

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

TRASTUZUMAB EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA HER-2 POSITIVO: UM  
ESTUDO SOBRE OS DIFERENTES ESCORES DE AVALIAÇÃO LABORATORIAL DO  
GENE HER-2/*neu*

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutora.*

**Aluna: Lissandra Dal Lago**  
**Orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann**

**Porto Alegre**

**2006**

D136t **Dal Lago, Lissandra**

Trastuzumab em pacientes com câncer de mama her-2 positivo : um estudo sobre os diferentes escores de avaliação laboratorial do gene her-2/neu / Lissandra Dal Lago ; orient. Gilberto Schwartzmann. – 2006.  
207 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Neoplasias mamárias 2. Quimioterapia adjuvante 3. Receptor erbB-2 4. Gene erbB-2 5. I. Schwartzmann, Gilberto II. Título.

NLM: WP 870

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## Dedicatória

Dedico este meu trabalho, realizado durante o meu período de *fellowship* no Instituto Jules Bordet à minha querida família, Osvaldo, Romi (*in memoriam*), Álisson e Alexandre.

## **Agradecimentos**

Ao meu querido pai Osvaldo, que soube entender a distância e participar ativamente deste meu período de trabalho e reflexões da trajetória de vida ;

Ao meu marido Alexandre, por ter aceitado o desafio de me acompanhar nesta viagem e por permanecer ao meu lado ;

Ao meu querido irmão Álisson, pelo seu incentivo e pelo seu auxílio na tradução dos artigos para o português ;

Ao meu querido orientador, professor Gilberto Schwartzmann, que me acompanha desde a graduação e que considero um exemplo de dedicação ao espírito científico.

Graças a ele, tive o estímulo de seguir a trajetória da Oncologia e da Pós-Graduação ;

À professora Martine Piccart, por ter me acolhido no Instituto Jules Bordet durante quase 3 anos, oportunizando um excelente aprendizado no trabalho da pesquisa clínica em Oncologia ;

Ao Dr Denis Larsimont, médico patologista do Instituto Jules Bordet, que me oportunizou o trabalho laboratorial incluído nesta tese ;

Aos meus amigos Gustavo Ismael, Daniela Rosa, Alessandro Pasqualotto, Carolina Vargas Schwarzbold, Ana Paula Schwarzbold, Albano Schwarzbold, Rosana Rodrigues e Valdeci Juarez Pomblum, pelo precioso auxílio na elaboração, edição final e impressão do meu trabalho ;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, representado pela professora Sandra Costa Fuchs, por ter me acolhido como sua aluna.

## Sumário

---

Lista de Abreviaturas .....	11
Capítulo I – Câncer de Mama .....	16
Introdução .....	17
Tratamento global do CM em estádios iniciais .....	19
Referências .....	20
Tabelas .....	22
Tabela 1. Recomendações gerais para o rastreamento do câncer de mama (4,5).....	23
Tabela 2. Sobrevida em 5 anos aproximada, de acordo com o estágio clínico AJCC .....	24
Capítulo II - Primeiro artigo em português .....	25
Tratamento adjuvante do câncer de mama em estádios iniciais. ....	26
Abstract.....	26
Introdução .....	27
I. Terapia adjuvante individualizada: prioridade máxima em 2005 .....	29
II. Citotóxicos trazidos para a cena adjuvante na última década .....	32
1. Taxanos .....	32
2. Capecitabina .....	36
3. Gemcitabina .....	37
4. Compostos de platina.....	38
III. Novos usos de medicamentos antigos .....	40
1. Quimioterapia em dose densa.....	40

2. Quimioterapia Metronômica .....	41
IV. Hormonioterapia adjuvante otimizada .....	43
1. Pacientes com CM em estádios iniciais na pós-menopausa (tabela 2) .....	43
2. Paciente com CM em estádios iniciais e na pré-menopausa .....	50
V. Novos agentes biológicos.....	55
1. Trastuzumab .....	55
2. Perspectivas.....	58
Tabelas.....	61
Tabela 1: Taxanos no contexto adjuvante .....	62
Tabela 2. Ensaio clínico de fase III, de tratamento adjuvante, incluindo o uso de inibidores da aromatase em pacientes pós-menopáusicas .....	63
Tabela 3. Risco associado ao tratamento adjuvante com inibidores da aromatase (IA).....	64
Tabela 4. Ensaio clínico randomizado avaliando ablação ovariana (AO) versus quimioterapia (QT) em pacientes pré-menopáusicas com câncer de mama em estádios iniciais .....	65
Tabela 5. Ensaio clínico randomizado avaliando ablação ovariana (AO) + Tamoxifeno vs quimioterapia (QT) em pacientes pré-menopáusicas com câncer de mama em estádios iniciais .....	66
Tabela 6. Ensaio clínico randomizado avaliando quimioterapia (QT) vs QT+ AO ± Tamoxifeno em pacientes pré-menopáusicas com câncer de mama em estádios iniciais .....	67
Tabela 7. Ensaio clínico randomizado avaliando Tamoxifeno (T) vs T+ AO em pacientes pré-menopáusicas com câncer de mama em.....	68

Tabela 8. Ensaio clínico randomizado de trastuzumab adjuvante em câncer de mama em estádios iniciais.....	69
Referências .....	70
Capítulo III – Biologia Molecular do Câncer de mama e o uso de trastuzumab .....	83
Biologia molecular do câncer de mama .....	84
Uso de trastuzumab no CM em estádios avançados.....	85
Trastuzumab no Tratamento do CM: Uso em Primeira Linha em Combinações com Quimioterápicos.....	87
Agregando Carboplatina à Combinação Trastuzumab e Paclitaxel .....	90
Trastuzumab e Docetaxel .....	93
Trastuzumab e Vinorelbina .....	97
Combinação do Trastuzumab com Outros Agentes.....	103
Avaliação laboratorial do estado HER-2 .....	107
Aneuploidia do cromossomo 17.....	109
Referências .....	111
Figuras.....	123
Figura 1: Expressão do HER-2 e conseqüências biológicas .....	124
Figura 3: Cortes histológicos mostrando diferentes padrões na intensidade para coloração para a proteína HER-2 na imunohistoquímica. ....	125
Figura 4. Amplificação do gene Her-2 por método FISH (Hibridização in situ por fluorescência) .....	126
Figura 5. CISH (Hibridização in situ cromogênica) .....	127
Figura 6. NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) por passos.....	128
Justificativa para o estudo .....	129



Segundo artigo em português .....	130
A correção do cromossomo 17 é essencial para a determinação do estado de amplificação do gene <i>Her-2/neu</i> no câncer de mama (CM). .....	131
Sumário .....	132
Introdução.....	134
Materiais e Métodos.....	137
Amostras .....	137
Critério para positividade do FISH e polissomia.....	137
Duplex real time NASBA .....	138
Análise estatística .....	139
Resultados.....	139
A polissomia do cromossomo 17 é responsável pela discordância no estado <i>Her-2/neu</i> como definido pelos diferentes sistemas de escore FISH utilizados. .....	139
Associação entre a IHQ e os três métodos de escore do FISH .....	141
Associação entre a expressão de RNAm (medido pelo NASBA) e o FISH de acordo com os três métodos de escore. ....	142
Características biológicas dos tumores com polissomia com estado <i>Her-2/neu</i> discordante de acordo com os 3 métodos de escore do FISH.....	144
Discussão .....	145
Referências.....	150
Tabela 1. <i>Primers</i> e seqüências de <i>molecular beacons</i> para ensaio de NASBA RNA mensageiro .....	155
Tabela 2. Associação entre os três sistemas de escore do FISH.....	156

Tabela 3. Número de cópias de Her-2 e CEP17 e expressão da proteína HER-2 nos 5 subgrupos .....	157
Tabela 4. Associação entre IHQ e FISH de acordo com o sistema de escore ....	158
Tabela 5. Associação entre NASBA e FISH de acordo com o sistema de escore .....	159
Tabela 6. Características biológicas dos 5 subgrupos.....	160
Figura 1. Associação entre NASBA ou IHQ e FISH de acordo com a média de corte do número de sinais do Her-2.....	161
Artigos em inglês .....	162

## Lista de Abreviaturas

---

AUC	Área sobre a curva ( <i>Area under curve</i> )
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica ( <i>American Society of Clinical Oncology</i> )
ATAC	Arimidex e Tamoxifeno sozinhos ou em combinação ( <i>Arimidex and Tamoxifen Alone or in Combination</i> )
AO	Ablação ovariana
ABCSG	Grupo austríaco de estudos do câncer de mama e colo-retal ( <i>Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group</i> )
AJCC	Comitê Americano do Câncer ( <i>American Joint Committee on Cancer</i> )
BCIRG	Grupo de Pesquisa Internacional do Câncer de Mama ( <i>Breast Cancer International Research Group</i> )
BIG	Grupo Internacional da Mama ( <i>Breast International Group</i> )
CALGB	Grupo B de Câncer e Leucemia ( <i>Cancer and Leukemia Group B</i> )
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CEP17	cromossoma 17
CLIS	Carcinoma lobular in situ

CISH	hibridização in situ cromogênica ( <i>Chromogenic in situ hybridization</i> )
CM	Câncer de mama
CMM	Câncer de mama metastático
EBCTCG	Grupo Colaborativo de Estudos em Câncer de Mama em Estádios Iniciais ( <i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i> )
ECOG	Grupo Cooperativo de Oncologia do Oeste ( <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> )
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
EORTC	Organização Européia de Pesquisa e Tratamento do Câncer de Mama ( <i>European Organization of Research and Treatment of Cancer</i> )
FASG	Grupo de Estudo Francês em Adjuvância ( <i>French Adjuvant Study Group</i> )
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência ( <i>Fluorescent in situ hybridization</i> )

GROCTA	Grupo Cooperativo de Quimioterapia e Hormonioterapia no Tratamento Adjuvante do Câncer de Mama ( <i>The Breast Cancer Adjuvant Chemohormone Therapy Cooperative Group</i> )
HER-2	Fator de crescimento epidérmico humano 2 ( <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
HERA	Estudo clínico adjuvante com Herceptin ( <i>Herceptin Adjuvant trial</i> )
HR	<i>hazard ratio</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IBCSG	Grupo Internacional de Estudos no Câncer de Mama ( <i>International Breast Cancer Study Group</i> )
IA	Inibidor de aromatase
IES	Estudo de Intergupo do Exemestano ( <i>Intergroup Exemestane Study</i> )
ITA	Arimidex- Tamoxifeno Italiano ( <i>Italian Tamoxifen Arimidex</i> )
RH	Receptor hormonal
MINDACT	Microarranjo para a doença com linfonodo negativo pode evitar quimioterapia ( <i>Microarray for Node Negative Disease may Avoid Chemotherapy</i> )

MRM	Mastectomia radical modificada
NASBA	Amplificação sequencial de ácidos nucleicos ( <i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i> )
NCCTG	Grupo Norte e Central de Tratamento do Câncer ( <i>The North Central Cancer Treatment Group</i> )
NCIC-CTG	Instituto Nacional do Câncer do Canadá – Grupo de Estudos Clínicos ( <i>National Cancer Institute of Canada – Clinical Trials Group</i> )
NSABP	Projeto Nacional Cirúrgico Adjuvante de Mama e Intestino ( <i>National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project</i> )
PERCHE	Estudo clínico de quimioterapia em pacientes com responsividade hormonal e pré-menopáusicas ( <i>Premenopausal Endocrine-Responsive Chemotherapy Trial</i> )
QT	Quimioterapia
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona TRANSBIG Pesquisa Translacional no Grupo Internacional de Mama ( <i>Translational Research In Breast International Group</i> )

RT	Radioterapia
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLR	Sobrevida livre de recorrência
SOFT	Estudo clínico de supressão da função ovariana ( <i>Suppression of Ovarian Function Trial</i> )
TEXT	Estudo clínico do tamoxifeno e Exemestano ( <i>Tamoxifen and Exemestane Trial</i> )
TLD	Tempo livre de doença
UCLA-ORN	Universidade da Califórnia, Rede de Pesquisa em Oncologia de Los Angeles ( <i>The University of California at Los Angeles-Oncology Research Network</i> )
ZEBRA	Associação Zoladex de pesquisa do Câncer de Mama em Estádios Iniciais ( <i>Zoladex Early Breast Cancer Research Association</i> )

## Capítulo I – Câncer de Mama

---



## **Introdução**

O câncer de mama (CM) é a principal causa de morte por câncer nas mulheres ocidentais, onde o risco médio de adquirir esta doença durante o tempo de vida é de uma em cada oito mulheres (1).

Atualmente, a incidência de CM é maior em países desenvolvidos, porém com o crescimento da população mundial e o aumento da expectativa de vida nos países em desenvolvimento, o CM será um desafio de saúde pública para países como o Brasil (2). Nesse país, o CM é a segunda neoplasia maligna em número de casos-novos e a maior causa de mortalidade em câncer entre as mulheres (3).

A etiologia do CM é multifatorial e a evolução genética dos precursores malignos até a doença invasiva é somente parcialmente entendida. Alguns fatores de risco para desenvolvimento de CM foram identificados, incluindo idade avançada, menarca precoce, nuliparidade ou primeira gravidez em idade acima de 30 anos, história pessoal de CM e/ou outras doenças benignas da mama, história de CM em parentes de primeiro grau, presença de uma mutação de BRCA1 e/ou BRCA2 em pacientes previamente submetidas ao teste genético, radioterapia prévia para mama ou tórax, densidade mamária aumentada na mamografia, uso de hormônios (como estrogênio e progesterona), consumo de álcool e raça branca (1).

