histórico hormonal e reprodutivo**

- Idade da menarca:** avaliar o tempo de exposição hormonal. Categorias usadas: menarca entre 9 a 12 anos e com 13 anos ou mais.
- Estava na menopausa:** avaliar a influência da ação hormonal. Categorias usadas: estar ou não na menopausa.
- Número de gestações:** levar a gestação a termo é um fator protetor para o câncer de mama, sendo então incluída esta categoria: nuligesta; de 1 a 2 gestações; e 3 gestações ou mais .
- Número de partos:** categorias usadas: nulípara; 1 a 2 gestações; 3 gestações ou mais.
- Idade do primeiro parto:** categorias usadas: até 20 anos; 21 a 34 anos; 35 anos ou mais.

### **Fatores de risco**

- Histórico familiar de câncer de mama:** nesta categoria foi inquerido se a paciente apresentava parente de primeiro grau: como mãe, irmã ou filha; e parentes de segundo grau, como: avó, tias e primas de primeiro grau. Os estudos mostram um aumento do desenvolvimento do câncer de mama em mulheres que apresentam familiares próximos acometidos com essa doença. Categorias usadas: sim ou não (HULKA; MOORMAN, 2001; JAMES *et al.*; 2007).
- Índice de Massa Corpórea:** evidências epidemiológicas consistentes demonstram uma correlação entre o aumento de risco de câncer de mama com maiores valores de IMC. Categorias usadas: baixo peso, IMC normal, sobrepeso e obesidade (RAMOS-NINO, 2013).

### Características anatomopatológicas

- Grau Histológico:** o grau de Nottingham está diretamente relacionado a agressividade do tumor. Categorias usadas: grau 1 ou grau 2; e grau 3 (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010).
- Números de linfonodos comprometidos:** vários estudos demonstram uma relação direta entre o número de linfonodos comprometidos com o prognóstico clínico e o tamanho tumoral. Categorias usadas: até 3 linfonodos; 4 ou mais linfonodos (WILLETT *et al.*, 2002; MARINHO *et al.*, 2008).

### Características dos biomarcadores

- Subtipo molecular:** atualmente o câncer de mama é dividido em diferentes subtipos moleculares e esta divisão é importante na avaliação de resposta clínica e patológica e sobrevida (LIPS *et al.*, 2013). Categorias usadas: luminal; HER-2; Triplo negativo e Triplo positivo.
- MYC pela técnica de FISH:** este gene tem um papel importante na carcinogênese de alguns tumores e sua amplificação pode estar associada com biologia tumoral desfavorável (CORZO *et al.*, 2006).
- KRAS:** a ativação deste oncogene influencia na diferenciação, crescimento e sobrevivência de tumores, e favorece fenótipos tumorais mais agressivos (KIM, 2013).

Para avaliar se as diferenças observadas nas características estudadas, entre as pacientes que apresentaram tumor responsivo e não responsivo, tinham significância estatística, foi aplicado o teste de Fisher, considerando o nível de significância de 5%.

A regressão logística foi usada para avaliar o efeito das características clínico-patológicas e moleculares na resposta à quimioterapia neoadjuvante. As *odds ratios* e seus respectivos intervalos com 95% de confiança foram calculados. Todos os procedimentos de análise foram executados no Stata 12.0.

### 3.2.5 Painel genético de genes associados ao risco de câncer de mama

#### Extração e quantificação de ácidos nucleicos

Para a realização dos ensaios de sequenciamento de nova geração (NGS) foram utilizadas amostras de DNA extraídas de leucócitos totais da sangue periférico das pacientes diagnosticadas com câncer de mama que tinham características relacionadas ao câncer de mama hereditário. A extração de DNA foi realizada por método automatizado no equipamento Maxwell® 16 (Promega), que utiliza como princípio a recuperação do DNA por microesferas ferromagnéticas. A quantificação do DNA extraído foi mensurada com 1µL do material por leitura espectrofotométrica em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), e obtenção do grau de pureza através das razões 260/230 e 260/280. O DNA previamente quantificado no NanoDrop também foi avaliado no Qubit® 2.0 (Invitrogen) para quantificação de DNA íntegro (DNA dupla-fita – dsDNA). Para quantificação no Qubit, 1µL do material foi misturado com 199µL da solução de trabalho (1µL do reagente Qubit dsDNA BR + 199µL do tampão Qubit), enquanto que para os padrões do kit, foram misturados 10µL de cada padrão com 190µL da solução de trabalho. Todas as soluções foram transferidas para o tubo apropriado para leitura no equipamento, vortexadas por 3 segundos, incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente (TA), e posteriormente avaliadas no aparelho.

#### Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de Nova Geração foi realizado na plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (Life Technologies). Os *genes* *ATM* (NM\_000051), *BARD1* (NM\_000465), *BRCA1* (NM\_00724), *BRCA2* (NM\_000059), *BRIP1* (NM\_032043), *CDH1*(NM\_004360), *CHEK2* (NM\_007194), *MRE11A* (NM\_005591), *MUTYH* (NM\_001048174), *NBN* (NM\_002485) , *PALB2* (NM\_024675), *PTEN* (NM\_000314), *RAD50* (NM\_005732), *RAD51C* (NM\_002876), *STK11* (NM\_000455), *TP53* (NM\_000546) e *TWIST1* (NM\_000474) foram selecionados baseados em dados da literatura que descreveram mutações relacionadas ao câncer de mama de origem hereditária. Os alvos sequenciados abrangem todos os éxons e mais 25 pares da região intrônica ao lado de cada éxon. Dois conjuntos (*pools*) de iniciadores desenhados por meio da ferramenta Ampliseq Designer (Life Technologies) geraram 560 amplicons totalizando 100,76 kb do genoma, abrangendo uma cobertura de 97,96% dos alvos. Cerca de 10 ng de cada amostra de DNA genômico foi submetida a amplificação pelo kit *Ion AmpliSeq Library Kit 2.0* (Life Technologies) no termociclador Veriti

(Applied Biosystems) para obtenção da biblioteca gênica. Os iniciadores foram parcialmente removidos pela adição da enzima Fupa, conforme recomendação do fabricante. Aos fragmentos amplificados na etapa anterior, foram adicionados numa extremidade um adaptador (idêntico para todas as amostras) e adaptadores contendo *barcodes* individuais para cada amostra, com a finalidade de identificar cada paciente após o sequenciamento, utilizando o kit *Ion Xpress Barcode Adapters library* (Life Technologies).

Após a adição do adaptador e do *barcode*, as amostras da biblioteca foram purificadas por meio de ligação do DNA em esferas magnéticas do kit *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter), lavadas com etanol 70% e eluídas com Low TE (Life Technologies) para recuperar o DNA purificado. A concentração da biblioteca purificada foi determinada por meio do kit *Ion Libray Quantification kit* (Life Technologies) como descrito a seguir. A quantificação absoluta por PCR em tempo real utilizou como referência uma curva padrão contendo 3 concentrações conhecidas de DNA contendo 0,068 pM, 0,068 pM e 0,68 pM. Foram adicionados 10 µl de TaqMan Master Mix (2X), 1 µl de TaqMan Assay (20X) e 9 µl e cada amostra de DNA diluída 1:100. A ciclagem foi realizada no equipamento ViiA 7 (Applied Biosystems) iniciando com um ciclo de 95°C por 20 segundos e 40 ciclos de 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos.

Em seguida, cada biblioteca foi diluída para uma concentração de 25 pM. As amostras que apresentaram concentração abaixo desse valor foram re-amplificadas pelo kit *Ion AmpliSeq Library Kit 2.0* (Life Technologies), conforme recomendação do fabricante e quantificadas novamente conforme descrito anteriormente. Uma vez que todas as amostras foram normalizadas para 25 pM, as 19 amostras foram divididas para formar 2 bibliotecas multiplex, sendo uma constituída por um conjunto de 10 amostras e a outra constituída por 9 amostras.

Para a amplificação clonal da biblioteca, cada fragmento foi ligado a uma esfera magnética [*Ion Sphere Particle* (ISP)] que foi submetida a uma PCR em emulsão no equipamento Ion Touch 2 (Life Technologies) utilizando o kit *Ion PGM Template OT2 200* (Life Technologies). Nesta etapa, cada esfera magnética contendo um único fragmento da biblioteca é isolada e amplificada dentro de uma micela lipídica, que após amplificação por PCR gera esferas monoclonais contendo múltiplas cópias do mesmo fragmento de DNA.

Com o objetivo de avaliar o nível de enriquecimento da biblioteca, foi realizada uma reação de ligação de sonda específica utilizando o kit *Ion Sphere Quality Control* (Life Technologies) e a marcação das esferas enriquecidas foi medida no equipamento Qubit 2.0 (Invitrogen) utilizando o programa no modo Ion. Para o sequenciamento somente foram utilizadas bibliotecas que apresentaram uma taxa de enriquecimento de ISP entre 10 a 30%.

Amostras com mais de 30% de enriquecimento geralmente geram muita policlonalidade, prejudicando a qualidade do sequenciamento. Por outro lado, bibliotecas com menos de 10% de enriquecimento também foram descartadas, pois também têm pouco aproveitamento pela baixa quantidade de material.

A eliminação das ISP's que não apresentaram fragmento amplificado por PCR em emulsão, ou seja, o enriquecimento da biblioteca, foi realizado pela ligação da biblioteca à DynaBeads MyOne streptavidin C1 beads do kit *Ion PGM Template OT2 200* conforme recomendação do fabricante utilizando equipamento Ion OneTouch ES (Life Technologies).

Após o enriquecimento, a biblioteca foi submetida a uma reação de sequenciamento utilizando o kit *Ion PGM Sequencing 200 Kit v2* (Life Technologies) e posteriormente, 30 µl do volume final foi carregado no chip Ion 316 (Life Technologies) de acordo com o recomendado. O equipamento Ion Torrent foi inicializado utilizando água MiliQ e os reagentes do kit *Ion PGM Sequencing 200 Kit v2* (Life Technologies). O ajuste das soluções foi realizado pelo equipamento. Uma vez inicializado, o chip carregado foi colocado no equipamento e a corrida foi realizada utilizando 500 fluxos, com auxílio de nitrogênio gasoso para injeção dos reagentes.

Os dados gerados no sequenciamento foram transferidos para o servidor do equipamento e inicialmente analisados na ferramenta *Ion Suite*. Utilizando o plugin "Variant Caller" foi realizado o alinhamento com o genoma de referência humano hg19 (UCSC Genome Browser - <http://genome.ucsc.edu/>) gerando os arquivos contendo as variantes. Esses arquivos foram submetidos à ferramenta "Ingenuity Variant Analysis" (<http://www.ingenuity.com>) que utiliza os bancos de dados abaixo como parâmetro:

- dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>);
- 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>);
- HGMD ([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk));
- Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/data/>) e
- SIFT (<http://sift.jcvi.org/>).

Foram consideradas apenas as variantes classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas e de significância incerta.

### **Sequenciamento direto automático**

A região das variantes de interesse descritas acima foi submetida ao sequenciamento direto automatizado (método de Sanger) para confirmar os resultados do sequenciamento de Nova Geração. Para a amplificação por PCR, cerca de 50 ng de DNA das pacientes foram

incubados com 1 unidade (U) de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), tampão da enzima, 2 mM de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 mM do conjunto de 4 nucleotídeos (dNTP), 0,2 μM de cada um dos iniciadores. A reação foi realizada no termociclador Veriti-96-well (Applied Biosystems) primeiramente com a ativação da enzima a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação com temperatura de 95 °C por 30 segundos para desnaturação, 55 a 60°C para anelamento (dependendo do iniciador), e 1 minuto a 72° C para extensão da cadeia de DNA. O tamanho em pares de base (pb) de cada amplicon está descrito na tabela 3.1.

Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 1% e visualizados sobre luz ultravioleta para extrair o fragmento de agarose contendo a banda de DNA específica. Em seguida as bandas foram purificadas no kit *Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* conforme recomendação do fabricante e o DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop).

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit *BigDye Terminator v3.1*. Foram utilizadas 10 ng para amostras com até 500 pb, e 20 ng de DNA para amostras com tamanho maior que de 500 pb a cada reação de sequenciamento. Ao DNA foi adicionado 1 μl de tampão fornecido pelo kit e 2 μl de *BigDye Terminator* e o volume foi completado com água até 10 μl em cada poço da placa *MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems)*. A obtenção de produtos para sequenciamento foi obtida pela ciclagem da reação no termociclador Veriti-96-well (*Applied Biosystems*) por 10 segundos a 94°C, 55°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos durante 40 ciclos.

A precipitação das amostras ocorreu pela adição de 50 μl de isopropanol seguida de incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Então, a placa foi centrifugada a 4°C por 4000 rpm durante 50 minutos. O isopropanol foi retirado pela inversão da placa e o DNA foi lavado com 100 μl de etanol 70% gelado e a centrifugação foi repetida. O excesso de etanol foi retirado da mesma forma, e a placa foi centrifugada por 2 minutos a 500 rpm com o fundo invertido para retirar o excesso de etanol. Para remover o etanol ainda remanescente, a placa foi incubada a 95°C por 2 minutos para secagem total. Os produtos da reação de sequenciamento foram sequenciados na plataforma 3130XL *Genetic Analyzer* segundo as recomendações do fabricante. Os arquivos gerados contendo os eletroferogramas do sequenciamento foram analisados no programa BioEdit (Tom Hall/Ibis Biosciences) e os resultados foram alinhadas com sequências de referência pela ferramenta *Nucleotide Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

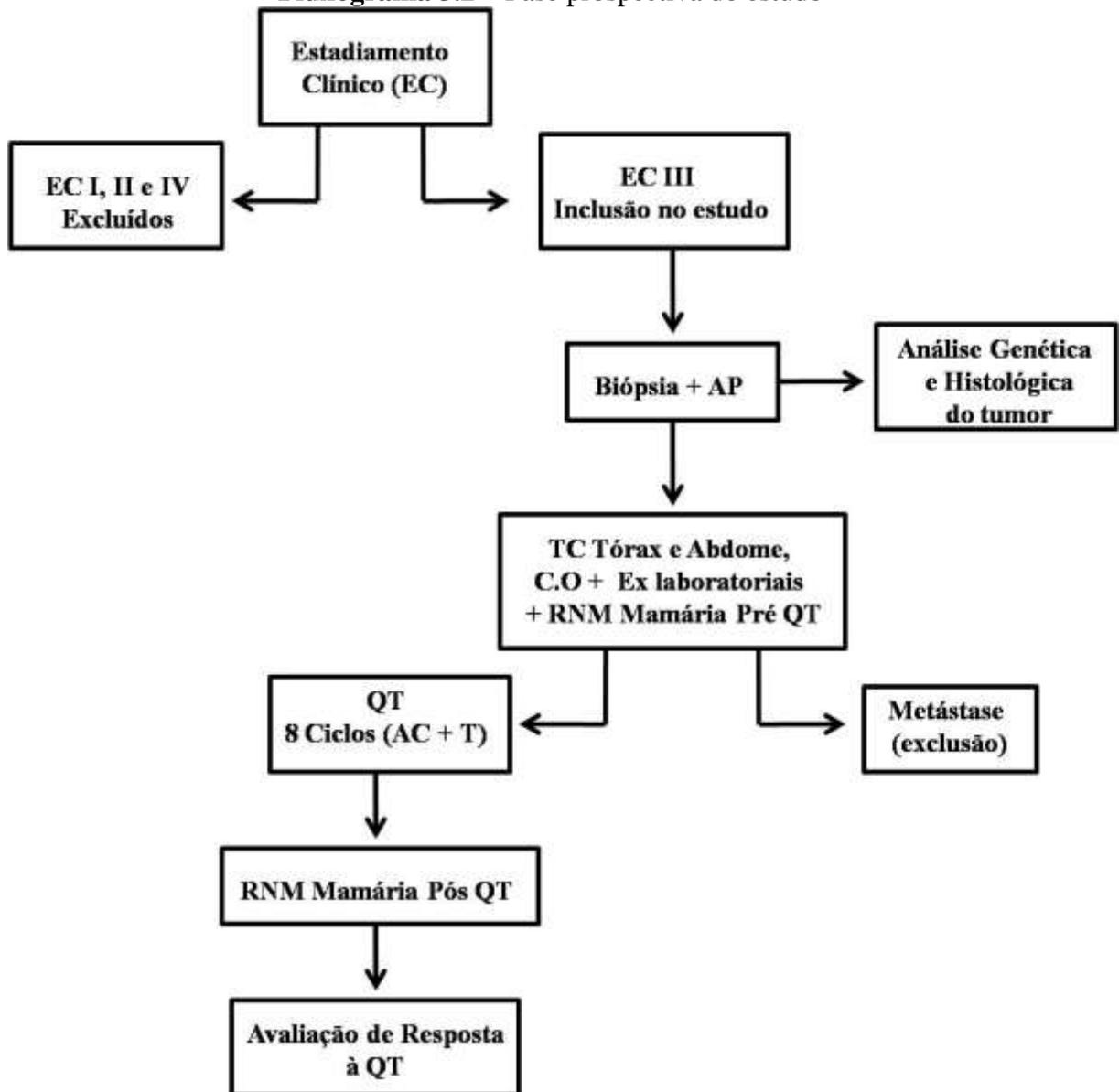
**Tabela 3.1** - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento direto das mutações

gene	posição no genoma	sequência	tamanho do amplicon (pb)
<i>BRCA1</i>	41242980	5' - TCCCAAAGTGCTGGGATTAG 5' - AATCCAGTCCTGCCAATGAG	495
<i>BRCA1</i>	41219623	5' - TGTAGAACGTGCAGGATTGC 5' - CGACCACACCCAGCTAATTT	406
<i>BRCA1*</i>	41209079	5' - ATATGACGTGTCTGCTCCAC 5' - AGTCTTACAAAATGAAGCGG	279
<i>BARD1</i>	215645503	5' - CCTCCCTGATGTACCACCAA 5' - AATGGAAAACGTGGCCATCA	180
<i>BRIP1</i>	59886018	5' - ATGATCCCTGCTGGAAAGAA 5' - CCTGGCCACTGTTCTAGGTG	213
<i>MRE11A</i>	94179032	5' - CCCAATGATTGCAACACAAA 5' - CTCCCAAAGTGCTGGGATTA	458
<i>BRIP1</i>	59763389	5' - TGCTCTGGTCTCCTGACAAA 5' - ACCAAATTTTCCCTGGGTTT	551
<i>BARD1</i>	215632255	5' - TGAAAGTGAAGAAAGCCATCAA 5' - ATGGGCACCTGAAGGTAGTG	360
<i>BRCA2</i>	32915046	5' - AAACCCAGAGCACTGTGTAAACTC 5' - TCTCCTCTTCTTTTCCAATTCTTG	489
<i>PALB2</i>	23652563	5' - GGCACCTTTTCTTCTCCTC 5' - GGATTTAATTGGCCGGAGTT	238
<i>NBN</i>	90996805	5' - CAGTCGCTACCGGGAAAATA 5' - CAGGTGGAAGTGGAAAGGAA	668
<i>MUTYH</i>	45805816	5' - GCGAGAGCAGGAGAGAAAGA 5' - CTCCTCGTGGCTAGTTCAGG	601
<i>MUTYH</i>	45799239	5' - ATGCTCTGAATGGCTGCTT 5' - CCTGTCCAGGTCCATCTCAT	665

\*sequência de acordo com [http://web.hku.hk/~ykchanc/BRCA1 sequence and primers listed in BIC database.htm](http://web.hku.hk/~ykchanc/BRCA1_sequence_and_primers_listed_in_BIC_database.htm)

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

**Fluxograma 3.2 – Fase prospectiva do estudo**



Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

## 4 RESULTADOS

Das 116 pacientes, 23,3% foram diagnosticadas com idade até 40 anos, consideradas como pacientes jovens. Destas pacientes 82,8% os tumores foram classificados como grau 1 ou 2 de Nottingham, e 92,3% dos tumores eram T3 ou T4 no estadiamento clínico. O comprometimento ganglionar foi presente em 94,9% das peças cirúrgicas após a quimioterapia. As pacientes apresentaram redução de sua área tumoral em 43,1% dos casos. Após o estudo imunohistoquímico, das 116 pacientes incluídas no estudo 53,4% não apresentavam expressão proteica para os receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e 42,2% apresentavam expressão proteica de HER-2.

Os tumores foram classificados como luminal A, luminal B, HER2 super-expresso e triplo negativo baseados no *status* dos receptores de estrogênio, receptores de progesterona e *HER-2*. Foram também divididos aqueles pacientes que tiveram tumores de início precoce (abaixo de 40 anos de idade) e início tardio (acima de 40 anos de idade).

### 4.1 RESULTADOS DO ESTUDO RETROSPECTIVO

O resultado da fase retrospectiva do estudo refere-se a expressão das proteínas dos genes *MYC*, *HER-2* e receptores hormonais; e da mutação do códon 12 de *KRAS*. O *status* desses genes foram correlacionados com a resposta clínica e patológica do tumor ao tratamento com quimioterapia neoadjuvante.

Das 116 pacientes, 27 (24,2%) pacientes foram diagnosticadas com idade até 40 anos, câncer de mama jovens. Destas pacientes, 96 (82,8%) os seus tumores foram classificados como grau 1 ou 2 de Nottingham, e a grande maioria que totalizava 107 (92,3%), os tumores eram T3 ou T4 no estadiamento clínico. O comprometimento ganglionar foi presente em 56 (94,9%) das peças cirúrgicas após a administração da quimioterapia. As pacientes apresentaram redução em mais de 50% de sua área tumoral em 43,1% dos casos.

Os produtos de biópsias tumorais foram analisados e o estudo imunohistoquímico mostrou que 62 (53,4%), das 116 pacientes incluídas no estudo, não apresentavam expressão proteica para os receptores hormonais (estrogênio e progesterona), porém 49 (42,2%) apresentavam expressão proteica para o gene *HER-2*.

A Tabela 4.1 vem mostrando a correlação entre o *status* da proteína HER-2, que foi pesquisado através de duas técnicas aplicadas no trabalho, o estudo imunohistoquímico e a técnica de FISH. A expressão proteica do gene *HER-2* foi observada em 42,2% dos tumores,

como mencionado anteriormente, enquanto que a amplificação deste gene foi detectada em 28 (24,1%) dos casos. A porcentagem de concordância entre os resultados das duas técnicas aplicadas IHC e FISH para *HER-2* foi de 93% ( $\kappa = 0.833$ ; excelente).

**Tabela 4.1** - Proteína *HER-2* e o *status* gênico no câncer de mama

IHQ	FISH			Total
	Não amplificado	Indeterminado	Amplificado	
1+	60 (89,55%)	2 (2,99%)	5 (7,46%)	67 (57,76%)
2+	23 (71,87%)	3 (9,38%)	6 (18,75%)	32 (27,59%)
3+	0 (0%)	0 (0%)	17 (100%)	17 (14,65%)
<b>Total</b>	<b>83 (71,55%)</b>	<b>5 (4,31%)</b>	<b>28 (24,14%)</b>	<b>116 (100%)</b>

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Todos os tumores estudados neste trabalho apresentavam concordância na presença de imunorreatividade para receptores de estrogênio e de progesterona. Desta forma, os tumores com expressão para receptores de estrogênio e progesterona foram renomeados como receptores hormonais positivos, com a finalidade de facilitar análises posteriores.

Uma correlação foi feita entre os resultados da expressão proteica dos receptores hormonais, e dos genes *HER-2* e *C-MYC* avaliados pela imunohistoquímica, com os achados clinicopatológicos (Tabela 4.2).

Quando analisamos a idade, observa-se que 15 (24,2%) mulheres que não expressavam receptores hormonais, tinham até 40 anos de idade ao diagnóstico. A grande maioria das mulheres que não expressaram o gene *HER-2* e o gene *MYC* tinham mais de 40 anos de idade, que correspondia a 82.1% e 85.0% respectivamente.

O grau histológico 3 que confere maior agressividade tumoral foi mais frequente nos tumores que não expressavam receptores hormonais (25.8%), nos que tinham expressão proteica positiva para *HER-2* (28.6%) e nos que apresentavam amplificação de *MYC* (19.4%).

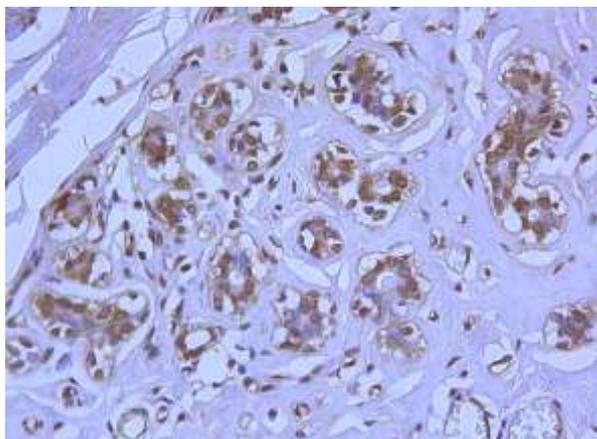
No estadiamento clínico teve uma predominância para os tumores T3 e T4 que são os com maior volume tumoral, com 93.5% destes tumores sem expressão de receptores hormonais, 93.9% com presença de expressão de *HER-2* e 94.4% com amplificação de *MYC*.

A resposta ao tratamento quimioterápico é uma das variáveis mais importantes deste estudo, e após análise observamos que 87.1% dos tumores resistentes à quimioterapia não expressavam receptores hormonais, e 83.7% deles apresentavam expressão proteica de *HER-2*, e 75% amplificavam o gene *MYC*.

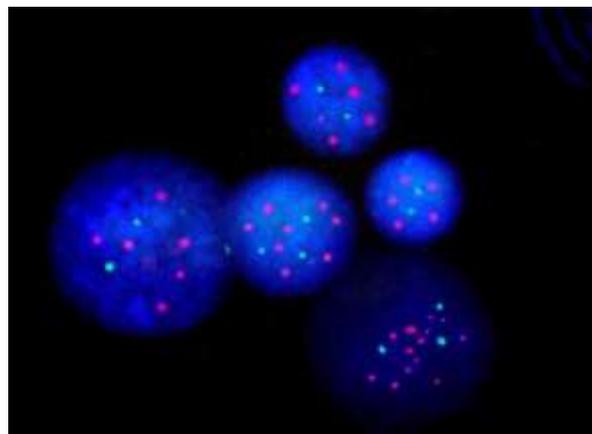
Os tumores que expressavam receptores de estrogênio e progesterona, em 64.2% não expressavam o gene *HER-2* e apenas 30.6% deles apresentavam amplificação de *MYC*. E um

pouco mais de 2/3 (70%) dos tumores HER-2 negativos não apresentavam amplificação de MYC.

As Fig. 4.1 e 4.2 representam a imunorreatividade da proteína e do gene *MYC* por estudo imunohistoquímico e a amplificação gênica observado por FISH, respectivamente.



**Figura 4.1** - Imunorreatividade de *MYC* por IHQ  
**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.



**Figura 4.2** - Hibridização de *MYC* por FISH.  
**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

As amostras tumorais foram classificadas em subtipos moleculares, e foi realizada através dos dados obtidos pela amplificação do gene *HER-2* juntamente com a expressão das proteínas dos RH. Das 116 amostras, 42,2% foram classificadas como sendo do subtipo luminal A, 4,3%, como luminal B, 19,8%, como *HER-2* positivo, e 33,6%, como triplo-negativo. A expressão proteica de *HER-2*, assim como a sua amplificação gênica foi associada com a expressão proteica dos receptores hormonais (OR:0,162; IC 95%: 0.070-0.373; OR: 0,173; IC 95%: 0.060-0.497, respectivamente).

**Tabela 4.2 - Achados clínico-patológicos correlacionados com o *status* da expressão proteica.**

Fator (N) OR(95%IC)	Expressão RH [N(%)]		OR (95% IC)	Expressão HER2 [N(%)]		OR (95% IC)	Expressão MYC [N(%)]		
	Negativo	Positivo*		Negativo	Positivo*		Negativo	Positivo*	
<b>Idade</b>									
≤ 40 (27)	15 (24.2%)	12 (22.2%)	1.117 (0.470- 2.655)	12 (17.9%)	15 (30.6%)	0.495 (0.207- 1.182)	12 (15.0%)	15 (41.7%)	0.247 (0.100- 0.610) **
> 40 (89)*	47 (75.8%)	42 (77.8%)		55 (82.1%)	34 (69.4%)		68 (85.0%)	21 (58.3%)	
<b>Grau</b>									
1/2 (96)	46 (74.2%)	50 (92.6%)	0.230 (0.072- 0.738) **	61 (91.0%)	35 (71.4%)	4.067 (1.433- 11.537) **	67 (83.8%)	29 (80.6%)	1.244 (0.450- 3.439)
3 (20) *	16 (25.8%)	4 (7.4%)		6 (9.0%)	14 (28.6%)		13 (16.2%)	7 (19.4%)	
<b>Invasão Tumoral</b>									
T1/T2 (9)	4 (6.5%)	5 (9.3%)	0.676 (0.172- 2.656)	6 (9.0%)	3 (6.1%)	1.508 (0.358- 6.352)	7 (8.8%)	2 (5.6%)	1.630 (0.322- 8.264)
T3/T4 (107) *	58 (93.5%)	49 (90.7%)		61 (91.0%)	46 (93.9%)		73 (91.2%)	34 (94.4%)	
<b>Metástase linfonodal</b>									
Ausente (6)	6 (9.7%)	0 (0)	< 0.001 (0)	2 (3.0%)	4 (8.2%)	0.346 (0.061- 1.971)	3 (3.8%)	3 (8.3%)	0.429 (0.082- 2.235)
Presente (110) *	56 (90.3%)	54 (100%)		65 (97.0%)	45 (91.8%)		77 (96.2%)	33 (91.7%)	
<b>Resposta à QT</b>									
Sensível (50)	8 (12.9%)	42 (77.8%)	0.042 (0.016- 0.113) **	42 (62.7%)	8 (16.3%)	8.610 (3.483- 21.283) **	41 (51.3%)	9 (25.0%)	3.154 (1.318- 7.547) **
Resistente (66) *	54 (87.1%)	12 (22.2%)		25 (37.3%)	41 (83.7%)		39 (48.7%)	27 (75.0%)	
<b>Expressão RH</b>									
Negativo (62)	-	-	-	24 (35.8%)	38 (77.6%)	0.162 (0.070- 0.373) **	37 (46.2%)	25 (69.4%)	0.379 (0.164- 0.872) **
Positivo (54) *	-	-		43 (64.2%)	11 (22.4%)		43 (53.8%)	11 (30.6%)	
<b>Expressão HER2</b>									
Negativo (67)	-	-	-	-	-	-	56 (70.0%)	11 (30.6%)	5.303 (2.255- 12.473) **
Positivo (49) *	-	-		-	-		24 (30.0%)	25 (69.4%)	

\*Análise de regressão logística do grupo de referência; \*\* Diferencialmente expressas entre os grupos,  $p < 0.05$ . N: número da amostra; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; RH: receptor hormonal; QT: Quimioterapia.

Fonte: Pereira *et al.*, 2013.

Na Tabela 4.3 são demonstrados os resultados da expressão dos receptores hormonais e dos genes *HER-2* e *MYC* correlacionados com os achados clínico-patológicos porém analisados pela técnica de FISH.

A expressão proteica do gene *MYC* foi observada em 31% dos tumores estudados, já a presença de ganho de *MYC*, assim como da polissomia do cromossomo 8, variou entre 11,2% a 76,7% dos casos, dependendo do critério adotado. A expressão proteica de *MYC* também

apresentou associação com os receptores hormonais (OR: 58.333, 95% IC: 0.164-0.872). A Tabela 4.3 vem descrevendo os achados correlacionados ao gene *MYC*. O ganho de *MYC* foi associado a superexpressão de *MYC* ( $p < 0,05$ , para todos os cortes aplicados), aos receptores hormonais ( $p < 0,05$ , para todos os pontos de cortes) e a expressão de HER-2 ( $p < 0,05$  exceto para o ponto de corte #4), como também com a amplificação de *HER-2* ( $p < 0,05$  para todos os pontos de corte).

A grande maioria das pacientes que não apresentavam amplificação de *MYC* , correspondendo a 75,7% tinham mais de 40 anos ao diagnóstico. O grau histológico de menor e maior agressividade não teve uma correlação com a presença ou não da amplificação do gene *MYC*

**Tabela 4.3-** Achados clínico-patológicos e a expressão proteica avaliada através do status dos genes *HER-2* e *MYC*

Fator (N)	HER2 amplificação [N(%)]		OR (95% IC)	MYC amplificação [N(%)]		OR (95% IC)	MYC duplicação ou pol8 [N(%)]		OR (95% IC)	Alto ganho de MYC [N(%)]		OR (95% IC)	ganho MYC [N(%)]		OR (95% IC)
	Negativo <i>HER21</i> <i>CEP17</i> ≤2.2)	Positivo <i>HER21</i> <i>CEP17</i> >2.2)*		Negativo <i>MYC1</i> <i>CEP18</i> ≤2.2)	Positivo <i>MYC1</i> <i>CEP18</i> >2.2)*		Negativo <i>MYC1</i> <i>CEP18</i> <1.3)	Positivo <i>MYC1</i> <i>CEP18</i> ≥1.3) ou pol8		Negativo <i>MYC1</i> núcleo<5)	Positivo <i>MYC1</i> núcleo≥5)*		Negativo <i>MYC1</i> núcleo<2.5)	Positivo <i>MYC1</i> núcleo≥2.5)*	
Idade															
≤40 (27)	17 (19.3%)	10 (35.7%)	0,431 (0,169-1,100)	25 (24.3%)	2 (15.4%)	0,480 (0,366-8,495)	5 (8.9%)	22 (36.6%)	0,169 (0,059-0,488)**	24 (24.5%)	3 (16.6%)	1,622 (0,432-6,085)	1 (3.7%)	26 (29.2%)	0,093 (0,012-0,723)**
>40 (89)*	71 (80.7%)	18 (64.3%)		78 (75.7%)	11 (84.6%)		51 (91.1%)	38 (63.4%)		74 (75.5%)	15 (83.4%)		26 (96.3%)	63 (70.8%)	
Grau															
1/2 (96)	75 (85.2%)	21 (75.0%)	1,923 (0,681-5,432)	86 (83.4%)	10 (76.9%)	1,518 (0,378-6,100)	48 (85.7%)	48 (80%)	1,500 (0,563-3,997)	82 (83.7%)	14 (77.7%)	1,464 (0,426-5,028)	23 (85.2%)	73 (82.0%)	1,260 (0,383-4,150)
3 (20)*	13 (14.8%)	7 (25.0%)		17 (16,6%)	3 (23.1%)		8 (14.3%)	12 (20.0%)		16 (16.3%)	4 (22.3%)		4 (14.8%)	16 (18.0%)	
Invasão Tumoral															
T1/T2 (9)	7 (7.9%)	2 (7.1%)	1123 (0,220-5,748)	7 (6,8%)	2 (15.4%)	0,401 (0,074-2,175)	5 (8.9%)	4 (6.6%)	1,373 (0,349-5,393)	7 (7.1%)	2 (11.1%)	0,615 (0,117-3,233)	1 (3.7%)	8 (8.9%)	0,389 (0,046-3,262)
T3/T4 (107)*	81 (92.1%)	26 (92.9%)		96 (93.2%)	11 (84.6%)		51 (91.1%)	56 (93.4%)		91 (92.9%)	16 (88.9%)		26 (96.3%)	81 (91.1%)	
Metástas e Linfática															
Ausente (6)	4 (4.5%)	2 (7.1%)	0,619 (0,107-3,575)	5 (4,8%)	1 (7.7%)	0,612 (0,066-5,689)	4 (7.2%)	2 (3.3%)	2,231 (0,392-12,686)	5 (5.1%)	1 (5.5%)	0,914 (0,100-8,318)	2 (7.4%)	4 (4.5%)	1,700 (0,294-8,832)
Presente (110)*	84 (95.5%)	26 (92.9%)		98 (95.2%)	12 (92.3%)		52 (92.8%)	58 (96.7%)		93 (94.9%)	17 (94.5%)		25 (92.6%)	85 (95.5%)	
Resposta à terapia															
Sensível (50)	46 (52.2%)	4 (14.2%)	6,571 (2,106-20,509)**	49 (47.6%)	1 (0,86)	10,889 (1,365-86,840)**	30 (53.6%)	20 (33.3%)	2,308 (1,089-4,890)**	48 (48.9%)	2 (11.1%)	7,680 (1,676-35,199)**	12 (44.4%)	38 (42.7%)	1,074 (0,451-2,557)
Resistente (66)*	42 (47.8%)	24 (85.8%)		54 (52.4%)	12 (10,34)		26 (46.4%)	40 (66.7%)		50 (51.1%)	16 (88.9%)		15 (55.6%)	51 (57.3%)	

Fator (N)	HER2 amplificação [N(%)]		OR (95% IC)	MYC amplificação [N(%)]		OR (95% IC)	MYC duplicação ou pol8 [N(%)]		OR (95% IC)	Alto ganho de MYC [N(%)]		OR (95% IC)	ganho MYC [N(%)]		OR (95% IC)
	Negativo <i>HER21</i> CEP17 ≤2.2)	Positivo <i>HER21</i> CEP17 >2.2)*		Negativo <i>MYC1</i> CEP18 ≤2.2)	Positivo <i>MYC1</i> CEP18 >2.2)*		Negativo <i>MYC1</i> CEP18 <1.3)	Positivo <i>MYC1</i> CEP18 ≥1.3) ou pol8		Negativo <i>MYC1</i> núcleo<5)	Positivo <i>MYC1</i> núcleo≥5)*		Negativo <i>MYC1</i> núcleo<2.5)	Positivo <i>MYC1</i> núcleo≥2.5)*	
HR expressão															
Negativo (62)	39 (44.3%)	23 (82.1%)	0,173 (0,060-0,497)**	50 (48.5%)	12 (92.3%)	0,079 (0,010-0,627)**	21 (37.5%)	41 (68.3%)	0,278 (0,129-0,599)**	46 (46.9%)	16 (88.9%)	0,111 (0,024-0,507)**	8 (29.6%)	54 (60.6%)	0,273 (0,108-0,691)**
Positivo (54)*	49 (55.7%)	5 (17.9%)		53 (51.5%)	1 (7.7%)		35 (62.5%)	19 (31.7%)		52 (53.1%)	2 (11.1%)		19 (70.4%)	35 (39.4%)	
HER2 expressão															
Negativo (67)	62 (70.4%)	5 (17.8%)	10,969 (3,761-31,981)**	65 (63.1%)	2 (15.4%)	9,408 (1,979-44,721)**	41 (73.2%)	26 (43.3%)	3,574 (1,636-7,808)**	65 (66.3%)	2 (11.1%)	15,758 (3,417-72,663)**	20 (74.0%)	47 (52.8%)	2,553 (0,981-6,642)**
Positivo (49)*	26 (29.6%)	23 (82.2%)		38 (36.9%)	11 (84.6%)		15 (26.8%)	34 (56.7%)		33 (33.7%)	16 (88.9%)		7 (26.0%)	42 (47.2%)	
MYC expressão															
Negativo (80)	77 (87.5%)	3 (10.7%)	58,333 (15,062-225,913)*	79 (76.7%)	1 (7.7%)	39,500 (4,883-319,520)*	53 (94.6%)	27 (45.0%)	21,593 (6,067-76,850)*	78 (79.6%)	2 (11.1%)	31,200 (6,623-146,981)**	26 (96.3%)	54 (60.6%)	16,852 (2,187-129,871)
Positivo (36)*	11 (12.5%)	25 (89.3%)		24 (23.3%)	12 (92.3%)		3 (5.4%)	33 (55.0%)		20 (20.4%)	16 (88.9%)		1 (3.7%)	35 (39.4%)	
HER2 amplificação															
Negativo (88)	-	-	-	87 (84.5%)	1 (7.7%)	65,250 (7,923-537,398)*	54 (96.4%)	34 (60.0%)	20,647 (4,603-92,614)*	87 (88.7%)	1 (5.5%)	134,455 (16,267-1111,302)*	26 (96.3%)	62 (69.6%)	11,323 (1,461-87,758)*
Positivo (28)*	-	-		16 (15.5%)	12 (92.3%)		2 (3.6%)	26 (40.0%)		11 (11.3%)	17 (94.5%)		1 (3.7%)	27 (30.4%)	

\*Grupo de referência para análise de regressão logística; \*\*Diferença expressiva entre grupos,  $p < 0,05$ . N: número de amostras; RC: Razão de Chance; IC: Intervalo de Confiança; HR: receptoe hormonal; CEP17: sinalização no cromossomo 17; CEP8: sinalização no cromossomo 8; pol8: polimorfismo do cromossomo 8.

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

A mutação do códon 12 do gene *KRAS* foi observada em 9 (7,76%) das amostras tumorais, e foi associada à amplificação do gene *HER-2* (OR: 4,565, 95% IC: 1.133-18,39) como também a amplificação do gene *MYC* (OR: 4.850; 95% IC: 1.049-22.424, por ponto de corte #1) (Tabela 4.4).

### **O resultado do impacto dos genes *MYC* e *KRAS* no fenótipo molecular, influenciando a resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante**

A expressão do gene *MYC* teve uma maior associação com os fenótipos moleculares luminal B e *HER-2* positivo (p= 0,008; OR: 24, 95% IC: 2.329-247.368; p< 0,001, OR: 63, 95% IC:12.021-330.170; respectivamente), quando comparados com o subtipo molecular luminal A. A presença de duplicação de *MYC* ou de polissomia do cromossomo 8 foi associada ao subtipo molecular *HER-2* positivo (p<0,001, OR: 49.867, 95% IC: 6.143-404.814).

A tabela 4.4 vem analisando a correlação dos achados clínico-patológicos com a presença da mutação no códon 12 do gene *KRAS*. Na nossa amostragem observamos uma predominância da ausência do gene *KRAS* em mulheres que detectaram a neoplasia mamária com mais de 40 anos de idade, que correspondeu a quase 80%, embora sem significância estatística (OR: 0.342, 95% IC 0.085-1.379) . A mutação deste gene foi detectada em 1/49 (2%) dos tumores classificados como : subtipo luminal A, 1/5 (20%) luminal B, 4/23 (17,4%) *HER-2* positivo e 3/39 (7,7%) no triplo negativo.

Quando analisamos a variável grau histológico, observamos uma maior associação da ausência da mutação de *KRAS* com os graus 1 e 2 de Nottingham (OR: 4.550, 95% IC 1.102-18.788). Não foi observado nos resultados encontrados no estudo uma associação entre a presença da mutação do códon 12 do gene *KRAS* com o tamanho do tumor; com a presença de comprometimento linfonodal; com a sensibilidade do tumor à resposta ao tratamento aplicado, como também à expressão proteica dos receptores hormonais, de *HER-2* e de *MYC*, entretanto vemos a presença de associação positiva entre a presença de amplificação do gene *HER-2* com a presença da mutação do códon 12 de *KRAS*, com significância estatística (OR: 4.565, 95% IC 1.133-18.390). O que conferiu uma maior associação ao subtipo molecular *HER-2* positivo quando comparado ao subtipo luminal A (p= 0.044, OR: 10.105, 95% IC 1.06-96.336) (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4** - Achados clínico-patológicos e a expressão da mutação de *KRAS*

Fator (N)	Mutação <i>KRAS</i> [N(%)]		OR (95% IC)
	Ausente	Presente*	
<b>Idade</b>			
≤40 (27)	23 (21.5%)	4 (44.4%)	0.342 (0.085-1.379)
>40 (89)*	84 (78.5%)	5 (55.6%)	
<b>Grau</b>			
1/2 (96)	91 (85.0%)	5 (55.5%)	4.550 (1.102-18.788)**
3 (20)*	16 (15.0%)	4 (44.5%)	
<b>Invasão tumoral</b>			
T1/T2 (9)	8 (7.5%)	1 (11.1%)	0.646 (0.071-5.835)
T3/T4 (107)*	99 (92.5%)	8 (88.9%)	
<b>Metástase linfonodal</b>			
Ausente (6)	5 (4.7%)	1 (11.1%)	0.392 (0.041-3.775)
Presente (110)*	102 (95.3%)	8 (88.9%)	
<b>Resposta � QT</b>			
Sensível (50)	48 (44.8%)	2 (22.2%)	2.847 (0.565-14.345)
Resistente(66)*	59 (55.2%)	7 (77.8%)	
<b>Expressão RH</b>			
Negativo (62)	55 (51.4%)	7 (77.8%)	0.302 (0.060-1.522)
Positivo (54)*	52 (48.6%)	2 (22.8%)	
<b>Expressão HER2</b>			
Negativo (107)	63 (58.8%)	4 (44.4%)	1.790 (0.455-7.043)
Positivo (9)*	44 (41.2%)	5 (55.6%)	
<b>Expressão MYC</b>			
Negativo (80)	76 (71.0%)	4 (44.4%)	3.065 (0.771-12.176)
Positivo (36)*	31 (29.0%)	5 (55.6%)	
<b>Amplifica�o HER2</b>			
Negativo (88)	84 (78.5%)	4 (44.4%)	4.565 (1.133-18.390)**
Positivo (28)*	23 (21.5%)	5 (55.6%)	
<b>Amplifica�o MYC</b>			
MYC/CEP8≤2.2 (103)	97 (90.6%)	6 (66.6%)	4.850 (1.049-22.424)**
MYC/CEP8>2.2 (13)*	10 (9.4%)	3 (33.4%)	

\*Análise de regressão logística do grupo de referência; \*\* Diferença de expressão entre os grupos,  $p<0.05$ . N: número de amostra; OR: odds ratio; IC: Intervalo de confiança. RH: receptor hormonal; CEP8: sinais do cromossomo 8; QT: Quimioterapia

Fonte: Pereira *et al.*, 2013.

## O resultado do impacto da expressão proteica dos *status* dos genes nos achados clínico-patológicos

O estudo avaliou a expressão proteica e o *status* dos genes em rela o às variáveis clínicas. A expressão e o ganho de *MYC* foram mais frequentes associados a mulheres que desenvolveram a neoplasia mal gna em idade jovem (até 40 anos) quando comparado com as mulheres diagnosticadas com mais de 40 anos (Tabela 4.2 e 4.3). Os resultados mostraram ainda, uma associa o de prote o da presença da expressão positiva de RH nos tumores de maior agressividade, grau histológico 3. Por outro lado, a expressão proteica do gene *HER-2* e a presença de muta o do códon 12 de *KRAS* parecem sugerir um risco para tumores de grau

histológico 3 (OR: 0.23, 95% IC: 0.072-0.738) (Tabela 4.2). Foi encontrada uma associação entre tumores do subtipo molecular HER-2 e triplo negativo com tumores grau 3 histológico, quando comparados com aqueles classificados com subtipo molecular luminal A (Tabela 4.2 e 4.3). No entanto, a presença de mutação de *KRAS* foi a única variável independente observada no modelo final de regressão logística associada ao maior risco para a presença de tumor grau 3 histológico.

### **O impacto da proteína e do *status* dos genes na resposta à quimioterapia**

No presente estudo, as taxas de resposta clínica dos tumores mamários ao tratamento quimioterápico foi de 43%. Entre as pacientes que responderam ao tratamento, apenas 4 delas (8%) vieram à óbito ao final do estudo (tempo mínimo de seguimento de 12 meses). Essas pacientes apresentaram tempo livre de doença de dois anos após o tratamento para o câncer de mama primário.

A expressão de RH sugeriu ser um efeito protetor para a resistência ao tratamento (OR: 0.042, IC: 95%: 0.016-0.113) (Tabela 4.2). Por outro lado a expressão do gene *HER-2* e sua amplificação sugeriu ser um fator de risco para a resistência à quimioterapia, ambos no objeto do estudo (OR: 8.610, IC: 95% : 3.483-21.283;  $p=0,001$ , OR: 6.571, 95%, IC: 2.106 – 20.509, respectivamente) (Tabela 4.2 e 4.3).

Adicionalmente, os tumores classificados como HER-2 positivo (OR: 46.67 95%, IC: 9.229- 235.97) e triplo negativo (OR: 24.44, 95%, IC: 7.887-75.756) apresentaram uma associação com aumento de risco à resistência ao tratamento quimioterápico empregado, quando comparados aos tumores classificados como luminal A.

A expressão do gene *MYC* e sua amplificação mostraram uma maior associação com risco de resistência à quimioterapia administradas as pacientes, quando analisadas de forma univariável ( $p=0,01$ , OR: 3.154, 95%, IC: 1.318 – 17.547;  $p < 0.05$ , exceto quando o ponto de corte #4 foi aplicado, respectivamente) (Tabela 4.2 e 4.3).

O *odds ratio* foi calculado considerando o grupo resistente ao tratamento quimioterápico e relacionando ao grupo que obteve resposta clínica satisfatória. O modelo final incluiu a amplificação de *MYC*, definida como a razão *MYC*/núcleo  $\geq 2.5$  (ponto de corte #4;  $p=0.016$ , OR: 0.109, 95% IC: 0.018 – 0.664) e, esta razão se mostrou ser um fator protetor ao tratamento empregado. Por outro lado a idade ( $p=0.02$ , OR: 1.063, 95% IC: 1.01 - 1.12) parece ser um fator de risco para a resistência ao tratamento quimioterápico. Adicionalmente, os tumores classificados como subtipos moleculares: luminal B, HER-2 positivo e triplo-negativo (OR: 42.063, 95% IC: 2.956 - 598.51; OR: 172.754, 95% IC: 15.754 – 1894.386; OR: 49.008, 95%

IC: 8.789 – 273.268, respectivamente) apresentaram uma associação positiva com o risco de serem resistentes à quimioterapia quando comparados aos tumores do subtipo luminal A. Os tumores grau 2 histológicos (OR: 10.544, 95% IC: 1.087 – 102.252) também apresentaram uma associação positiva com o risco resistência ao tratamento quimioterápico aplicado quando comparados com os tumores grau 1. No entanto, nessa análise, quando se faz a correlação apenas entre os graus histológicos, não houve significância estatística entre os graus histológicos tumorais e a resposta ao tratamento na amostra estudada.

## 4.2 RESULTADOS DA ETAPA II

### **Caracterização da amostra**

Durante a pesquisa alguns parâmetros que não fazem parte da caracterização da amostra, e sim do fluxo dessas pacientes na busca de diagnóstico e tratamento foram avaliados, com a finalidade de detectar possíveis dificuldades ao acesso a rede pública, assim como também analisar o tempo de espera para o diagnóstico e o início do tratamento adequado.

O período entre a percepção da doença (constatação clínica ou radiológica do tumor) e o diagnóstico (data do resultado da biópsia) foi de  $9.23 \pm 6.01$  meses (variando entre 0 a 36 meses). O tempo transcorrido entre a percepção da doença e o diagnóstico foi de até 6 meses em 14 casos estudados (28%), 27 (54%) pacientes permaneceram de 7 a 12 meses com a constatação clínica do tumor, porém sem diagnóstico histopatológico, e 9 (18%) casos este período foi maior do que 13 meses.

Após o resultado da biópsia, marco em que consideramos como diagnóstico, foi mensurado o tempo entre este e o início do tratamento quimioterápico (data da infusão do primeiro ciclo de quimioterapia). Este início foi em 71.15% (37 pacientes) em até 60 dias, e no restante, totalizando 15 pacientes, o tratamento teve início com 61 dias ou mais.

Na etapa prospectiva do estudo foram incluídas 52 pacientes. A média de idade foi de  $43.92 \pm 9.65$  de idade (variando de 25 a 62 anos) . As pacientes com idade entre 51 e 62 anos apresentaram tumores responsivos na totalidade dos casos. A raça predominante foi a negra. A maioria das pacientes eram procedentes de outros municípios do Estado do Pará (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5** - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e características sociodemográficas, no período de 2012 a 2015.

Características sócio-demográficas	Resposta Patológica				TOTAL		p-valor
	Completa ou Parcial		Sem Resposta ou Progressão		n	%	
	n	%	n	%			
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>76.92</b>	<b>12</b>	<b>23.08</b>	<b>52</b>	<b>100.00</b>	<b>n.a.</b>
<b>Faixa Etária</b>							
25 a 40 anos	14	35.00	5	41.67	19	36.54	n.a.
41 a 50 anos	11	27.50	7	58.33	18	34.62	
51 a 62 anos	15	37.50	0	0.00	15	28.85	
<b>Cor</b>							
Branca	12	30.00	3	25.00	15	28.85	0.733
Parda	7	17.50	1	8.33	8	15.38	
Negra	21	52.50	8	66.67	29	55.77	
<b>Local de Residência</b>							
Belém	14	35.00	2	16.67	16	30.77	n.a.
Outros municípios do PA	24	60.00	10	83.33	34	65.38	
Fora do PA	2	5.00	0	0.00	2	3.85	

**Nota:** n.a. Não se aplica.

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

A média do início da vida reprodutiva, caracterizado pela menarca foi de  $13.25 \pm 1.67$  anos de idade. A maioria das mulheres não estavam na menopausa no momento do diagnóstico. Houve um maior número de mulheres com 3 ou mais gestações e, conseqüentemente com maior número de partos. Uma minoria delas teve o primeiro parto após os 35 anos de idade (Tabela 4.6).

**Tabela 4.6** - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e histórico hormonal e reprodutivo

Características do histórico hormonal e reprodutivo	Resposta Patológica				TOTAL		p-valor
	Completa ou Parcial		Sem Resposta ou Progressão		n	%	
	n	%	n	%			
<b>Idade na Menarca<sup>(1)</sup></b>							
9 a 12 anos	13	32.50	5	45.45	18	35.29	0.488
13 anos e mais	27	67.50	6	54.55	33	64.71	
<b>Estava na Menopausa</b>							
Não	27	67.50	11	91.67	38	73.08	0.144
Sim	13	32.50	1	8.33	14	26.92	
<b>Número de Gestações</b>							
Nuligesta	6	15.00	1	8.33	7	13.46	0.820
1 a 2 gestações	16	40.00	6	50.00	22	42.31	
3 gestações ou +	18	45.00	5	41.67	23	44.23	
<b>Número de Partos</b>							
Nulípara	6	15.00	1	8.33	7	13.46	0.820
1 a 3 partos	16	40.00	6	50.00	22	42.31	
4 a 17 partos	18	45.00	5	41.67	23	44.23	
<b>Idade no Primeiro Parto</b>							
Até 30 anos	17	50.00	5	45.45	22	48.89	1.000
20 a 34 anos	14	41.18	5	45.45	19	42.22	
35 anos ou mais	3	8.82	1	9.09	4	8.89	

**Nota:** <sup>(n)</sup> Corresponde ao número de casos com valores ausentes em cada variável.

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as pacientes que tinham histórico familiar de câncer de mama, com aquelas que não relataram histórico. Um pouco mais de ¾ das pacientes apresentavam índice de massa corpórea acima do considerado normal pela OMS (Tabela 4.7).

**Tabela 4.7** - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e fatores de risco

Fatores de risco	Resposta Patológica				TOTAL		p-valor
	Completa ou Parcial		Sem Resposta ou Progressão		n	%	
	n	%	n	%			
<b>Histórico Familiar de Câncer de Mama</b>							
Não	32	80.00	9	75.00	41	78.85	0.701
Sim	8	20.00	3	25.00	11	21.15	
<b>Tabagismo</b>							
Sim	33	82.50	11	91.67	44	84.62	0.663
Não	7	17.50	1	8.33	8	15.38	
<b>Categorias de Índice de Massa Corporal (IMC)</b>							
Baixo Peso	1	2.50	1	8.33	2	3.85	0.378
Peso Normal	10	25.00	1	8.33	11	21.15	
Sobrepeso	18	45.00	7	58.33	25	48.08	
Obesidade	11	27.50	3	25.00	14	26.92	

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

Na análise anatomopatológica, foi observado uma proporção semelhante entre os tumores com graus de menor agressividade (G1 e G2), com o de maior agressividade (G3). A maioria das pacientes apresentavam até três linfonodos axilares comprometidos em exame anatomopatológico realizado após os ciclos de quimioterapia neoadjuvante (Tabela 4.8).

O estadiamento clínico da totalidade das pacientes foi o III segundo a classificação TNM, e que para efeito didático foi subdividido em IIIA (23 casos), IIIB (26 casos) e IIIC (3 casos).

Das pacientes que apresentaram tumor responsivo ao esquema quimioterápico aplicado, 5 (9,61%) delas apresentaram resposta patológica completa.

**Tabela 4.8** - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e características anatomopatológicas

Características anatomopatológicas	Resposta Patológica				TOTAL		p-valor
	Completa ou Parcial		Sem Resposta ou Progressão		n	%	
	n	%	n	%			
<b>Grau Histológico<sup>(2)</sup></b>							
Grau 1 ou Grau 2	20	52.63	6	50.00	26	52.00	1.000
Grau 3 - pouco diferenciado	18	47.37	6	50.00	24	48.00	
<b>Número de Linfonodos Comprometidos</b>							
Até 3 linfonodos	27	71.05	3	50.00	30	68.18	0.364
4 ou mais linfonodos	11	28.95	3	50.00	14	31.82	

**Nota:** <sup>(n)</sup> Corresponde ao número de casos com valores ausentes em cada variável.

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

## Caracterização dos biomarcadores

A maioria das mulheres da amostra apresentavam após análise do perfil molecular do tumor presença da expressão de receptores hormonais, caracterizados como Luminais (englobando o luminal A e B). A amplificação do gene *MYC* teve uma associação significativa com os tumores que apresentaram resposta clínica ou patológica satisfatória, com redução de mais de 50% do volume tumoral ( $p= 0.005$ ). A ausência da mutação do códon 12 do gene *KRAS* foi estatisticamente significativa ( $p= 0.011$ ) na influência da resposta favorável do tumor ao tratamento aplicado (Tabela 4.11).

A porcentagem de concordância entre os resultados de IHQ e FISH para o gene *HER-2* foi de 55,7% ( $\kappa = 0, 258$ ; concordância pobre), já para o gene *MYC* esta concordância foi de 90,3% ( $\kappa = 0,740$ ; concordância intermediária para boa). Neste estudo, dez casos que obtiveram escore 0 ou 1+ pela IHQ, apresentaram amplificação gênica a técnica de FISH. Quando se analisa o gene *MYC*, 5 casos classificados como negativos pela IHQ apresentaram na técnica de FISH resultado duvidoso (quando a razão ficou entre  $<1,8$  a  $<2,2$ ). Na análise do gene *HER-2* por FISH, encontramos 23 amostras tumorais que apresentam amplificação gênica, e 13 casos com amplificação limítrofe.

**Tabela 4.9 - Avaliação do gene *HER-2* sob os testes usados IHQ e FISH**

HER2 IHQ	HER2 FISH			Total
	Negativo	Positivo	Limítrofe	
Negativo	16	10	13	39
Positivo	0	13	0	13
<b>Total</b>	16	23	13	52

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

**Tabela 4.10 - Classificação dos subtipos moleculares da amostra pela técnica de IHQ e FISH**

Subtipo molecular por IHQ	Subtipo molecular por FISH				Total
	<i>HER-2</i>	Luminal	TN	TP	
<i>HER-2</i>	5	0	0	0	5
Luminal	0	9	0	16	25
TN	7	0	7	0	14
TP	0	0	0	8	8
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>52</b>

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

**Tabela 4.11** - Distribuição das pacientes com câncer de mama localmente avançado segundo resposta patológica e biomarcadores

Biomarcadores	Resposta Patológica				TOTAL		p-valor
	Completa ou Parcial		Sem Resposta ou Progressão		n	%	
	n	%	n	%			
<b>Subtipo Molecular</b>							
Luminal	23	57.50	2	16.67	25	48.08	0.058
HER2+	3	7.50	2	16.67	5	9.62	
Triplo Negativo	9	22.50	5	41.67	14	26.92	
Triplo Positivo	5	12.50	3	25.00	8	15.38	
<b>MYC FISH</b>							
Amplificado	26	65.00	2	16.67	28	53.85	0.005
Limítrofe	9	22.50	2	41.67	11	26.92	
Não amplificado	5	12.50	8	41.67	13	19.23	
<b>KRAS</b>							
Mutado	3	7.50	6	41.67	9	15.38	0.011
Não Mutado	36	92.50	6	58.33	42	84.62	

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

Os resultados mostraram uma menor associação na resposta ao tratamento quimioterápico entre os tumores classificados como subtipo molecular HER-2 positivo quando comparados aos tumores luminais, ajustados pela amplificação do gene *MYC*, chegando a 59% dos casos.

Ocorreu uma menor associação entre a resposta ao tratamento quimioterápico entre os tumores subtipo molecular triplo negativo quando comparado com os tumores luminais, ajustados pela amplificação do gene *MYC*, chegando a 97%.