As recomendações para o rastreamento do CM (4,5) podem ser encontradas na tabela 1.

O diagnóstico do CM pode ser sugerido por métodos de imagem, como a mamografia, a ultrasonografia e a a ressonância nuclear magnética. Embora a aspiração por agulha fina (citologia) possa ser útil, o diagnóstico definitivo é sempre histológico (biópsia ou análise da peça operatória). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma ductal (70-80%), seguido pelo carcinoma lobular ou por uma associação de ambos. Os carcinomas mucinosos e tubulares têm sido associados a um melhor prognóstico (1).

O sistema de classificação mais utilizado para estadiamento do câncer de mama é o TNM (6) da AJCC.

No CM em estádios iniciais, os fatores prognósticos mais importantes são o número de linfonodos axilares afetados e o tamanho do tumor (7). A tabela 3 mostra a sobrevida de 5 anos aproximada, de acordo com o estágio clínico (AJCC)(8).

Outros fatores de mau prognóstico incluem idade menor de 35 anos, ausência de expressão de receptores hormonais (RH) e superexpressão ou amplificação do oncogene *Her-2/neu* (9). Alguns novos fatores promissores a serem levados em consideração são a detecção de metástases na medula óssea, os marcadores de invasividade (ativador do plasminogênio tipo uroquinase, uPA/PAI-1) e o reconhecimento de padrões de assinatura genética por microarranjo do CM (10).

## **Tratamento global do CM em estádios iniciais**

O tratamento do CM em estádios iniciais deve ser sempre considerado potencialmente curativo. A cirurgia conservadora seguida de radioterapia pode ser realizada na maioria dos casos (11). A mastectomia radical modificada (MRM) é reservada para pacientes que não são candidatas a uma cirurgia conservadora, embora algumas MRM possam ser evitadas com a administração da terapia neoadjuvante (12). As margens de ressecção devem ser livres de tumor sempre que possível. A dissecação axilar permite uma avaliação do número de linfonodos axilares afetados e ao mesmo tempo tem um papel no controle regional da doença. A dissecação do linfonodo sentinela pode evitar a dissecação axilar e, portanto, reduzir a morbidade (13). No entanto, o índice de falso-negativos aumenta em função da inexperiência da equipe, do tamanho do tumor e da multifocalidade. Os resultados a longo prazo são ainda desconhecidos, assim como a conduta mais apropriada em caso de micrometástases linfonodais. A radioterapia reduz o risco de recidiva loco-regional mas o efeito na sobrevida é discutível (11). Ela está sempre indicada após cirurgia conservadora. Após mastectomia, ela está geralmente indicada em pacientes com  $\geq 4$  linfonodos axilares positivos, com tumores  $>5\text{cm}$  e/ou multifocais. Em tumores medindo entre 3-5 cm e/ou pacientes com 1-3 linfonodos axilares comprometidos, a indicação é incerta (14). A radioterapia (RT) pode ser realizada até 3-6 meses após a cirurgia e, em geral, é realizada após a quimioterapia (QT).

## Referências

1. Lohrisch C, Piccart M. UICC Manual of Clinical Oncology 2004; chapter 23 (Breast Cancer): 505-536.
2. Schwartzmann G, Ratain MJ, Cragg GM, et al. Anticancer drug discovery and development throughout the world. J Clin Oncol 2002; 20 (18 Suppl):47s-59s.
3. Anuário Estatístico Instituto Nacional do Câncer – INCA, <http://www.inca.gov.br/>.
4. Fletcher SW, Black W, Harris R, et al. Report of the International Workshop on Screening for Breast Cancer. J Natl Cancer Inst 1993; 85(20):1644-56.
5. Olsen O, Gotzsche PC. Cochrane review on screening for breast cancer with mammography. Lancet. 2001; 358(9290):1340-2.
6. John Wiley & Sons. TNM Classification of Malignant Tumours, 6th edition 2002
7. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer. 1989 Jan 1;63(1):181-7.
8. AJCC Cancer Staging Manual, 6<sup>th</sup> edition, 2002.
9. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987;235(4785):177-82.

10. Hayes DF. Prognostic and predictive factors revisited. *Breast*. 2005; 14(6):493-9.
11. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005, 365:1687 –1717.
12. Morrow M. Limiting breast surgery to the proper minimum. *The Breast* 2005 14(6): 523-526.
13. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(6):546-53.
14. Bellon JR, Harris JR. What extent of radiation therapy is standard? *Breast*. 2005;14(6):532-40.

## Tabelas

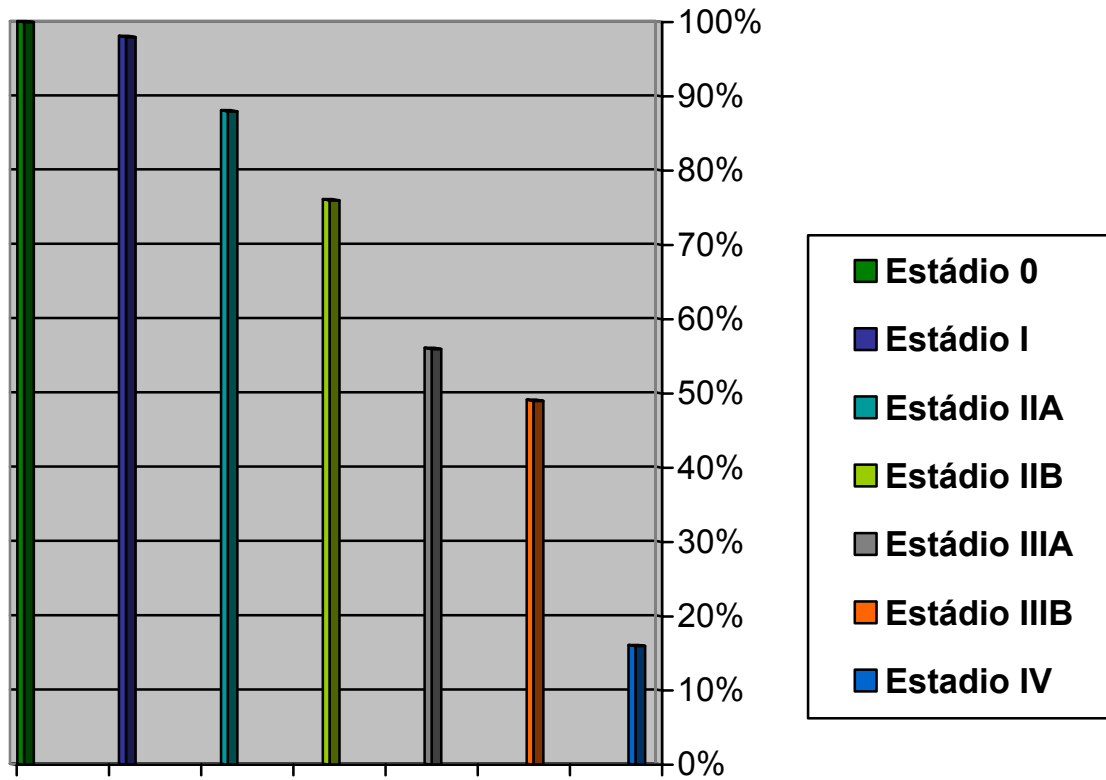
Tabela 1. Recomendações gerais para o rastreamento do câncer de mama (4,5).

> 50 anos	Auto-exame da mama e exame clínico regular Mamografia a cada 1 ou 2 anos
40-50 anos	Auto-exame da mama e exame clínico regular Mamografia (a cada 1 ou 2 anos) em geral é recomendada
< 40 anos	Auto-exame da mama e exame clínico regular

>= acima de; < abaixo de

Tabela 2. Sobrevida do câncer de mama em 5 anos aproximada, de acordo com o estágio clínico AJCC

Fonte: *American Cancer Society*





## Capítulo II - Primeiro artigo em português

---

## **Tratamento adjuvante do câncer de mama em estádios iniciais.**

---

Lissandra Dal Lago, Chantal Bernard-Marty, Martine J. Piccart

*Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica*

### **Abstract**

The early diagnosis of breast cancer offers unique opportunities for curative interventions. After the surgical procedure, the recognition of the disease recurrence risk is necessary in order to offer adjuvant treatments. The correct identification of high risk tumors based on clinical, pathological and molecular profiles will allow an improved selection of effective and safe treatments. The 2005 St. Gallen's consensus conference on management of early breast cancer recognizes the importance of groups with distinct degrees of endocrine responsiveness. This review is about these different groups of patients separated by the presence or absence of hormone receptors and the treatment options available beyond the classical anti estrogen tamoxifen, the aromatase inhibitors. It will also review the recent advances in adjuvant chemotherapy options with the introduction of the taxanes in this scenario and the early results of the anti HER2 agent trastuzumab in the adjuvant setting. We hope to call attention on the importance of identifying the exact profiles for an effective endocrine manipulation and the tailored alternative therapies for patients not likely to benefit (exclusively) from hormone therapy.

**Uniterms:** Early breast cancer, adjuvant treatment of early breast cancer, endocrine responsiveness

## Introdução

As recomendações do consenso de St. Gallen de 2005 representam uma profunda mudança nas tomadas de decisões relativas ao tratamento adjuvante do câncer de mama (CM), que eram baseadas principalmente no risco de recidiva, para recomendações baseadas principalmente na responsividade hormonal.

Para tumores exibindo um perfil molecular que não deixa dúvida sobre a resposta à manipulação hormonal, torna-se prioritária a seleção de uma hormonioterapia que ofereça o melhor risco-benefício. A adição de alguns poucos ciclos de quimioterapia (QT) antes do início da hormonioterapia adjuvante pode ser considerada em pacientes com alto risco de recidiva (tais como aqueles com  $\geq 4$  linfonodos positivos).

Para tumores exibindo perfil molecular que deixa dúvidas sobre a responsividade à hormonioterapia, um maior peso será dado ao papel do tratamento quimio-endócrino seqüencial e à seleção do agente endócrino que pode ter maior chance de atividade quando estas estruturas moleculares estiverem presentes.

Finalmente, um cuidado extremo deverá ser dado aos tumores sem responsividade hormonal, quando da seleção do regime da QT adjuvante, uma vez que ela representará a única “arma” contra potencial micrometástase. Provavelmente estes tumores serão os mais beneficiados com a introdução no esquema de tratamento de agentes citotóxicos sem resistência cruzada, bem como com o ajuste fino da dose e do esquema destes agentes.

Para a optimização desta delicada decisão de tratamento, os oncologistas precisam ter amplo conhecimento dos benefícios e dos riscos associados às modalidades do tratamento adjuvante.

Este artigo pretende fornecer este conhecimento de uma maneira concisa.

## **I. Terapia adjuvante individualizada: prioridade máxima em 2005**

A meta-análise do Grupo Colaborador de Câncer de Mama em estádios iniciais (EBCTCG) atualizada com 15 anos de acompanhamento de todos os estudos clínicos randomizados deste grupo, reforça as evidências da eficácia de terapias sistêmicas adjuvantes na redução da recorrência da doença e da mortalidade no CM em estádios iniciais (1). Estes dados propiciam estimativas médias dos benefícios relativos e absolutos do tratamento em estudos na população global, e são considerados subótimos para a abrangência da heterogeneidade genética do câncer de mama (CM) (2).

A individualização da hormonioterapia adjuvante (tamoxifeno ou ablação ovariana) tem sido baseada no estado do receptor hormonal do tumor. No entanto, marcadores moleculares adicionais ou “assinaturas” hormonais são necessárias com urgência, para identificar subgrupos que possam se beneficiar particularmente de dos novos agentes chamados inibidores de aromatase (IA), que estão entrando na cena adjuvante e apresentam custo mais elevado.

A individualização da QT adjuvante ainda não existe. Até o momento, a QT com regimes mais agressivos tem sido oferecida a pacientes com alto risco de recorrência (tipicamente aqueles com doença com linfonodo axilar positivo), em virtude do aumento do ganho médio de eficácia proporcionado por estes regimes em estudos clínicos randomizados. Evidências retrospectivas, mas encorajadoras, indicam uma magnitude muito maior de benefícios da QT em doenças com receptores de estrogênio (RE) negativos em relação a doenças com RE positivos (3). A próxima geração de estudos clínicos prospectivos deveria idealmente ser conduzida separadamente em CM com receptores hormonais negativos e

positivos, permitindo um maior poder de identificação do tratamento sistêmico ótimo para estes dois tipos de doença.