Foi observado ainda, nos resultados analisados que a chance do tumor responder ao tratamento parece ser maior entre os tumores com amplificação limítrofe de *MYC*, em relação aos tumores com a presença da amplificação em *MYC*, quando ajustado pelo subtipo molecular do tumor, chegando a 96%. Outra associação mostrou que o risco do tumor ser responsivo ao tratamento empregado parece ser muito menor (98%) entre os tumores que não apresentam amplificação de *MYC* quando comparados aos amplificados, ajustado pelos subtipos moleculares do tumor (Tabela 4.12).

**Tabela 4.12 - Resultados do modelo final de regressão logística**

	OR	IC <sub>95%</sub>
<b>Subtipo Molecular</b>		
Luminal	1.00	
HER2+	0.41	(0.00-0.87)
Triplo Negativo	0.15	(0.02-1.16)
Triplo Positivo	0.03	(0.00-0.53)
<b>MYC</b>		
Amplificado	1.00	
Limítrofe	0.04	(0.00-0.57)
Não amplificado	0.02	(0.00-0.39)

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

### Resultados das imagens da Ressonância Nuclear Magnética mamária

O padrão da imagem obtida pelo RNM mamária das pacientes da amostra na fase prospectiva foi avaliado e correlacionado ao subtipo molecular dos respectivos tumores. Este padrão foi analisado com base nas imagens das RNM realizadas antes do início da quimioterapia neoadjuvante. Não foi levado em consideração as imagens obtidas após a QT neoadjuvante, pois algumas pacientes tiveram redução completa ou quase completa do tumor, impossibilitando esta avaliação, e também para evitar que mudanças no padrão de imagem pudessem ser influenciadas pela ação da QT.

Das 52 pacientes incluídas na pesquisa, apenas uma paciente teve que ser excluída desta avaliação, pois seu exame apresentou problemas técnicos no processamento das imagens geradas, totalizando ao final 51 ressonâncias mamárias. Para obter esta correlação entre os achados de imagens da RNM e o perfil molecular do tumor, a técnica de FISH foi a escolhida para a classificação molecular e não o resultado da imunohistoquímica, visto que, nesta fase do estudo tivemos uma concordância pobre entre as técnicas aplicadas para classificação tumoral (IHQ e FISH).

Do total de imagens analisadas, 10 pacientes apresentavam perfil molecular triplo negativo. Na RNM observamos que 70% destas pacientes apresentaram lesão única ao exame de imagem.

Nas pacientes que foram classificadas como subtipo molecular HER-2 positivo, 66,7% delas apresentavam lesões multifocais e/ou multicêntricas, ou um padrão de massa tumoral não definida. Nos tumores classificados como luminais ou luminais/HER-2 não houve uma característica predominante das lesões encontradas. Estas variaram entre lesões multicêntricas em 55,5%, lesão única em 33,3% e presença de realce em 11,1% dos casos.

Em nosso estudo não observamos diferenças significativas para avaliar a resposta clínica do tumor através de exame clínico quando comparadas com a mensuração tumoral através da imagem gerada pela RNM, fortalecendo a nosso ver, que o exame clínico é um excelente

método de avaliação de resposta clínica tumoral, desde que aplicado pelos mesmos examinadores e de maneira sistemática, obedecendo parâmetros de mensuração, como foi o realizado em nosso trabalho, feito pela mesma equipe de mastologistas e com uso de paquímetro para o auxílio desta medição.

### **Resultado do sequenciamento genético**

A primeira reação de sequenciamento abrangeu as amostras de 10 pacientes (Tabela 4.13, coluna da esquerda) que resultou em 53% de esferas clonais com 2124099 fragmentos lidos (*reads*), sendo 313 Megabases (Mb) com índice de qualidade igual a 20 (AQ20). O tamanho das *reads* apresentou uma média de 170 pb e uma mediana de 182 pb. Destes, 99,5% alinharam com as sequências de referência dos genes alvo.

Já o segundo sequenciamento foi realizado com as amostras de 9 pacientes (Tabela 4.13, coluna da direita). A reação resultou em 67% de clonalidade das quais 3295493 *reads* foram aproveitadas totalizando 495 Mb com qualidade AQ20. A média de tamanho das *reads* foi de 173 pb e uma mediana de 185 pb e 99% alinharam com as sequências de referência dos genes estudados.

O número de variantes encontrada em cada amostra, tomando como referência o genoma humano versão hg19, está descrito na Tabela 4.13. A cobertura média de todas as amostras foi de 337,7. A menor cobertura foi observada na paciente 7 da Tabela 4.13 (88,2) e a maior na paciente 1 da Tabela 4.13 (546,2). Em todos os casos, o resultado foi bastante satisfatório, pois em todas as amostras, a cobertura foi superior a 30 vezes, que é a mínima recomendada para a análise de mutações germinativas (Tabela 4.13).

Com base nos bancos de dados pesquisados pela ferramenta de análises de variantes Ingenuity (<http://www.ingenuity.com/products/variant-analysis>), foram identificadas quatro variações de significância incerta e mais sete mutações com relevância de patogenicidade. Das 19 pacientes, oito delas apresentaram mutações, sendo cinco com significância de patogenicidade. As mutações mais comuns encontradas na amostra encontravam-se nos genes *BRCA1* e *BARD1* (3 cada uma). As demais mutações foram encontradas nos genes *BRIP1* (2), *BRCA2*, *MRE11A* e *ATM*. Todas as sequências foram avaliadas com base no genoma hg19 (GRCh37) e todas as variantes descritas foram confirmadas por sequenciamento direto.

As mutações em *BRCA1* foram encontradas somente em pacientes com perfil molecular triplo negativo. Por outro lado, as mutações em *BARD1* foram relacionadas às pacientes com fenótipo luminal A (2 de 3) e uma paciente triplo negativo. Mutações em *BRIP1* foram descritas

em duas pacientes com fenótipo molecular luminal A e a única mutação em *BRCA2* foi encontrada em uma paciente com fenótipo molecular luminal A.

Dentre os fenótipos de câncer de mama das pacientes analisadas, o triplo negativo foi o mais comum, sendo três mutações de relevância patogênica e uma com variação de significância incerta, seguida por três pacientes luminais A (2 relevância patogênica e 1 com variação de significância incerta) e apenas uma paciente com fenótipo luminal B/HER2 enriquecido. Considerando as pacientes que carregam mutações dentre as dezenove estudadas, nenhuma era exclusivamente luminal B ou HER2 positiva.

A amostra 10 da Tabela 4.13, descrita abaixo, apresentou deleção de uma sequência CT na posição 41242980 de *BRCA1* (p.S1342; delCT) em heterozigose. Essa mutação gerou uma alteração no quadro de leitura (*frameshift*) que provavelmente gerou um códon de parada TGA logo após a serina 1342, gerando uma proteína truncada (Fig. 4.3A).

**Tabela 4.13** - Número de variantes das pacientes sequenciadas e cobertura média para os alvos selecionados

amostra	número de variantes	cobertura média (reads)	amostra	número de variantes	cobertura média (reads)
1	69	546,2	11	103	274,8
2	36	343,4	12	108	295,4
3	83	522,6	13	96	290,3
4	70	476,1	14	107	235,8
5	47	448,9	15	76	277,3
6	77	499,2	16	112	309,9
7	78	88,2	17	93	209,2
8	59	480	18	85	262
9	91	297,4	19	92	255,1
10	102	304,8			

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

A amostra 16 da tabela acima apresentou duas mutações: uma em *BRCA1* e outra em *BARD1*, ambas em heterozigose. A mutação *BRCA1* fica numa região de *splicing* descrita no banco dbSNP com o código rs80358089. De acordo com o banco de dados ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), este alelo tem relevância patogênica (Fig. 4.3B). Foi encontrada também uma deleção da sequência TTGCCTGAATGTTCTTCACCA de 21 pares de base no gene *BARD1* que abrange a região intrônica e exônica gerando uma perda de 5 aminoácidos da sequência da proteína (p.L340\_P346del). A mesma mutação também foi encontrada nas amostras 2 e 4 da Tabela 4.13, em heterozigose. De acordo com a base dbSNP (rs28997575), esta variante não foi mencionada como patogênica, embora a ferramenta de análise de variantes do Ingenuity a tenha descrito como provavelmente patogênica, talvez devido a alteração na sequência de aminoácidos. Porém, a presença de três amostras (16, 2 e 4)

com a mesma variante e a frequência de 4,47% na base de dados 1000 Genomes pode indicar que esta alteração pode ser um polimorfismo.

A terceira mutação em *BRCA1* em heterozigose foi encontrada na amostra 5 da Tabela 4.13, cuja deleção de uma base G na posição 41209079 gerou um *frameshift* (p.Q1709fs\*74) (Fig 4.3C). Esta mutação está registrada na base dbSNP (rs397507247) e de acordo com a ferramenta ClinVar é descrita como patogênica.

Além da variante em *BARD1*, a amostra 4 da Tabela 4.13 possui uma substituição do alelo A para G no gene *BRIP1* na posição 59886018 em heterozigose. Esta variação causou uma alteração missense (p.I243T) da proteína, que não está descrita em nenhuma das bases de dados estudadas, embora a ferramenta SIFT conclua que esta alteração é danosa para a proteína. Novos estudos poderão elucidar se esta variante realmente tem impacto clínico.

Outra possível mutação em *BRIP1* na posição 59763389 foi encontrada na paciente 3. Esta variação causou a troca de uma base T por uma C em heterozigose gerando uma mudança na sequência da proteína (p.N905D). Esta variante foi classificada como de significância incerta, pois não há dados descritos até o momento nos bancos de dados estudados. Da mesma forma, outra variante de significância incerta no gene *BRCA2* em heterozigose foi encontrada na mesma paciente. Neste caso, houve a troca de um alelo C por outro T na posição 32915046 (p.A2185V).

Uma variante de significância incerta foi observada na paciente 6 da Tabela 4.13, localizada no gene *MRE11A* na posição 94179032 em heterozigose, gerando uma troca de aminoácido (p.R604P). Esta variante está descrita no dbSNP (rs148637964), e de acordo com o banco de dados ClinVar, sua significância para patogenicidade é incerta.

Por fim, uma variante de significância incerta em heterozigose foi detectada no gene *ATM* da amostra 2 da Tabela 4.13. Neste indivíduo, a substituição do alelo C para o alelo G ocorreu na posição 108216533 gerando uma variável missense da proteína (p.Q2828E).

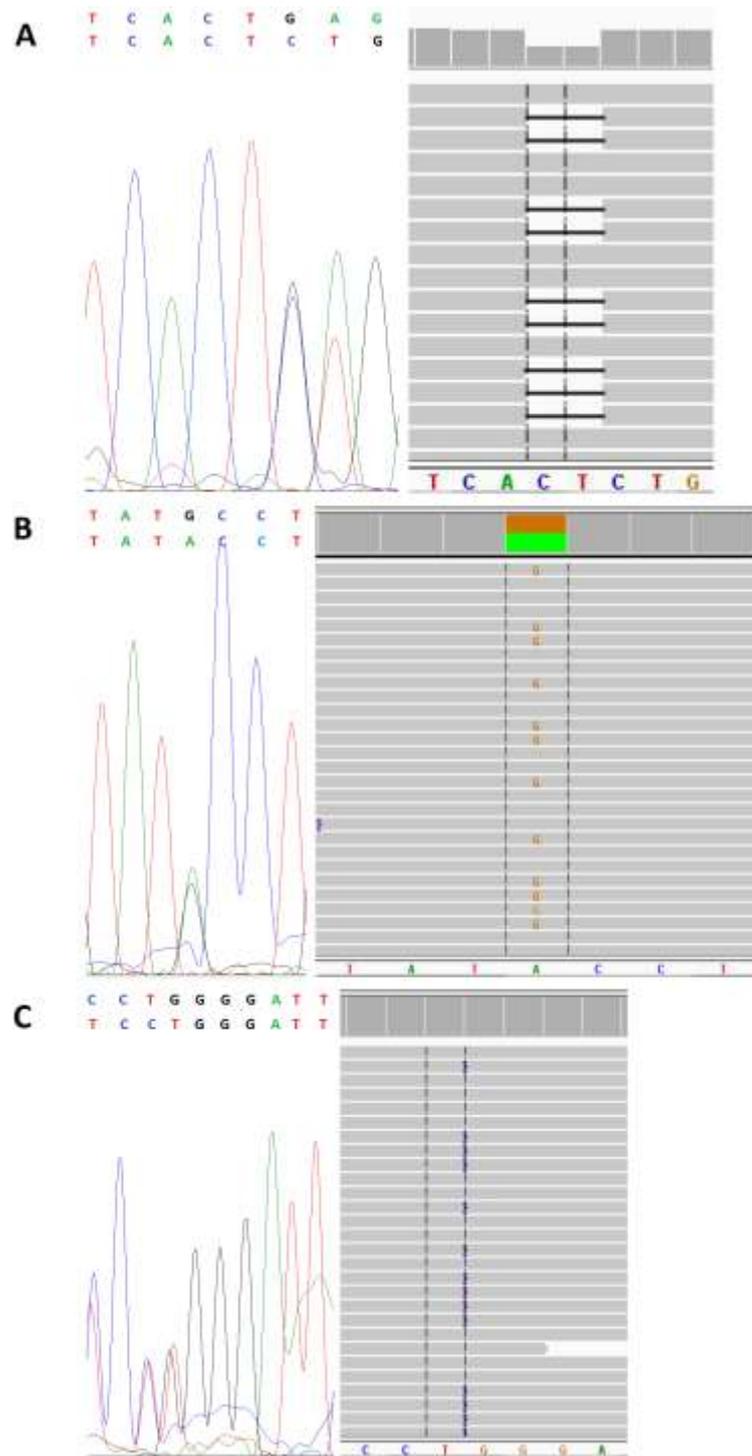
**Quadro 4.1** – Características clínicas das pacientes com mutação patogênica

Paciente	Idade (anos)	Mutação	Subtipo molecular	Resposta ao tratamento	Evolução
1	35	BARD1	Luminal A	Clínica completa	Recidiva locorregional com 2 anos de seguimento
2	37	BARD1	Luminal A	Clínica completa	Sem recidiva , 2 anos de seguimento
3	28	BRCA1	Triplo negativo	Clínica parcial >50% do tumor	Recidiva locorregional cm 1,5 anos de seguimento
4	37	BRCA1	Triplo negativo	Clínica parcal >50% do tumor	Sem recidiva, 2 anos de seguimento
5	39	BRCA1/ BARD1	Triplo negativo	Clínica completa	Sem recidiva, após 2,5 nos de seguimento

Fonte: Dados da pesquisa, 2015.

O sequenciamento genético foi realizado em todas as pacientes do estudo que foram diagnosticadas com câncer de mama até os 40 anos de idade. Após o resultado do exame genético e a identificação das mulheres portadoras de mutações genéticas patogênicas, foi informado a presença da mutação encontrada e seu significado clínico. Essas informações após o consentimento dessas pacientes, foi repassado a toda equipe clínica (Oncologista clínico, Mastologista, Radioterapeuta). Os familiares destes pacientes foram orientados quanto aos riscos da presença da mutação familiar, e estão sendo acompanhados com consultas e exames de rastreamento de câncer de mama.

Previamente ao início deste estudo, não havia no Estado do Pará, um serviço de aconselhamento de câncer familiar estruturado, porém após os resultados encontrados neste trabalho, onde foi observado que a maior parte das mulheres que apresentaram mutações patogênicas, não relatavam presença de histórico familiar de câncer de mama ou de outros sítios. Uma outra observação importante é como seguir essas mulheres e seus familiares. Então este trabalho alavancou um projeto que já vinha sendo desenhado e estruturado com a finalidade de formação de um serviço que pudesse oferecer aconselhamento genético a essas mulheres e seus familiares próximos. O Hospital Ophir Loyola adquiriu em janeiro de 2016 um laboratório de genética e biologia molecular, o primeiro da região Norte, voltado a assistência hospitalar. Este laboratório contém um sequenciador genético de nova geração, como também toda uma estrutura para pesquisas de mutações genéticas e outros exames importantes no auxílio do tratamento oncológico e outras doenças.



**Figura 4.3** – Confirmação do sequenciamento genético das mutações encontradas na população pesquisada

**Nota:** À esquerda são representados os eletroferogramas correspondentes ao sequenciamento direto. A sequência abaixo (mais próximas aos picos) é idêntica ao genoma de referência. A sequência acima se refere a variante encontrada. À direita são mostrados os gráficos do programa IGV representando as *reads* sequenciadas por NGS. **A.** Deleção de CT em heterozigose. Essa variação causou um *frameshift* evidenciado pelos picos duplos no eletroferograma após a deleção. **B.** Troca de uma base A por uma base G. **C.** Inserção de uma base G.

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

## 5 DISCUSSÃO

Em nosso conhecimento, este estudo foi pioneiro em correlacionar os achados clínico-patológicos e moleculares com a resposta clínica tumoral à quimioterapia neoadjuvante, tendo como o auxílio a avaliação de biomarcadores (*MYC*, *KRAS*, *HER-2* e receptores hormonais).

A pesquisa foi conduzida de forma criteriosa, atentando para a garantia e o controle de qualidade em todas as etapas.

A interpretação dos resultados obtidos, as limitações encontradas e as implicações para estudos futuros são discutidas a seguir.

O câncer de mama com o passar dos anos vem confirmando o quanto é complexo e heterogêneo o seu comportamento molecular e demonstra também, o grande número de genes potencialmente envolvidos no controle do crescimento, morte e diferenciação celular, levando a grandes diferenças no comportamento clínico e nas respostas tumorais as terapias empregadas (SØRLIE *et al.*, 2001). A identificação de subpopulações de pacientes que provavelmente terão melhores respostas da doença frente a determinada terapia preconizada é o objetivo central da medicina molecular moderna.

Muitas análises são realizadas na identificação de fatores de risco que estão envolvidos na progressão do câncer, em especial do câncer de mama, que é objeto de nosso estudo. A resposta histopatológica observada frente a administração de quimioterapia neoadjuvante é um dos preditores mais fortes no prognóstico de pacientes com câncer de mama. Biomarcadores têm sido descritos e pesquisados, e são úteis como ferramentas na avaliação prognóstica, ou na predição de respostas terapêuticas.

Diferentes regimes de quimioterapia são aplicados dentro da oncologia, podendo ser administrados tanto previamente, assim como, após tratamento cirúrgico. Entretanto, a identificação da melhor terapia a ser disponibilizada ainda é motivo de investigações atuais e futuras.

Apesar da amostra do estudo ter sido de conveniência, provavelmente as mulheres potencialmente elegíveis para este trabalho foram representativas da população com câncer de mama em Belém, em razão do Hospital Ophir Loyola atuar como hospital de referência para o tratamento de doenças malignas, na rede de assistência municipal e estadual do Estado do Pará-Região Norte.

Na **primeira etapa** do trabalho foi avaliado o possível significado prognóstico e preditivo das alterações dos genes *MYC* e *KRAS*, concomitantemente com o padrão de RE, RP

e *HER-2*, em pacientes com câncer de mama localmente avançado tratados com quimioterapia neoadjuvante com a administração de doxorubicina e ciclofosfamida (Anexo B).

Nos primeiros resultados foi observado que 24% dos tumores apresentavam amplificação de *HER-2*, corroborando com os estudos prévios (18-20%) (SLAMON *et al.*, 1987). A amplificação de *HER-2* é o primeiro mecanismo da super-expressão de *HER-2* (AKIYAMA; YAMADA, S. YAMADA, K., 1986). Embora a concordância entre IHC e FISH tenha sido excelente, 5 casos foram discordantes entre essas técnicas, onde receberam escore 1+ pela IHC e apresentaram amplificação do gene *HER-2*. Desde a padronização dos estudos imunohistoquímicos, testes podem ser afetados por fatores analíticos e pré analíticos, e vários grupos têm sugerido a utilização de resultados da proteína *HER-2* pela técnica de FISH nos cânceres de mama (MARTIN *et al.*, 2012).

Várias definições para a amplificação de *MYC* são usadas em estudos de câncer de mama. Entretanto, estas diferentes definições conduzem a resultados inconsistentes relativo ao papel do gene *MYC* na carcinogênese mamária. Neste trabalho, foi aplicado diferentes pontos de corte para definir a amplificação de *MYC* como anteriormente descrito, incluindo a aceitação do baixo ganho de *MYC* com ou sem polissomia do cromossomo 8. A frequência da amplificação de *MYC* foi de 11.2% (ponto de corte #1) para 76.7% (ponto de corte #1) em nossas amostras. Embora haja uma associação entre a amplificação de *MYC* e sua expressão, como descritos em trabalhos prévios, nossos dados confirmam que outros mecanismos de amplificação gênica estão envolvidos na super-expressão de *MYC* no câncer de mama (XU; CHEN; OLOPADE, 2010). Entretanto, as avaliações da expressão de *MYC* por meio de IHC leva a variados resultados dependendo do anticorpo usado, do protocolo estabelecido e do sistema de *score* aplicado, destacando que a técnica de FISH pode ser uma ferramenta interessante na prática clínica devido sua reprodutividade (CHEN; OLOPADE, 2008).

Foi observado ainda neste estudo que a amplificação de *MYC* e sua expressão proteica parece ser mais associada nos tumores mamários que não expressam receptor de estrogênio e de progesterona, corroborando com estudos prévios (PEREZ *et al.*, 2011). Entretanto, algumas investigações não mostraram este achado, ou pelo contrário, mostraram uma correlação inversa ao observado na revisão anterior (LIAO; DICKSON, 2000). Os achados na literatura são inconsistentes na associação entre a amplificação de *MYC* e os parâmetros clínico-patológicos do câncer de mama, e isto se deve provavelmente, a falta de pontos de corte unificados na definição da amplificação deste gene. Uma meta-análise observou que a única associação estatisticamente significativa foi da correlação da amplificação de *MYC* com a ausência da expressão proteica da progesterona (DEMING *et al.*, 2000).

Em nossos achados foi detectado uma associação entre a amplificação de *MYC* e *HER-2*, como anteriormente relatada (AL-KURAYA *et al.*, 2004). Foi também observado uma associação entre a super-expressão/amplificação de *MYC* com os subtipos moleculares luminal B ou *HER-2* positivo em relação ao luminal A. Esses achados sugerem que o gene *MYC* pode estar envolvido em vias de sinalização específicas para cada subtipo molecular.

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que relata a associação do gene *MYC* no câncer de mama primário. O mecanismo exato no qual o gene *MYC* pode estar envolvido em tumores de idade jovem precisa ser elucidado. Entretanto, a amplificação de *MYC* parece está associada na inativação do gene *BRCA-1* em um grupo de câncer de mama hereditário e esporádico. *BRCA-1* está usualmente associado com tumores em pacientes jovens, com um fenótipos distintos caracterizado por grau tumoral elevado, aneuploidia, taxas altas de proliferação e expressão negativa para receptor de estrogênio. A investigação de alvos do *MYC* é ainda necessária para o melhor entendimento da heterogeneidade do câncer de mama (GRUSHKO *et al.*, 2004).

A amplificação de *MYC*, assim como a do gene *HER-2* são associadas com a mutação do códon 12 do gene *KRAS*. Nas células do câncer de mama, o *KRAS* pode ser ativado pela via de *HER-2*, reforçado pelo acúmulo da atividade de *MYC*, que pode levar a instabilidade do cromossomo e contribuir para a amplificação do *MYC* (CLEATOR; PARTON; DOWSETT, 2012). A mutação de *KRAS* foi identificada em 7.76% das amostras tumorais, corroborando com estudos prévios que relatam que a frequência da mutação de *KRAS* no câncer de mama gira ao redor de 5-10% dos casos (KARNOUB; WEINBERG, 2008). Mais de um caso de tumor com super-expressão de *HER-2* ou triplo negativo apresentaram mutação de *KRAS*, embora estudos prévios não mostram a associação entre *KRAS* e subtipo molecular triplo negativo. Acreditamos que seja pela baixa frequência desta mutação observada em tumores mamários. Entretanto um aumento no número de tumores estudados será essencial para promover evidências no papel do *KRAS* na carcinogênese mamária (SÁNCHEZ-MUÑOZ *et al.*, 2010; MARTIN *et al.*, 2012).

Em nossa população, o perfil molecular *HER-2* positivo e triplo negativo são mais frequentemente associados aos graus mais agressivos do tumor, como o grau 3, e consequentemente apresentam fenótipos mais agressivos. Adicionalmente, nós observamos que a mutação do códon 12 do gene *KRAS* poderá ser um meio de avaliar resposta em tumores com grau 3 histológico. Devido sua baixa frequência, investigações futuras ainda são necessárias para avaliar quando a mutação do códon 12 de *KRAS* pode prever um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (SØRLIE *et al.*, 2001; VAN 'T VEER *et al.*, 2002).

Em relação a resposta a quimioterapia, nós observamos que os receptores hormonais podem prever a quimiossensibilidade, como anteriormente relatado. Em outra direção, a amplificação de *HER-2* ou sua super-expressão predizem resistência aos antracíclicos em nossas pacientes, destacando que este grupo de pacientes pode ser adequado para tratamento com anticorpo monoclonal trastuzumab (CLEATOR; PARTON; DOWSETT, 2012).

A expressão de *MYC*, assim como sua amplificação, foi fator de risco (exceto com baixo ganho) para a quimiorresistência quando avaliado por meio de regressão logística univariada. Entretanto, na análise multivariada para identificar fatores de predição de resistência para doxorrubicina associado a ciclofosfamida, nós observamos que este gene foi um fator de quimiossensibilidade quando ajustado pelo grau histológico, idade, e fenótipos moleculares. Este achado deve-se, provavelmente, a significativa associação entre *MYC* com receptores hormonais (bom prognóstico) e *HER-2* (mau prognóstico).

O gene *MYC* pode ter uma dupla função na célula do câncer, isto é, promove proliferação celular e induz a apoptose, dependendo dos antecedentes moleculares e do microambiente tumoral. Células em proliferação são mais sensíveis à quimioterapia, isto pode sugerir que *MYC* pode ser sensível em células de câncer de mama para a apoptose. Estudos prévios, *in vitro*, demonstraram o aumento da sensibilidade de células de câncer de mama com a amplificação de gene *MYC* para o paclitaxel seguido de FEC (5-fluoracil+epirrubicina+ciclofosfamida) por meio de análise univariada. Entretanto a análise multivariada falhou na demonstração desta associação (PELENGARIS; KHAN, 2003, YASOJIMA *et al.*, 2011).

Um estudo conduzido por Todorovic-Rakovic e colaboradores (2012), sem a realização de análise multivariada, concluiu que pacientes com amplificação de *MYC* tratadas com quimioterapia (CMF ou FEC) tinham benefícios clínicos em contraste com pacientes que não apresentavam a amplificação. Perez e colaboradores (2011), relataram que tumores com ganho de *MYC* ou polissomia do cromossomo 8 mostravam um maior benefício com o uso de trastuzumab, quando comparado com tumores sem esta alteração. Este autor também relatou que pacientes com co-amplificação de *MYC* e *HER-2* tiveram um benefício significativo maior com o trastuzumab do que pacientes com a amplificação apenas em *HER-2*. Nossos resultados, assim como esses da literatura sugerem que a amplificação de *MYC* pode ser usada como um fator de predição de quimiossensibilidade e na indicação do tratamento. Entretanto, é importante que vários marcadores sejam avaliados para experimentar e determinar um modelo estatístico aplicável na identificação de pacientes que poderiam apresentar melhores respostas ao tratamento indicado.

Na **segunda etapa** do trabalho foi avaliado o efeito dos achados clínico-patológicos e moleculares na resposta à quimioterapia neoadjuvante com a administração de doxorubicina e ciclofosfamida e **adição de taxane**, em pacientes com câncer de mama localmente avançado. Foi pesquisado também o possível significado prognóstico e preditivo das alterações dos genes *MYC* e *KRAS*, concomitantemente com o padrão de RE, RP e *HER-2*, nessas pacientes (ANEXO A). Ainda nesta etapa foi desenado um painel contendo 17 genes com a finalidade de associar a presença de possíveis mutações germinativas na resposta à quimioterapia neoadjuvante, em pacientes que desenvolveram a doença até os 40 anos de idade. Nesta etapa atual, a adição de taxane foi proposta com base em ensaios clínicos mais recentes que adicionaram o uso de taxane ao esquema quimioterápico anteriormente aplicado. Neste novo esquema terapêutico foi demonstrado o benefício nas taxas de resposta patológica completa em até 26% , quando comparadas com o esquema anterior que alcançava taxas de 13%, assim como demonstrou também uma diminuição na presença de linfonodos comprometidos pela neoplasia em peças cirúrgicas, e um aumento nas taxas de cirurgias conservadoras. Embora esses ensaios não tenham observado aumento no tempo livre de doença e sobrevida global, os pacientes que alcançaram resposta patológica completa após o tratamento, tiveram impacto positivo na sobrevida (BEAR *et al.*, 2006; RASTOGI *et al.*, 2008). Apesar da discordância existente no papel da neoadjuvância na influência da sobrevida global, a grande maioria deles, por outro lado, pactuam que esta forma de terapia aumenta o número de cirurgias conservadoras, como a quadrantectomia. É consenso também que a neoadjuvância pode avaliar marcadores de predição de resposta, e mecanismos de resistência do tumor, com maior rapidez do que na terapia adjuvante (SMITH *et al.*, 2002, RASTOGI *et al.*, 2008; GAMPENRIEDER; RINNERTHALER; GREIL, 2013; PARK *et al.*, 2015,). Os estudos mais recentes mostram que a resposta patológica completa do tumor é forte ferramenta para a determinação da sobrevida global. (YANG, 2016).

As pacientes que estavam dentro da faixa etária entre 51 a 62 anos, ao diagnóstico da doença, apresentaram na sua totalidade, resposta clínica satisfatória. Nesta faixa etária, a maioria dos tumores mamários têm expressão proteica positiva para receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona), assim como uma alta porcentagem de tumores com subtipo molecular luminal A, conferindo tumores com características biológicas mais indolentes, conduzindo a uma menor agressividade tumoral e, possível melhor resposta terapêutica (TEW *et al.*, 2014). No entanto, alguns ensaios clínicos demonstraram que tumores mamários receptores hormonais positivos teriam uma menor resposta patológica completa (RPC), com terapia neoadjuvante, quando comparados com os tumores *HER-2* positivos e triplo negativos.

Esta resposta mais pobre, pode ser explicada nestes casos, pois nestes subtipos moleculares que expressam receptores hormonais, a terapia alvo é reservada para a adjuvância, com a administração de hormonioterapia, e adicionalmente a administração de mais dois ciclos de quimioterapia poderia influenciar no aumento nas taxas de RPC, com esquema contendo antracíclicos (HUOBER *et al.*, 2010; VON MINCKWITZ; FONTANELLA, 2013). Em um estudo que comparou as características patológicas de não resposta a quimioterapia neoadjuvante, os tumores que expressavam receptores de estrogênio e progesterona apresentaram maior taxas de não resposta do que resposta a esta terapia (BALMATIVOLA *et al.*, 2014).

O histórico hormonal e reprodutor das participantes do estudo (idade da menarca, o *status* da menopausa, a idade do primeiro filho) não influenciou na resposta à quimioterapia neoadjuvante. Esses fatores têm correlação com o risco para o desenvolvimento da doença, porém isoladamente, não interferem na resposta ao tratamento sistêmico (HULKA, MOORMAN, 2008; CGHFBC, 2012).

Ao momento do diagnóstico das pacientes envolvidas no estudo, 75% delas, apresentavam seu índice de massa corpórea maior ou igual a 25, o que é considerado acima da faixa de normalidade segundo a Organização Mundial da Saúde. A influência da obesidade já é bem estabelecida na literatura, como sendo um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (MICHELS *et al.*, 2007; AMARAL, 2010; RAMOS-NINO, 2013; KAMINSKA *et al.*, 2015).

A amplificação do gene *HER-2* foi observada em um pouco menos que 10% nas amostras tumorais, quando avaliadas pela técnica de imunohistoquímica, uma porcentagem um pouco menor do que relata a literatura, que gira ao redor de 15% a 20% (SLAMON *et al.*, 1987; BRAVATÀ *et al.*, 2013; PANIS *et al.* 2015). Quando esta análise da amplificação gênica é feita pela técnica de FISH, achamos um total de 23 pacientes com tumores enriquecidos por *HER-2*, representando 44,23% dos casos estudados. Este valor é bastante expressivo, sendo bem acima ao encontrado em estudo brasileiro sobre as incidências dos subtipos moleculares nas diversas regiões brasileiras. Na região Norte, embora seja a que mais expressa *HER-2*, a incidência de tumores enriquecidos por este gene é de 24% (CARVALHO *et al.*, 2014). Acreditamos que este resultado discordante da literatura se deva a característica da amostra estudada, com tumores com alta agressividade e estadiamento clínico elevado.

Na primeira etapa do trabalho, a concordância entre as técnicas aplicadas na investigação de *HER-2*, foi excelente, entretanto, nesta segunda etapa, foi considerada pobre, com apenas 55,7% de concordância, (índice de kappa : 0,258). Este fato pode ter ocorrido

talvez, pela aplicação de métodos diferentes para a recuperação antigênica e de amplificação, como também pela utilização de clones diferentes de anticorpos primários, e pela possível variabilidade interobservador. Uma outra hipótese para esta divergência entre técnicas, pode ser justificada com base em alguns estudos que já relatam a superioridade da técnica de FISH, na análise de *HER-2*, quando comparada com a técnica de IHQ. Uma pesquisa publicada recentemente, que analisou a expressão do gene *HER-2* em amostras tumorais de pacientes com carcinoma mamário, por diferentes técnicas moleculares (IHQ, FISH e PCR), observou que um número de pacientes classificadas como negativas para a expressão de *HER-2*, pelas técnicas de IHQ e FISH, tinham em suas dosagens séricas, altos níveis proteicos de calpain-10, que é uma proteína encontrada em tumores mamários e, está associada a tumores de pior prognóstico. O estudo sugeriu que a super-expressão de calpain-10, em tumores com fenótipo negativo para *HER-2*, ocorreria devido a perda do domínio extracelular deste gene no câncer de mama, que é o domínio que confere o fenótipo do tumor, porém a célula tumoral permaneceria com o domínio intracelular, que é domínio responsável pela ativação de proteínas tirosino quinases (PANIS *et al.*, 2015). Na atualidade, já existem terapias específicas para estas proteínas, como também para a amplificação de *HER-2*, as chamadas terapias alvos, que já se mostram bastante efetivas na redução tumoral. A perda do domínio extracelular, pode acarretar em não detecção de tumores que apresentam um comportamento mais agressivo, comprometendo a indicação de terapia mais adequada para os pacientes em questão, assim como no tempo livre de doença e sobrevida global. (SHARMA *et al.*, 2010; UENO; ZHANG, 2011; BASELGA *et al.* 2012).

Foi observado ainda nesta segunda fase do estudo, que tumores com amplificação do gene *HER-2* tem uma associação estatisticamente significativa ( $p = 0.002$ ) com a expressão proteica positiva para *MYC*, o que nos faz acreditar que a adição do taxane não altera a biologia tumoral quando acrescentada ao regime contendo antracíclico e ciclofosfamida, em neoadjuvância. Foi feito modelo estatístico comparando a amplificação dos genes *MYC* e *HER-2* associados com a resposta clínica à quimioterapia neoadjuvante, e não encontrada significância estatística nestas associações. Pacientes com câncer de mama que tem co-amplificação desses genes tem substancialmente piores desfechos do que os pacientes que apresentam uma amplificação única em um dos genes. Este fato foi observado em um estudo randomizado, e a hipótese para este resultado é que a amplificação de *MYC* pode conferir resistência a terapia com trastuzumab em pacientes com fenótipo *HER-2* positivo (KIM *et al.*, 2005; PEREZ *et al.*, 2011). Porém este estudo contradiz um ensaio clínico, batizado de B31 e realizado pelo NSABP, onde neste a co-amplificação dos genes *MYC* e *HER-2* mostrou benefício maior ao uso de trastuzumab quando usada em adjuvância (PEREZ *et al.*, 2011).

Em referência ao gene *MYC*, o seu papel como vias de sinalização comandado pela ativação de *HER-2*, é controversa. No câncer de mama, as alterações do gene *MYC* parece afetar as respostas a terapias específicas e a co-existência de *HER-2* com a amplificação de *MYC*, foi correlacionada a um pior prognóstico. Em nosso estudo foi observada uma maior frequência absoluta nos tumores com amplificação gênica de *HER-2* e que não foram responsivos à quimioterapia. (CHEN; OLOPADE, 2008; PEREZ *et al.*, 2011).

Apesar da excelente concordância encontrada entre a IHQ e o FISH na pesquisa de *MYC*, na primeira fase do estudo, ainda tivemos casos, principalmente nesta segunda fase do estudo, em que a presença do gene só foi evidenciada pela técnica de FISH, por isso, alguns trabalhos sugerem que o FISH é o exame padrão ouro na análise deste gene (SINGHI *et al.*, 2012).

Não foi observado associação significativa entre a amplificação de *MYC* e os subtipos moleculares, como também no grau histológico tumoral. Encontramos apenas uma maior frequência nos subtipos moleculares: luminal e *HER-2* positivo. Este resultado não condiz com os achados de Chen e Olopade (2008) em estudo prévio. Na casuística daquele grupo, a amplificação de *MYC* foi mais associada aos subtipos moleculares triplo negativo, e em menor número nos luminais e *HER-2* positivo. O que nos faz pensar que a pouca consistência entre a correlação de *MYC* com os subtipos moleculares e achados histopatológicos se deve a grande heterogeneidade do câncer de mama e a diversidade nos métodos empregados nas pesquisas.

Apesar da baixa frequência de mutação da *KRAS* nas amostras do estudo (15,38%), o encontrado foi discretamente superior ao encontrado por Boquett e Ferreira, 2010. Porém esta mutação foi encontrada em até 49% das amostras de câncer de mama, em outro estudo. Porém neste, as mutações foram pesquisadas nos códons 12, 13 e 61, o que nos faz acreditar que os tumores de nosso estudo poderiam ter um maior número de mutações se mais códons fossem pesquisados (LEUNG *et al.* 2012). Encontramos uma associação estatisticamente significativa entre o estadiamento clínico e a presença da mutação em *KRAS* ( $p= 0.05$ ). Apesar de todas as pacientes do estudo, no momento do diagnóstico, estarem classificadas com estadiamento clínico III, algumas delas apresentavam maior volume tumoral, e também um maior comprometimento axilar, daí serem subclassificadas em IIIA, IIIB e IIIC. A maior frequência de mutações ocorreu nas paciente com EC IIIC. Nas estadiadas como EC IIIA, não houve mutação no códon 12 de *KRAS* em nenhuma amostra tumoral. Este achado se deve provavelmente, a maior agressividade dos tumores na presença da mutação deste oncogene (BOQUETT; FERREIRA, 2010). O *KRAS* também teve um associação fortemente positiva a expressão proteica de *MYC*, com  $p = 0.005$ . Estudos mostram que o gene *KRAS* quando presente,

leva a um pior prognóstico com resistência a quimioterapia e um curso clínico desfavorável da doença no câncer de mama. Esse gene pode possivelmente, ser uma ferramenta com significância prognóstica e preditiva à resposta quimioterápica, quando presente a mutação no tumor, e também quando associado a outros genes mutados, como o *MYC* (PEREIRA *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2015).

A quimioterapia neoadjuvante é a terapia padrão ouro para o tratamento de câncer de mama localmente avançado, como também vem sendo adotada em tumores menos volumosos, no objetivo de diminuição tumoral e aumento das taxas de cirurgias conservadoras. E mais recentemente, prescrita para obter avaliação confiável da sensibilidade ou resistência para aquele tratamento empregado, possibilitando a prescrição de tratamentos alternativos nos casos de não resposta clínica (MAKRIS *et al.*, 1997; BERRUTI *et al.*, 2014).

A resposta patológica completa (RPC) tem demonstrado ser um forte fator preditor de desfecho clínico e sobrevida, sendo considerada como a melhor avaliação para o desfecho clínico, com significativa melhora no tempo livre de doença, e na sobrevida global quando comparada com pacientes que apresentam tumor residual após a quimioterapia neoadjuvante (GAMPENRIEDER; RINNERTHALER; GREIL., 2013; TESHOME; HUNT, 2014; VIALE, 2013; BERRUTI *et al.*, 2014).

O *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda que a RPC seja usada como o “endpoint” para a aceleração na aprovação de novos agentes quimioterápicos que possam ser aplicados na terapia neoadjuvante. Embora a sobrevida livre de doença seja o achado de maior relevância para a plena aprovação destas novas terapias. Por isso, a padronização no conceito de RPC nos ensaios clínicos é de suma importância para a aplicação destes estudos, que acarretará em benefícios para os pacientes (BOSSUYT *et al.* 2015).

A RPC é considerada como a ausência de tumor residual invasivo em mama e nos linfonodos axilares (ypT0/isypN0 ou ypT0ypN0). Apesar de existirem discrepâncias na literatura, pois alguns trabalhos consideram a RPC como a ausência de tumor na mama ou nos linfonodos axilares, não havendo a necessidade desta regressão tumoral ocorrer em ambos. O importante é sabermos que apenas o componente residual invasivo, e não a presença de carcinoma *in situ*, influência na resposta patológica completa (KUERER *et al.*, 1999; MAZOUNI *et al.*, 2007).

A maioria dos ensaios clínicos focam nas taxas de RPC, negligenciando as respostas parciais e os tumores não responsivos. Entretanto, o câncer de mama devido sua heterogeneidade biológica, apresenta várias possibilidades de resposta clínica frente as terapias aplicadas na neoadjuvância, e a identificação de marcadores que sinalizam as respostas parciais

ou até mesmo a não resposta a neoadjuvância, podem ser usados no auxílio dos tratamentos sistêmicos aplicados (BALMATIVOLA *et al*, 2014).

Na segunda fase do estudo, 42 pacientes apresentaram resposta clínica parcial, porém apenas cinco destas apresentaram resposta patológica completa, (dois casos de fenótipo molecular triplo negativo, um era *HER-2* positivo, e dois classificados como triplo positivo, com expressão para receptores hormonais e *HER-2*). A avaliação da resposta patológica tem maior acurácia na determinação da resposta ao tratamento, por isso nosso foco foi em avaliar tanto a resposta patológica parcial, como a resposta patológica completa, sendo consideradas como “endpoints“ para análise desses dados.

Os achados de RPC encontrados condizem com os da literatura, onde as melhores respostas clínicas e patológicas são observadas em tumores triplo negativos e com *HER-2* enriquecido. Embora nos tumores *HER-2* enriquecidos as respostas clínicas e patológicas sejam superiores quando se associa a terapia alvo (transtuzumab, pertuzumab) à neoadjuvância, as pacientes do nosso estudo, apresentaram resposta clínica satisfatória. Em nossas amostras a amplificação de *HER-2* não foi um fator preditor de resposta patológica. No trabalho a terapia alvo (trastuzumab) foi administrada em adjuvância (GIANNI *et al.*, 2010; GIANNI; PIENKOWSKI, 2012; TESHOME; HUNT, 2014; PARK *et al*, 2015).

A média de idade dessas pacientes foi de 38,6 anos (variando entre 31 e 48 anos), o grau histológico foi classificado como G3 em 60% dos casos. A presença de resposta clínica parcial, resposta clínica completa, resposta patológica parcial ou resposta patológica completa não tiveram associação com o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento, em entre o tempo entre os sintomas e o diagnóstico da neoplasia ( $p > 0.05$ ).

A imunorreatividade de *MYC* foi mais frequentemente observada nos tumores com amplificação de *MYC* ou com alto ganho de *MYC* do que nos tumores sem ganho de *MYC*. E tanto nos casos de expressão de *MYC* e alto ganho de *MYC* foram associados com resposta patológica parcial. A presença de *MYC/CEP8* ratio  $\geq 2.2$  não foi um fator de predição para a resposta patológica parcial nesta análise de regressão logística, entretanto, foi mais frequente em tumores de pacientes com resposta patológica parcial que nas pacientes sem RPP. O aumento da relação *MYC/núcleo* ou *MYC/CEP8* foi associada com a resposta clínica parcial. Essas correlações nos faz acreditar que o *MYC* pode ter um papel na quimiossensibilidade para os esquemas AC e/ou docetaxel. Nosso grupo já observou esta quimiossensibilidade para o esquema AC, como descrito anteriormente.

Por trabalhos anteriores mostrarem associação entre a amplificação de *MYC* com altas taxas de RPC no esquema FEC (5-fluoracil/epirrubicina/ciclofosfamida) em câncer de mama

(YASOJIMA *et al.*, 2011). E em linhagens celulares de câncer de mama, foi demonstrado *in vitro* que os taxanes (paclitaxel e docetaxel) inibiam preferencialmente as células que apresentavam amplificação de *MYC* (UITDEHAAG *et al.*, 2015). Após os nossos achados e os relatos na literatura, sugerimos que a investigação da amplificação do gene *MYC* pode ser incluída na prática clínica, assim como já se faz a pesquisa de receptores hormonais e *HER-2*. (UITDEHAAG *et al.*, 2015).

Os tumores com mutação de *KRAS* foram menos responsivos ao esquema de quimioterapia adotada do que os tumores sem a presença da mutação, porém não foi considerada uma variável independente para predição de resposta.

Nossos resultados tiveram como destaque, a amplificação de *MYC* como um fator preditor de resposta patológica tanto para o regime AC como o para o AC + T nas pacientes com câncer de mama localmente avançados. Entretanto, pacientes com aumento do número de cópias de *MYC* mostraram uma maior frequência nas RPC neste tratamento neoadjuvante. A análise da amplificação de *MYC* pela técnica de FISH pode auxiliar na identificação de pacientes que teriam uma melhor resposta a terapia neoadjuvante preconizada para esta neoplasia.

A mutação do códon 12 nos tumores estudados destacou-se por conferir maiores taxas de não resposta do tumor aos regimes quimioterápicos empregados, sugerindo que nesses pacientes, uma nova opção terapêutica deveria ser aplicada.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foram observadas associações entre esses biomarcadores.

- A expressão proteica dos receptores hormonais, a amplificação do gene *HER-2* e o ganho de *MYC* influenciaram a resposta clínica ao regime de quimioterapia com adriamicina e ciclofosfamida;
- A expressão e a amplificação de *MYC* são mais frequentes em tumores de acometimento em pacientes com idade até 40 anos do que em tumores de aparecimento em idades com mais de 40 anos;
- A amplificação do *MYC* e a mutação do códon 12 de *KRAS* se deu de forma distinta quando comparadas as pacientes responsivas *versus* não responsivas ao tratamento com regime contendo adriamicina + ciclofosfamida associado ao taxane;
- A análise da amplificação de *MYC* pode auxiliar no planejamento terapêutico visando melhor resposta ao regime adriamicina + ciclofosfamida associado ao taxane;
- Somente as características moleculares do tumor foram associadas a resposta ao regime quimioterápico com adriamicina + ciclofosfamida associado ao taxane;
- As principais mutações genéticas em pacientes com até 40 anos foram encontradas nos genes *BRCA1* e *BARD1*;
- A presença de mutações patogênicas não interferiu na resistência ao regime adriamicina + ciclofosfamida associado ao taxane.
- A análise da amplificação de *MYC* pode auxiliar no planejamento terapêutico visando melhor resposta ao regime contendo adriamicina + ciclofosfamida associado ao taxane;
- A amplificação de *MYC* é um fator de predição de resposta patológica no regime AC + T em pacientes com câncer de mama.

## REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, S. K., YAMADA, S. S.; YAMADA, K. M. Characterisation of a 140 Kd avian cell surface antigen as a fibronectin-binding molecule. *J. Cell Biol.*, v. 102, n.2, p. 442-448, Feb. 1986.
- AL-KURAYA, K. *et al.* Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. **Cancer Res.**, v. 64, n. 23, p. 8534-40, Dec. 2004.
- AMADORI, D. *et al.* Quadro clínico e tratamento do carcinoma de mama localmente avançado e do carcinoma inflamatório. In: VERONESI, U. **Mastologia oncológica**. Rio de Janeiro: Medsi, 2002, p. 449-63.
- AMARAL, P. *et al.* Body fat and poor diet in breast cancer women. **Nutr Hosp.**, v. 25, n. 3, p. 456-61. May-Jun. 2010.
- ANTONIOU, A. *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **Am J Hum Genet.**, v. 72, n. 5, p. 1117-30. May. 2003.
- ARIAS, V., MAZZA, P. L.; FUNKE, M. A. A.; Processamento tecidual para análise imunoistoquímica de receptores hormonais em carcinoma mamário: dois momentos em um laboratório de anatomia patológica; correlação dos resultados com método bioquímico. **J. Bras. Med. Lab.**, v.39, n. 3, p. 223-8. 2003.
- ARTEAGA, C. L. *et al.* Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v.9, n. 1, p. 16-32, Jan. 2012.
- ATTAM, A. *et al.* Mammographic density as a risk factor for breast cancer in a low risk population. **Indian J Cancer**, v. 45, n. 2, p. 50-3, Apr./Jun. 2008.
- BALMATIVOLA, D. *et al.* Pathological non-response to chemotherapy in a neoadjuvant setting of breast cancer: an inter-institutional study. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 148, n. 3, p. 511-23, Dec. 2014.
- BARNARD, M. E.; BOEKE, C. E.; TAMIMI, R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1856, n 1, n. 73-85, Aug. 2015. Review.
- BARNES, D. M. *et al.* The interaction of oestrogen receptor status and pathological features with adjuvant treatment in relation to survival in patients with operable breast cancer: a retrospective study of 2660 patients. **Endocr Relat Cancer**, v. 11, n. 1, p. 85-96, Mar. 2004.
- BARROS, A. C. S. D.; BUZAID A. C. Fatores Prognósticos e Preditivos de Resposta. In: \_\_\_\_\_ . **Câncer de mama: Tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Dentrix Edição e Design, 2007. Cap. 4, p. 43-60.

BASELGA, J. *et al.*. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. **N Engl J Med.**, v. 366, n. 2, p. 109-19, Jan. 2012.

BEAR, H. D. *et al.* Sequential Preoperative or Postoperative Docetaxel Added to Preoperative Doxorubicin Plus Cyclophosphamide for Operable Breast Cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 13, p. 2019-27, 2006.

BENTLEY, D. L.; GROUDINE, M. Sequence requirements for premature termination of transcription in the human *c-MYC* gene. **Cell.**, v. 53, n. 2, p. 245-256. 1988.

BERNARDES DE JESUS, B.; BLASCO, M. A. Telomerase at the intersection of cancer and aging. **Trends Genet.**, v. 29, n. 9, p. 513-20, Sep. 2013.

BERRUTI, A. *et al.* Pathologic complete response as a potential surrogate for the clinical outcome in patients with breast cancer after neoadjuvant therapy: a meta-regression of 29 randomized prospective studies. **J Clin Oncol.**, v. 32, n. 34, p. 3883-91. Dec. 2014.

BLOOM, H.; RICHARDSON, W. Histopathological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1,409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **Br. J. Canc.**, v 11, n. 3, p. 359-77, Sep. 1957.

BOFF, R. A.; WISINTAINER, F. **Mastologia Moderna: abordagem multidisciplinar.** Caxias do Sul: Mesa Redonda, 2006. Cap. 15, p. 181-92.

BOQUETT, J. A.; FERREIRA, R. J. Aspectos biológicos e atividade tumorigênica da família protooncogênica Ras. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 201-11, Jul/Dez. 2010.

BOSSUYT, V. *et al.* Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. **Ann Oncol.**, v. 26, n. 7, p. 1280-91, Jul. 2015. Review.

BRAVATÀ, V. *et al.* "Omics" of HER2-positive breast cancer. **OMICS**, v. 17, n. 3, p. 119-29, Mar. 2013.

BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nat Rev Cancer.**, v. 5, n. 3, p. 231-7. Mar. 2005. Review.

BUNONE, G. *et al.* Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. **EMBO J.**, v. 15, n. 9, p. 2174-83, 1996.

CANADIAN AGENCY FOR DRUGS AND TECHNOLOGIES IN HEALTH. **Oncotype DX in Women and Men with ER-Positive, HER2-Negative Early Stage Breast Cancer who are Lymph Node Negative: A Review of Clinical Effectiveness and Guidelines.** Ottawa, 2014.

- CAPLAN, L. Delay in Breast Cancer: Implications for Stage at Diagnosis and Survival. **Front Public Health.**, v. 2, p. 87, 2014.
- CARVALHO, F. M. *et al.* Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. **BMC Womens Health.**, v.14, n. 102, p. 1-8, Aug. 2014.
- CARVALHO, L. V. *et al.* Molecular characterization of breast cancer in young Brazilian women. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 56, n. 3, p. 278-87, May-Jun. 2010.
- CASTRO, G. D.; CASTRO, J. A. Alcohol drinking and mammary cancer: Pathogenesis and potential dietary preventive alternatives. **World J Clin Oncol.**, v. 5, n. 4, p. 713-29, 2014.
- CHAN, H. J.; PETROSSIAN, K.; CHEN, S. Structural and functional characterization of aromatase, estrogen receptor, and their genes in endocrine-responsive and -resistant breast cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, 2015 Aug 13. pii:S0960-0760(15)30030-3.
- CHEN, M. *et al.* Accuracy of physical examination, ultrasonography, and magnetic resonance imaging in predicting response to neo-adjuvant chemotherapy for breast cancer. **Chin Med J.**, v. 125, n.11, p. 1862-6, 2012.
- CHEN, Y.; OLOPADE, O. I. *MYC* in breast tumor progression. **Expert Rev Anticancer Ther.**, 8, n. 10, p. 1689-98, Oct. 2008.
- CHIAO, P. J. *et al.* The current state of oncogenes and cancer: experimental approacher for analyzing oncogenetic events in human cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 9, n. 1, p. 63-80, 1990.
- CHUA, S. *et al.* Neoadjuvant vinorelbine/epirubicin (VE) versus standard adria*MYC*in/cyclophosphamide (AC) in operable breast cancer: analysis of response and tolerability in a randomised phase III trial (TOPIC 2). **Ann Oncol.**, v. 16, n. 9, p. 1435-41, Sep. 2005.
- CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. **Oncologist.**, v. 9, n. 6, p. 606-16, 2004.
- CLARK, A. G.; VIGNJEVIC, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 36, p. 13-22, Oct. 2015. Review.
- CLEATOR, S.; PARTON, M.; DOWSETT, M. The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Endocr Relat Cancer.**, v. 9, n. 3, p. 183-95, Sep. 2012.
- COATES, A. 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. 1533-46, Aug. 2015.
- COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **Lancet Oncol.**, v. 13, n. 11, p. 1141-51, Nov. 2012.

COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nat Rev Cancer.**, v. 10, n. 1, p. 51-7, Jan. 2010.

COLOTTA, F. *et al.* Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073-81. Jul. 2009.

CORZO, C. *et al.* The *MYC* oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 165, n. 2, p. 151-6, Mar. 2006.

De LOS SANTOS, J. F. *et al.* Magnetic resonance imaging as a predictor of pathologic response in patients treated with neoadjuvant systemic treatment for operable breast cancer. Translational Breast Cancer Research Consortium trial 017. **Cancer**, v. 119, n. 10, p. 1776-83, May, 2013.

DEMING, S. L. *et al.* *C-MYC* amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. **Br J Cancer**, v. 83, n. 12, p. 1688-95, Ago. 2000.

DIAMANDIS, E. P. Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer. **Clin Chim Acta.**, v. 257, n. 2, p. 157-80, Jan. 1997.

DOBRZYCKA, B. *et al.* Mutations of the *KRAS* oncogene in endometrial hyperplasia and carcinoma. **Folia Histochem Cytobiol.**, v. 47, n. 1, p. 65-8, 2009.

DOUGLAS, J. A. *et al.* Mammographic Breast Density- Evidence for genetic Correlations with Established Breast Cancer Risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 17, n. 12, p. 3509-16, Dec. 2008.

DUFFY, M. J. Predictive Markers in Breast and Other Cancers: a review. **Cli Chem.**, v. 51, n. 3, p. 494-503, Mar. 2005.

\_\_\_\_\_.; O'DONOVAN, N.; CROWN, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. **Cancer Treat Rev.**, v. 37, n. 2, p. 151-9. Apr. 2011.

EFSTRATIADIS, A.; SZABOLCS, M.; KLINAKIS, A. Notch, *MYC* and Breast Cancer. **Cell Cycle**. v. 6, n. 4, p. 418-29, Feb. 2007.

EL-SAYED, M. I. *et al.* Biological markers and response to neoadjuvant taxane-based chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. **ISRN Oncology**, v. 2012, Dec. 2012.

ELSTON, C.; ELLIS, I. 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. **Histopathol.**, v. 19, n. 5, p. 403-10, Nov. 1991.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, n. 2, p. 165-71, abr.-jun. 2006.

FERNANDEZ, P. C. *et al.* Genomic targets of the human *c-MYC* protein. **Genes Dev.**, v. 17,

n. 9, p. 1115-29, May, 2003.

FISHER, B. *et al.* Effect of Preoperative Chemotherapy on Local-Regional Disease in Women With Operable Breast Cancer: Findings From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. **J Clin Oncol.**, v. 15, n. 7, p. 2483-93, Jul. 1997.

FREEDMAN, R. A.; PARTRIDGE, A. H. Management of breast cancer in very young women. **Breast.**, v. 22, p. S176-9, Aug. 2013. Suppl 2. Review.

FREITAS-JÚNIOR, R. *et al.* Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 7, p. 731-7, July 2012.

FUCHS, C. S. *et al.* Alcohol consumption and mortality among women. **N Engl J Med.**, v. 332, n. 19, p. 1245-50, May. 1995.

GAMPENRIEDER, S. P.; RINNERTHALER, G, GREIL, R. Neoadjuvant chemotherapy and targeted therapy in breast cancer: past, present, and future. **J Oncol.**, v. 2013, p. 732047, 2013.

GAUDET, M. M. *et al.* Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. **J Natl Cancer Inst.**, v. 105, n. 8, p. 515-25. Apr. 2013.

GERDES, J. *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer.**, v. 31, n. 1, p. 13-20, Jan. 1983.

GIANNI, L. *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.**, v. 13, n. 1, p. 25-32, Jan. 2012.

\_\_\_\_\_. 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 randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. **Lancet.**, v. 375, n. 9712, p. 377-84. Jan. 2010.

GNANT, M.; THOMSEN, C.; HARBECK, N. St. Gallen/Vienna 2015: A Brief Summary of the Consensus Discussion. **Breast Care (Basel)**, v. 10, n. 2, p. 124-30. Apr. 2015.

GONG, L.; LOU, X. J. Pathway EGFR Inhibitor Pathway, Pharmacodynamics. Disponível em: <<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA162356267?previousQuery=162356267>>. Acesso em: 26 jul. 2016.

GRUSHKO, T. A. *et al.* MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. **Clin Cancer Res.**, v. 10, n. 2, p. 499-507, Jan. 2004.

GUARNERI, V. *et al.* A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy. **Ann Oncol.**, v. 20, n. 7, p. 1193-1198, Jul. 2009.

GUERRA, M. R.; MOURA GALLO, C. V.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev Bras Canc.**, v. 51, n. 3, p. 227-34, 2005.

GÜNES, C.; RUDOLPH, K. L. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell.*, v. 152, n. 3, p. 390-3, Jan. 2013.

HAMMOND, M. E. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 134, n 7, p. 48-72, 2010.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.*, v. 86, n. 3, p. 353-64. Aug. 1996. Review.

\_\_\_\_\_.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*, v. 144, n. 5, p. 646-74. Mar. 2011

HARRIS, L. R. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J Clin Oncol.**, v. 25, n. 33, p. 5287-312, Nov. 2007.

HATAKE, K.; TOKUDOME, N.; ITO, Y. Next generation molecular targeted agents for breast cancer: focus on EGFR and VEGFR pathways. **Breast Cancer.**, v. 14, n. 2, p. 132-49, 2007.

HENRIKSSON, M.; VITA, M. The *MYC* oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. **Sem Cancer Biol.**, v. 16, n. 4, p. 318-33, Aug. 2006.

HERYNK, M. H.; FUQUA, S. A. W. Estrogen Receptor Mutation in Human Disease. **Endocrino Reviews**, v. 25, n. 6, p. 869-98, 2004.

HESELMAYER-HADDAD, K. *et al.* Ried. Single-cell genetic analysis of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer reveals enormous tumor heterogeneity yet conserved genomic imbalances and gain of *MYC* during progression. **Am J Pathol.**, v. 181, n. 5, p. 1807-22, Nov. 2012.

HORIUCHI, D. *et al.* *MYC* pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. **J. Exp. Med.**, v. 209, n. 4, p. 679-696. 2012.