O uso da tecnologia de microarranjo como ferramenta para dissecar a heterogeneidade do CM e para melhorar a individualização do tratamento tem crescido exponencialmente, mas ainda sem nenhuma aplicação clínica rotineira . Perou et al. (4) descreveram pela primeira vez as diferenças dos perfis de expressão genética entre tumores malignos da mama com RE clinicamente positivos e negativos. Mais tarde, Sorlie et al. (5) refinaram a classificação dos tumores com RE positivos e negativos através da identificação de diferentes subgrupos com assinaturas moleculares distintas, cada uma associada com desfechos clínicos distintos

Van de Vijver et al. (6) descobriram uma assinatura prognóstica de 70 genes em pacientes com CM com linfonodos axilares negativos sem prévia exposição à terapia sistêmica: o perfil da expressão foi superior aos critérios clínicos tradicionais e patológicos na identificação de pacientes com e sem metástase à distância. Eles argumentaram que o uso desta assinatura poderia reduzir a fração de mulheres que receberiam o tratamento de QT adjuvante em aproximadamente 30%. Esta hipótese desafiadora precisava ser validada antes que o prognóstico com a assinatura molecular fosse implementado na prática clínica. Por esta razão, antes de lançar um grande estudo clínico randomizado (MINDACT), foi realizada uma validação externa e independente da assinatura dos 70 genes de Amsterdã (6), baseada em 301 pacientes acompanhados por uma média de 10 anos (7). A assinatura prognóstica dos 70 genes se mostrou superior ao índice prognóstico de Nottingham, ao critério de St. Gallen 2003 e ao

'Adjuvant! On Line', tanto na previsão do tempo de metástase à distância quanto de sobrevida global. As mulheres classificadas como de baixo risco através da assinatura dos 70 genes tiveram uma projeção de sobrevida sem metástase à distância em 5 anos de 95% e uma projeção de sobrevida de 10 anos de 88%.

A Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC) e o TRANSBIG lançaram o primeiro estudo clínico prospectivo multinacional (MINDACT) que investigará o papel da assinatura da expressão dos 70 genes identificados pelos holandeses (6) como ferramenta para melhorar a tomada de decisões da QT no CM em estádios iniciais com linfonodos não comprometidos. Este estudo clínico ambicioso poderia atualizar o nível de evidência da assinatura dos genes de um escore de 3 para um escore de 1, conduzindo a uma profunda mudança na prática clínica do CM.

Este processo de evolução da pesquisa "do laboratório para o leito" se torna crítico quando se fala, tanto em querer evitar o super-tratamento e as suas complicações potenciais severas, quanto evitar o sub-tratamento e suas consequências drásticas para a sobrevida do paciente.

## II. Citotóxicos trazidos para a cena adjuvante na última década

O papel de novos agentes citotóxicos tais como os taxanos, a capecitabina, a gemcitabina e os compostos platinados na cena adjuvante será revisado nesta seção.

### 1. Taxanos

O papel dos taxanos no uso adjuvante ainda é controverso, apesar dos resultados preliminares serem promissores. Na literatura, 19 estudos clínicos avaliaram o papel dos taxanos em critério de adjuvância, com um recrutamento planejado de 35.500 pacientes. Até o momento, 8 estudos clínicos apresentaram resultados finais, que são sumarizados na Tabela 1. O último painel de especialistas do Consenso de St. Gallen ( 8 ) confirmou que ainda não há uma evidência de nível 1 para o uso de taxanos no tratamento adjuvante do CM com linfonodos axilares negativos. Com relação aos pacientes com CM com linfonodos axilares positivos, o painel dos especialistas continua dividido, em virtude do desenho sub-ótimo destes estudos clínicos, que misturam populações responsivas ou não à hormonioterapia, além da falta de controle apropriado de outras variáveis, tais como a duração do tratamento.

O estudo do Grupo B de Câncer e Leucemia (CALGB) 9344 (9), incluiu 3.121 pacientes com CM com linfonodos axilares positivos, avaliando se o aumento da dose de doxorrubicina ou a adição de paclitaxel ao regime de QT adjuvante melhoraria a sobrevida livre de doença (SLD) e a sobrevivência global (SG) destas pacientes. Em um acompanhamento de 69 meses, houve uma



redução estatisticamente significativa no risco de recorrência (17%) e de morte (18%) no braço que continha paclitaxel. Uma análise não planejada de subgrupo demonstrou uma significativa melhora na sobrevida livre de recorrência (SLR) apenas para pacientes com tumores com RE negativo. A adição de paclitaxel prolongando a duração da quimioterapia adjuvante, com atraso no uso da radioterapia quando indicada, não prejudicou o uso ou resultados dos tratamentos conservadores, inclusive proporcionando melhora no controle local em relação ao grupo que recebeu AC (10 )

No estudo clínico B-28 (11) do Projeto Nacional de Cirurgia e Adjuvância de Mama (NSABP), 3.060 pacientes com CM com linfonodos axilares positivos foram randomizadas para receber uma combinação de ciclofosfamida e doxorubicina, ou o mesmo regime seguido por paclitaxel. Após um acompanhamento mediano de 64 meses, houve uma redução estatisticamente significativa do risco de recidiva, mas não houve redução estatisticamente significativa no risco de morte no braço com paclitaxel. Uma análise de subgrupo de acordo com o estado dos linfonodos axilares e dos receptores hormonais (RH) não demonstrou diferença significativa na SLD, na SLR e na SG entre os dois braços. Deve-se salientar que a administração de QT e tamoxifeno concomitantes neste estudo clínico é um fator potencial de confusão.

No estudo clínico 001 do Grupo Internacional de Pesquisa do Câncer de Mama (BCIRG) (12), 1.491 pacientes com linfonodos axilares positivos foram randomizadas para receber FA<sub>50</sub>C (5-fluorouracil, doxorubicina 50 mg/m<sup>2</sup>, e ciclofosfamida), ou TAC (docetaxel, doxorubicina 50mg/m<sup>2</sup>, e ciclofosfamida). Em um acompanhamento mediano de 55 meses, houve redução estatisticamente

significante do risco de recidiva (28%) e de morte (30%) no braço do docetaxel. A melhora da SLD foi independente tanto do RH quanto do nível de HER-2. A maior magnitude do benefício da associação de taxano no subgrupo com 1-3 linfonodos axilares positivos em comparação com o subgrupo com número maior de linfonodos axilares envolvidos não foi confirmada na análise de Cox.

O estudo clínico do PACS01 (13) comparou 6 ciclos de FE<sub>100</sub>C (5-fluorouracil, epirrubicina 100mg/m<sup>2</sup>, ciclofosfamida) a 3 ciclos de FE<sub>100</sub>C seguidos por 3 ciclos de docetaxel (100mg/m<sup>2</sup>) em 1.999 mulheres com CM com linfonodos axilares positivos. Em um acompanhamento de 60 meses, houve redução estatisticamente significativa no risco de recorrência e morte para o braço com docetaxel sequencial (17% e 23%, respectivamente). Uma análise pré-planejada de um subgrupo sugere que o benefício é restrito as pacientes com 1-3 linfonodos axilares comprometidos e aquelas com idade superior a 50 anos.

Em um estudo clínico pequeno do M. D. Anderson Cancer Center (14), 524 pacientes foram randomizadas para receber 4 ciclos de paclitaxel seguidos de 4 ciclos de 5-fluorouracil, doxorubicina e ciclofosfamida (FAC) ou 8 ciclos de FAC apenas. Em um acompanhamento de 60 meses, não houve diferença estatisticamente significativa entre os braços na SLR e na SG, apesar de haver uma tendência favorecendo o regime com taxano.

O estudo clínico E2197 (17) comparou 4 ciclos de AT (doxorubicina a 60mg/m<sup>2</sup> e docetaxel a 60mg/m<sup>2</sup>) com 4 ciclos de AC (doxorubicina a 60mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida a 600mg/m<sup>2</sup>) em 2.952 pacientes com 1-3 linfonodos axilares positivos ou axila negativa e tumor maior do que 1 cm. Num seguimento mediano de 53 meses, não houve diferença na SLD entre os dois braços de tratamento.

O estudo clínico neoadjuvante NSABP B-27 (16), conduzido em 2.411 pacientes com CM operável foi planejado para determinar o efeito da adição de docetaxel após 4 ciclos de doxorrubicina e ciclofosfamida (AC) pré-operatórios. Apesar da duplicação da taxa de resposta patológica, não houve diferença estatisticamente significativa em termos de SLD e SG que fosse favorável ao braço com taxano. Assim como no NSABP-B28, o tamoxifeno foi dado concomitante à QT.

Um estudo clínico pequeno mas muito interessante, o US Oncology 9735 (15), sugere que um regime sem antraciclina, mas baseado em taxano (docetaxel + ciclofosfamida) pode ser tão eficaz quanto 4 ciclos de AC (doxorrubicina-docetaxel), enquanto o estudo clínico do Intergupo/E2197 não encontrou nenhuma vantagem do braço AT x 4 (doxorrubicina-docetaxel) sobre AC x 4 (15).

Até agora, regimes com doses adequadas de antraciclina permanecem um procedimento aceitável de QT adjuvante no CM. A meta-análise do EBCTCG (1) com 15 anos de acompanhamento demonstra que, na média, estes regimes continuam sendo significativamente mais efetivos do que o regime CMF na redução da recorrência da doença e da mortalidade do CM. Não houve excesso estatisticamente significativo de leucemia secundária ou morte cardíaca, porém seqüelas cardíacas a longo prazo podem ocorrer e não são detectadas em meta-análises.

Infelizmente, o lugar dos taxanos no tratamento adjuvante ainda não foi validado com um nível de evidência 1. No entanto, o limiar para a prescrição de antraciclinas seguidas por taxanos foi reduzido para os tumores sem expressão de RH, para aqueles mostrando um perfil genético preocupante ou quando existe

um temor de cardiotoxicidade por antraciclina (tumores manifestando excesso de HER-2 preenchem ambos os critérios).

Um outro aspecto importante a ser considerado é o alto custo do tratamento devido ao crescente uso de epirrubicina e taxanos em regimes de QT (18). Nossos sistemas de saúde pública estão sob ameaça e este aspecto deve motivar uma transição acelerada da oncologia empírica ('o mesmo tratamento serve para todos') para a oncologia molecular, que por sua vez, dependerá da pesquisa translacional de alta qualidade conectada aos estudos clínicos (19).

## 2. Capecitabina

A capecitabina é um medicamento muito atraente para o tratamento adjuvante do CM, por apresentar biodisponibilidade oral e perfil de efeitos colaterais favorável. Na doença metastática, demonstrou-se que ela é ativa tanto como agente único (20), quanto em combinação com outros agentes, tais como docetaxel, paclitaxel, vinorelbina e antraciclinas (21). Além disso, a capecitabina combinada com docetaxel mostrou uma SG melhor quando comparada ao docetaxel sozinho no CM metastático (22).

Recentemente, a análise interina de um estudo clínico neoadjuvante de fase II randomizado mostrou que a combinação docetaxel/capecitabina proporcionou maiores taxas de resposta clínica e patológica quando comparadas à combinação doxorrubicina/ciclofosfamida (AC) em 121 pacientes com CM em estágios II/III (23).

Atualmente, a capecitabina está sendo avaliada como agente único em estudos clínicos de fase III, sendo comparada com regimes tipo CMF ou AC em

pacientes idosos com CM em estádios iniciais (NO17629), além das combinações de capecitabina com paclitaxel e docetaxel (IDO1-580) (<http://www.clinicaltrials.gov>). Um amplo estudo de registro, conduzido pela US Oncology, compara tratamentos pós-operatórios com 4 ciclos de AC seguidos por 4 ciclos de monoterapia com docetaxel ou capecitabina/docetaxel combinados. A combinação capecitabina/docetaxel será comparada a regimes baseados em antraciclina no grande estudo clínico MINDACT, dando-se particular atenção às seqüelas de longo prazo, as quais espera-se serem reduzidas no braço não baseado em antraciclina.

### 3. Gemcitabina

Este nucleosídeo pirimidínico antimetabólico mostrou atividade em uma variedade de tumores sólidos, com um perfil favorável de toxicidade. Como agente único, a gemcitabina leva a taxas de resposta que variam de 14% a 37% no tratamento de primeira linha do CM avançado, e de 12% a 30% como terapia de salvamento em pacientes previamente tratados com antraciclina e/ou taxanos. Estudos de fase II demonstraram altas taxas de resposta para a combinação com vinorelbina, sais de platina e taxanos (24).

Quinhentos e vinte e nove pacientes com câncer de mama metastático (CMM) foram randomizadas para receber paclitaxel (a cada 3 semanas) e gemcitabina ou paclitaxel como agente único. O braço combinado relatou maiores taxas de resposta, maior tempo livre de progressão e maior sobrevida (25).

Muitos estudos clínicos randomizados de fase III estão em andamento para identificar o papel da gemcitabina no tratamento adjuvante do CM: a *Cancer*

*Research Campaign Clinical Trial* realiza um estudo clínico comparando a eficácia do uso de paclitaxel, epirrubicina e ciclofosfamida adjuvantes, com ou sem o uso da gemcitabina, em uma amostra de 3.000 pacientes (<http://www.clinicaltrials.gov>). O estudo clínico tAnGo (26) examinará a eficácia da seqüência de epirrubicina e ciclofosfamida (EC) seguida por paclitaxel como agente único ou combinado com gemcitabina, em 3.000 pacientes com CM em estádios iniciais. Finalmente, um estudo clínico de fase III conduzido pelo NSABP, que incluirá 4.800 pacientes com CM em estádios iniciais e com axila positiva, tem como desfecho principal a SLD em três braços, incluindo um regime com dose densa (a cada 2 semanas) de doxorubicina, ciclofosfamida e paclitaxel, com ou sem gemcitabina/docetaxel, doxorubicina e ciclofosfamida.