HOWELL, A; CUZICK, J. Risk factors. Introduction to Session 1. **Breast Cancer Research.**, v. 11, n. 3, p. 1-2, Dez. 2009.

HUANG, D. *et al.* Anti-angiogenesis or pro-angiogenesis for cancer treatment: focus on drug distribution. *Int J Clin Exp Med.*, v. 8, n. 6, p. 8369-76, 2015.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 61, n. 1-2, p. 203-13; Sep-Oct. 2008.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 38, n. 1, p. 103-13, Feb. 2001.

HUO, C. W. *et al.* .Mammographic density-a review on the current understanding of its **association with breast cancer**. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 144, n. 3, p. 479-502, Apr. 2014.

HUOBER, J. *et al.* Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 124, n. 1, p. 133-40, Nov. 2010.

HUSSAIN, H. A.; HARVEY, A. J. Evolution of breast cancer therapeutics: Breast tumour kinase's role in breast cancer and hope for breast tumour kinase targeted therapy. **World J Clin Oncol.**, v. 5, n. 3, p. 299-310, Aug. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Atlas Online de Mortalidade**. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo04/consultar.xhtml?jsessionid=D7912BE5326A4E9E3E4D121E7EB8ADC8#panelResultado>>. Acesso em: 12 jan. 2016).

\_\_\_\_\_. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.

\_\_\_\_\_. **Dia nacional de combate ao câncer: Estimativa 2016/2017**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-incidencia.asp>>. Acesso em: FIGURA)

\_\_\_\_\_. **Tipos de Câncer: Mama**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 20 jan. 2016. ESTIMATIVA 57.960

IWAMOTO, T. *et al.* Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. **J Natl Cancer Inst.**, v. 103, n. 3, p. 264-72, Feb. 2011.

JAMES, C. R. *et al.* BRCA 1, a Potencial Predictive Biomarker in the Treatment of Breast Cancer. **Oncologist.**, v.12, n. 2, p. 142-50, Feb. 2007.

KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism.**, v. 64, n. 3,Suppl 1, p. S16-21. Mar. 2015.

KAMINSKA, M *et al.* Breast cancer risk factors. **Prz Menopauzalny.**, v. 14, n. 3, p. 196-202, 2015.

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Ras oncogenes: split personalities. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 7, p. 517-31 Jul. 2008.

KAUFF, N. D. *et al.* Risk-Reducing Salpingo-oophorectomy in Women with a *BRCA1* or *BRCA2* Mutation. **N Engl J Med.**, v. 346, p. 1609-1615, May 2002.

KIM, D. Y. *et al.* A novel 2-pyrone derivative, BHP, impedes oncogenic KRAS-driven malignant progression in breast cancer. **Cancer Lett.** (2013). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.023>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

KUERER, H. M. *et al.* Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. **J Clin Oncol.**, v. 17, n. 2, p. 460-9. Feb. 1999.

LEE, J. K. *et al.* Clinicopathological features of infiltrating lobular carcinomas comparing with infiltrating ductal carcinomas: a case control study. **World J Oncol.**, v. 8, n. 34, p. 1-8. 2010.

LEUNG, J. Y. *et al.* Heterogeneity in *MYC*-induced mammary tumors contributes to escape from oncogene dependence. **Oncogene**, v. 31, n. 20, p. 2545-54, May. 2012.

LIAO, D. J.; DICKSON, R. B. *C-MYC* in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**. v. 7, n. 3, p. 143-64, Sep. 2000.

LIMA, S. M. R.; BOTOGOSKI, S. R. **Menopausa**: o que você precisa saber - Abordagem prática e atual do período do climatério. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

LIPS, E. H. *et al.* Breast cancer subtyping by immunohistochemistry and histological grade outperforms breast cancer intrinsic subtypes in predicting neoadjuvant chemotherapy response. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 140, n. 1, p. 63-71, Jul. 2013.

LOBBES, M. B. I. *et al.* Contrast enhanced mammography: Techniques, current results, and potential indications. **Clinical Radiology**, v. 68, n. 9, p. 935-44, Sep. 2013.

LOBODA, A. *et al.* A gene expression signature of RAS pathway dependence predicts response to PI3K and RAS pathway inhibitors and expands the population of RAS pathway activated tumors. **BMC Medical Genomics**. v. 3, p. 26, Jun. 2010.

LUMACHI, F.; SANTEUFEMIA, D. A.; BASSO, S. M. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. **World J Biol Chem.**, v. 6, n. 3, p. 231-9, Aug. 2015.

MAGLIACANE, G. *et al.* Rapid targeted somatic mutation analysis of solid tumors in routine clinical diagnostics. **Oncotarget.**, v. 6, n. 31, p. 30592-603, Oct. 2015.

MAKRIS, A. *et al.* Prediction of Response to Neoadjuvant Chemoendocrine Therapy in Primary Breast Carcinomas. **Clin Cancer Res.**, v. 3, n. 4, p. 593-600, Apr. 1997.

MALHOTRA, R. *et al.* Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification. **Anal Chem.**, v. 82, n. 8, p. 3118-23, Apr. 2010.

MARINHO, V. F. Z. *et al.* Marcadores Moleculares Em Câncer de Mama Preditivos de Metástases Axilares. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 54, n. 3, p. 203-7. 2008.

MARINOVICH, M. L. *et al.* Meta-analysis of agreement between MRI and pathologic breast tumour size after neoadjuvant chemotherapy. **Br J Cancer.**, v. 109, n. 6, p. 1528-36, Sep. 2013.

MARTIN, V. *et al.* Internal Quality Assurance Program for ERBB2 (HER2) Testing Improves the Selection of Breast Cancer Patients for Treatment with Trastuzumab. **Patholog Res Int.**, v. 2012, p. 261857, 2012.

MARYÁŠ, J., *et al.* Proteomics in investigation of cancer metastasis: functional and clinical consequences and methodological challenges. **Proteomics**, v. 14, n. 4-5, p. 426-40, Mar. 2014.

MAURI, D.; PAVLIDIS, N.; IOANNIDIS, J. P. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. **J Natl Cancer Inst.**, v. 97, n. 3, p. 188-94. Feb. 2005.

MAZOUNI, C. *et al.* Inclusion of taxanes, particularly weekly paclitaxel, in preoperative chemotherapy improves pathologic complete response rate in estrogen receptor-positive breast cancers. **Ann Oncol.**, v. 18, n. 5, p. 874-80, May. 2007.

McGUIRE, K. P. *et al.* MRI staging after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: does tumor biology affect accuracy? **Ann Surg Oncol.**, v. 18, n. 11, p. 3149-54, Oct. 2011.

\_\_\_\_\_. *et al.* Surgical patterns of care in patients with invasive breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy and breast magnetic resonance imaging: results of a secondary analysis of TBCRC 017. **Ann Surg Oncol.**, v. 22, n. 1, p. 75-81. Jan. 2015.

MENEZES, G. L. *et al.* Magnetic resonance imaging in breast cancer: A literature review and future perspectives. **World J Clin Oncol.**, v. 5, n. 2, p. 61-70. May. 2014.

MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with *MYC*. **Nat Rev Cancer.**, v. 8, n. 12, p. 976-90, Dec. 2008.

MICHELS, K. B. *et al.* Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. **Cancer**, v. 109, n. 12, p. 2712-49, Jun. 2007. Suppl.

MUKHTAR, R. A. *et al.* Clinically meaningful tumor reduction rates vary by prechemotherapy MRI phenotype and tumor subtype in the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). **Ann Surg Oncol.**, v. 20, n. 12, p. 3823-30, Nov. 2013.

NAGATA, C. *et al.* Alcohol Drinking and Breast Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among the Japanese Population. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 37, p. 568-74. 2007.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 11, n. 3, p. 220-8, Mar. 2010.

NESBIT, C. E.; TERSAK, J. M.; PROCHOWNIK, E. V. *MYC* oncogenes and human neoplastic disease. **Oncogene**, v. 18, n. 19, p. 3004-16, May. 1999.

NJIAJU, U. O.; OLOPADE, O. I. Genetic Determinants of Breast Cancer Risk: A Review of Current Literature and Issues Pertaining to Clinical Application. Olopade MD. **Breast J.**, v. 18, n. 5, p. 436-42, Sep./Oct. 2012

NOSKE, A. *et al.* Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765). **Breast Cancer Res Treat.**, v.126, n. 1, p.109–117, Feb. 2011.

O'FLYNN, E. A.; DESOUZA, N. M. Functional magnetic resonance: biomarkers of response in breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 13, n. 3, p. 405, Jun. 2011.

OLAYIOYE, M. A. *et al.* The erbB signaling network: heterodimerization in development and cancer. **Embo J.**, v. 19, p. 3159-67. 2000.

PAIK, S. *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med.**, v. 351, n. 27, p.2817-26, Dec. 2004.

PANIS, C. *et al.* The positive is inside the negative: HER2-negative tumors can express the HER2 intracellular domain and present a HER2-positive phenotype. **Cancer Lett.**, v. 357, n. 1, p. 186-95, Feb. 2015.

PARANJAPE, T. *et al.*. A 3'-untranslated region *KRAS* variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. **Lancet Oncol.** v. 12, n. 4, p. 377-386, Apr. 2011.

PARK, K. *et al.* Molecular characterization of patients with pathologic complete response or early failure after neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer using next generation sequencing and nCounter assay. **Oncotarget.**, v. 6, n. 27, p. 24499-510, Sep. 2015.

PARKER, J. S. *et al.*. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol.**, v. 27, n. 8, p. 1160-7. Mar. 2009.

PARTRIDGE, A. *et al.* Risk Perception and Psychosocial Outcomes of Women With Ductal Carcinoma In Situ: Longitudinal Results from a Cohort Study. **J Natl Cancer Inst.**, v. 100, n. 4, p. 243-51, Feb. 2008.

PATANI, N.; MARTIN, L. A.; DOWSETT, M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. **Int J Cancer**, v. 133, n. 1, p. 1-13, Jul. 2013.

PATEY, D.; SCARFF, R. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. **Lancet.**, v. 211, n. 5460, p. 801-4, Apr. 1928.

PELENGARIS, S.; KHAN M. The many faces of *c-MYC*. **Arch Biochem Biophys.**, v. 416, n. 2, p. 129-36, Aug. 2003.

\_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; EVAN, G. *c-MYC*: more than just a matter of life and death. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 10, p. 764-76. Oct. 2002.

PENAULT-LLORCA, F., *et al.* Changes and Predictive and Prognostic Value of the Mitotic Index, Ki-67, Cyclin D1, and Cyclo-oxygenase-2 in 710 Operable Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. **Oncologist.**, v. 13, n. 12, p. 1235-45, Dec. 2008.

PEREIRA, C. B. L. *et al.* Prognostic and Predictive Significance of *MYC* and *KRAS* Alterations in Breast Cancer from Women Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. **PLoS One**, v. 8, n. 3, Mar. 2013.

PEREZ, E. A., *et al.* C-*MYC* alterations and association with patient outcome in early-stage HER2-positive breast cancer from the north central cancer treatment group N9831 adjuvant trastuzumab trial. **J Clin Oncol.**, v. 29, n. 6, p. 651-9, Feb. 2011.

PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug. 2000.

PINDER, S.E.; HARRIS, G.; O'MALLEY, F. P. Invasive carcinoma – special types. In: O'MALLEY, F. P. PINDER, S.E.; Mulligan, A. M. (Ed.). **Breast Pathology: A Volume in the Foundations in Diagnostic Pathology series.** Philadelphia: Saunders, 2011. p. 227-59.

PINHO, V. F. S.; COUTINHO, E. S. F. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n.5, p. 1061-9, maio 2007.

PODSYPANINA, K. *et al.* Oncogene cooperation in tumor maintenance and tumor recurrence in mouse mammary tumors induced by *MYC* and mutante *Kras*. **PNAS**, v. 5, n. 13, p. 5242-7, 2008.

PRICE, E. R. *et al.* How to use magnetic resonance imaging following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. **World J Clin Cases**, v. 3, n. 7, p. 607-13 Jul. 2015.

PUSZTAI, L. Current Status of Prognostic Profiling in Breast Cancer. **Oncologist.**, v. 13, n. 4, p. 350-60. Apr. 2008.

RAHMATHULLA, G.; TOMS, S. A.; WEIL, R. J. The Molecular Biology of Brain Metastasis. **Journal of Oncology**, v. 2012, n. 2012, 16 p.

RAKHA, E. A. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research.**, v. 12, n. 4, p. 207-218. 2010.

RAMOS-NINO, M. E. The Role of Chronic Inflammation in Obesity-Associated Cancers. **ISRN Oncology**, v. 2013, n. 2013, p. 1-25, 2013.

RASTOGI, P. *et al.* Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. **J Clin Oncol.**, v. 26, n. 5, p. 778-85, Feb. 2008.

RAVAIOLI, A. *et al.* Prognosis and prediction of response in breast cancer: the current role of the main biological markers. **Cell Prof.**, v. 31, p. 113-126. 1998.

RAY, D. ROBERT-LÉZNÉS, J. Coexistence of a c-*MYC* mRNA initiated in intron 1 with the normal c-*MYC* mRNA and similar regulation of both transcripts in mammalian cells. **Oncogene Res.**, v. 5, n. 1, p. 73-78. 1989.

- RECONDO, G. *et al.* Therapeutic options for *HER-2* positive breast cancer: Perspectives and future directions. **World J Clin Oncol.**, v. 5, n. 3, p. 440-54. Aug. 2014.
- REDDEN, M. H.; FUHRMAN, G. M. Neoadjuvant chemotherapy in the treatment of breast cancer. **Surg Clin North Am.**, v. 93, p. 2, p. 493-9. Apr. 2013.
- REYMOND, N.; D'ÁGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nat Rev Cancer.**, v. 13, n. 12, p. 858-70. Dec. 2013. Review.
- RHYU, M. G. Genetics events underlying morphological complexity of gastric carcinoma. **J Korean Med Sci.**, v. 13, n. 4, p. 339-349, 1998.
- RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **Am J Clin Nutri.**, v. 78, p. 559-569. 2003.
- RONCKERS, C. M.; ERDMANN, C. A.; LAND, C. E. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. **Breast Cancer Res.**, v. 7, n. 1, p. 21-32. 2005
- ROSEN, P. P. *et al.* Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. **J Clin Oncol.**, v. 11, p. 2090-2100, 1993 apud CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. **Oncologist.**, v. 9, n. 6, p. 606-16, 2004.
- ROSS, J. S. *et al.* The *HER-2/neu* Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. **Oncologist.**, v. 8, n. 4, p. 307-25. 2003.
- RYAN, K. M.; BIRNIE, G. D. *MYC* oncogenes: the enigmatic family. **Biochem. J.**, v. 314, n. Pt 3, p. 713-21, Mar. 1996.
- SAIJO, N. Critical comments for roles of biomarkers in the diagnosis and treatment of cancer. **Cancer Treat. Rev.**, v.38, n. 1, p. 63-7, Feb. 2012.
- SÁNCHEZ-MUÑOZ, A. *et al.* Lack of evidence for *KRAS* oncogenic mutations in triple-negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 13, n. 10, p.136, Apr. 2010.
- SCARFF, R.; TORLONI, F. **Histological typing of breast tumors.** International histological classification of tumors. no 2. Geneva: World Health Organization, 1968.
- SCHLOTTER, C. M. *et al.* *C-MYC*, not *HER-2/neu*, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 5, p. 30-6. 2003.
- SEOL, H. *et al.* Intratumoral heterogeneity of *HER2* gene amplification in breast cancer:its clinicopathological significance. **Modern Pathology.**, v. 25, n. 7, p. 938–948, Jul. 2012.
- SHARMA, P. *et al.* Abstract P1-11-07: Results of a Phase II Study of Neoadjuvant Platinum/Taxane Based Chemotherapy and Erlotinib for Triple Negative Breast Cance. **Cancer Research**, v. 70, n. 24, Dec. 2010. Suppl.

SHING, H. J. *et al.* Pure and Mixed Tubular Carcinoma of the Breast: Mamographic and Sonographic Differential Features. **Korean J Radiol.**, v. 8, n. 2, p. 103-10. 2007.

SINGHI, A. D. *et al.* *MYC* gene amplification is often acquired in lethal distant breast cancer metastases of unamplified primary tumors. **Mod Pathol.**, v. 25, n. 3, p. 378-87, Mar. 2012

SINGLETERY, S. E. Rating de Risk Factors for Breast Cancer. **Ann Surg.**, v. 237, n. 4, p. 474-82, Apr. 2003.

\_\_\_\_\_.; CONNOLLY, J. L. Breast Cancer Staging: Working With the Sixth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **Cancer J Clin.** v. 56, n. 1, p. 37-47, Jan-Feb. 2006.

SINN, H. P.; KREIPE, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care (Basel).**, v. 8, n. 2, p.149-54, May. 2013. Review.

SLAMON, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of *HER-2/neu* oncogene. **Science**, v. 235, p. 177-82. 1987.

SMITH, I. C. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. **J Clin Oncol.**, v. 20, n. 6, p. 1456-66, Mar. 2002.

SMITH, I. E. *et al.* A novel continuous infusional 5-fluorouracil-based chemotherapy regimen compared with conventional chemotherapy in the neo-adjuvant treatment of early breast cancer: 5 year results of the TOPIC trial. **Ann Oncol.**, v. 15, n. 5, p. 751-8, May. 2004.

SØRLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep. 2001.

\_\_\_\_\_.; *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **PNAS**, v. 100, n. 14, 2003.

STECKEL, M. *et al.* Determination of synthetic lethal interactions in KRAS oncogene dependent cancer cells reveals novel therapeutic targeting strategies. **Cell Research**, v. 22, n. 12, p. 1227-45, Aug. 2012.

STEWART, T. A.; BELLVE, A. R. Transcription and promoter usage of the *MYC* gene in normal somatic and spermatogenic cells. **Science.**, v. 226, n. 4675, p. 707-710. 1984.

STRATTON, M. R.; RAHMAN, N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. **Nature Genetics**, v. 40, p. 17-22, 2008.

TANEJA, P. *et al.* Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. **Clin Med Insights Oncol.**, v. 20, n. 4, p. 15-34, Apr. 2010.

TANSEY, W. P. Mammalian *MYC* Proteins and Cancer. **New Journal of Science**, v. 2014, n. 2014, 27 p.

TAYLOR, C. P. *et al.* Rapid detection of prognostic genetic factors in neuroblastoma using fluorescence in situ hybridisation on tumour imprints and bone marrow smears. United Kingdom Children's Cancer Study Group. **Br J Cancer**, v. 69, n. 3, p. 445-51, Mar. 1994.

TERRY, P. D.; ROHAN T. E. Cigarette Smoking and the Risk of Breast Cancer in Women: A Review of Literature. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 11, n. 10 Pt 1, p. 953-71, Oct. 2002.

TESHOME, M.; HUNT, K. K. Neoadjuvant therapy in the treatment of breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am.**, v. 23, n. 3, p. 505-23, Jul. 2014.

TEW, W. P. *et al.* Breast and ovarian cancer in the older woman. **JCO**, v. 32, n. 24, p. 2553-61, Aug. 2014.

TEWARI, M.; KRISHNAMURTHY, A.; SHUKLA H. Predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Surgical Oncology**. v. 17, n. 4, p. 301-11. Dec. 2008.

TODOROVIC-RAKOVIC, N. *et al.* C-MYC as a predictive marker for chemotherapy in metastatic breast cancer. **Clin Exp Med.**, v. 12, p. 217-23, 2012.

TU, W. B. *et al.* MYC and its interactors take shape. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1849, n. 5, p. 469-83, May 2015.

TURKOZ, F. P. *et al.* Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients. **Breast.**, v. 22, n. 3, p. 344-350, Jun. 2013.

UENO, N. T.; ZHANG, D. Targeting EGFR in Triple Negative Breast Cancer. **J Cancer.**, v. 2, p. 324-8, 2011.

UITDEHAAG, J. C. *et al.* Selective Targeting of CTNBB1-, KRAS- or MYC-Driven Cell Growth by Combinations of Existing Drugs. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125021. May. 2015.

UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER. **TNM Classificação de Tumores Malignos**. 7.ed. Rio de Janeiro: INCA, 2010. Traduzido de: TNM Classification of malignant Tumours.

UNTCH, M. *et al.* Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol.**, v.13, n. 2, p. 135-44, Feb. 2012.

VAN DE VIJVER, M. J. *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med.**, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, Dec. 2002.

VAN DER HAGE, J. A. *et al.* Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. **J Clin Oncol.**, v. 19, n. 22, p. 4224-37, Nov. 2001.

VAN 'T VEER, L. J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature.**, v. 415, n. 6871, p.530-6, Jan. 2002.

VO, A. T.; MILLIS, R. M. Epigenetics and breast cancers. **Obstet Gynecol Int.**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

VON MINCKWITZ, G. *et al.* Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPARDUO study of the German Breast Group. **J Clin Oncol.**, v. 23, p. 2676-85, 2005.

\_\_\_\_\_.; FONTANELLA, C. Pathway-Oriented Concepts in Adjuvant and Neoadjuvant Breast Cancer Therapy. **Breast Care (Basel)**, v. 8, n. 4, p. 246-7, Aug. 2013.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Mol Oncol.**, v. 4, n. 3, p. 192-208, Jun. 2010.

WILLETT, W. C. *et al.* Epidemiologia e causas não genéticas do câncer de mama. In: HARRIS, J. R. *et al.* **Doenças da mama**. 2. ed. Belo Horizonte: Medsi, 2002. p. 205-59.

WOLFF, A.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. **J Clin Oncol.**, v. 31, n. 31, 3997-4013, Nov. 2013.

WORLD CANCER RESEARCH FUND AND THE AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, nutrition and prevention of cancer: a global perspective**. Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 1997.

XU, J.; CHEN, Y.; OLOPADE, O. I. *MYC* and Breast Cancer. **Genes Cancer.**, v. 1, n. 6, p. 629-40, Jun. 2010.

YAGER, J. D. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention—A review. **Steroids**. v. 99, n. Pt A, p. 56-60. Jul. 2015.

YANG, Yaewon *et al.* Prognostic impact of AJCC response criteria for neoadjuvant chemotherapy in stage II/III breast cancer patients: breast cancer subtype analyses. **BMC Cancer**, v. 16, n. 515, p. 1-10, Jul. 2016.

YASOJIMA H, *et al.* Association between c-*MYC* amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Eur J Cancer**, v. 47, p. 1779-88, 2011.

YASWEN, P. *et al.* Therapeutic targeting of replicative immortality. **Semin Cancer Biol.**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.007>>. Acesso em: 25 set. 2015.

ZHOU, X.S.; HUANG, T.S. Relevance feedback in image retrieval: a comprehensive review. **Multimedia Systems**, v. 8, n. 6, p. 536-44, Apr. 2003.

Zhu, Y. *et al.* BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. **Oncotarget.**, v. 21. Sep. 2016.

## **APÊNDICES**

## Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**PROJETO: Biomarcadores de resposta a quimioterapia no câncer de mama localmente avançado.**

Nome do voluntário: -----

Você está sendo convidada a participar de um estudo **que tem por objetivo avaliar a expressão dos genes *c-MYC*, *HER-2* e *kras* como fatores de resposta à quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama** e que envolve a **coleta de material para a realização de uma biópsia (análise de pequenas amostras de tecido para o diagnóstico do tipo do tumor) e a realização de um exame para avaliação do tamanho do tumor (Ressonância Magnética).**

O Câncer de mama é o tipo de tumor mais frequente em mulheres no Brasil e o segundo no Estado do Pará. Infelizmente muitos destes tumores são descobertos em estágio avançado, precisando de tratamento com quimioterapia antes da realização de cirurgia, chamado de quimioterapia neoadjuvante. Esta quimioterapia visa diminuir o tumor para melhorar as condições da cirurgia, porém nem todos os pacientes apresentam a mesma redução do tumor. Conhecer algumas características deste tumor, como os genes que pretendemos estudar, é importante para compreender melhor a doença, o tratamento e as respostas à quimioterapia ajudando assim na identificação dos pacientes que se beneficiarão ou não das medicações fornecidas.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

### **OBJETIVO DO ESTUDO**

**Este estudo tem como objetivo avaliar as expressões proteicas dos genes *C-MYC*, *HER-2* e *KRAS* como fatores de predição de resposta à quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama localmente avançado, nas pacientes tratadas no Hospital Ophir Loyola.**

### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

**Se você concordar em participar deste estudo será coletada uma amostra do tumor para a realização da biópsia (exame que diagnostica o tipo de tumor). A coleta de material para a biópsia será feita por um(a) médico(a) pesquisador(a) participante desse estudo.** Também você irá realizar um exame de imagem (Ressonância Magnética) das mamas. Essas amostras de tumor serão levadas ao laboratório onde será realizado em estudo imunohistoquímico, FISH e RFLP-PCR para avaliar os genes (*C-MYC*, *HER-2* e *KRAS*) nas células do tumor. Essas técnicas vão detectar as proteínas dos genes que queremos estudar e correlacionar com a resposta do tumor à quimioterapia que você irá receber como parte de seu tratamento. Esta quimioterapia será a que é feita de rotina no Hospital Ophir Loyola para o tratamento de câncer de mama. O material isolado das amostras de tumor será armazenado no Serviço de Anatomia-patológica deste hospital, após a utilização do mesmo para os procedimentos relacionados a este projeto. Se você concordar em participar deste projeto de pesquisa os pesquisadores participantes também consultarão seus registros médicos para obter dados que podem ser importantes para compreender o câncer de mama.

## **MÉTODOS ALTERNATIVOS**

**Sua participação nesse estudo é totalmente voluntária. Você não é obrigada a participar do estudo. Se você não concordar em realizar a Ressonância mamária e permitir a biópsia de seu tumor, você não participará desse estudo.**

## **RISCOS**

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. É importante que você saiba dos riscos implicados na coleta de uma amostra do tumor e na realização da Ressonância mamária. A biópsia do tumor e à quimioterapia são procedimentos que fazem parte do tratamento usual do câncer de mama, porém a ressonância não faz parte da rotina. A coleta da biópsia de seu tumor pode causar sangramento no local. Caso isso aconteça, esse sangramento será controlado pela médico (a) que realizará a coleta. A Ressonância mamária é um exame não invasivo que visa o estudo do tamanho do tumor e dos gânglios, você precisará tomar um contraste, porém este exame será realizado em ambiente hospitalar diminuindo os riscos de alguma complicação que possa ocorrer.

## **BENEFÍCIOS**

**Você não terá benefícios com os resultados dessa pesquisa. Entretanto, os resultados gerados por ela poderão ajudar a compreender melhor o câncer de mama e auxiliar no tratamento do mesmo, no futuro, para outras mulheres.**

## **ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

**É importante que você saiba que o seu tratamento será o mesmo, caso aceite ou não participar desse projeto. É que você tem direito de saber qualquer informação gerada nessa pesquisa relacionada à sua doença. Essa pesquisa é coordenada pela Dra. Cynthia Lins, qualquer dúvida que tenha respeito pode ser sanada entrando em contato pelo telefone (91) 98129-8434.**

## **CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS**

**Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola e equipe de pesquisadores envolvidos nesse estudo. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.**

## **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 (Hospital Ophir Loyola). Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.**

## **CUSTOS**

**Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para você pela sua participação nesse estudo.**

## **BASES DA PARTICIPAÇÃO**

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Caso você decida interromper sua participação no estudo, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta e o uso das amostras para os fins relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização. Caso isso aconteça o motivo será comunicado a você.

## **GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a **Dra. Cynthia Lins** no telefone **(91) 98129-8434**. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola, situado à Avenida Governador Magalhães Barata, nº 992 Belém - PA, CEP: 66063-240 Telefone: (91) 3342-1100, ou também pelo e-mail: [cmblins@gmail.com](mailto:cmblins@gmail.com).

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a uma biópsia e a um exame de Ressonância das mamas adicionais ao necessário para o meu tratamento e que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

**Autorizo o uso do material coletado para outros projetos com a finalidade de Pesquisa:**

SIM

NÃO

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento

\_\_\_\_\_ dia \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
(Assinatura do Paciente)

\_\_\_\_\_  
(Nome do Paciente – letra de forma )

\_\_\_\_\_ dia \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
(Assinatura de Testemunha, se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo à paciente.

## **Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de sangue para Pesquisa de painel genético de genes de risco para câncer de mama**

**PROJETO: Pesquisa de painel genético de genes de risco para câncer de mama**

Nome do voluntário: -----

Você está sendo convidada a participar de um estudo **que tem por objetivo a pesquisa de um painel genético contendo genes de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. Este painel contém a pesquisa de 17 genes, que são: *ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MRE11A, MUTYH, NBN, PALB2, PTEN, RAD50, STK11, TP53 e TWIST.*** e que envolve a coleta de sangue para a realização do sequenciamento genético destes genes.

O Câncer de mama é o tipo de tumor mais frequente em mulheres no Brasil e o segundo no Estado do Pará. Infelizmente muitos destes tumores são descobertos em estágio avançado, precisando de tratamento com quimioterapia antes da realização de cirurgia, chamado de quimioterapia neoadjuvante. Esta quimioterapia visa diminuir o tumor para melhorar as condições da cirurgia, porém nem todos os pacientes apresentam a mesma redução do tumor. Conhecer algumas características deste tumor, como os genes que pretendemos estudar, é importante para compreender melhor a doença, o tratamento e as respostas à quimioterapia ajudando assim na identificação dos pacientes que se beneficiarão ou não das medicações fornecidas.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

### **OBJETIVO DO ESTUDO**

**Este estudo tem como objetivo a pesquisa de um painel genético contendo genes de risco para o desenvolvimento de câncer de mama nas pacientes com diagnóstico de câncer de mama até os 40 anos de idade, que são consideradas jovens, tratadas no Hospital Ophir Loyola, na cidade de Belém, Estado do Pará.**

### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

**Se você concordar em participar deste estudo será coletado 2 tubos de sangue EDTA, para extração de DNA e realização de sequenciamento genético contendo os genes a serem pesquisados. A coleta de sangue para o sequenciamento genético será realizado por um(a) técnico(a) de laboratório e encaminhado para pesquisador (a) participante desse estudo.** Essas amostras de sangue serão levadas ao laboratório onde será realizado a extração de DNA, a realização de uma biblioteca genética e o sequenciamento direto automático. Essas técnicas tem a finalidade de detecção de genes com relevância patogênica em pacientes que desenvolveram o câncer de mama em idade jovem, até os 40 anos de idade. O material coletado será processado no laboratório do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Se você concordar em participar deste estudo genético os pesquisadores participantes também consultarão seus registros médicos para obter dados que podem ser importantes para compreender o câncer de mama.

## **MÉTODOS ALTERNATIVOS**

**Sua participação nesse estudo é totalmente voluntária. Você não é obrigada a participar do estudo. Se você não concordar em realizar a coleta de sangue, você não participará desse estudo.**

## **RISCOS**

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. É importante que você saiba dos riscos implicados na coleta de sangue. A coleta de sangue é realizada em vários momentos de seu tratamento, como por exemplo: antes de cada ciclo de quimioterapia. A coleta de sangue pode causar uma equimose no local da punção, como também um pequeno processo inflamatório, chamado de flebite. Caso isso aconteça, essas complicações serão controladas pela médico (a) que realizará a coleta.

## **BENEFÍCIOS**

**Você poderá após o sequenciamento genético ter conhecimento da mutação de um dos genes pesquisados que são de risco para o desenvolvimento de câncer mamário, como também de outros tumores. E o conhecimento dessas mutações poderá auxiliar no seu aconselhamento genético como também de seus familiares.**

## **ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

**É importante que você saiba que o seu tratamento será o mesmo, caso aceite ou não participar desse projeto. É que você tem direito de saber qualquer informação gerada nessa pesquisa relacionada à sua doença. Essa pesquisa é coordenada pela Dra. Cynthia Lins, qualquer dúvida que tenha respeito pode ser sanada entrando em contato pelo telefone (91) 98129-8434.**

## **CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS**

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola e equipe de pesquisadores envolvidos nesse estudo. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

## **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 (Hospital Ophir Loyola), assim como o seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

## **CUSTOS**

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para você pela sua participação nesse estudo.

## **BASES DA PARTICIPAÇÃO**

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Caso você decida interromper sua participação no estudo, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta e o uso das amostras para os fins relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização. Caso isso aconteça o motivo será comunicado a você.

## **GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a **Dra. Cynthia Lins** no telefone **(91) 98129-8434**. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola, situado à Avenida Governador Magalhães Barata, nº 992 Belém - PA, CEP: 66063-240 Telefone: (91) 3342-1100, ou também pelo e-mail: [cmblins@gmail.com](mailto:cmblins@gmail.com).

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a uma biópsia e a um exame de Ressonância das mamas adicionais ao necessário para o meu tratamento e que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

**Autorizo o uso do material coletado para outros projetos com a finalidade de Pesquisa:**

**SIM**

**NÃO**

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento

\_\_\_\_\_ dia \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
(Assinatura do Paciente)

\_\_\_\_\_  
(Nome do Paciente – letra de forma )

\_\_\_\_\_ dia \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
(Assinatura de Testemunha, se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo à paciente.

# **ANEXOS**

## Anexo A – Artigo Científico – Fase II do Estudo

### ***MYC* amplification predictive of complete pathological response to docetaxel-based neoadjuvant chemotherapy for breast cancer**

Elsevier Editorial System(tm) for Clinical Breast Cancer  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

**Title:** *MYC* Amplification as a Predictive Factor of Complete Pathological Response to Docetaxel-based Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer

**Article Type:** Original Study

**Keywords:** breast cancer; neoadjuvant chemotherapy; taxane; docetaxel; pathological response; *MYC*.

**Corresponding Author:** Dr. Mariana Ferreira Leal, Ph.D.

**Corresponding Author's Institution:** Universidade Federal de São Paulo

**First Author:** Cynthia Pereira

**Order of Authors:** Cynthia Pereira; Mariana Ferreira Leal, Ph.D.; Eliana Abdelhay; Sâmia Demachki; Paulo Assumpção; Mirian Souza; Caroline Moreira-Nunes; Adriana Tanaka; Marília Smith; Rommel Burbano

**Abstract:** Background: Neoadjuvant chemotherapy is a standard treatment for Stages II and III breast cancer. The identification of biomarkers that may help in the prediction of response to neoadjuvant therapies is necessary for a more precise definition of the best drug or drug combination and induce a better response. Material and methods: We assessed the role of Ki67 and hormone receptors expression, HER2 and *MYC* genes and their protein status, and KRAS codon 12 mutations as predictor factors of pathological response to anthracycline-cyclophosphamide (AC) followed by taxane docetaxel (T) neoadjuvant chemotherapy (AC+T regimen) in 51 invasive ductal breast cancer patients. Results: After neoadjuvant chemotherapy, 82.4% patients showed pathological partial response, with only 9.8% showing pathological complete response. In multivariate analysis, *MYC* immunoreactivity and high *MYC* gain defined as *MYC*/nucleus  $\geq 5$  were significant predictor factors for pathological partial response. Using the ROC curve analysis, the ratio of 2.5 *MYC*/CEP8 (sensitivity of 80% and specificity of 89.1%) or 7 *MYC*/nuclei copies (sensitivity of 80% and specificity of 73.9%) as the best cutoff in predicting a pathological complete response was identified. Thus, *MYC* may have a role in chemosensitivity to anthracycline-cyclophosphamide and/or docetaxel drugs. Additionally, *MYC* amplification may be a predictor factor of pathological response to AC+T regimen in breast cancer patients. Moreover, patients with increased number of *MYC* copies showed more frequently pathological complete response to this neoadjuvant treatment. Conclusion: The analysis of *MYC* amplification may help in the identification of patients that may have better response to AC+T treatment.

**Suggested Reviewers:** Janete Cerutti

j.cerutti@unifesp.br

Cancer researcher  
Roger Chammas  
rchammas@usp.br

Cancer researcher  
Denise Christofolini  
denise.christofolini@fmabc.br

Geneticist  
Opposed Reviewers:

## Cover letter



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

São Paulo, July 18<sup>th</sup> 2016

**Title:** *MYC* Amplification as a Predictive Factor of Complete Pathological Response to Docetaxel-based Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer

**Authors:** Cynthia Brito Lins Pereira, Mariana Ferreira Leal, Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay, Sâmia Demachki, Paulo Pimentel Assumpção, Mirian Carvalho de Souza, Caroline Aquino Moreira-Nunes, Adriana Tanaka, Marília Cardoso Smith, Rommel Rodríguez Burbano

Dear editor,

On behalf of my co-authors, I submit the manuscript entitle “*MYC* Amplification as a Predictive Factor of Complete Pathological Response to Docetaxel-based Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer” for consideration by the Clinical Breast Cancer. The content of the manuscript is original and it has not been published or accepted for publication, either in whole or in part, in any form. No part of the manuscript is currently under consideration for publication elsewhere.

All authors have contributed significantly, and that all authors are in agreement with the content of the manuscript. All authors have approved the final manuscript. All authors declare that they have no conflicts of interest.

In the present study, we evaluated hormone receptor expression, Ki67, HER2 and *MYC* genes and their protein status, and KRAS codon 12 mutations in 51 breast tumors from women who underwent neoadjuvant chemotherapy with anthracycline-cyclophosphamide followed by taxane docetaxel (AC+T regimen). Several analyses have been performed to identify the risk factors for breast cancer progression and the patients who respond best to a specific treatment. To our knowledge, this is the first study to evaluate the prognosis significance of *MYC* and *KRAS* alterations concomitantly with hormone receptors and HER2 status, in breast cancer patients treated with this chemotherapy regimen. After neoadjuvant chemotherapy, 82.4% patients showed pathological partial response, with only 9.8% showing pathological complete response.

We performed univariate and multivariate statistical analyses. In multivariate analysis, it was observed that *MYC* immunoreactivity and high *MYC* gain defined as *MYC*/nucleus  $\geq 5$  were significant predictor factors for pathological partial response. Using the ROC curve analysis, the ratio of 2.5 *MYC*/CEP8 (sensitivity of 80% and specificity of 89.1%) or 7 *MYC*/nuclei copies (sensitivity of 80% and specificity of 73.9%) as the best cutoff in predicting a pathological complete response was identified. Thus, *MYC* may have a role in chemosensitivity to anthracycline-cyclophosphamide and/or docetaxel drugs. Additionally, *MYC* amplification may be a predictor factor of pathological response to AC+T regimen in breast cancer patients. Moreover, patients with increased number of *MYC* copies showed more frequently pathological complete response to this neoadjuvant treatment. The analysis of *MYC* amplification may help in the identification of patients that may have better response to AC+T treatment.

This study was approved by the appropriate ethics committee.

No picture is showed in the manuscript.

Thank you in advance,

*Mariana Ferreira Leal*

Mariana Ferreira Leal, Ph.D.

Federal University of São Paulo

Office phone number: +55-11- 55764260 / Office fax number: +55-11-55764260

E-mail address: mariana.morf@epm.br.

## Highlights

### Microabstract

- The identification of biomarkers may help in the prediction of response to neoadjuvant therapies.
- Ki67, hormone receptors, *HER2*, *MYC* and *KRAS* role as predictor factors of response to anthracycline-cyclophosphamide followed by taxane neoadjuvant chemotherapy was investigated in 51 breast cancer patients.
- *MYC* amplification analysis may help in the identification of patients that better response to this treatment.

**\*Manuscript**

[Click here to download Manuscript: Pereira Leal et al - Breast cancer - without table.docx](#)

## ***MYC* Amplification as a Predictive Factor of Complete Pathological Response to Docetaxel-based Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer**

Cynthia Brito Lins Pereira<sup>1,2,3\*</sup>, Mariana Ferreira Leal<sup>1,4,5\*</sup>, Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay<sup>2</sup>, Sâmia Demachki<sup>1</sup>, Paulo Pimentel Assumpção<sup>1</sup>, Mirian Carvalho de Souza<sup>2</sup>, Caroline Aquino Moreira-Nunes<sup>6</sup>, Adriana Michiko da Silva Tanaka<sup>7</sup>, Marília Cardoso Smith<sup>4</sup>, Rommel Rodríguez Burbano<sup>1,3</sup>.

\*Both authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, 66073–000, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro – RJ, 20230-130, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Ophir Loyola, Belém – PA, 66060-281, Brazil.

<sup>4</sup>Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo – SP, 04023-900, Brazil.

<sup>5</sup>Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo – SP, 04038-032, Brazil.

<sup>6</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 60020-181, Brazil.

<sup>7</sup>Clínica de Radiologia Lobo, Belém – PA, 66055-240, Brazil.

To whom correspondence should be addressed: Mariana Ferreira Leal, Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil. Email: mariana.morf@epm.br. Telephone: +55-11-5576-4848-2374. Fax: +55-11-5576-4260.

### **Abstract**

Background: Neoadjuvant chemotherapy is a standard treatment for Stages II and III breast cancer. The identification of biomarkers that may help in the prediction of response to neoadjuvant therapies is necessary for a more precise definition of the best drug or drug combination and induce a better response. Material and methods: We assessed the role of Ki67 and hormone receptors expression, *HER2* and *MYC* genes and their protein status, and *KRAS* codon 12 mutations as predictor factors of pathological response to anthracyclinecyclophosphamide (AC) followed by taxane docetaxel (T) neoadjuvant chemotherapy (AC+T regimen) in 51 invasive ductal breast cancer patients. Results: After neoadjuvant chemotherapy, 82.4% patients showed pathological partial response, with only 9.8% showing pathological complete response. In multivariate analysis, *MYC* immunoreactivity and high *MYC* gain defined as  $MYC/nucleus \geq 5$  were significant predictor factors for pathological partial response. Using the ROC curve analysis, the ratio of 2.5 *MYC/CEP8* (sensitivity of 80% and specificity of 89.1%) or 7 *MYC/nuclei* copies (sensitivity of 80% and specificity of 73.9%) as the best cutoff in predicting a pathological complete response was identified. Thus, *MYC* may have a role in chemosensitivity to anthracyclinecyclophosphamide and/or docetaxel drugs. Additionally, *MYC* amplification may be a predictor factor of pathological response to AC+T regimen in breast cancer patients. Moreover, patients with increased number of *MYC* copies showed more frequently pathological complete response to this neoadjuvant treatment. Conclusion: The analysis of *MYC* amplification may help in the identification of patients that may have better response to AC+T treatment.

**Keywords:** breast cancer; neoadjuvant chemotherapy; taxane; docetaxel; pathological response; MYC.

## **Background**

Breast cancer is one of the major causes of death by cancer in women. Neoadjuvant chemotherapy is one of the standard treatments for Stage II and III breast cancer, however prognosis is reportedly better in patients who have achieved a pathological complete response (pCR) compared with those who have not.<sup>1</sup> Several neoadjuvant chemotherapy protocols have been used, but the identification of patients who would better respond to a specific neoadjuvant regimen remains arbitrary. The development of strategies for accurate prediction of patient response to commonly used chemotherapeutic drugs are still necessary and may limit the use of ineffective treatments in many patients.<sup>2</sup>

Biomarkers that predict response to therapy may eliminate unnecessary treatments or could help adapt treatment regimens to induce a better response.<sup>3</sup> It is still important to determine the best predictive biomarker for each neoadjuvant drug or drug combinations. We previously evaluated the association between hormone receptor expression, HER2 and MYC genes and their protein status, and KRAS codon 12 mutations in breast cancer with clinicopathological features and chemotherapy response in breast cancer patients from Northern Brazil.<sup>4</sup> We demonstrated that MYC amplification defined as MYC/nucleus ratio of  $\geq 2.5$  was a protective factor for anthracycline-cyclophosphamide (AC) neoadjuvant chemotherapy resistance in these patients.<sup>4</sup> However, only about 15–20% of patients treated with standard neoadjuvant chemotherapy (such as AC treatment) show pCR.<sup>5</sup> This proportion can increase to 26% in a regimen with AC treatment followed by a taxane,<sup>6</sup> such as docetaxel and paclitaxel. The taxanes have substantial activity against breast cancer, even after failed treatment with anthracyclines.<sup>7</sup> However, the treatment with this regimen presents several adverse effects, including nausea, vomiting, low white blood cell counts, cardiotoxicity, fever, diarrhea, and peripheral neuropathy.<sup>8,9</sup> Nowadays, there are no clinically useful predictive markers to identify patients who are likely to respond to taxanes.<sup>10</sup>

Therefore, in the present study, we aimed to assess the role of Ki67 and hormone receptors expression, HER2 and MYC genes and their protein status, and KRAS codon 12 mutations as predictor factors of pathological response to AC followed by taxane neoadjuvant chemotherapy (AC+T regimen) in breast cancer patients.

## **Material and Methods**

### *Patients and tumor samples*

Between 2012 and 2015, 51 female patients were selected from a cohort of patients with locally advanced invasive ductal carcinoma who underwent therapeutic surgery for a first incidence of breast cancer. All tumors were at stage III according to TNM staging.<sup>11</sup>

Cardiac problems, pregnancy, lactation or any other contraindication for neoadjuvant chemotherapy were the exclusion criteria. Patients with incomplete neoadjuvant chemotherapeutic cycle (2 patients) were also not included. Signed informed consent was obtained from all patients prior to samples collection with the approval of the ethics committee of the Ophir Loyola Hospital (Protocol #184.445). All patients were from Northern Brazil, where human population is composed of interethnic crosses between three main origin groups: European (mainly represented by the Portuguese), Africans, and Amerindians.<sup>12</sup> The mean age of patients was 43.7 years (range of 25–62). Table 1 shows the clinicopathologic characteristics of the 51 studied patients.

All patients were treated at Ophir Loyola Hospital (Pará State, Brazil) and received Adriamycin (doxorubicin; 60 mg/m<sup>2</sup>) plus Cytosan (cyclophosphamide; 600 mg/m<sup>2</sup>) by intravenous every

21 days for four cycles and then taxane docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>) by intravenous every 21 days for four cycles. No patient was treated with trastuzumab chemotherapy.

Tumors samples obtained by incisional biopsy before neoadjuvant were formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE). Sections of FFPE tissue were stained with hematoxylineosin for histological evaluation or used for immunohistochemical, fluorescence in situ hybridization (FISH) and polymerase chain reaction (PCR) analyses.

#### *Clinical and pathological response evaluation*

Before neoadjuvant chemotherapy treatment and surgery, patients were examined using a 1.5 tesla MRI scanner (GE Healthcare, Germany) and gadolinium-based contrast media (10 mL). No clinical evidence of tumor in the breast and axillary lymph nodes was defined as a clinical complete response (cCR). Reduction in total tumor size of 50% or greater was graded as a clinical partial response (cPR). Tumors were defined as treatment resistant if no response (less than 50% reduction or less than 25% increase) or progression (at least a 25% increase or presence of new lesions) was observed.

Pathological response of breast cancers to neoadjuvant treatment was assessed in the 51 patients. Pathologic complete response (pCR) was defined as no residual invasive tumor in the breast and the regional lymph nodes by the anatomopathological evaluation of the surgical samples.<sup>13,14</sup> A pathologic partial response (pPR) was defined as a specimen with evidence of residual tumor.

#### *Immunohistochemistry*

Immunohistochemistry was performed with primary monoclonal antibodies against Ki67 (MIB-1, Dako, USA) ER (SAB4500810, Sigma, USA), PR (HPA004751, Sigma, USA), HER2 (Clone CB11, Life Technologies, USA) or *MYC* (clone 289–19510, Life Technologies, USA) as previously described by our group.<sup>4</sup> Positive Ki67, ER, PR or *MYC* expression was defined as clear nuclear immunostaining in more than 10% of tumor cells.<sup>15-18</sup> Since there is no standard cutoff for Ki67 analysis, the percentage of Ki67 staining and the cut off 20%<sup>19,20</sup> or 35% (Ki67 high)<sup>21,22</sup> were also recorded in each case. HER2 protein staining was scored as 0 (negative), 1+ (weakly positive), 2+ (moderately positive) and 3+ (strongly positive).<sup>23</sup> Double-blind analysis was performed on all samples.

#### *Dual-color FISH*

*HER2* and *MYC* amplification analyses by dual-color FISH assay were also performed as previously described.<sup>4</sup> For the detection of *HER2* amplification, the ratio of *HER2* signals to chromosome 17 (CEP17) signals was calculated according to the established guidelines. Patients were stratified depending on their *HER2* gene status as: amplified if *HER2*/CEP17 ratio >2.2; not amplified if *HER2*/CEP17 <1.8; equivocal if 1.8 < *HER2*/CEP17 < 2.2.<sup>23</sup> *MYC* amplification was defined as the ratio of *MYC* signals to chromosome 8 (CEP8) signals >2.2.<sup>24,25</sup> Additionally, high *MYC* gain was defined as  $\geq 5$  *MYC* copies/nucleus.<sup>25</sup> Cases with  $\geq 2.5$  *MYC* copies/nucleus or *MYC*/CEP8 ratio  $\geq 1.3$  were considered to present at least low *MYC* gain<sup>25</sup> or gene duplication,<sup>24,25</sup> respectively.

#### *Mutation analysis*

*KRAS* mutation analysis was performed by PCR-RFLP<sup>26</sup> and DNA sequencing<sup>4</sup> as previously performed by our group. A wild-type sample of peripheral blood lymphocytes from normal healthy individual and a colorectal cancer sample with codon 12 mutations were used as negative and positive controls, respectively. The controls were included in all experiments. All reactions were performed in duplicate.

#### *Statistical analyses*

Chi-squared ( $\chi^2$ ) test was used to investigate the possible associations between protein expression, gene amplification or mutation. Univariate and multivariate logistic regression were used to identify variables that may help to predict pPR and pCR. In addition, we performed an ROC curve to evaluate the change in *MYC* copies that predicted for pCR. In all analyses, p

values less than 0.05 were considered significant. Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals are shown.

## **Results and Discussion**

### *Treatment response*

All patients presented tumors greater than 2 cm before treatment by MRI evaluation. Among the studied patients, 41 (80.4%) displayed at least cPR, including 12 (23.5%) showing cCR. After neoadjuvant chemotherapy, 42 (82.4%) patients presented at least pPR, with only 5 (9.8%) showing pCR. However, 8 (15.7%) cases presented clinical complete response but without pCR and therefore were false-positives. The presence of falsepositives in the MRI evaluation may be explained by the residual invasive cancer which does not require vasculature due to their small tumor volumes or a low viability of cancer cells.<sup>27</sup> The presence of cPR, cCR, pPR or pCR did not depend of the time interval between diagnosis and treatment or the time between the onset symptoms and diagnosis ( $p > 0.05$ ; univariate logistic regression analysis). Since the pathologic evaluation is more accurate to determine the treatment response, we used pPR and pCR as the primary endpoints of the following analyses of the present study.

### *Predictor factors for pPR*

Table 1 shows the relationship between the pPR rate and the clinicopathological characteristic as well as biomarkers. In our sample, T4 tumors were less responsive (pPR) than T3 tumors ( $p=0.048$ ;  $OR=0.21$ ; 95% CI: 0.48–0.99; Univariate logistic regression). Therefore, multivariate logistic regression analyses were adjusted for T stage. Although the presence of distant metastasis was not a predictor factor for pPR by logistic regression analysis, distant metastasis was more frequently observed in patients without pPR than in patients with pPR ( $p<0.001$ ;  $X^2$  test).

Ki67 is a nuclear marker of proliferation which is expressed in all phases of the cell cycle, with the exception of G0 phase.<sup>28</sup> Ki67 is a prognostic marker in early breast cancer, its role in breast cancer management remains uncertain.<sup>29</sup> In the present study, Ki67 positive expression ( $\geq 10\%$  cells with immunoreactivity) was detected in all cases. The mean Ki67 expression was 36% (range of 10%–90%). Since there is no standard cutoff for Ki67 analysis, we evaluated whether the percentage of Ki67 staining, as well as the cutoff of 20% or 35% (Ki67 high), may be a predictor factor for pathologic response. No association was observed between the percentage of Ki67 expression and pPR ( $p=0.478$ ;  $OR=0.35$ ; 95% CI: 0.02–6.18; Univariate logistic regression). Additionally, both cutoffs of 20% or 35% were not predictors factors for pPR ( $p>0.05$ ; Univariate logistic regression). Although no consensus is reached, some previous studies reported that Ki67 may have a predictive role for clinical or pathological response to neoadjuvant chemotherapy (see review<sup>30</sup>). The percentage of tumors with low Ki67 was lower in the present cohort than in other previously studies, in which about 50% of tumors had a low Ki67.<sup>21,31</sup> In addition to tumor heterogeneity, differences in neoadjuvant chemotherapy regimens and in studied populations may explain the variances among the studies.

Previous studies reported that patients with hormone-positive tumors presented early response with AC+T treatment.<sup>32</sup> The estrogen and progesterone receptors immunoreactivity were detected in 28 (54.9%) and 30 (58.8%) samples, respectively. Although estrogen-positive receptor tumor presented pPR more frequently than estrogennegative receptor tumors ( $p=0.044$ ;  $OR=5.69$ ; 95% CI: 1.05–30.83; Univariate logistic regression) in the present cohort, it did not remain significant predict factor for pPR by a multivariate logistic regression model adjusting by T stage ( $p=0.112$ ).

Despite in vitro studies demonstrated that HER2 overexpression confers increased resistance to paclitaxel in breast cancer cells, controversial results regarding the relationship between HER2 and taxane benefits in breast cancer have been published (see review<sup>10</sup>). Here, HER2 protein staining was scored as 0, 1+ and 3+ in 31 (60.8%), 7 (13.7%) and 13 (25.5%) of tumors,

respectively. *HER2* amplification was observed in 22 (43.1%) of cases. All cases with 3+ protein staining score presented *HER2* amplification. *HER2* expression and its amplification were not predictors factors for pPR in our sample ( $p > 0.05$ ; Univariate logistic regression). Our results agree with the studies showing that *HER2* has not a predictive value regarding taxane-based treatment (without combined trastuzumab treatment) response<sup>33-36</sup> and, therefore it is still not ready to use in current clinical practice to predict this type of chemotherapy treatment response.<sup>10</sup>

*MYC* is a transcription factor that is now known to be one of the most frequently deregulated oncogenes.<sup>37</sup> *MYC* constitutes a direct target and effector of growth regulatory pathways, influencing basic cellular processes such as cell proliferation, growth, apoptosis, energy metabolism and various biosynthetic pathways (see review<sup>38</sup>). *MYC* overexpression and activation occur mainly by gene amplification or translocation.<sup>39</sup> In the present study, *MYC* immunoreactivity was detected in 36 (70.6%) of the cases. The presence of *MYC* amplification, defined as the ratio of *MYC* signals to chromosome 8 (CEP8) signals  $\geq 2.2$ <sup>24,25</sup> was observed in 27 (52.9%) of tumors. However, all tumors presented  $\geq 2.5$  *MYC* copies/nucleus, which included low *MYC* gain,<sup>25</sup> and 50 (98%) cases presented at least *MYC* duplication (*MYC*/CEP8 ratio  $\geq 1.3$ ).<sup>24,25</sup> Additionally, high *MYC* gain defined as  $\geq 5$  *MYC* copies/nucleus was detected in 35 (68.6%) of breast cancer samples. *MYC* immunoreactivity was more frequently observed in the tumors with *MYC* amplification (75% vs 25%;  $p < 0.001$ ;  $X_2$  test) or with high *MYC* gain (88.9% vs 11.1%;  $p < 0.001$ ;  $X_2$  test) than in tumors without *MYC* gain. Both *MYC* expression ( $p = 0.013$ ; OR=7.33; 95% CI: 1.53–35.24; Univariate logistic regression) and high *MYC* gain ( $p = 0.002$ ; OR=34; 95% CI: 3.70–312.09; Univariate logistic regression) were also associated with pPR. In the multivariate logistic regression model, *MYC* immunoreactivity ( $p = 0.024$ ; OR=6.46; 95% CI: 1.27–32.74) and high *MYC* gain ( $p = 0.004$ ; OR=29.91; 95% CI: 2.92–306.50) remained significant. Furthermore, the presence of *MYC*/CEP8 ratio  $\geq 2.2$  was not a predictor factor for pPR by logistic regression analysis; however, it was more frequent in tumors samples of patients with pPR than in patients without pPR ( $p = 0.047$ ;  $X_2$  test).

As described above, our group previously observed that *MYC* amplification was a biomarker for clinical response for AC neoadjuvant chemotherapy.<sup>4</sup> Additionally, Yasojima et al. showed that *MYC* amplification is significantly associated with a high pCR rate to 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide (P-FEC) in breast tumors.<sup>40</sup> Moreover, Kurosumi et al. described that breast cancer whose tumors overexpressed *HER2* showing a high signal ratio *MYC*/CEP17 ( $> 2.5$ ) might be more sensitive to the treatment with docetaxel and trastuzumab.<sup>41</sup> *In vitro*, taxane paclitaxel and docetaxel seems to preferentially inhibit the proliferation of *MYC*-amplified cell lines.<sup>42</sup> In breast cancer cell lines, Uitdehaag et al.

showed that neratinib and docetaxel drugs show a synergistic effect specific for the *MYC*-amplified cells and suggested that the combination of this chemotherapy drugs can be target depending on tumor cells.<sup>42</sup> Thus, *MYC* may have a role in chemosensitivity to AC and/or docetaxel drugs.

Activation of RAS plays a critical role in cell growth control through the enhancing of active *MYC* protein.<sup>43</sup> In a transgenic mouse model, the synergistic effects of *Myc* and the mutant *Kras* leads to breast tumor formation, maintenance, and recurrence.<sup>44</sup> *KRAS* mutations result in reduced intrinsic GTPase activity, which result in constitutive activation of *KRAS* itself and downstream signaling pathways, thereby mediating malignant transformation.<sup>45</sup> As previously reported by our group,<sup>4</sup> *KRAS* mutation was associated with *MYC* amplification and expression in the studied cohort of breast cancer samples ( $p < 0.05$ ; for the comparisons;  $X_2$  test). Thus, we also evaluated whether *KRAS* mutation status may help in the prediction of pPR. *KRAS* codon 12 mutation was observed in 8 (15.7%) of tumors. The tumors with *KRAS* mutation were less responsive to neoadjuvant chemotherapy cycles than wild-type *KRAS* tumors ( $p = 0.017$ ; OR=0.13; 95% CI: 0.03–0.70; Univariate logistic regression). In the multivariate logistic

regression model, this factor remained significant ( $p=0.025$ ; OR=0.13; 95% CI: 0.02–0.77). Then, we conducted another multivariate regression model to identify predictors of pPR entering T stage, *KRAS* mutation, *MYC* expression or its amplification (testing the different cutoffs described above for *MYC* status) as dependent variables. In this multivariate analysis, only high *MYC* gain was a significant independent predictor factor ( $p=0.013$ ; OR=21.481; 95% CI: 1.91–241.46). Therefore, further investigation is still necessary to understand *KRAS* mutation role in response to AC+T chemotherapy for breast cancer.

#### *Predictor factor for pCR*

Concerning the possible predictors of pCR, no categorical factor was a significant biomarker in the primary logistic regression analysis. However, increased *MYC*/nuclei ( $p=0.015$ ; OR=2.78; 95% CI: 1.22–6.33; Univariate logistic regression) or *MYC*/CEP8 ( $p=0.003$ ; OR=29.89; 95% CI: 3.12–286.00; Univariate logistic regression) were associated with pCR. Therefore, we performed an ROC curve to evaluate the change in *MYC* copies that predicted for pCR. This curve and the corresponding AUC show that *MYC*/nuclei (AUC=81.3%,  $p=0.023$ ) or *MYC*/CEP8 (AUC=87.8%,  $p=0.006$ ) have predictive ability to discriminate patients with pCR from those without pCR. Using the ROC curve analysis, we identified the ratio of 2.5 *MYC*/CEP8 or 7 *MYC*/nuclei copies as the best cutoff in predicting a pCR to neoadjuvant chemotherapy. The 2.5 *MYC*/CEP8 cutoff value was associated with an optimal sensitivity of 80% and specificity of 89.1%. The 7 *MYC*/nuclei cutoff value was associated with an optimal sensitivity of 80% and specificity of 73.9%.

The univariate logistic analysis confirmed that 2.5 *MYC*/CEP8 and 7 *MYC*/nuclei cutoff were predictor factors for pCR. Tumor with  $\geq 2.5$  *MYC*/CEP8 ( $p=0.004$ ; OR=32.8; 95% CI: 3.04–354.36) or  $\geq 7$  *MYC*/nuclei ( $p=0.038$ ; OR=11.33; 95% CI: 1.15–111.69) ratio presented increased rate of pCR.

Therefore, the analysis of *MYC* amplification adds in the determination of the best neoadjuvant treatment for breast cancer patients. Taking together our results and those from literature, we suggest that the *MYC* amplification investigation should be included in clinical practice as it is already performed for hormone receptors and HER2 expression/amplification. In this analysis, patients with higher number of *MYC* copies seems to have increased odds to present cPR and the AC+T regimen should be indicated.