#### 4. Compostos de platina

Os compostos de platina, amplamente utilizados na oncologia, também são ativos no CM metastático, especialmente em tratamentos de primeira linha (27). Porém, a disponibilidade de drogas menos tóxicas com meios de administração mais convenientes limitou seu uso na doença metastática. Estudos pré-clínicos indicaram que há uma sinergia entre sais de platina e o anticorpo monoclonal trastuzumab em linhas de células humanas de CM que superexpressam o HER2/*neu* (28).

Estas descobertas levaram a dois estudos clínicos de fase II conduzidos pelo *Breast Cancer International Research Group* (BCIRG) em pacientes com CM metastático que superexpressam HER-2 (29). O BCIRG 101 e o UCLA-ORN avaliaram dois compostos de platina, a cisplatina e a carboplatina,

respectivamente, em combinação com docetaxel e trastuzumab, em 124 pacientes portadores de CM metastático. As taxas de resposta globais foram de 79% e 58%, respectivamente.

Um estudo randomizado de fase III com 188 pacientes com CMM e superexpressão do HER-2, demonstrou uma melhora estatisticamente significativa tanto da resposta global (52% *versus* 32%;  $p=0,04$ ) quanto no tempo livre de progressão (11,2 meses *versus* 6,9 meses;  $p=0,007$ ) com a adição de sais de platina. Estes pacientes foram tratados com trastuzumab e paclitaxel, com ou sem carboplatina (30). O estudo clínico em andamento BCIRG 007 pretende reunir 466 pacientes com CM em estágio IIIb/IV com superexpressão do HER-2 e está comparando docetaxel e trastuzumab com ou sem carboplatina ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Em terapia adjuvante, o estudo clínico BCIRG 006 (31) randomizou 3.222 pacientes para comparar os regimes AC seguido de docetaxel, AC seguido de docetaxel com trastuzumab ou 6 ciclos de docetaxel concomitante com carboplatina e trastuzumab. Num seguimento mediano de 1,5 anos, os regimes contendo trastuzumab obtiveram resultados superiores, mas por enquanto não houve diferença estatisticamente significativa na SLD entre os dois braços que continham trastuzumab, em relação ao uso ou não de carboplatina

### III. Novos usos de medicamentos antigos

O desenvolvimento de novas drogas não é a única maneira de melhorar o impacto na sobrevida da QT adjuvante. A manipulação de drogas “antigas” com novas doses e esquemas, tais como a abordagem de dose densa e metronômica, poderia melhorar a eficácia da QT adjuvante em pacientes com CM em estádios iniciais, particularmente aquelas com tumores que apresentam RH negativos.

#### 1. Quimioterapia em dose densa

Historicamente, o intervalo entre ciclos de QT tem sido ditado pela dinâmica de recuperação dos neutrófilos. Com a maioria dos agentes mielossupressores utilizados, sozinhos ou em combinação, o nadir de granulócitos periféricos é alcançado cerca de 10 a 15 dias após a administração da QT e a recuperação é atingida em aproximadamente 21 dias. Norton e Simon (32), em uma tentativa de erradicação de populações de células malignas, desenvolveram um modelo cinético matemático para determinar a maneira mais efetiva de administração de drogas citotóxicas sem resistência cruzada. Como resultado desse trabalho, os autores recomendaram a administração seqüencial destes agentes de uma maneira dose densa.

O estudo do intergrupo 9741, coordenado pelo Grupo B de câncer e leucemia (CALGB) foi um grande estudo clínico adjuvante de fase III concebido para validar este conceito (33). O estudo incluiu 2.005 pacientes com CM com linfonodos axilares positivos em um arranjo fatorial dois por dois, para testar qual dos dois esquemas melhoraria a SLD e a SG. Os regimes de QT administrados



em dose densa (a cada 2 semanas) e seqüencial (ao invés de concomitante) incorporavam doxorrubicina, ciclofosfamida e paclitaxel. Em um acompanhamento mediano de 36 meses, o regime de dose densa seqüencial demonstrou uma melhora estatisticamente significativa em termos de SLD (85% *versus* 81%) e SG (92% *versus* 90%). A SLD estimada de 4 anos foi de 82% *versus* 75%. O regime de dose densa implica obrigatoriamente no uso de fator de estimulação de medula óssea ( G-CSF)

Venturini et al. (34) utilizaram FEC acelerado (a cada 2 semanas) *versus* FEC convencional em 1.214 pacientes com linfonodos axilares negativos e de alto risco, além de pacientes com CM com linfonodos axilares positivos. Este estudo menor mostrou apenas uma tendência de melhora na SG no braço dose densa.

Os dados de toxicidade nestes dois estudos clínicos não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os braços convencional e o dose densa, pelo menos em termos de riscos a curto prazo.

A maioria dos estudos clínicos de dose densa publicados apresentaram resultados negativos, provavelmente explicados por várias limitações de desenho destes estudos. Entre estas limitações inclui-se braços com poder insuficiente, braços assimétricos em relação às drogas administradas e/ou o uso de doses sub-ótimas dos agentes citotóxicos (35).

## 2. Quimioterapia Metronômica

Modelos pré-clínicos mostram elegantemente que a freqüência de administração dos agentes quimioterápicos em doses menores (os chamados esquemas “metronômicos”) podem otimizar suas propriedades anti-angiogênicas

(36). A QT metronômica pode ser capaz de driblar a resistência às drogas, focalizando em células tumorais endoteliais normais ao invés de células tumorais geneticamente instáveis (37).

O estudo clínico IBCSG-22-00 é um estudo randomizado, aberto, multicêntrico com 1.330 pacientes com CM em estádios iniciais com RH negativo que explora o papel da QT metronômica (ciclofosfamida e metotrexato oral por 1 ano) como terapia de consolidação após o término da QT adjuvante baseada em antraciclina ou CMF ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

O paclitaxel semanal foi usado com sucesso no tratamento do CM avançado. O estudo clínico CALGB 9840 (38) conduzido em 577 pacientes mostrou superioridade dos esquemas semanais em relação aos esquemas a cada três semanas, no tempo livre de progressão da doença. Em relação à toxicidade, houve uma pequena diminuição da mielosupressão, porém houve mais neurotoxicidade com o esquema semanal se comparado ao esquema a cada 3 semanas do paclitaxel.

O estudo clínico ECOG 1199/Intergroup deverá fornecer informações importantes relacionadas ao mérito da QT com tempo convencional (3 semanas) contra a QT metronômica. Em torno de 5.000 pacientes foram randomizadas em 1 de 4 braços contendo AC convencional e docetaxel, ou paclitaxel, dados em esquemas semanais ou a cada três semanas ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

## IV. Hormonioterapia adjuvante otimizada

A hormonioterapia é um elemento chave em tratamentos adjuvantes para o CM em estádios iniciais, conforme evidenciado pela demonstração de que o tamoxifeno e, mais recentemente, os inibidores da aromatase (IA), têm um profundo impacto no curso do CM com responsividade hormonal.

### 1. Pacientes com CM em estádios iniciais na pós-menopausa (tabela 2)

Em 2005, os resultados da meta-análise do EBCTCG (1) confirmaram que a hormonioterapia adjuvante para o CM em estágio inicial com RE positivo, em pacientes na pós-menopausa, tem um impacto muito importante de longo prazo em SLD e na mortalidade do CM. Até recentemente, o tamoxifeno foi considerado o tratamento convencional ideal para todas as pacientes com RH positivo. No entanto, vários estudos clínicos grandes utilizando IA estão desafiando esta posição privilegiada do tamoxifeno. Os IA têm sido explorados até então: a) como substituto ou em combinação com o tamoxifeno (estudos clínicos ATAC e BIG 1-98), b) seqüencialmente, após 2-3 anos de uso de tamoxifeno (estudos clínicos ITA, IES, ARNO 95 e ABCSG 8), e c) seqüencialmente, após os 5 anos de tamoxifeno (estudo clínico MA. 17).

Benefícios associados à introdução do AI em esquemas adjuvantes

a) IA desde o início (« up front »)

No estudo clínico randomizado, placebo controlado e duplo-cego ATAC (Arimidex e Tamoxifeno separados ou em combinação) (39), 9.366 pacientes pós-menopáusicas com CM operável foram randomizadas para receber anastrozole (1 mg/dia), tamoxifeno (20 mg/dia), ou uma combinação dos dois, durante um período de 5 anos. Neste estudo, 84% dos pacientes tinham RE positivo e/ou tumores com receptor de progesterona (RP) positivo. O braço da combinação foi descontinuado, já que não mostrou benefício em relação ao tamoxifeno sozinho na segunda análise. A última atualização dos resultados, após um acompanhamento mediano de 68 meses (40) favorece o uso de anastrozole em pacientes com RE positivo, com razão de risco estatisticamente significativa para a SLD (primeiro desfecho do estudo), para o tempo de recorrência, para o CM contra-lateral, e para a SLR. No entanto, até o momento não existe uma diferença estatisticamente significativa entre o braço do anastrozole e do tamoxifeno em termos de SG. Uma análise retrospectiva de sub-grupos mostra uma redução de 57% nos eventos de recorrência do CM no braço com o anastrozole, quando comparado com o braço tamoxifeno em mulheres que apresentam RE positivo e RP negativo (41).

O estudo clínico IBCSG 18-98 / BIG 1-98 comparou (A) tamoxifeno (5 anos) com (B) letrozole (5 anos), com (C) tamoxifeno (2 anos) seguido de letrozole (3 anos), com (D) letrozole (2 anos) seguido de tamoxifeno (3 anos). O recrutamento foi completado em maio de 2003, com a inclusão de 8.028 pacientes e análise de 8010 pacientes, os primeiros resultados, baseados na comparação entre os braços com início do tratamento com letrozole (braços B e D) contra o tamoxifeno (braços A e C) demonstram, após um acompanhamento

mediano de 25,8 meses (41) uma diferença estatisticamente significativa em SLD, tempo de recorrência, e SL de metástase à distância, que favorece o uso do letrozole.

b) Seqüência tamoxifeno seguido de IA

No pequeno estudo clínico italiano Tamoxifeno Arimidex (ITA), 426 pacientes na pós-menopausa foram tratadas com tamoxifeno adjuvante por cerca de 2 anos, e daí continuaram o tratamento com tamoxifeno ou com anastrozole por um total de 5 anos de hormonioterapia adjuvante. Uma análise atualizada, após um acompanhamento mediano de 36 meses, confirma que o risco de recidiva foi estatisticamente menor no braço seqüencial com melhora estatisticamente significativa na SLR e na sobrevida livre de recidiva local (42).

O Estudo Intergrupo do Examestano (IES/ BIG 2-97) (44) foi um grande estudo clínico duplo-cego, randomizado, que envolveu 4.742 mulheres na pós-menopausa com RE positivo ou CM com RH desconhecido, que estavam em remissão da doença após completarem 2 a 3 anos de terapia adjuvante com tamoxifeno. As pacientes foram randomizadas para receber examestano ou para continuarem com tamoxifeno até completarem 5 anos de hormonioterapia adjuvante. Em uma terceira análise interina, com um acompanhamento mediano de 37,4 meses (45) o *HR* da SLD (desfecho primário) e do CM contralateral, mostraram uma redução estatisticamente significativa no grupo do examestano quando comparado ao grupo do tamoxifeno. Até o momento, apenas uma tendência de melhora na SG pôde ser observada em favor do braço seqüencial.

Os resultados do ABCSG 8 (2.262 pacientes na menopausa com CM responsivo à hormonioterapia) e do ARNO 95 (962 pacientes na menopausa com

CM responsivo à hormonoterapia) foram combinados (3.244 pacientes) para a análise de eficácia da troca do tamoxifeno adjuvante para o anastrozole, após 2 anos de tamoxifeno (46). Em um acompanhamento mediano de 28 meses, houve uma redução estatisticamente significativa de 40% nos eventos, que incluem recorrências, CM secundários e mortes, além de uma melhora altamente significativa na SLR à distância no braço do anastrozole.

#### c) Uso estendido do IA

Um grande estudo clínico foi projetado para testar se a extensão de tratamentos adjuvantes além de 5 anos com um IA poderia melhorar o desfecho clínico de SLR. No estudo clínico NCIC CTG MA.17 / BIG 1-97, 5.187 mulheres na pós-menopausa foram tratadas aproximadamente 5 anos (4,6 a 6 anos) com tamoxifeno e após receberam de forma randomizada letrozole ou placebo por um período adicional de 5 anos. Uma primeira análise interina (47), após um acompanhamento mediano de 2,4 anos, mostrou um aumento estatisticamente significativo da taxa de SLD no grupo do letrozole, com uma diferença absoluta de 2.2% e com projeção atuarial de 6% na taxa de eventos em 4 anos. Esta diferença robusta e inesperada levou a uma abertura precoce do estudo. Na atualização dos dados, com um acompanhamento mediano de 30 meses, persiste o benefício em SLD e SLD à distância. A sobrevida geral não difere entre os dois grupos, mas no subgrupo de pacientes com linfonodos axilares positivos o uso do letrozole produz melhora significativa na sobrevida (RR 0,61 ;IC 0,38-0,98 ) (48).

### Perfil de segurança dos IA (Tabela 3)

Dados todos os estudos clínicos positivos e a perspectiva otimista de que os benefícios de SG surgirão com maiores períodos de acompanhamento, as principais preocupações com o uso adjuvante dos IA são os seus efeitos colaterais a longo prazo. Enquanto mostrou-se que o tamoxifeno previne a perda óssea e mantém um balanço lipídico apropriado, os AI podem afetar o remodelamento ósseo e o balanço lipídico devido a deprivação hormonal mais intensa. Várias questões de segurança, incluindo as fraturas ósseas, as mudanças no perfil lipídico, os eventos cardíacos e vasculares, foram definidos como sendo importantes para investigações clínicas específicas. A Tabela 3 resume o nosso conhecimento atual neste campo, após um acompanhamento relativamente pequeno.

No estudo clínico ATAC, as pacientes tratadas com anastrozole têm taxas significativamente menores de fogachos, sangramento e secreção vaginal, câncer endometrial, e de eventos cerebrovasculares ou tromboembólicos venosos, do que aquelas que receberam tamoxifeno. Por outro lado, mulheres tratadas com anastrozole mostraram taxas significativamente maiores de sintomas articulares e fraturas ósseas (45).

Os resultados disponíveis do estudo clínico ABCSG 8 / ARNO 95 (46) demonstraram significativo aumento de fratura ( $p=0,015$ ) e menos tromboembolismos ( $p=0,034$ ) no braço do anastrozole em relação ao do tamoxifeno

Em comparação com o placebo (estudo clínico MA.17) (48), o letrozole induziu mais artralguas e fogachos, mais osteoporose, enquanto houve uma

incidência ligeiramente maior de fraturas ósseas e eventos cardiovasculares não estatisticamente diferente daquelas taxas observadas no grupo do placebo.

Em comparação com o tamoxifeno (BIG 1-98) (42), o letrozole induziu significativamente um maior número de fraturas ósseas, eventos cardíacos e hipercolesterolemia. O tromboembolismo, câncer de endométrio e sangramento vaginal foram mais frequentes no braço do tamoxifeno. Em relação às doenças isquêmicas cardiovasculares, as incidências relatadas até o momento não são estatisticamente significantes (1,4% para o letrozole *versus* 1,2% para tamoxifeno).

Em comparação com o tamoxifeno, o exemestano induziu menos eventos tromboembólicos venosos e menos sintomas ginecológicos (Tabela 3). Em contraste, as artralguas foram mais comuns e uma atenção particular deverá ser dada aos eventos cardiovasculares, que por enquanto não foram significativamente maiores no grupo do exemestano (45).

O dados de maior longo-prazo são aguardados.

#### Recomendações para a prática clínica diária

Dado o rápido crescimento do conhecimento adquirido a partir destes estudos clínicos adjuvantes, houve uma tentativa de produzir regras terapêuticas. Neste contexto, o “*ASCO’s 2005 Technology Assessment Committee*” concluiu que a hormonioterapia adjuvante para mulheres com CM RH positivo na pós-menopausa deveria incluir um IA como terapia inicial ou como tratamento posterior ao tamoxifeno (49). No entanto, baseado nos estudos clínicos



publicados, ainda não é possível determinar a estratégia ideal individual para cada paciente.

Em 2005, três categorias de responsividade do CM foram identificadas pelo Painel de Consenso de St. Gallen (8): aqueles tumores com responsividade endócrina, aqueles com responsividade endócrina incerta, e aqueles sem responsividade ou chance de resposta endócrina. Provavelmente, os pacientes do primeiro grupo terão maior benefício com a hormonioterapia sozinha, enquanto que aqueles do último grupo se beneficiarão da QT sozinha. O uso adjuvante da QT seguido de hormonioterapia deve ser priorizado para o recém definido grupo intermediário.

Devemos salientar que a responsividade à hormonioterapia está se tornando o principal aspecto para a tomada de decisão na terapia adjuvante, seguida do risco de recidiva. O tamoxifeno, IAs , ou uma seqüência de tamoxifeno seguida por IA são consideradas opções válidas pelo Painel do Consenso de St. Gallen, e estas escolhas devem ser baseadas nas comorbidades dos pacientes ou na preferência do médico.

A esperança do futuro: a escolha da hormonoterapia adequada baseada no perfil molecular do tumor

Os esforços das pesquisas atuais estão voltados para a descoberta de assinaturas moleculares que possam identificar aquelas pacientes mais responsivas ao tamoxifeno ou aos IA. A hipótese é a de que o primeiro grupo de pacientes será um candidato ideal para a estratégia de sequenciamento,

enquanto ao último grupo deveria ser oferecido um IA diretamente (“up-front”). No entanto, atualmente nenhuma destas abordagens mostrou evidências científicas com nível-1. Os dados mais maduros são aqueles gerados por Paik e colaboradores (nível-2): seu escore de recorrência, obtido da avaliação por *RT-PCR* de 21 genes em material de tumores embebidos em parafina, obtidos de pacientes com CM com linfonodos axilares negativos, identifica um grupo de mulheres com excelente prognóstico após o uso do tamoxifeno adjuvante (50).

## 2. Paciente com CM em estádios iniciais e na pré-menopausa

A administração ótima da hormonioterapia em pacientes com CM na pré-menopausa em estádios iniciais continua sendo uma área de incertezas.

### Revisão do EBCTCG

Em 2005, a revisão do EBCTCG, incluindo quase 8.000 mulheres com idade abaixo de 50 anos, apresentando CM em estádios iniciais com RE positivo ou desconhecido, com pelo menos 5 anos de acompanhamento, confirma o impacto positivo da ablação ovariana (AO), da supressão ovariana ou de ambos os procedimentos na recorrência e morte por CM (1). No entanto, estes efeitos não são tão marcantes quanto os observados em meta-análises preliminares, quando a AO não havia sido testada contra a terapia sistêmica eficaz .. Os dados não indicam que os efeitos sejam diferentes entre a AO e a supressão ovariana e entre mulheres com idades inferior a 40 anos e idades entre 40 e 49 anos.

## Ablação ovariana (AO)

### a) AO como alternativa à QT (tabela 4)

O estudo clínico ZEBRA (51) é o maior estudo que comparou diretamente a supressão ovariana com a QT. Este estudo randomizado incluiu 1.640 mulheres na pré-menopausa com CM apresentando linfonodos axilares comprometidos, que receberam 6 ciclos de CMF ou 2 anos de goserelina. Num acompanhamento mediano de 6 anos, para as mulheres com tumores com RE positivo, os dois braços resultaram numa SLD e SG equivalentes. Em contraste, o regime CMF proporcionou uma SLD e SG superior à goserelina no subgrupo de mulheres com RE negativo.

Os estudos clínicos escocês (52), escandinavo (53) e o alemão (54) não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre o CMF e a AO em termos de SLD e SG. Interessante notar que o estudo escocês demonstrou uma melhora na sobrevida nos sub-grupos de mulheres com níveis significantes de RE que foram tratadas com AO e nas mulheres com escores baixos de RE tratadas com 6 meses de CMF oral.

Os estudos comparando a AO mais o tamoxifeno contra a QT nas mulheres na pré-menopausa com tumores com RH positivo não demonstraram diferenças significantes na SLD e na SG (tabela 5).

O estudo clínico GROCTA, que recrutou 244 pacientes com CM e linfonodos axilares positivos, comparou a AO (por cirurgia, radioterapia ou 2 anos de goserelina) mais 5 anos de tamoxifeno com 6 ciclos de CMF oral (55). Num seguimento de 76 meses, não houve diferença estatisticamente significante entre

as duas abordagens de tratamento em termos de SLD e SG. Este estudo foi considerado com baixo poder estatístico, particularmente para a sobrevida.

No estudo clínico FASG 06, três anos de triptorelina mais tamoxifeno foram comparados com 6 ciclos de FEC<sub>50</sub>, em 333 pacientes com CM em estádios iniciais com linfonodos axilares positivos (56). Num seguimento mediano de 54 meses não houve diferença estatisticamente significativa na SLD e na SG entre os dois braços de tratamento.

Outro estudo clínico francês (57) que comparou FAC com a AO e o tamoxifeno em 162 pacientes com CM com linfonodos axilares positivos foi fechado precocemente devido ao baixo recrutamento e portanto foi considerado como de baixo poder estatístico.

O estudo clínico ABCSG 5 comparou a goserelina por 3 anos mais o tamoxifeno por 5 anos com 6 ciclos de CMF endovenoso em 1.045 pacientes (58). Num seguimento mediano de 42 meses, a hormonoterapia combinada resultou numa melhora estatisticamente significativa na SLD em comparação com o CMF, com nenhuma diferença na SG.

Um estudo recente comparou 2 anos de leuprorelina com 6 ciclos de CMF endovenoso em 599 pacientes com CM e axila positiva. Este estudo falhou em demonstrar diferença na SLD e na SG (59).

Infelizmente, a relevância clínica destes estudos é prejudicada pela ausência do tamoxifeno nos braços com QT, além do uso de regimes diferentes de CMF (com uma variada propensão à falência ovariana).

b) AO seguindo a QT (tabela 6)

A amenorréia que segue a QT mostrou ter impacto na sobrevida (60). Os estudos clínicos incorporando a AO após a QT adjuvante não estabeleceram benefício definitivo; no entanto, o subgrupo de pacientes com RH positivo que não se tornaram amenorréicas com a QT podem se beneficiar da adição da AO (IBCSG VIII) (61).

O Intergrupo 0101 (62) é um estudo randomizado envolvendo 1.504 pacientes em pré-menopausa, que compara 6 ciclos de FAC com 6 ciclos de FAC seguido de um agonista LH-RH por 5 anos, ou 6 ciclos de CAF seguido da combinação LH-RH mais tamoxifeno por 5 anos. Em 5 anos de seguimento, somente o braço contendo tamoxifeno demonstrou uma melhora estatisticamente significativa na SLR.

O estudo clínico PERCHE coordenado pelo IBCSG recrutará 1.750 mulheres na pré-menopausa com CM em estágio inicial com RH positivo para avaliar a eficácia e a segurança da adição da QT adjuvante à AO mais tamoxifeno ou à AO mais exemestano por 5 anos ([www.ibcsg.org](http://www.ibcsg.org)).

#### Hormonioterapia combinada

Poucos estudos clínicos compararam tamoxifeno com ou sem AO (tabela 7) e somente estudos clínicos muito recentes de recrutamento recém iniciado estão investigando a AO em associação com os IA. O estudo ZIPP (63) incluiu 2.631 mulheres randomizadas em 4 braços: um braço com 2 anos de tamoxifeno, outro com 2 anos de agonista LHRH, outro com a combinação dos dois e outro braço controle sem nenhum tratamento. Num seguimento mediano de 4,3 anos, houve

uma diferença estatisticamente significativa na sobrevida livre de eventos e na SG favorecendo o braço com agonista LHRH. O INT 0142 foi um estudo clínico prospectivo e randomizado desenhado para comparar a SLD, a SG e a qualidade de vida do uso de tamoxifeno adjuvante por 5 anos sozinho ou com a AO. O estudo recrutou muito lentamente e foi fechado antes de obter o seu número planejado de pacientes. Desta forma, as análises de sobrevida ficaram prejudicadas (64).

O tamoxifeno sozinho pode também ser uma terapia adjuvante eficaz, mas não existem estudos clínicos comparando a sua eficácia com a QT ou com a AO no tratamento adjuvante.

Os dois estudos clínicos coordenados pelo IBCSG e que vão ser realizados pelo BIG irão contribuir para responder a estas questões importantes. O SOFT é um estudo de fase III em andamento que tem por objetivo a inclusão de 3.000 pacientes e que vai comparar a eficácia da AO associada ao tamoxifeno ou ao examestano, com o tamoxifeno sozinho nas mulheres em pré-menopausa com tumores RH positivo. O TEXT é um estudo clínico de fase III randomizado que vai incluir 1.845 pacientes na pré-menopausa com RH positivo, que vai avaliar a eficácia e a segurança da AO (LHRH) mais o examestano comparado com a AO mais o tamoxifeno por 5 anos ([www.ibcsg.org](http://www.ibcsg.org)).

O estudo clínico ABCSG-12 é outro estudo em andamento com um recrutamento planejado de 1.250 mulheres na pré-menopausa com RH positivo e CM em estágio inicial, que compara a hormonioterapia adjuvante com a supressão ovariana (goserelina) mais anastrozole ou tamoxifeno por 3 anos (65).

## **V. Novos agentes biológicos**

### **1. Trastuzumab**

O trastuzumab é um anticorpo monoclonal que tem como alvo o receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2), um receptor de tirosina-quinase de superfície celular que está superexpresso em 25% a 30% dos CM (66). É um agente ativo no CM como medicamento isolado e mostrou que, quando combinado com QT no CM avançado, prolonga a sobrevida (67). Esta atividade na doença metastática e a associação conhecida da superexpressão do HER2 e o mau prognóstico, fizeram com que fossem lançados os estudos clínicos examinando o papel adjuvante no CM em estádios iniciais.

Existem 5 estudos clínicos randomizados do uso de trastuzumab na adjuvância que recrutaram mais de 14.500 mulheres com CM em estágio inicial, com superexpressão do HER-2, com linfonodos axilares positivos ou com linfonodos axilares negativos e alto risco. Os resultados extremamente positivos em termos de SLD (31,68-70) e de significância estatística em SG (70), fizeram com que o trastuzumab fosse aceito com parte do tratamento padrão das mulheres com CM HER-2 positivo. Os resultados são resumidos na tabela 8.