#### **Conclusion**

Our results highlight that *MYC* amplification is a predictor factor of pathological response to AC+T regimen in breast cancer patients. Moreover, patients with increased number of *MYC* copies showed more frequently pCR to this neoadjuvant treatment. The analysis of *MYC* amplification by FISH may help in the identification of patients that may better response to AC+T treatment.

#### **Funding**

This work was supported by the Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa [grant numbers FAPESPA/PPSUS 011/2013, ICAAF 073/2013]; the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [to RRB and MACS]; and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [to MFL].

#### **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### **References**

1. Kobayashi K, Horii R, Ito Y, et al. Prognostic significance of histological therapeutic effect in preoperative chemotherapy for breast cancer. *Pathol Int.* 2016;66:8-14.

2. Staunton JE, Slonim DK, Collier HA, et al. Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:10787-10792.
3. Brown JR, DiGiovanna MP, Killelea B, Lannin DR, Rimm DL. Quantitative assessment Ki-67 score for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Lab Invest*. 2014;94:98-106.
4. Pereira CB, Leal MF, de Souza CR, et al. Prognostic and predictive significance of MYC and KRAS alterations in breast cancer from women treated with neoadjuvant chemotherapy. *PLoS One*. 2013;8:e60576.
5. Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol*. 2006;24:1940-1949.
6. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008;26:778-785.
7. Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*. 2006;24:2019-2027.
8. Smith RE, Anderson SJ, Brown A, et al. Phase II trial of doxorubicin/docetaxel/cyclophosphamide for locally advanced and metastatic breast cancer: results from NSABP trial BP-58. *Clin Breast Cancer*. 2002;3:333-340.
9. Valero V, Perez E, Dieras V. Doxorubicin and taxane combination regimens for metastatic breast cancer: focus on cardiac effects. *Semin Oncol*. 2001;28:15-23.
10. Azambuja E, Durbecq V, Rosa DD, et al. HER-2 overexpression/amplification and its interaction with taxane-based therapy in breast cancer. *Ann Oncol*. 2008;19:223-232.
11. Sobin LH, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumours*. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2004.
12. Batista dos Santos SE, Rodrigues JD, Ribeiro-dos-Santos AK, Zago MA. Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the Amazon region as revealed by mtDNA and Y-DNA. *Am J Phys Anthropol*. 1999;109:175-180.
13. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999;17:460-469.
14. Feldman LD, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Ames FC, Blumenschein GR. Pathological assessment of response to induction chemotherapy in breast cancer. *Cancer research*. 1986;46:2578-2581.
15. Moon HG, Han W, Ahn SK, et al. Breast cancer molecular phenotype and the use of HER2-targeted agents influence the accuracy of breast MRI after neoadjuvant chemotherapy. *Annals of surgery*. 2013;257:133-137.
16. Barinoff J, Hils R, Bender A, et al. Clinicopathological differences between breast cancer in patients with primary metastatic disease and those without: a multicentre study. *Eur J Cancer*. 2013;49:305-311.
17. da Costa Jde F, Leal MF, Silva TC, et al. Experimental gastric carcinogenesis in Cebus apella nonhuman primates. *PLoS One*. 2011;6:e21988.
18. Silva TC, Leal MF, Calcagno DQ, et al. hTERT, MYC and TP53 deregulation in gastric preneoplastic lesions. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:85.

19. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med.* 2010;1:747-754.
20. Tashima R, Nishimura R, Osako T, 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.* 2015;10:e0119565.
21. Denkert C, Loibl S, Muller BM, et al. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol.* 2013;24:2786-2793.
22. Horimoto Y, Arakawa A, Tanabe M, et al. Ki67 expression and the effect of neoadjuvant chemotherapy on luminal HER2-negative breast cancer. *BMC cancer.* 2014;14:550.
23. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:118-145.
24. Singhi AD, Cimino-Mathews A, Jenkins RB, et al. MYC gene amplification is often acquired in lethal distant breast cancer metastases of unamplified primary tumors. *Mod Pathol.* 2012;25:378-387.
25. Perez EA, Jenkins RB, Dueck AC, et al. C-MYC alterations and association with patient outcome in early-stage HER2-positive breast cancer from the north central cancer treatment group N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol.* 2011;29:651-659.
26. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A, et al. Mutations of the KRAS oncogene in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society.* 2009;47:65-68.
27. Hayashi Y, Takei H, Nozu S, et al. Analysis of complete response by MRI following neoadjuvant chemotherapy predicts pathological tumor responses differently for molecular subtypes of breast cancer. *Oncol Lett.* 2013;5:83-89.
28. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133:1710-1715.
29. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1656-1664.
30. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The lancet oncology.* 2010;11:174-183.
31. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast cancer research and treatment.* 2013;139:539-552.
32. von Minckwitz G, Blohmer JU, Costa SD, et al. Response-guided neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31:3623-3630.
33. Noguchi S. Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. *Cancer Sci.* 2006;97:813-820.
34. Sjostrom J, Collan J, von Boguslawski K, et al. C-erbB-2 expression does not predict response to docetaxel or sequential methotrexate and 5-fluorouracil in advanced breast cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38:535-542.
35. Miyoshi Y, Kurosumi M, Kurebayashi J, et al. Low nuclear grade but not cell proliferation predictive of pathological complete response to docetaxel in human breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134:561-567.
36. Learn PA, Yeh IT, McNutt M, et al. HER-2/neu expression as a predictor of response to neoadjuvant docetaxel in patients with operable breast carcinoma. *Cancer.* 2005;103:2252-2260.

37. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov.* 2015;5:1024-1039.
38. Kress TR, Sabo A, Amati B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nat Rev Cancer.* 2015;15:593-607.
39. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol.* 2006;16:318-330.
40. Yasojima H, Shimomura A, Naoi Y, et al. Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Cancer.* 2011;47:1779-1788.
41. Kurosumi M, Tabei T, Sano M, et al. Relationship between the signal ratios of HER-2/CEP17 and c-MYC/CEP17 and the pathological response of neoadjuvant therapy using docetaxel and trastuzumab in breast cancer. *Mol Med Rep.* 2008;1:71-75.
42. Uitdehaag JC, de Roos JA, van Doornmalen AM, et al. Selective Targeting of CTNBB1-, KRAS- or MYC-Driven Cell Growth by Combinations of Existing Drugs. *PLoS One.* 2015;10:e0125021.
43. Sears R, Leone G, DeGregori J, Nevins JR. Ras enhances Myc protein stability. *Molecular cell.* 1999;3:169-179.
44. Podsypanina K, Politi K, Beverly LJ, Varmus HE. Oncogene cooperation in tumor maintenance and tumor recurrence in mouse mammary tumors induced by Myc and mutant Kras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105:5242-5247.
45. Stolze B, Reinhart S, Bullinger L, Frohling S, Scholl C. Comparative analysis of KRAS codon 12, 13, 18, 61, and 117 mutations using human MCF10A isogenic cell lines. *Sci Rep.* 2015;5:8535.
46. 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.* 1991;19:403-410.

Table 1. Partial pathological response to neoadjuvant chemotherapy in relation to clinicopathological characteristics and biomarkers tumor status in a series of 51 breast cancer patients

Characteristic	N	Without pPR [N (%)]	With pPR [N (%)]	p-value <sup>a</sup>	Adjusted p-value <sup>b</sup>
<b>Age (years)</b>					
< 40	19	4 (21.1)	15 (78.9)	0.624	0.578 <sup>c</sup>
≥ 40	32	5 (15.6)	27 (84.4)		
<b>Menopausal status</b>					
Premenopause	38	8 (21.1)	30 (78.9)	0.297	0.243 <sup>c</sup>
Menopause	13	1 (7.7)	12 (92.3)		
<b>Smoking habit</b>					
No-smoker	42	8 (18.6)	35 (81.4)	0.680	0.700 <sup>c</sup>
Smoker	8	1 (12.5)	7 (87.5)		
<b>BMI</b>					
Non-obese (< 30)	38	6 (15.8)	32 (84.2)	0.554	0.452 <sup>c</sup>
Obese (≥ 30)	13	3 (23.1)	10 (76.9)		
<b>Grade<sup>d</sup></b>					
1/2	26	5 (19.2)	21 (80.8)	0.814	0.526 <sup>c</sup>
3	25	4 (16)	21 (84)		
<b>Tumor invasion<sup>e</sup></b>					
T3	37	4 (10.8)	33 (89.2)	0.048*	-
T4	14	5 (35.7)	9 (64.3)		

<b>Lymph node metastasis<sup>e</sup></b>					
Absent	3	0 (0)	3 (100)	0.999	0.999 <sup>e</sup>
Present	48	9 (18.8)	39 (81.3)		
<b>Distant metastasis<sup>e</sup></b>					
Absent	37	0 (0)	37 (100)	0.997	0.997 <sup>e</sup>
Present	14	9 (64.3)	5 (35.7)		
<b>Ki67 expression<sup>f</sup></b>					
< 20%	17	2 (11.8)	15 (88.2)	0.504	0.971 <sup>e</sup>
≥ 20%	31	6 (19.4)	25 (80.6)		
<b>High Ki67 expression<sup>f</sup></b>					
Negative (< 35%)	26	2 (7.7)	24 (92.3)	0.087	0.240
Positive (≥ 35%)	22	6 (27.3)	16 (72.7)		
<b>ER expression</b>					
Negative	23	7 (30.4)	16 (69.6)	0.044*	0.112
Positive	28	2 (7.1)	26 (92.9)		
<b>PR expression</b>					
Negative	21	5 (23.8)	16 (76.2)	0.340	0.562
Positive	30	4 (13.3)	26 (86.7)		
<b>HER2 expression</b>					
0/1+	38	5 (13.2)	33 (86.8)	0.162	0.113 <sup>e</sup>
3+	13	4 (30.8)	9 (69.2)		
<b>HER2 amplification</b>					
Negative (<2.2 <i>HER2</i> /CEP17)	29	4 (13.8)	25 (86.2)	0.411	0.288 <sup>e</sup>

Positive ( $\geq 2.2$ <i>HER2</i> /CEP17)	22	5 (22.7)	17 (77.3)		
<b>Breast cancer subtype</b>					
Luminal A	22	2 (9.1)	20 (90.9)	0.579	0.460
Luminal B	14	3 (21.4)	11 (78.6)		
HER2 overexpression	8	2 (25)	6 (75)		
Triple-negative	7	2 (28.6)	5 (71.4)		
<b>MYC expression</b>					
Negative	15	6 (40)	9 (60)	0.013*	0.024*
Positive	36	3 (8.3)	33 (91.7)		
<b>MYC amplification</b>					
Negative ( $< 2.2$ <i>MYC</i> /CEP8)	24	7 (29.2)	17 (70.8)	0.057	0.077
Positive ( $\geq 2.2$ <i>MYC</i> /CEP8)	27	2 (7.4)	25 (92.6)		
<b>High <i>MYC</i> gain</b>					
Negative ( $< 5$ <i>MYC</i> /nuclei)	16	8 (50)	8 (50)	0.002*	0.004*
Positive ( $\geq 5$ <i>MYC</i> /nuclei)	35	1 (2.9)	34 (97.1)		
<b><i>KRAS</i> mutation</b>					
Absent	43	5 (11.6)	38 (88.4)	0.017*	0.025*
Present	8	4 (50)	4 (50)		

---

\*Significant predictor factor for pPR; <sup>a</sup>p-value of univariate logistic regression; <sup>b</sup>p-value of multivariate analysis adjusted for T status (T3 vs T4); <sup>c</sup>T status remained a significant predictor factor for pPR; <sup>d</sup>Histological grade was assessed using the modified Scarff-Bloom-Richardson system [41]; <sup>e</sup>According to TNM staging [11]; <sup>f</sup>Three tumors samples were not evaluated. N: number of samples; pPR: pathologic partial response to neoadjuvant chemotherapy; BMI: body mass index; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; CEP17: chromosome 17 centromere signal; CEP8: chromosome 8 centromere signal.

# Prognostic and Predictive Significance of *MYC* and *KRAS* Alterations in Breast Cancer from Women Treated with Neoadjuvant Chemotherapy

Cynthia Brito Lins Pereira<sup>1</sup>\*, Mariana Ferreira Leal<sup>2</sup>\*, Carolina Rosal Teixeira de Souza<sup>3</sup>, Raquel Carvalho Montenegro<sup>3</sup>, Juan Antonio Rey<sup>4</sup>, Antônio Alberto Carvalho<sup>3</sup>, Paulo Pimentel Assumpção<sup>5</sup>, André Salim Khayat<sup>5</sup>, Giovanni Rebouças Pinto<sup>6</sup>, Sâmia Demachki<sup>5</sup>, Marília de Arruda Cardoso Smith<sup>7</sup>, Rommel Rodríguez Burbano<sup>3</sup>

**1** Mastology Unit, Ophir Loyola Hospital, Belém, PA, Brazil, **2** Department of Orthopaedics and Traumatology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **3** Human Cytogenetics Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil, **4** Research Unit-Unidad de Investigación, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, **5** Nucleu of Research in Oncology, João de Barros Barreto University Hospital, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil, **6** Department of Biomedicine, Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil, **7** Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

## Abstract

Breast cancer is a complex disease, with heterogeneous clinical evolution. Several analyses have been performed to identify the risk factors for breast cancer progression and the patients who respond best to a specific treatment. We aimed to evaluate whether the hormone receptor expression, *HER2* and *MYC* genes and their protein status, and *KRAS* codon 12 mutations may be prognostic or predictive biomarkers of breast cancer. Protein, gene and mutation status were concomitantly evaluated in 116 breast tumors from women who underwent neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin plus cyclophosphamide. We observed that *MYC* expression was associated with luminal B and *HER2* overexpression phenotypes compared to luminal A ( $p < 0.05$ ). The presence of *MYC* duplication or polysomy 8, as well as *KRAS* mutation, were also associated with the *HER2* overexpression subtype ( $p < 0.05$ ). *MYC* expression and *MYC* gain were more frequently observed in early-onset compared to late-onset tumors ( $p < 0.05$ ). *KRAS* mutation was a risk factor of grade 3 tumors ( $p < 0.05$ ). A multivariate logistic regression demonstrated that *MYC* amplification defined as *MYC*/nucleus ratio of  $\geq 2.5$  was a protective factor for chemotherapy resistance. On the other hand, age and grade 2 tumors were a risk factor. Additionally, luminal B, *HER2* overexpression, and triple-negative tumors presented increased odds of being resistant to chemotherapy relative to luminal A tumors. Thus, breast tumors with *KRAS* codon 12 mutations seem to present a worse prognosis. Additionally, *MYC* amplification may help in the identification of tumors that are sensitive to doxorubicin plus cyclophosphamide treatment. If confirmed in a large set of samples, these markers may be useful for clinical stratification and prognosis.

**Citation:** Pereira CBL, Leal MF, de Souza CRT, Montenegro RC, Rey JA, et al. (2013) Prognostic and Predictive Significance of *MYC* and *KRAS* Alterations in Breast Cancer from Women Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. PLoS ONE 8(3): e60576. doi:10.1371/journal.pone.0060576

**Editor:** Balraj Mittal, Sanjay Gandhi Medical Institute, India

**Received:** November 29, 2012; **Accepted:** February 28, 2013; **Published:** March 26, 2013

**Copyright:** © 2013 Pereira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Funding for this study was provided as grants and fellowships from the Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA/PPSUS 247/2009, #300240/2009), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (to RRB and MACS) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (to MFL). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mariana.morf@epm.br

## Introduction

Several analyses have been performed to identify the risk factors for breast cancer (BC) progression. The histological response to preoperative chemotherapy is one of the most reliable predictors for prognosis of BC patients. Many different chemotherapy regimens have been applied in the preoperative setting. However, the identification of patients who respond best to a specific treatment is still critical to the appropriate management.

Some markers have been described as useful factors for prognostic evaluation or predicting therapeutic response. Several studies demonstrated that lack of estrogen (ER) and/or progesterone (PR) receptors predicts for chemosensitivity [1]. On the other hand, it has been proposed that *HER2* (c-erbB2) is a

predictor factor for either resistance or sensitivity to different types of chemotherapeutic agents. However, the literature results are still controversial, especially concerning the response to anthracyclines [2].

ER, PR and *HER2* had been used to classify tumors according to luminal A (ER+/HER2-), luminal B (ER+/HER2+), *HER2* overexpression (ER-/HER2+), and triple-negative (ER-/PR-/HER2-) molecular subtypes. *HER2* overexpression and triple-negative are more aggressive and present poor prognosis than the luminal subtypes [3,4]. Moreover, molecular phenotypes have become increasingly valuable in guiding treatment decisions. However, these markers remain imperfect tools and, therefore, new prognostic and predictive factors are still required to optimize treatments among BC patients [5].

MYC acts as a downstream target of HER2-driven proliferative signals in BC cells *in vitro* [6] and may be regulated by ER or PR contributing to different cell phenotypes [7]. MYC plays a role in the regulation of cell growth and proliferation, metabolism, differentiation, apoptosis, and angiogenesis [8]. MYC amplification and its protein overexpression have been found in about 15% and 40% of BC, respectively [9]. Due to the elevated frequency of alteration, it has been advocated that MYC is involved in BC development and progression [10].

Activation of HER2 induces activation of RAS, which enhances the accumulation of MYC activity by stabilizing the MYC protein [1,11]. In a transgenic mouse model, the synergistic effects of *Myc* and the mutant *kias* leads to breast tumor formation, maintenance, and recurrence [12]. These data suggest that the *KRAS* mutation may have a role in breast carcinogenesis.

In the present study, we evaluated the hormone receptor (HR) expression, *HER2* and *MYC* genes and their protein status, and *KRAS* codon 12 mutations in BC from women who underwent neoadjuvant chemotherapy, as well as their associations with clinicopathological features and chemotherapy response.

## Methods

### Patients and tumor samples

During the period from 2005 to 2011, 116 females were selected from a cohort of patients with locally advanced invasive ductal carcinoma who underwent therapeutic surgery for a first incidence of BC. All tumors were at stage III according to TNM staging [13]. Cardiac problems, presence of distant metastasis, pregnancy or lactation were exclusion criteria. The mean age of patients was  $52 \pm 12$  years (range of 31–83).

All patients were treated at Ophir Loyola Hospital (Pará, Brazil) and received Adriamycin (doxorubicin; 60 mg/m<sup>2</sup>) plus Cyclophosphamide (cyclophosphamide; 600 mg/m<sup>2</sup>) by intravenous every 21 days for four cycles. The response to chemotherapy was based on the change in the primary tumor size on pre- and post-therapy. The tumor size was assessed by clinical palpation using a caliper. Tumors were classified as sensitive to chemotherapy if complete (macroscopic disappearance) or partial (at least a 50% reduction) response was achieved. Tumors were defined as treatment-resistant if no response (less than 50% reduction or less than 25% increase) or progression (at least a 25% increase or presence of new lesions) was observed.

Tumors were obtained by incisional biopsy before neoadjuvant chemotherapy. The tumor invasion and the nodal status were determined according to TNM staging [13]. The histological grade was assessed using the modified Scarff-Bloom-Richardson system [14].

Tumors were classified as luminal A, luminal B, HER2 overexpression, and triple-negative subtypes based on the ER, PR, and HER2 status [15]. We also classified data into tumors of early-onset (patients with  $\leq 40$  years of age) and late-onset ( $> 40$  years) [16,17].

Tumors samples were formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE). Sections of FFPE tissue were stained with hematoxylin-eosin for histological evaluation or used for immunohistochemical, FISH and PCR analyses.

The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Pará, Brazil. Written informed consent with approval of the ethics committee was obtained from all patients prior to specimen collection.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed with primary monoclonal antibodies against ER (SAB4500810, Sigma, USA), PR (HPA004751, Sigma, USA), HER2 (Clone CB11, Life Technologies, USA) or MYC (clone 289–19510, Life Technologies, USA). Universal peroxidase-conjugated secondary antibody kit (Dako-Cytomation, USA) was used for the detection system and 3,3'-diamino-benzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dakocytomation, Denmark) was used as the chromogen. Positive ER, PR or MYC expression was defined as clear nuclear immunostaining in more than 10% of tumor cells [18,19,20,21]. HER2 protein staining was scored as 0 (negative), 1+(weakly positive), 2+ (moderately positive) and 3+ (strongly positive) [2]. Double-blind analysis was performed on all samples.

A breast tissue sample from a male with gynecomastia was used as negative control. In addition, negative controls with primary antibody replaced with Tris-buffered saline were run with the patient slides.

### Dual-color FISH

*HER2* and *MYC* amplification was evaluated by dual-color FISH assay using Dako *ERBB2* FISH PharmDX™ Kit and *MYC/CEN-8* FISH Probe Mix (Dako A/S, Denmark), respectively. FISH scoring was performed by counting fluorescence signals in at least 60 tumor cells. Double-blind analysis was performed on all samples.

For the detection of *HER2* amplification, the ratio of *HER2* signals to chromosome 17 (CEP17) signals was calculated according to the established guidelines. Patients were stratified depending on their *HER2* gene status as: amplified if *HER2/CEP17* ratio  $> 2.2$ ; not amplified if *HER2/CEP17*  $< 1.8$ ; equivocal if  $1.8 < \text{HER2/CEP17} < 2.2$  [2].

Since no established guideline was published, *MYC* amplification was defined using different cutoffs as per previously-criteria: 1) the ratio of *MYC* signals to chromosome 8 (CEP8) signals  $> 2.2$  [22,23] as applied for the detection of *HER2* amplification; 2) *MYC/CEP8* ratio  $\geq 1.3$  (at least gene duplication) or *MYC/CEP8* ratio  $< 1.3$  with polysomy 8 (3 or more copied of CEP8) [22,23]; 3)  $> 5$  *MYC* copies/nucleus (high *MYC* gain) [23]; 4)  $\geq 2.5$  *MYC* copies/nucleus, which included low *MYC* gain [23].

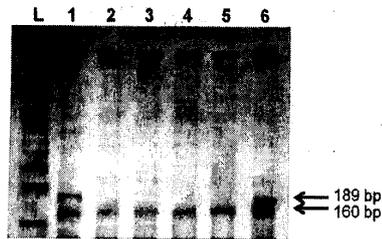
### Mutation analysis

DNA was purified using MagMAX™ FFPE DNA Isolation Kit (Life Technologies, USA). *KRAS* codon 12 point mutation was evaluated by PCR-RFLP as previously described [24]. PCR products were digested with endonuclease *Bst*OI. The digestion products were electrophoresed on polyacrylamide gels with SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, USA) and visualized using blue light. The mutant-type (non-restricted PCR products) were 189 bp, whereas the wild-type products were 160 bp (Figure 1). The PCR products of muted *KRAS* were sequenced for confirmation of mutation using an ABI Prism® 377 DNA Sequencer (Life Technologies, USA).

A wild-type sample of peripheral blood lymphocytes from normal healthy individual and a colorectal cancer sample with codon 12 mutations were used as negative and positive controls, respectively. The controls were included in all experiments. All reactions were performed in duplicate.

### Statistical analyses

Cohen's kappa test ( $\kappa$ ) was used to evaluate the concordance between the HER2 status by IHC and FISH. This rate was calculated considering negative cases (scores 0 and 1+ and no



**Figure 1. Mutation analysis by PCR-RFLP of *KRAS* codon 12.** 1 and 6: tumors with mutation. 2-5: tumors without mutation. L: size marker.  
doi:10.1371/journal.pone.0060576.g001

amplification), and positive cases (score 3+ and amplification). Patients with equivocal IHC or FISH results were not considered for this purpose [25]. Concordance was assessed by Fleiss' equally arbitrary guidelines, which characterize  $\kappa$  values over 0.75 as excellent, 0.40 to 0.75 as fair to good, and below 0.40 as poor [25].

In the remaining analyses, samples with  $HER2/CEP17 > 2.2$  were classified as presenting *HER2* amplification and with scores of 2+ and 3+ as positive *HER2* expression.

Logistic regression was used to evaluate the relationship between protein immunoreactivity, gene amplification or mutation, and clinicopathological features. IHC, FISH or PCR-RFLP results, as well as molecular phenotype, were considered dependent variables. Age was not added as a co-variable, since age did not differ between groups (by Student's T-test; data not shown).

A multivariate logistic regression in a forward stepwise approach (condition method) was used to identify variables that may help to predict chemotherapy resistance and to identify risk factors for grade 3 tumors. Age was also added as a dependent variable in the multivariate analyses.

In all analyses, p values less than 0.05 were considered significant. Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals are shown.

**Results**

**The protein and gene status and their relationships**

For *HER2*, the percentage of concordant results between IHC and FISH was equal to 93.9%, with a statistically significant  $\kappa$  value of 0.833. The 5 discordant cases were classified as score 1+ by IHC and showed gene amplification by FISH. In addition, 6/32 of tumors classified as score 2+ presented  $HER2/CEP17$  ratio  $\geq 2.2$  (Table 1).

**Table 1.** *HER2* protein and its gene status in the breast tumors.

IHC	FISH			Total
	Not amplified	Equivocal	Amplified	
1+	60 (89.55%)	2 (2.99%)	5 (7.46%)	67 (57.76%)
2+	23 (71.87%)	3 (9.38%)	6 (18.75%)	32 (27.59%)
3+	0 (0%)	0 (0%)	17 (100%)	17 (14.65%)
Total	83 (71.55%)	5 (4.31%)	28 (24.14%)	116 (100%)

IHC: immunohistochemistry; FISH: fluorescence in situ hybridization.  
doi:10.1371/journal.pone.0060576.t001

Table 2 presents the IHC results and Table 3 the FISH results. Figure 2 represents protein immunoreactivity by IHC and gene amplification by FISH assay. No ER-positive case was found without concomitant PR immunoreactivity. Therefore, tumors with ER and PR immunoreactivity were renamed as HR-positive cases for further analyses.

*HER2* expression and its amplification were associated with HR ( $p < 0.001$ , OR: 0.162; 95% CI: 0.070–0.373;  $p = 0.001$ , OR: 0.173; 95% CI: 0.060–0.497, respectively) and *MYC* expression ( $p < 0.001$ , OR: 5.303, 95% CI: 2.255–12.473;  $p < 0.001$ , OR: 58.333, 95% CI: 15.062–225.913, respectively) (Table 2 and 3).

*MYC* expression was also associated with HR ( $p = 0.023$ , OR: 0.379, 95% CI: 0.164–0.872) (Table 2). *MYC* gain was associated with *MYC* ( $p < 0.05$ , for all applied cutoffs), HR ( $p < 0.05$ , for all cutoffs) and *HER2* expression ( $p < 0.05$ , except for the cut point #4), as well as with *HER2* amplification ( $p < 0.05$ , for all cutoffs) (Table 3).

*KRAS* codon 12 mutation was observed in 9 (7.76%) tumors. *KRAS* mutation was associated with *HER2* ( $p = 0.033$ , OR: 4.565, 95% CI: 1.133–18.39) and *MYC* amplification ( $p = 0.043$ , OR: 4.850; 95% CI: 1.049–22.424, for cut point #1) (Table 4).

**The impact of *MYC* and *KRAS* in the molecular phenotype**

Taking in account the HR expression and *HER2* amplification to classify tumors by molecular phenotype, 49 (42.2%) of the tumors were deemed luminal A, 5 (4.3%) were luminal B, 23 (19.8%) were *HER2* overexpressed, and 39 (33.6%) were triple-negative.

*MYC* expression was associated with luminal B and *HER2* overexpression phenotypes ( $p = 0.008$ , OR: 24, 95% CI: 2.329–247.368;  $p < 0.001$ , OR: 63, 95% CI: 12.021–330.170; respectively) compared to luminal A. The presence of *MYC* duplication or polysomy 8 (cut point #2) was also associated with the *HER2* overexpression subtype ( $p < 0.001$ , OR: 49.867, 95% CI: 6.143–404.814).

*KRAS* mutation was detected in 1/49 (2%) luminal A, 1/5 (20%) luminal B, 4/23 (17.4%) *HER2* overexpression and 3/39 (7.7%) triple-negative tumors. *KRAS* mutation was associated with *HER2* overexpression phenotype in relation to luminal A ( $p = 0.044$ , OR: 10.105, 95% CI: 1.06–96.336).

**The impact of protein and gene status on clinicopathological features**

*MYC* expression and *MYC* gain were more frequently observed in early-onset compared to late-onset tumors ( $p = 0.002$ , OR: 0.247, 95% CI: 0.100–0.610;  $p < 0.05$ , for cutoffs #2 and #4; respectively) (Table 2 and 3).