O estudo NSABP B-31, um estudo clínico de fase III patrocinado pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA, randomizou 2.700 pacientes para receber AC seguido por paclitaxel sozinho ou em combinação com trastuzumab semanal por um total de 52 semanas. O desfecho primário foi a SG.

O estudo clínico NCCTG N9831 tinha um recrutamento planejado de 3.300 pacientes que foram randomizadas para receber um de três braços de tratamento: AC por 4 ciclos seguido de paclitaxel semanal por 12 ciclos, AC seguido de paclitaxel semanal seguido de trastuzumab semanal por 1 ano ou o mesmo esquema de QT com o trastuzumab administrado concomitantemente em combinação com o paclitaxel. O Instituto Nacional do Câncer decidiu fazer uma análise conjunta dos estudos clínicos NSABP B-31 e NCCTG N9831 com o objetivo de aumentar o poder de comparação dos tratamentos.

A análise conjunta de dois braços controle com dois braços de trastuzumab em março de 2005 demonstrou 133 eventos no grupo tratuzumab e 261 eventos no grupo controle (recidiva, segunda neoplasia e morte antes da recidiva ) com uma diferença absoluta de 12% na SLD em três anos . O uso de tratuzumab foi associado a uma redução em risco de morte de 33% (  $p=0,015$ ) (70)

O estudo clínico HERA, uma colaboração do BIG (Grupo Internacional da Mama), da indústria farmacêutica Hoffmann-La Roche, de grupos colaborativos não-afiliados e de centros independentes, investiga o papel do trastuzumab independentemente do regime de QT neo/ adjuvante prévio em 5.082 pacientes. Neste estudo de 3 braços, o trastuzumab é administrado a cada 3 semanas por 1 ou 2 anos e comparado com o braço observação. O desfecho primário é a SLD.

Na primeira análise interina em 1 ano, a comparação do grupo trastuzumab por 1 ano com o grupo controle demonstra 127 e 220 eventos , respectivamente (recidiva, câncer contralateral, segunda neoplasia ou morte ), representando um



*HR* de 0,54 (,54-0,67 ; $p < 0,0001$ ) . O benefício absoluto em SLD em 2 anos é de 8,4% , sem diferença significativa em sobrevida geral (68).

A SG mostrou-se significativamente maior nos estudos americanos, enquanto apenas uma tendência favorável emergiu para o estudo HERA (*HR* 0,78, valor  $p$  não significativo), devendo-se observar que este apresentou o seguimento mais curto (1 ano ao invés de 2 anos). A insuficiência cardíaca congestiva grave é um efeito adverso potencial do trastuzumab nos três estudos clínicos: o risco parece ser maior nos estudos clínicos americanos, que iniciaram o trastuzumab mais cedo do que no estudo HERA, onde o trastuzumab foi administrado após o fim da QT e da radioterapia adjuvante. Um seguimento mais longo é essencial para quantificar melhor o risco nestes três estudos clínicos.

O estudo clínico BCIRG 006 tem 3 braços comparando 4 ciclos de AC seguidos de docetaxel (AC-T) a cada 3 semanas com 4 ciclos de AC seguidos de docetaxel (AC-TH) a cada 3 semanas concomitante com trastuzumab semanal (seguido de a cada 3 semanas) por 1 ano, ou carboplatina e docetaxel a cada 3 semanas por 6 ciclos concomitante com trastuzumab semanal (seguido de a cada 3 semanas)(TCH) por 1 ano. O recrutamento foi completado com 3.222 pacientes. A primeira análise interina conduzida com 322 eventos em um seguimento mediano de 23 meses demonstrou que ambos os braços contendo trastuzumab alcançaram o desfecho primário, a SLD (*HR* 0,49 com AC-TH,  $p=0,00000048$  e *HR* 0,61 com TCH,  $p=0,00015$  (quando comparado com o AC-T). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois braços contendo trastuzumab. Um seguimento mais longo é necessário para confirmar se regimes

sem antraciclina e com trastuzumab terão a mesma eficácia de regimes baseados em antraciclina. A incidência de eventos cardíacos sintomáticos foi de 1,2% no braço AC-T, 2,3% no braço AC-TH e 1,2% no braço ACT (31).

O pequeno estudo clínico FinHer randomizou 232 pacientes após receber 3 ciclos de docetaxel (a cada 3 semanas) ou 8 ciclos de vinorelbina semanal, para receber 3 ciclos de FEC (5-fluorouracil 600mg/m<sup>2</sup>, epirrubicina 60mg/m<sup>2</sup>, ciclofosfamida 600mg/m<sup>2</sup>), com ou sem administração de trastuzumab. Com 38 meses de seguimento mediano, este estudo demonstrou um *HR* de 0,43 para a SLD em três anos no braço contendo trastuzumab, mas sem alcançar significância na sobrevida (69). O decréscimo da fração de ejeção ventricular esquerda de mais de 15 pontos percentuais ocorreu em 3,5% das pacientes tratadas com trastuzumab contra 6% das pacientes que não receberam trastuzumab.

## 2. Perspectivas

Vários novos agentes parecem ser bom candidatos para a incorporação nos regimes de tratamento adjuvante do CM. Para eles, ainda estão faltando dados sobre a biodisponibilidade, segurança e eficácia na doença avançada. Quatro exemplos são citados abaixo.

O antígeno HER-2 é um antígeno atrativo para uma vacina, já que se encontra superexpresso em algumas células tumorais e é conhecido por suas propriedades

imunogênicas tanto em modelos animais (71) como em humanos (72). Existem boas razões para especular que as vacinas de HER-2 com capacidade de provocar resposta humoral como de células T, poderiam ser mais eficazes do que a terapia com anticorpo monoclonal sozinha, pelo menos em alguns pacientes com CM. Baseado neste princípio, estudos de fase I estão em andamento com a vacinação no tratamento adjuvante de pacientes com CM de alto risco, com o objetivo de avaliar a segurança e a imunogenicidade de vacinações seriadas da proteína recombinante do HER-2 (GSK 719125).

Um fator contributivo para a falha tardia do trastuzumab poderia ser a ativação colateral de outros membros da família do HER nas células tumorais (73). O desenvolvimento de outras terapias-alvo contra múltiplos membros da família HER poderia ter um grande impacto na inibição da proliferação celular e da angiogênese. O CI 1033 é um agente oral alvo que interfere diretamente no sítio de ligação do ATP dos membros da família do HER (EGFR, HER2, HER3, HER4), resultando na inibição irreversível da ativação destes receptores e sua subsequente ativação do sinal intracelular (74). Os estudos de fase I usaram doses de 2mg a 1000 mg em esquemas semanais e diários. Os efeitos adversos mais comuns foram diarreia, *rash*, náuseas e vômitos em baixo grau. Os resultados de um estudo aberto, randomizado, multicêntrico de fase Ib em 168 pacientes com CM metastático, com 3 níveis de dose são aguardados.

O lapatinib é um inibidor reversível potente das tirosina-quinases HER-1 e HER-2. Este agente induz a parada do crescimento tumoral e/ou a apoptose celular nas linhagens de células tumorais dependentes do HER-1 e do HER-2

(75). É um medicamento oral bem tolerado em estudos de fase I como agente isolado. As doses utilizadas variaram de 175 a 1800mg/dia. Os efeitos adversos mais importantes observados foram *rash* cutâneo, diarreia, anorexia, fadiga, estomatite, náusea e vômito, geralmente de graus 1 ou 2 (76). Este medicamento também foi avaliado em estudos de fase I em combinação com QT (paclitaxel) (77), trastuzumab (78) e letrozole (79). Estudos de fase II e de fase III como agente único ou em combinação com estes agentes estão em andamento no CM avançado e no CM inflamatório (EGF 30008, EGF 30001, EGF 100151, EGF 20008) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

O RAD001 é um inibidor oral potente da via mTOR, que exerce um papel central na regulação do crescimento celular e na sobrevivência e angiogênese do CM. Os resultados de estudos pré-clínicos com o RAD 001 mostraram alta sensibilidade das linhas celulares do CM in vitro a este agente (80). A combinação do RAD 001 com o letrozole in vitro demonstrou efeitos aditivos/sinérgicos na inibição da proliferação das células de câncer de mama MCF7 que expressavam aromatase (81). Um estudo clínico de fase I (82) conduzido em pacientes com CM metastático tratadas com letrozole por no mínimo 4 meses não demonstrou respostas objetivas. A combinação de letrozole (2,5mg/dia) e RAD001 (até 10mg/dia) demonstrou um bom perfil de toxicidade, sem toxicidades graus 3/4. Uma resposta completa foi observada.

O desafio para os próximos anos será encontrar a melhor maneira de introduzir esses novos agentes no tratamento adjuvante do CM que superexpressa HER-2.

## Tabelas

---

**Tabela 1: Taxanos no contexto adjuvante**

Estudo	Eligibilidade	Pacientes (n)	Regimes	Seguimento (meses)	Desfecho	Comentários
<b>Monoterapia com Paclitaxel</b>						
<b>CALGB9344</b> Henderson IC e col, JCO 2003	Metástases em LN	3121	AC x 4 AC x 4 → P x 4 (A=60,75 or 90)	69	Aumento da SLD (HR 0,83; IC 0,73-0,94) e aumento da SG (HR 0,82; IC 0,71-0,95)	Análise de subgrupo mostrou maior benefício do paclitaxel em casos de RE negativo/desconhecido
NSABP B28 Mamounas EO e col, JCO 2005	Metástases em LN	3060	AC x 4 AC x 4 → P x 4	64	Aumento da SLR (HR 0,83; IC 0,73-0,95) Sem diferenças na SG	Paclitaxel foi igualmente efetivo em RE positivo e RE negativo
<b>MDACC</b> Buzdar e col, Clin Canc Res, 2002	N0 ou metástases em LN	524 (neoadjuvante 174 e adjuvante 350)	FAC x 4 P x 4 → FAC x 4	60	Sem diferenças significativas na SLR	Tendência não-significativa sugerindo benefício do paclitaxel em pacientes com RE negativo
<b>Monoterapia/combinção com Docetaxel</b>						
<b>BCIRG 001</b> Martin M e col, N Engl J Med, 2005	Metástases em LN	1491	FAC x 6 DAC x 6	55	SLD: benefício absoluto de 7% em 5 anos (HR 0,72); aumento da SG (HR 0,70)	Pareceu haver maior benefício no subgrupo com 1-3 linfonodos positivos, não confirmado pela análise de Cox
<b>NSABP B-27</b> Bear HD et al Breast Cancer Res Treat, 2004	Tratamento neoadjuvante	2411	AC x 4 AC x 4 → D x 4		Sem diferenças significativas na SLD e na SG	
<b>PACS 01</b> Fumoleau RH, e col, Breast Cancer Res Treat, 2004	Metástases em LN	1999	FEC (100) x 6 FEC(100) x 3 → Dx3	60	SLD melhorou com docetaxel (HR 0,83;IC 0,69-0,99); SG também foi melhor (HR 0,77)	Havia mais pacientes com receptores negativos no grupo FEC100 (22 vs 19%); mulheres com mais de 50 anos e aquelas com 1-3 linfonodos positivos tiveram maior benefício
<b>US Oncology 9735</b> Jones SE et al ASCO, 2001	Estádio I-III Com ou sem metástases em LN	1015	AC x 4 DC x 4	43	Não relatado	Necessário seguimento a longo prazo
<b>E 2197</b> Goldstein LJ e col, ASCO 2005	S/ metástases em linfonodos (T>1cm) ou c/ metástases em LN	2952	AC x 4 AD x 4	59	Sem diferenças significativas na SLD ou na SG	Desfecho melhor do que o esperado para os dois esquemas terapêuticos

D=docetaxel; F=5-fluorouracil, A=doxorubicina, C=ciclofosfamida; E=epirubicina; P=paclitaxel; SLR = sobrevida livre de recorrência; SLD= sobrevida livre de doença; SG= sobrevida global; HR= *hazard ratio*; IC= intervalo de confiança; RE=receptor de estrogênio; LN: linfonodos

**Tabela 2. Ensaios clínicos de fase III, de tratamento adjuvante, incluindo o uso de inibidores da aromatase em pacientes pós-menopáusicas**

Estudo	Características e número de pacientes	Braços de tratamento	Seguimento (m)	Resultados ( <i>Hazard Ratio</i> )					Comentários
				SLD	SG	TR	CMCL	TRD	
ATAC <i>Trialists group</i>	84%RH + 61% N neg 64% tu ≤ 2cm 20% QT <b>9.366</b>	Tamoxifeno x 5 anos Anastrozole x 5 anos Tamoxifeno + Anastrozole (descontinuado)	68	0,87 (0,78-0,97) p=0,01	0,97 (0,85-1,12) p=0,7	0,79 (0,70-0,90) p=0,0005	0,58 (0,38-0,88) p=0,01	0,86 (0,74-0,99) p=0,04	Análise de subgrupo para SLD: RH+: 0,79 RE+RPg+: 0,84 RE+RPg-: 0,43
Estudo IES BIG 2-97	81% RH+ 51% N neg 37% QT <b>4.742</b>	Tamoxifeno 5 anos Tamoxifeno 2-3 anos → Exemestano 2-3 anos	37,4	0,73 (0,62-0,85) p=0,0001	0,83 (0,67-1,02) p=0,08	Não relatado	0,50 (0,26-0,97) P=0,04	Não relatado	Impacto deletério não significativo na qualidade de vida (FACT-ES) (Fallowfield LJ e col, Breast Cancer Res Treat 2004)
Estudo ITA	Todos RE+ N+ <b>426</b>	Tamoxifeno 5 anos Tamoxifeno 2-3 anos → Anastrozole 2-3 anos	52	0,35 (0,18-0,68) p=0,001 (SLE)	Não relatado	Não relatado	Não relatado	Não relatado	HR da SLP 0,43 (0,25-0,73) p=0,001
BIG 1-98	Todos RH+ 52% N- 37% tu > 2cm 25% QT <b>8.028</b>	A. Tamoxifeno 5 anos B. Letrozole 5 anos C. Tamoxifeno 2 anos → Letrozole 3 anos D. Letrozole 2 anos → Tamoxifeno 3 anos	25,8	0,81 (0,70-0,93) p=0,003 em 5 anos	0,86 (p=0,16)	0,72 (p=0,0002)	0,4% v 0,7% (p=0,125)	0,73 (p=0,0012)	Análise de subgrupo N+ HR 0,71 QT prévia HR 0,70
MA.17 BIG 1-97	98% RH+ 50% N- 46% QT <b>5.187</b>	Tamoxifeno 4,5-6,0 anos → Placebo Tamoxifeno 4,5-6,0 anos → Letrozole 5 anos	2,4 anos	0,58 (p=0,00008) em 4 anos	0,82 (0,57-1,19) p=0,30	Recorrência local ou à distância, ou câncer de mama contralateral 0,57 (0,43-0,75) p=0,00008		Análise de subgrupo: N+ (redução de risco de 40%) e N- (redução de risco de 53%) para SLD em 3 anos no braço do letrozole Benefício na sobrevida em N+ Sem impacto deletério na qualidade de vida (SF-36 e MENQOL)	
ABCSG 8/ ARNO 95	Todos RH+ 74% N- 70% T1 <b>3.123</b>	Tamoxifeno 5 anos Tamoxifeno 2 anos → Anastrozole 3 anos	26	0,60 (0,44-0,81) p<0,0009 (SLE)	0,76 (0,52-1,12) p=0,16	Não relatado	0,61 (0,42-0,87) p=0,0067 ↓ SLRD		

SLD: sobrevida livre de doença; SG= sobrevida global; TR: tempo para recorrência; CMCL: câncer de mama contralateral; TRD: tempo para recorrência à distância; RH: receptor hormonal; RE: receptor de estrogênio; RPg: receptor de progesterona; SLE: sobrevida livre de eventos; SLRD: sobrevida livre de recorrência à distância; QT: quimioterapia; tu: tamanho tumoral; SLP: sobrevida livre de progressão.

**Tabela 3. Risco associado ao tratamento adjuvante com inibidores da aromatase (IA) (IA versus tamoxifeno em todos os estudos, exceto MA.17: IA versus placebo)**

	<b>Eventos ósseos</b>	<b>Eventos vasculares</b>	<b>Outros</b>
<b>Anastrozole</b> (ensaios clínicos ATAC e ABCSG8/ARN 095)	<u>Artralgias</u> 35,6% vs 29,4% (p<0,0001) RC 1,32 (1,19-1,47) (ATAC) 19% vs 16% (p=0,05) RC 1,25 (ABCSG8/ARNO95)	<u>Cardiovasculares</u> 4,1% vs 3,4% (p=0,1) RC 1,23 (ATAC) 0,37% vs 0,19% (p=0,51) RC 2,0 (ABCSG8/ARNO)	<u>Câncer invasivo de endométrio</u> 0,2% vs 0,8% (p=0,02) RC 0,29 (ATAC) 1 vs 7 eventos (p=0,069) (ABCSG8/ARNO)
	<u>Fraturas</u> 11% vs 7,7% (p<0,0001) RC 1,49 (1,25-1,77) (ATAC) 2,0% vs 1,0% (p=0,01;NS) RC 2,14 (ABCSG8/ARNO95)	<u>Cerebrovasculares</u> 2,0% vs 2,8% (p=0,03) RC 0,70 (ATAC)	<u>Fogachos</u> 35,7% vs 40,9% (p<0,0001) RC 0,80 (ATAC) 48% vs. 50%(p=0.034); RC=0.92 (ABCSG8/ARNO)
		<u>Tromboembólicos venosos</u> 2,8% v 4,5% (p=0,0004) RC 0,61 (ATAC) 12% vs. 3% (p=0.034); RC 0.25 (ABCSG8/ARNO)	<u>Sangramento vaginal</u> 5,4% vs 10,2% (p<0,001) RC 0,50 (ATAC) 18% vs 17% (p=0.93) (ABCSG8/ARNO)
			<u>Corrimento vaginal (ATAC)</u> 3,5% vs 13,2% (p<0,0001) RC 0,24
<b>Letrozole</b> (MA.17 e BIG 1-98 trials)	<u>Artralgias</u> 25% vs 21% (p<0,001) (MA.17) 20.3 v 12.3% (p<0,001) (BIG 1-98)	<u>Cardiovasculares</u> 5,8% vs. 5,6% (p=0,76) (MA.17) 1.4% v 1.2% (p=0,28) (BIG 1-98)	<u>Câncer de endométrio</u> 0,1% vs. 0,3% (p=0,18) (BIG 1-98) 5,8% vs 5,6% (p=0,76) (MA 17)
	<u>Fraturas</u> 5,7% vs 4% (p=0,001) (BIG 1-98) 5,3% vs 4,6 % (p=0,25) (MA.17)		<u>Fogachos</u> 47,2% vs 40,5% (p<0,001) (MA.17) 33,5% vs. 38,0% (BIG 1-98)
<b>Exemestano</b> (ensaio clínico IES)	<u>Artralgias</u> 19,8% vs 13,1% (p<0,001)	<u>Cardiovasculares</u> 0,9% vs 0,4% (p=0,02; NS)	<u>Sintomas ginecológicos</u> 14,3% vs 17,8% (p=0,002)
	<u>Fraturas</u> 3,1% vs 2,3% (p=0,08)	<u>Tromboembólicos venosos</u> 1,9% vs 3,3% (p<0,001)	<u>Fogachos</u> 42% vs 40% (p=0,28)

RC: razão de chances

NS : não-significativo



**Tabela 4. Ensaios clínicos randomizados avaliando ablação ovariana (AO) versus quimioterapia (QT) em pacientes pré-menopáusicas com câncer de mama em estadios iniciais**

Autor, ano	Características e número de pacientes	Braços de tratamento	Seguimento (anos)	Hazard ratio			Comentários
				SLE	SLD	SG	
ZEBRA Jonat e col; Breast Cancer Res Treat, 2000; JCO 2002	70% 1-3 LN+, 25% 4-9 LN+ 80% RE +  <b>1.640</b>	Z x 2 anos vs CMF x 6	6	-	1,18 (1,02-1,37) p=0,29	1,21 (0,99-1,49) p=0,067	Aumento da SG em 270 pacientes com RE+ que fizeram AO; CMF melhor para RE- (RH: 1,76; p=0,0006)  Sem diferenças em relação ao <i>status</i> dos linfonodos
Scottish trial Lancet 1993; Thomson, The Breast 2002	LN- or LN+ 60% RE+  <b>332</b>	AO vs CMF oral x 6 to 8  (+/- prednisolona)	10,7	0,95 (0,71-1,26) p=0,70  1,00 (0,75-1,32) p= 0,97	-	1,01 (0,74-1,37) p=0,96  1,06 (0,78-1,44) p=0,71	10% de: <i>crossover</i> dos tratamentos ou TAM ou sem tratamento após a randomização (potencial viés)
<i>Scandinavian trial</i> Ejlertsen e col, ASCO 1999	LN+ and/or TU>5cm RH+  <b>732</b>	AO vs CMF iv x 9	68 meses	-	67% vs 66% (em 5 anos) (ns)	78% vs 82% (em 5 anos) (ns)	68% das pacientes no braço do CMF ficaram amenorreicas
GABG IV A 93 Von Minckwitz ASCO 2004	  <b>771</b>	Z x 2 anos vs CMF iv x 3	4,9		0,81(0,56-1,17) p=0,24		

SLE: sobrevida livre de eventos; SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença; RH: receptores hormonais; RE: receptor de estrogênio; C: ciclofosfamida; M: metotrexate; F: 5-fluorouracil; AO: ablação ovariana; LN: linfonodos; TU: tumor; ns= sem significancia estatística; iv: intravenoso; TAM: tamoxifeno

**Tabela 5. Ensaios clínicos randomizados avaliando ablação ovariana (AO) + Tamoxifeno vs quimioterapia (QT) em pacientes pré-menopáusicas com câncer de mama em estadios iniciais**

Autor, ano	Características e número de pacientes	Braços de tratamento	Seguimento (anos)	Hazard ratio			Comentários
				SLR	SLD	SG	
GROCTA Boccardo F e col, JCO, 2000	RE+ 86% LN+ 91% pré-menopausa  <b>244</b>	AO (Cirurgia/Radioterapia/Z x2 anos) + T x 5 anos vs CMF oral x 6	76 meses	-	Sem diferenças	Sem diferenças	Baixo poder para avaliar sobrevida
FASG 06 Roche H e col, ASCO 2000	RH+ LN+  <b>333</b>	Triptoreline + T x 3 anos vs FEC 50 x 6	54 meses	-	91,7% vs 80,9% (p=0,12)	97% vs 92,9% (p=0,18)	
Roche H e col, ASCO 1996	RH+ LN+ 84% premenop  <b>162</b>	AO + T x 2 anos vs FAC x 6	84 meses	-	Sem diferenças	Sem diferenças	Baixo recrutamento, desequilíbrio entre os braços, fechado prematuramente
ABCSG 5 Jakesz R e col. JCO, 2002	RH+ 50% LN+  <b>1.045</b>	Z x 3 anos + T x 5 anos vs CMF x 6 (i.v)	5 y	5-anos : 81% vs 76% (p= 0,037)		Sem diferenças	
Wallwiener ASCO 2004	RH+ LN+  <b>599</b>	Leuprorelin x 2 anos vs CMF (i.v) x 6		83% vs 80,9% (ns)		98,7% vs 97,2% (ns)	

SLR: sobrevida livre de recidiva; SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença; RH: receptores hormonais; RE: receptor de estrogênio; C: ciclofosfamida; A: adriamicina; M: metotrexate; F: 5-fluorouracil; AO: ablação ovariana ; LN: linfonodos; TU: tumor; ns= sem significância estatística; Z: Zoladex; i.v: intravenoso;

**Tabela 6. Ensaios clínicos randomizados avaliando quimioterapia (QT) vs QT+ AO ± Tamoxifeno em pacientes pré-menopáusicas com câncer de mama em estádios iniciais**

Autor, ano	Características e número de pacientes	Braços de tratamento	Seguimento (anos)	Hazard ratio		Comentários
				SLD	SG	
Intergroup 0101 Davidson e col ASCO 1999	RH+ 59% 1-3 LN+ 29% <40 anos  <b>1.504</b>	CAF x 6  CAF x 6 → Z x5 anos  CAF x 6 → Z + T x5 anos	6	-	-	Associação de T ao CAF aumentou o TR (valores-p unicaudais < 0,01) Não houve avaliação de CAF x 6 → T
IBCSG VIII JNCI, 2003	68% RE+ T1-T3N0 Pré e peri-menopausa  <b>1.063</b>	Z x 2 anos  CMF x 6  CMF x 6 → Z x 1,5 anos	5,7	Sem diferenças	Sem diferenças	Análise de subgrupo: melhor sobrevida para RE- tratado com CMF (com ou sem Z) ; Z equivalente a CMF para RE+

SLE: sobrevida livre de eventos; SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença; RH: receptores hormonais; RE: receptor de estrogênio; C: ciclofosfamida; A: adriamicina; M: metotrexate; F: 5-fluorouracil; AO: ablação ovariana ; LN: linfonodos; TU: tumor; ns= sem significância estatística; Z: Zoladex ; T : Tamoxifeno; TR: tempo para recorrência

**Tabela 7. Ensaios clínicos randomizados avaliando Tamoxifeno (T) vs T+ AO em pacientes pré-menopáusicas com câncer de mama em estadios iniciais**

Autor, ano	Características e número de pacientes	Braços de tratamento	Seguimento (anos)	Hazard ratio		Comentários
				SLE	SG	
ZIPP trial Lars ASCO, 1999	42% LN+ 43% previous CT  <b>2,631</b>	T x 2 anos Z x 2 anos T + Z x 2 anos Sem tratamento hormonal	4,3	Melhor com Z (RH 0,77 p=0,001)	Melhor com Z (RH 0,84 p=0,12, NS)	Benefício independente de tratamento adjuvante com T ou CT
INT 0142 Robert ASCO03	LN- RH+ <b>345</b>	T T + AO	5	Baixo poder	Baixo poder	Fechado prematuramente

SLE: sobrevida livre de eventos; SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença; RH: receptores hormonais; RE: receptor de estrogênio; C: ciclofosfamida; A: adriamicina; M: metotrexate; F: 5-fluorouracil; AO: ablação ovariana ; LN: linfonodos; TU: tumor; ns= sem significancia estatística; Z: Zoladex