The expression of HR expression presented a protective effect for grade 3 tumors ( $p = 0.014$ , OR: 0.23, 95% CI: 0.072–0.738)

**Table 2.** Clinicopathological features by protein expression status.

Factor (N)	HR expression [N(%)]		OR (95% CI)	HER2 expression [N(%)]		OR (95% CI)	MYC expression [N(%)]		OR (95% CI)
	Negative	Positive*		Negative	Positive*		Negative	Positive*	
Age									
≤40 (27)	15 (12.93)	12 (10.34)	1.117 (0.470–2.655)	12 (10.34)	15 (12.93)	0.495 (0.207–1.182)	12 (10.34)	15 (12.93)	0.247 (0.100–0.610)**
>40 (89)*	47 (40.52)	42 (36.21)		55 (47.41)	34 (29.31)		68 (58.62)	21 (18.10)	
Grade									
1/2 (96)	46 (39.66)	50 (43.10)	0.230 (0.072–0.738)**	61 (52.59)	35 (30.17)	4.067 (1.433–11.537)**	67 (57.76)	29 (25.00)	1.244 (0.450–3.439)
3 (20)*	16 (13.79)	4 (3.45)		6 (5.17)	14 (12.07)		13 (11.21)	7 (6.03)	
Tumor invasion									
T1/T2 (9)	4 (3.45)	5 (4.31)	0.676 (0.172–2.656)	6 (5.17)	3 (2.59)	1.508 (0.358–6.352)	7 (6.03)	2 (1.72)	1.630 (0.322–8.264)
T3/T4 (107)*	58 (50)	49 (42.24)		61 (52.59)	46 (39.66)		73 (62.93)	34 (29.31)	
Lymph node metastasis									
Absent (6)	6 (5.17)	0 (0)	<0.001 (0)	2 (1.72)	4 (3.45)	0.346 (0.061–1.971)	3 (2.59)	3 (2.59)	0.429 (0.082–2.235)
Present (110)*	56 (48.28)	54 (46.55)		65 (56.03)	45 (38.79)		77 (66.38)	33 (28.45)	
Response to therapy									
Sensitive (50)	8 (6.90)	42 (36.21)	0.042 (0.016–0.113)**	42 (36.21)	8 (6.9)	8.610 (3.483–21.283)**	41 (35.34)	9 (7.76)	3.154 (1.318–7.547)**
Resistant (66)*	54 (46.55)	12 (10.34)		25 (21.55)	41 (35.34)		39 (33.62)	27 (23.28)	
HR expression									
Negative (62)	–	–	–	24 (20.69)	38 (32.76)	0.162 (0.070–0.373)**	37 (31.90)	25 (21.55)	0.379 (0.164–0.872)**
Positive (54)*	–	–	–	43 (37.07)	11 (9.48)	–	43 (37.07)	11 (9.48)	–
HER2 expression									
Negative (67)	–	–	–	–	–	–	56 (48.28)	11 (9.48)	5.303 (2.255–12.473)**
Positive (49)*	–	–	–	–	–	–	24 (20.69)	25 (21.55)	–

\*Reference group for logistic regression analysis; \*\* Differentially expressed between groups,  $p < 0.05$ . N: number of samples; OR: odds ratio; CI: confidence interval. HR: hormone receptor.

doi:10.1371/journal.pone.0060576.t002

(Table 2). On the other hand, HER2 expression and *KRAS* mutation was a risk factor for grade 3 tumors ( $p = 0.008$ , OR: 4.067, 95% CI: 1.433–11.537;  $p = 0.036$ , OR: 4.55; 95% CI: 1.102–18.788, respectively) (Table 2 and 4). Since HR and HER2 expression were associated with grade 3 tumors, logistic regression was also performed using the molecular phenotype as dependent variables. Women with HER2 overexpression and triple-negative tumors ( $p = 0.027$ , OR: 5.412, 95% CI: 1.216–24.094;  $p = 0.017$ , OR: 5.287, 95% CI: 1.342–20.836, respectively) had elevated risk of being diagnosed with grade 3 tumors relative to those with luminal A tumors.

The logistic regression model performed to verify if molecular were together associated with the risk of grade 3 tumors showed that the final model only included *KRAS* mutation.

#### The impact of protein and gene status on chemotherapy response

The overall response rate of primary tumor to preoperative chemotherapy was 43%. Among responsive patients, only 4 (8%) patients died at the end of this study (minimum follow-up time of

over 12 months). These patients presented metastatic tumors about 2 years after the treatment for primary cancer.

The expression of HR presented a protective effect for treatment-resistance ( $p < 0.001$ , OR: 0.042, 95% CI: 0.016–0.113) (Table 1). On the other hand, HER2 expression and its gene amplification were a risk factor for chemotherapy resistance ( $p < 0.001$ , OR: 8.610, 95% CI: 3.483–21.283;  $p = 0.001$ , OR: 6.571, 95% CI: 2.106–20.509, respectively) (Table 2 and 3). Additionally, *HER2* overexpression ( $p < 0.001$ , OR: 46.67, 95% CI: 9.229–235.97) and triple-negative ( $p < 0.001$ , OR: 24.44, 95% CI: 7.887–75.759) subtypes presented an increased risk of being resistant to chemotherapy relative to luminal A.

MYC expression and its gene amplification were a risk factor for chemotherapy resistance ( $p = 0.01$ , OR: 3.154, 95% CI: 1.318–7.547;  $p < 0.05$ , except when the cut point #4 was applied; respectively) (Table 2 and 3).

We conducted a forward stepwise logistic regression model to identify predictors of chemotherapy resistance, entering age, stage, grade, molecular phenotype, *KRAS* mutation, MYC expression, and the FISH results for detection of its amplification (including the different cutoffs described above for MYC status) as dependent

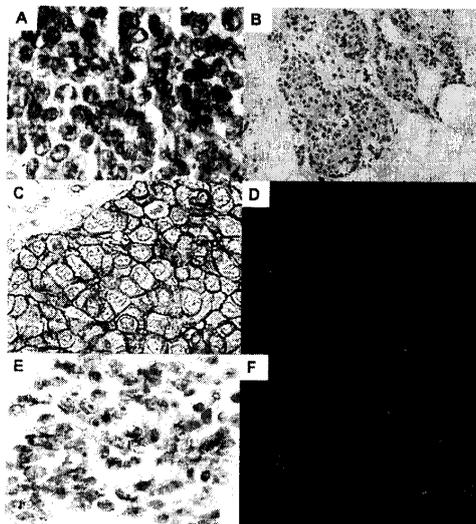
**Table 3.** Clinicopathological features and protein expression by HER2 and MYC amplification status.

Factor (N)	HER2 amplification [N(%)]		OR (95% CI)		MYC amplification [N(%)]		OR (95% CI)		MYC duplication or polB [N(%)]		OR (95% CI)		High MYC gain [N(%)]		OR (95% CI)		MYC gain [N(%)]		OR (95% CI)	
	Negative (HER2/CEP17 ≤2.2)	Positive (HER2/CEP17 >2.2)*	Negative (MYC/CEP8 ≤2.2)	Positive (MYC/CEP8 >2.2)*	Negative (MYC/CEP8 <1.3)	Positive (MYC/CEP8 ≥1.3 or polB)	Negative (MYC/nucleus <5)	Positive (MYC/nucleus ≥5)*	Negative (MYC/nucleus <2.5)	Positive (MYC/nucleus ≥2.5)*	Negative (MYC/nucleus <5)	Positive (MYC/nucleus ≥5)*	Negative (MYC/nucleus <2.5)	Positive (MYC/nucleus ≥2.5)*						
Age																				
≤40 (27)	17 (14.66)	10 (8.62)	25 (21.55)	2 (1.72)	5 (4.31)	22 (18.97)	24 (20.69)	3 (2.59)	1 (0.86)	1.622 (0.432–6.085)	0.480 (0.366–8.495)	0.169 (0.059–0.488)**	26 (22.41)	26 (22.41)	1 (0.86)	26 (22.41)	1.622 (0.432–6.085)	0.093 (0.012–0.723)**	1 (0.86)	26 (22.41)
>40 (89)*	71 (61.21)	18 (15.52)	78 (67.24)	11 (9.48)	51 (43.97)	38 (32.76)	74 (63.79)	15 (12.93)	26 (22.41)				63 (54.31)	63 (54.31)	26 (22.41)	63 (54.31)				
Grade																				
1/2 (96)	75 (64.66)	21 (18.10)	86 (74.14)	10 (8.62)	48 (41.38)	48 (41.38)	82 (70.69)	14 (12.07)	1.464 (0.426–5.028)	1.518 (0.378–6.100)	1.500 (0.563–3.997)	1.464 (0.426–5.028)	73 (62.93)	73 (62.93)	23 (19.83)	73 (62.93)	1.464 (0.426–5.028)	1.260 (0.383–4.150)	23 (19.83)	73 (62.93)
3 (20)*	13 (11.21)	7 (6.03)	17 (14.66)	3 (2.59)	8 (6.90)	12 (10.34)	16 (13.79)	4 (3.45)					16 (13.79)	16 (13.79)	4 (3.45)	16 (13.79)				
Tumor invasion																				
T1/T2 (9)	7 (6.03)	2 (1.72)	7 (6.03)	2 (1.72)	5 (4.31)	4 (3.45)	7 (6.03)	2 (1.72)	1.373 (0.349–5.393)	0.401 (0.074–2.175)	1.373 (0.349–5.393)	0.615 (0.117–3.233)	8 (6.90)	8 (6.90)	1 (0.86)	8 (6.90)	0.615 (0.117–3.233)	0.389 (0.046–3.262)	1 (0.86)	8 (6.90)
T3/T4 (107)*	81 (69.83)	26 (22.41)	96 (82.76)	11 (9.48)	51 (43.97)	56 (48.28)	91 (78.45)	16 (13.79)					26 (22.41)	26 (22.41)	26 (22.41)	81 (69.83)				
Lymph node metastasis																				
Absent (6)	4 (3.45)	2 (1.72)	5 (4.31)	1 (0.86)	4 (3.45)	2 (1.72)	5 (4.31)	1 (0.86)	2.231 (0.392–12.686)	0.612 (0.066–5.689)	2.231 (0.392–12.686)	0.914 (0.100–8.318)	4 (3.45)	4 (3.45)	2 (1.72)	4 (3.45)	0.914 (0.100–8.318)	1.700 (0.294–8.832)	2 (1.72)	4 (3.45)
Present (110)*	84 (72.41)	26 (22.41)	98 (84.48)	12 (10.34)	52 (44.83)	58 (50.00)	93 (80.17)	17 (14.66)					25 (21.55)	25 (21.55)	25 (21.55)	85 (73.28)				
Response to therapy																				
Sensitive (50)	46 (39.66)	4 (3.45)	49 (42.24)	1 (0.86)	30 (25.86)	20 (17.24)	48 (41.38)	2 (1.72)	2.308 (1.089–4.890)**	10.889 (1.365–86.840)**	2.308 (1.089–4.890)**	7.680 (1.676–35.199)**	38 (32.76)	38 (32.76)	12 (10.34)	38 (32.76)	7.680 (1.676–35.199)**	1.074 (0.451–2.557)	12 (10.34)	38 (32.76)
Resistant (66)*	42 (36.21)	24 (20.69)	54 (46.55)	12 (10.34)	26 (22.41)	40 (34.48)	50 (43.10)	16 (13.79)					15 (12.93)	15 (12.93)	15 (12.93)	51 (43.97)				

Table 3. Cont.

Factor (N)	HER2 amplification [N(%)]		OR (95% CI)		MYC amplification [N(%)]		OR (95% CI)		MYC duplication or pol8 [N(%)]		OR (95% CI)		High MYC gain [N(%)]		OR (95% CI)		MYC gain [N(%)]		OR (95% CI)	
	Negative (HER2/CEP17 ≤2.2)	Positive (HER2/CEP17 >2.2)*	Negative (MYC/CEP8 ≤2.2)	Positive (MYC/CEP8 >2.2)*	Negative (MYC/CEP8 <1.3)	Positive (MYC/CEP8 ≥1.3 or pol8)	Negative (MYC/nucleus <5)	Positive (MYC/nucleus ≥5)*	Negative (MYC/nucleus <2.5)	Positive (MYC/nucleus ≥2.5)*										
HER2 expression																				
Negative (62)	39 (33.62)	23 (19.83)	0.173 (0.060–0.497)**	12 (10.34)	50 (43.10)	21 (18.10)	41 (35.34)	0.278 (0.129–0.599)**	16 (13.79)	46 (39.66)	8 (6.90)	54 (46.55)	0.111 (0.024–0.507)**	8 (6.90)	54 (46.55)	0.273 (0.108–0.691)**				
Positive (54)*	49 (42.24)	5 (4.31)		1 (0.86)	53 (45.69)	35 (30.17)	19 (16.38)		2 (1.72)	52 (44.83)	19 (16.38)	35 (30.17)								
HER2 expression																				
Negative (67)	62 (53.45)	5 (4.31)	10.969 (3.761–31.981)**	2 (1.72)	65 (56.03)	41 (35.34)	26 (22.41)	3.574 (1.636–7.808)**	2 (1.72)	65 (56.03)	20 (17.24)	47 (40.52)	15.758 (3.417–72.663)**	20 (17.24)	47 (40.52)	2.553 (0.981–6.642)**				
Positive (49)*	26 (22.41)	23 (19.83)		11 (9.48)	38 (32.76)	15 (12.93)	34 (29.31)		16 (13.79)	33 (28.45)	7 (6.03)	42 (36.21)								
MYC expression																				
Negative (80)	77 (66.38)	3 (2.59)	58.333 (15.062–225.913)**	1 (0.86)	79 (68.10)	53 (45.69)	27 (23.27)	21.593 (6.067–76.850)**	2 (1.72)	78 (67.24)	26 (22.41)	54 (46.55)	31.200 (6.623–146.981)**	26 (22.41)	54 (46.55)	16.852 (2.187–129.871)**				
Positive (36)*	11 (9.48)	25 (21.55)		12 (10.34)	24 (20.70)	3 (2.59)	33 (28.45)		16 (13.79)	20 (17.24)	1 (0.86)	35 (30.17)								
HER2 amplification																				
Negative (88)	–	–	–	1 (0.86)	87 (75.00)	54 (46.55)	34 (29.31)	20.647 (4.603–92.614)**	1 (0.86)	87 (75.00)	26 (22.41)	62 (53.45)	134.455 (16.267–1111.302)**	26 (22.41)	62 (53.45)	11.323 (1.461–87.758)**				
Positive (28)*	–	–	–	12 (10.34)	16 (13.79)	2 (1.72)	26 (22.41)		17 (14.66)	11 (9.48)	1 (0.86)	27 (23.28)								

\*Reference group for logistic regression analysis; \*\* Differentially expressed between groups, p<0.05. N: number of samples; OR: odds ratio; CI: confidence interval. HR: hormone receptor; CEP17: chromosome 17 signals; CEP8: chromosome 8 signals; pol8: chromosome 8 polysomy. doi:10.1371/journal.pone.0060576.t003



**Figure 2. IHC and FISH analysis in breast tumors.** a) Progesterone immunoreactivity (400x); b) Estrogen immunoreactivity (100x); c) HER2 immunoreactivity, score 3+ (400x); d) Interphase nuclei presenting two or more signals for chromosome 17 centromere (green) and HER2 (red) (1000x); e) MYC immunoreactivity (400x); f) Interphase nuclei presenting two or more chromosome 8 centromere (green) and MYC signals (red) (1000x).  
doi:10.1371/journal.pone.0060576.g002

variables. The OR was calculated considering the treatment-resistant group in relation to chemotherapy sensitivity group. The final model included *MYC* amplification defined as *MYC*/nucleus ratio of  $\geq 2.5$  (cut point #4;  $p = 0.016$ , OR: 0.109, 95% CI: 0.018–0.664) as a protective factor. On the other hand, age ( $p = 0.02$ , OR: 1.063, 95% CI: 1.01–1.12) was a risk factor. Additionally, luminal B, HER2 overexpression, and triple-negative tumors ( $p = 0.006$ , OR: 42.063, 95% CI: 2.956–598.51;  $p < 0.001$ , OR: 172.754, 95% CI: 15.75–1894.386;  $p < 0.001$ , OR: 49.008, 95% CI: 8.789–273.268, respectively) presented increased odds of being resistant to chemotherapy relative to luminal A tumors. Moreover, grade 2 tumors presented an increased risk of being resistant to treatment relative to grade 1 ( $p = 0.042$ , OR: 10.544, 95% CI: 1.087–102.252). However, grade 3 tumors did not present an increased risk relative to grade 1 in this model.

**Discussion**

In this study, we evaluated ER and PR expression, *HER2* and *MYC* genes and their protein status, and *KRAS* mutations in the same set of BC. First, we observed that 24% of tumors presented *HER2* amplification, corroborating a previous study (18–20%) [26]. *HER2* amplification is the primary mechanism of *HER2* overexpression [27]. Although an excellent concordance between IHC and FISH results was detected, 5 cases were scored as 1+ by IHC and presented *HER2* amplification. Since standardization of IHC tests may be affected by preanalytical and analytical factors, some groups have suggested the utilization of FISH results for *HER2* protein overexpression determination in BC [25]. Therefore, we used only the FISH result for *HER2* in the molecular phenotype classification and, then, in the multivariate analyses.

**Table 4. Clinicopathological features and protein expression by *KRAS* mutation.**

Factor (N)	<i>KRAS</i> mutation [N(%)]		OR (95% CI)
	Absent	Present*	
<b>Age</b>			
≤40 (27)	23 (19.83)	4 (3.45)	0.342 (0.085–1.379)
>40 (89)*	84 (72.41)	5 (4.31)	
<b>Grade</b>			
1/2 (96)	91 (78.45)	5 (4.31)	4.550 (1.102–18.788)**
3 (20)*	16 (13.79)	4 (3.45)	
<b>Tumor invasion</b>			
T1/T2 (9)	8 (6.9)	1 (0.86)	0.646 (0.071–5.835)
T3/T4 (107)*	99 (85.34)	8 (6.9)	
<b>Lymph node metastasis</b>			
Absent (6)	5 (4.31)	1 (0.86)	0.392 (0.041–3.775)
Present (110)*	102 (87.93)	8 (6.9)	
<b>Response to therapy</b>			
Sensitive (50)	48 (41.38)	2 (1.72)	2.847 (0.565–14.345)
Resistant (66)*	59 (50.86)	7 (6.03)	
<b>HR expression</b>			
Negative (62)	55 (47.41)	7 (6.03)	0.302 (0.060–1.522)
Positive (54)*	52 (44.83)	2 (1.72)	
<b>HER2 expression</b>			
Negative (107)	63 (54.31)	4 (3.45)	1.790 (0.455–7.043)
Positive (9)*	44 (37.93)	5 (4.31)	
<b>MYC expression</b>			
Negative (80)	76 (65.52)	4 (3.45)	3.065 (0.771–12.176)
Positive (36)*	31 (26.72)	5 (4.31)	
<b>HER2 amplification</b>			
Negative (88)	84 (72.41)	4 (3.45)	4.565 (1.133–18.390)**
Positive (28)*	23 (19.83)	5 (4.31)	
<b>MYC amplification</b>			
MYC/CEP8 $\geq 2.2$ (103)	97 (83.62)	6 (5.17)	4.850 (1.049–22.424)**
MYC/CEP8>2.2 (13)*	10 (8.62)	3 (2.59)	

\*Reference group for logistic regression analysis; \*\* Differentially expressed between groups,  $p < 0.05$ . N: number of samples; OR: odds ratio; CI: confidence interval. HR: hormone receptor; CEP8: chromosome 8 signals.  
doi:10.1371/journal.pone.0060576.t004

Several definitions for *MYC* amplification have been used in BC studies. However, these different definitions lead to inconsistent results concerning the role of *MYC* in breast carcinogenesis. Here, we applied different cutoffs to define *MYC* amplification as described above, including the acceptance of low *MYC* gain with or without polysomy 8. The frequency of *MYC* amplification ranged from 11.2% (cut point #1) to 76.7% (cut point #4) in our sample. Furthermore, *MYC* overexpression was detected in 31% of BC. Although we found an association between *MYC* amplification and its expression, as already described in previous studies, our data confirm that mechanisms other than gene amplification are involved in *MYC* overexpression in BC [9]. However, the assessments of *MYC* expression by IHC provide variable results depending on the antibody, testing protocol, and scoring system used [10], highlighting that FISH may be an interesting tool in clinical practice due to its reproducibility.

We observed that *MYC* amplification and expression were more frequent in BC without ER or PR expression, corroborating previous studies [23]. However, some investigations did not find such inverse correlation or even show the opposite correlation (see review [28]). Although literature findings are inconsistent regarding associations between *MYC* amplification and clinicopathological parameters (in part, probably due to the lack of a unique cutoff for *MYC* amplification definition), a meta-analysis demonstrated that the correlation of *MYC* amplification with PR negativity was the only statistically significant association [29].

Here, we detected an association between *MYC* and *HER2*, as previously reported [30,31]. As expected, we also observed an association between *MYC* expression or its amplification with luminal B or *HER2* overexpression in relation to luminal A, confirming the results for *HER2* and HR described above. These findings suggest that *MYC* may be involved in subtype-specific pathways.

*MYC* expression and gain were more frequently observed in early-onset compared to late-onset BC. To our knowledge, this is the first study to report this association in human primary BC. The exact mechanisms by which *MYC* may be involved in early-onset BC needs to be elucidated. However, *MYC* amplification seems to be associated to *BRCA1* inactivation in a group of hereditary and sporadic BC [32]. *BRCA1* inactivation is usually predisposed to early-onset tumors, with a distinct phenotype characterized by high tumor grade, aneuploidy, high proliferation rate, and ER-negativity [32]. The investigation of *MYC* targets is still necessary to better understand the heterogeneity of BC.

*MYC* amplification, as well as *HER2* amplification, was associated with *KRAS* codon 12 mutation. In BC cells, *KRAS* may be activated by *HER2* [1], enhancing the accumulation of *MYC* activity [11], which may lead to chromosomal instability [33] and contribute to *MYC* amplification. *KRAS* mutation was detected in 7.76% of the tumors, corroborating a previous study which reported that 5% of BC presented some *KRAS* mutation [34]. More than one case of *HER2* overexpression and triple-negative subtypes presented *KRAS* mutation. However, previous studies did not find any *KRAS* mutation in triple-negative tumors, probably due to its low frequency [35,36]. Thus, an increased number of tumors are essential to provide evidence of the role of *KRAS* in human breast carcinogenesis.

In our population, *HER2* overexpression and triple-negative were more frequently grade 3 tumors, which is in agreement with the more aggressive phenotype of these tumors [3,4]. Additionally, we observed that the *KRAS* mutation was the main predictive factor for grade 3 tumors. Due to its small frequency, further investigations are still necessary to evaluate whether a *KRAS* codon 12 mutation may predict a worse prognosis in BC patients.

Concerning the response to chemotherapy, we observed that HR predicts chemosensitivity, as previously reported [1]. On the other hand, *HER2* amplification or expression predicts resistance to anthracyclines in our sample, highlighting that this group of patients may be suitable for treatment with the monoclonal antibody trastuzumab [37].

Furthermore, *MYC* expression and amplification (except when accepting low *MYC* gain) was a risk factor for chemoresistance by univariate logistic regression. However, in the multivariate analysis

to identify predictors of resistance to doxorubicin plus cyclophosphamide drugs, we observed that *MYC* amplification (including low ratio of *MYC* gain) was a predictor of chemosensitivity when adjusted by grade, age, and the molecular phenotyping. This finding is probably due to the significant association of *MYC* with both HR (good prognosis) and *HER2* (worse prognosis).

*MYC* may have a dual function in cancer cells, i.e. it can promote cell proliferation or induces apoptosis [8] depending on molecular background and tumor microenvironment. Since rapidly proliferating cells are generally more sensitive to chemotherapy, it has been suggested that *MYC* may sensitive BC cells to apoptosis [38]. Previous *in vitro* studies demonstrated greater sensitivity of BC cells with *MYC* amplification to paclitaxel and to doxorubicin compared to those without this amplification [39,40,41]. To our knowledge, few studies evaluated the possible role of *MYC* as a predictor for chemotherapy response in humans. Yasojima et al. reported that *MYC* was associated with the response to neoadjuvant chemotherapy comprising paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide by univariate analysis. However, the multivariate analysis failed to show such association [38]. Without performing a multivariate analysis, Todorovic-Rakovic et al. suggested that patients with *MYC* amplification treated with chemotherapy (cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil or 5-fluorouracil, adriablastin and cyclophosphamide) had clinical benefits in contrast to patients without amplification [7]. Furthermore, Perez et al. reported that tumors with *MYC* gain or polysomy 8 appeared to derive more benefits from trastuzumab than tumors without these alterations. The author also reported that patients with *MYC/HER2* coamplification benefited significantly more from trastuzumab than patients with only *HER2* amplification [23]. Our results and those from the literature suggest that *MYC* amplification may be used as a predictor factor for chemosensitivity and treatment determination. However, it is important to evaluate several markers concomitantly to try to determine a statistical model to identify patients who would best respond to a treatment.

As a result of the increased number of chemotherapy regimens that have been applied in the preoperative setting, it is becoming increasingly important to identify patients who carry a particularly high risk for being unresponsive for a specific treatment. To our knowledge, this is the first study to evaluate the possible prognostic and predictive significance of *MYC* and *KRAS* alterations concomitantly with HR and *HER2* status, in BC patients treated with neoadjuvant doxorubicin plus cyclophosphamide drugs. We observed an association among the molecular markers investigated. BC with *KRAS* codon 12 mutations seem to present a worse prognosis. Additionally, *MYC* amplification may help in the identification of tumors that are sensitive to doxorubicin plus cyclophosphamide. If confirmed in a large set of samples, these markers may be useful for clinical stratification and prognosis.

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CBLP MFL MACS RRB. Performed the experiments: CBLP CRTS RCM AAC. Analyzed the data: CBLP MFL PPA SD. Contributed reagents/materials/analysis tools: JAR ASK GRP. Wrote the paper: MFL CBLP MACS RRB.

#### References

- Cleator S, Parou M, Dowsett M (2002) The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 9: 183–195.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, et al. (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25: 118–145.
- Soric T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geister S, et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10869–10874.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530–536.

5. Dechaphunkul A, Phukaolom M, Kanjanapradit K, Graham K, Ghosh S, et al. (2012) Prognostic significance of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in breast cancer. *Int J Breast Cancer* 2012: 290854.
6. Neve RM, Sutterluty H, Pullen N, Lane HA, Daly JM, et al. (2000) Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* 19: 1647–1656.
7. Todorovic-Rakovic N, Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D (2012) C-myc as a predictive marker for chemotherapy in metastatic breast cancer. *Clin Exp Med* 12: 217–223.
8. Pelengaris S, Khan M (2003) The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys* 416: 129–136.
9. Xu J, Chen Y, Olopade OI (2010) MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* 1: 629–640.
10. Chen Y, Olopade OI (2008) MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 8: 1689–1698.
11. Sears R, Leone G, DeGregori J, Nevins JR (1999) Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* 3: 169–179.
12. Podsypanina K, Politi K, Beverly LJ, Varmus HE (2008) Oncogene cooperation in tumor maintenance and tumor recurrence in mouse mammary tumors induced by Myc and mutant Kras. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5242–5247.
13. Sobin LH, Wittekind CH (2004) TNM classification of malignant tumours. New York: Wiley-Liss.
14. Elston CW, Ellis IO (1991) 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.
15. Sahzaman BS, Malone KE, McDougall JA, Daling JR, Li CI (2012) Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2-neu expression in first primary breast cancers and risk of second primary contralateral breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 135: 849–855.
16. Mukherjee N, Bhattacharya N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, et al. (2012) Subtype-specific alterations of the Wnt signaling pathway in breast cancer: clinical and prognostic significance. *Cancer Sci* 103: 210–220.
17. Chander N, Mandal S, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK (2004) Differential association of BRCA1 and BRCA2 genes with some breast cancer-associated genes in early and late onset breast tumors. *Ann Surg Oncol* 11: 1045–1055.
18. Moon HG, Han W, Ahn SK, Cho N, Moon WK, et al. (2013) Breast cancer molecular phenotype and the use of HER2-targeted agents influence the accuracy of breast MRI after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 257: 133–137.
19. Barinoff J, Hils R, Bender A, Gross J, Kurz C, et al. (2013) Clinicopathological differences between breast cancer in patients with primary metastatic disease and those without: a multicentre study. *Eur J Cancer* 49: 305–311.
20. da Costa Jde F, Leal MF, Silva TC, Andrade Junior EF, Rezende AP, et al. (2011) Experimental gastric carcinogenesis in *Cebus apella* nonhuman primates. *PLoS One* 6: e21988.
21. Silva TC, Leal MF, Calcagno DO, de Souza CR, Khayat AS, et al. (2012) hTERT, MYC and TP53 deregulation in gastric precancerous lesions. *BMC Gastroenterol* 12: 85.
22. Singhi AD, Cimino-Mathews A, Jenkins RB, Lau F, Fink SR, et al. (2012) MYC gene amplification is often acquired in lethal distant breast cancer metastases of unamplified primary tumors. *Mod Pathol* 25: 378–387.
23. Perez EA, Jenkins RB, Dueck AG, Wiktor AE, Bedroske PP, et al. (2011) C-MYC alterations and association with patient outcome in early-stage HER2-positive breast cancer from the north central cancer treatment group N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol* 29: 651–659.
24. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A, Kowalczuk O, Nikielina W, et al. (2009) Mutations of the KRAS oncogene in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 47: 65–68.
25. Martin V, Camponovo A, Ghisletta M, Bongiovanni M, Mazzaucchi L (2012) Internal Quality Assurance Program for ERBB2 (HER2) Testing Improves the Selection of Breast Cancer Patients for Treatment with Trastuzumab. *Patholog Res Int* 2012: 261857.
26. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, et al. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177–182.
27. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T (1986) The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232: 1644–1646.
28. Liao DJ, Dickson RB (2000) c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 7: 113–164.
29. Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ (2000) C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 83: 1688–1695.
30. Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zahariva B, et al. (2004) Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res* 64: 8531–8540.
31. Park K, Kwak K, Kim J, Lim S, Han S (2005) c-myc amplification is associated with HER2 amplification and closely linked with cell proliferation in tissue microarray of nonselected breast cancers. *Hum Pathol* 36: 634–639.
32. Grushko TA, Dignam JJ, Das S, Blackwood AM, Perou CM, et al. (2001) MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. *Clin Cancer Res* 10: 499–507.
33. Prochownik EV, Li Y (2007) The ever expanding role for c-Myc in promoting genomic instability. *Cell Cycle* 6: 1024–1029.
34. Karnoub AE, Weinberg RA (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 517–531.
35. Sanchez-Munoz A, Gallego E, de Luque V, Perez-Rivas LG, Vicioso L, et al. (2010) Lack of evidence for KRAS oncogenic mutations in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 10: 136.
36. Martin V, Botta F, Zanellato E, Molinari F, Crippa S, et al. (2012) Molecular characterization of EGFR and EGFR-downstream pathways in triple negative breast carcinomas with basal like features. *Histol Histopathol* 27: 785–792.
37. Crown J, Dieras V, Kaufmann M, von Minckwitz G, Kaye S, et al. (2002) Chemotherapy for metastatic breast cancer-report of a European expert panel. *Lancet Oncol* 3: 719–727.
38. Yasojima H, Shimomura A, Naoi Y, Kishi K, Baba Y, et al. (2011) Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Cancer* 47: 1779–1788.
39. Fornari FA Jr, Jarvis DW, Grant S, Orr MS, Randolph JK, et al. (1996) Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. *Biochem Pharmacol* 51: 931–940.
40. Fornari FA Jr, Jarvis DW, Grant S, Orr MS, Randolph JK, et al. (1994) Induction of differentiation and growth arrest associated with nascent (nonoligosomal) DNA fragmentation and reduced c-myc expression in MCF-7 human breast tumor cells after continuous exposure to a sublethal concentration of doxorubicin. *Cell Growth Differ* 5: 723–733.
41. Olah E, Csokay B, Prajda N, Kote-Jarai Z, Yeh YA, et al. (1996) Molecular mechanisms in the antiproliferative action of taxol and tirazofurin. *Anticancer Res* 16: 2469–2477.