**Tabela 8. Ensaios clínicos randomizados de trastuzumab adjuvante em câncer de mama em estadios iniciais**

	Análise agrupada dos estudos NSABP-B31 / NCCTG- N9831		HERA	BCIRG 006	FINHER					
	AC → P	AC → P + T	Observação	T x 1 ano*	AC→D	AC→DT	DCarboT	V ou D→ FEC <sub>60</sub> T ou	FEC <sub>60</sub>	
Nº pacientes	1679	1672	1693	1694	1043	1076	1076	1010	116	116
Tempo de seguimento mediano	2 anos		1 ano		~2 anos			~3 anos (232)		
HR para sobrevida livre de doença	0,48 (2p= 3 x 10 <sup>-12</sup> )		0,54 (p < 0,0001)		0,49 (AC-DT) p<0,0001 0,61 (DcarboT) p=0,0002			0,42 (p=0,01)		
HR para tempo até recorrência à distancia	0,47 (2p= 8 x 10 <sup>-10</sup> )		ND		ND			0,29 (p=0,002)		
HR para sobrevida livre de doença à distancia	ND		0,51 (p < 0,0001)		ND			ND		
HR para sobrevida global	0,67 (2p= 0,015)		0,76 (p =0,26)		ND			0,41 (p=0,07)		
Incidência cumulativa de eventos cardíacos graves	0,6%	4%	0,1%	0,5%	1,2%	2,3%	1,2%		3,5%	6%

A: doxorrubicina; C: ciclofosfamida; P: paclitaxel; D: docetaxel; Carbo: carboplatina; T:trastuzumab HR: *hazard ratio*; ND: não disponível

\* Ainda sem resultados disponíveis para tratamento com trastuzumab x 2 anos

## Referências

---

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group ((EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005, 365:1687 – 1717.
2. Gelber RD, Bonetti M, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A; International Breast Cancer Study Group (IBCSG). Tailoring adjuvant treatments for the individual breast cancer patient. *Breast* 2003, 12 (6):558-68.
3. Colleoni M, Gelber S, Coates AS et al: Influence of endocrine-related factors on response to perioperative chemotherapy for patients with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2001, 19 (21):4141-9.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406 (6797):747-52.
5. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98 (19):10869-74.
6. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002, 347 (25):1999-2009.
7. Piccart MJ, Loi S, Van't Veer L et al. Multi-center external validation study of the Amsterdam 70-gene prognostic signature in node negative untreated breast

- cancer: are the results still outperforming the clinical-pathological criteria? Breast Cancer Res Treat 2004, 88 (1) (abstract 38)
8. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD et al. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. Ann Oncol 2005, 16(10) 1569-83.
  9. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. J Clin Oncol 2003, 21(6):976-83.
  10. Sartor CI, Petersen BL, Woolf S et al. . Effect of addition of adjuvant paclitaxel on radiotherapy delivery and locoregional control of node-positive breast cancer: cancer and leukemia group B 9344. J Clin Oncol 2005 , 23 (1) :30-40.
  11. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky C et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. J Clin Oncol 2005, 23 (16):3686-96.
  12. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. N Engl J Med 2005, 352(22) 2302-13
  13. Fumoleau RH, Spielmann M, Canon JL, et al. Five years of the PACS 01 trial: 6 cycles of FEC100 vs 3 cycles of FEC100 followed by 3 cycles of docetaxel for the adjuvant treatment of node positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2004, 88 (1) (abstract 27).

14. Buzdar AU, Singletary SE, Valero V et al. Evaluation of paclitaxel in adjuvant chemotherapy for patients with operable breast cancer: preliminary data of a prospective randomized trial. *Clin Cancer Res* 2002, 8(5):1073-9.
15. Jones SE, Savin M, Holmes FA et al. Preliminary results of a prospective randomized trial of adjuvant chemotherapy for patients (pts) with stage I-III operable, invasive breast cancer comparing 4 courses of adriamycin/cyclophosphamide (AC) to 4 courses of taxotere/cyclophosphamide (TC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001 (abstract 128).
16. Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al. A randomized trial comparing preoperative doxorubicin/cyclophosphamide to preop AC followed by preop docetaxel and to preop AC followed by postoperative docetaxel in patients with operable carcinoma of the breast: results of NSABP B-27. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 88 (1) (abstract 26).
17. Goldstein L, O'Neill A, Sparano J, et al. E2197: Phase III AT (doxorubicin/docetaxel) vs. AC (doxorubicin/cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive and high risk node negative breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005 (abstract 512).
18. Hamilton A, Hortobagyi G. Chemotherapy: what progress in the last 5 years? *J Clin Oncol* 2005, 23(8):1760-75.
19. Piccart-Gebhart MJ. Moving away from the 'one shoe fits all' strategy: the key to future progress in chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005, 23(8):1611-3.



20. Blum JL, Jones SE, Buzdar AU et al. Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17(2):485-93.
21. Fumoleau P, Cameron D. Future options with capecitabine (Xeloda) in (neo)adjuvant treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2004, (5 Suppl 10):45-50.
22. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 2002, 20(12):2812-23.
23. Ahn J-B, Oh J-H, Kwon Y, et al. Interim analysis findings from a phase III randomized trial of docetaxel/capecitabine vs. doxorubicin/cyclophosphamide as primary chemotherapy for stage II/III breast cancer. *Ann Oncol* 2004, 15 (Suppl 3) (Abstract 215PD).
24. O'Shaughnessy J. Gemcitabine combination chemotherapy in metastatic breast cancer: phase II experience. *Oncology (Huntingt)* 2003, 17(12 Suppl 14):15-21.
25. Albain KS, Nag S, Calderillo-Ruiz G et al. Global phase III study of gemcitabine plus paclitaxel (GT) vs. paclitaxel (T) as frontline therapy for metastatic breast cancer (MBC): First report of overall survival. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004 (abstract 510).
26. Poole C. Adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer: the tAnGo trial. *Oncology (Huntingt)* 2004, 18(14 Suppl 12):23-6.
27. Sledge GW Jr, Loehrer PJ Sr, Roth BJ et al. Cisplatin as first-line therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1988, 6(12):1811-4.

28. Pegram MD, Slamon DJ. Combination therapy with trastuzumab (Herceptin) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: evidence for receptor-enhanced chemosensitivity. *Semin Oncol* 1999, 26(4 Suppl 12):89-95.
29. Pegram MD, Pienkowski T, Northfelt DW et al. Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96(10):759-69.
30. Robert NJ, Leyland-Jones B, Asmar L et al. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin versus trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2 overexpressing metastatic breast cancer: An update including survival. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2004 (abstract 573).
31. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel(AC→T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC→TH)with doxorubicin, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients:BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat* 2005 (abstract 1).
32. Norton L, Simon R. The Norton-Simon hypothesis revisited. *Cancer Treat Res* 1986, 70: 163-9.
33. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003, 21(8):1431-9.

34. Venturini M, Aitini E, Del Mastro L, et al. Phase III adjuvant trial comparing standard versus accelerated FEC regimen in early breast cancer patients. Results from GONO-MIG1 study. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 82 (abstract 12).
35. Piccart-Gebhart MJ. Mathematics and Oncology: a match for life? *J Clin Oncol* 2003, 21(8): 1425-8.
36. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000, 60(7):1878-86.
37. Dreys J, Fakler J, Eisele S et al. Antiangiogenic potency of various chemotherapeutic drugs for metronomic chemotherapy. *Anticancer Res* 2004, 24(3a):1759-63.
38. Seidman AD, Berry D, Cirrincione C et al. CALGB 9840: Phase III study of weekly (W) paclitaxel (P) via 1-hour (h) infusion versus standard (S) 3h infusion every third week in the treatment of metastatic breast cancer (MBC), with trastuzumab (T) for HER2 positive MBC and randomized for T in HER2 normal MBC. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004 (abstract 512).
39. ATAC Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifeno versus tamoxifeno alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002, 359: 2131-9.

40. ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifeno, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005, 365: 60-62.
41. Dowsett M, Cuzick J, Wale C et al. Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study. *J Clin Oncol*. 2005, 23(30):7512-7.
42. Thurlimann BJ, Keshaviah A, Coates AS et al. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group A comparison of letrozole and tamoxifeno in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005, 353(26): 2807-9.
43. Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M et al. Switching to anastrozole versus continued tamoxifeno treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifeno Anastrozole Trial. *J Clin Oncol* 2005, 23(22): 5138-47.
44. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifeno therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Mar 11;350(11):1081-92.
45. Coombes RC, Hall E, Snowdon CF et al. The Intergroup Exemestane Study: a randomized trial in postmenopausal patients with early breast cancer who remain disease-free after two to three years of tamoxifeno-updated survival analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 88 (1) (abstract 3).
46. Jakesz R, Jonal W, Gnant M et al. Switching of post menopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant

- tamoxifeno: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005, 366(9484): 455-62.
47. Goss PE, Ingle JN, Martino S et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifeno therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003, 349(19):1793-802.
48. Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. Randomized trial of letrozole following tamoxifeno as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCI CTG MA.17. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97(17): 1262-71.
49. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005, 23(3):619-29.
50. Paik S, Shak S, Tang G et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifeno-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004, 351(27):2817-26.
51. Kaufmann M, Jonat W, Blamey R et al. Survival analyses from the ZEBRA study. goserelin (Zoladex) versus CMF in premenopausal women with node-positive breast cancer. *Eur J Cancer* 2003, 39(12):1711-7.
52. Scottish Cancer Trials Breast Group: Adjuvant ovarian ablation versus CMF chemotherapy in premenopausal women with pathological stage II breast carcinoma: the Scottish trial. *Lancet* 1993, 341: 1293-8.

53. Ejlersen B, Dombernowski P, Mouridsen HT et al. Comparable effect of ovarian ablation (OA) and CMF chemotherapy in pre-menopausal hormone receptor positive breast cancer patients. Proc Am Soc Clin Oncol 1999, 18 (abstract 248).
54. Von Minckwitz G, Graf E, Geberth M et al. Goserelin versus CMF as adjuvant therapy for node-negative, hormone receptor-positive breast cancer in premenopausal patients. The GABG IV-A-93 Trial. Proc Am Soc Clin Oncol 2004, 23:10 (abstract 534).
55. Boccardo F, Rubagotti A, Amoroso D et al. Cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus tamoxifeno plus ovarian suppression as adjuvant treatment of estrogen receptor-positive pre-/perimenopausal breast cancer patients: results of the Italian Breast Cancer Adjuvant Study Group 02 randomized trial. J Clin Oncol 2000, 18(14):2718-27.
56. Roche H, Kerbrat P, Bonneterre J et al. Complete hormonal blockade versus chemotherapy in premenopausal early-stage breast cancer patients with positive hormone-receptor and 1-3 node-positive tumor: Results of the FASG 06 trial. Proc Am Soc Clin Oncol 2000, 19 (abstract 279).
57. Roche H, Mihura J, de Lafontan B et al. Castration and tamoxifeno vs chemotherapy (FAC) for premenopausal, node and receptors positive breast cancer patients: a randomized trial with a 7 years follow-up. Proc Am Soc Clin Oncol 1996 (abstract 134).
58. Jakesz R, Hausmaninger H, Kubista E et al. Randomized adjuvant trial of tamoxifeno and goserelin versus cyclophosphamide, methotrexate, and

fluorouracil: evidence for the superiority of treatment with endocrine blockade in premenopausal patients with hormone-responsive breast cancer--Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 5. *J Clin Oncol* 2002, 20(24):4621-7.

59. Wallwiener D, Possinger K, Schmid P et al. A phase III trial comparing adjuvant treatment with leuporelin acetate 3M-Depot for 24 months with CMF chemotherapy in ER/PR + node + pre-perimenopausal breast cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004, 22 (abstract 533).

60. Collichio F, Pandya K. Amenorrhea following chemotherapy for breast cancer: effect on disease-free survival. *Oncology (Huntingt)* 1994, 8(12):45-52.

61. International Breast Cancer Study Group (IBCSG). Adjuvant chemotherapy followed by goserelin versus either modality alone for premenopausal lymph node negative breast cancer: a randomised trial. *J Nat Cancer Inst* 2003, 95(24): 1833-46.

62. Davidson N, O' Neill A, Vukov A et al. Effect of chemohormonal therapy in premenopausal, node (+), receptor (+) breast cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group phase III Intergroup Trial (E5188, INT-0101). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999 (abstract 249).

63. Lars R. Zoladex[trade] and Tamoxifeno as Adjuvant Therapy in Premenopausal Breast Cancer: A Randomised Trial by the Cancer Research Campaign (C. R. C.) Breast Cancer Trials Group, the Stockholm Breast Cancer Study Group, The South-East Sweden Breast Cancer Group & the Gruppo Interdisciplinare

Valutazione Interventi in Oncologia (G. I. V. I. O). Proc Am Soc Clin Oncol 1999 (abstract 251).

64. Robert NJ, Wang M, Cella D et al. Phase III comparison of tamoxifeno versus tamoxifeno with ovarian ablation in premenopausal women with axillary node-negative receptor-positive breast cancer  $\leq 3$  cm. Proc Am Soc Clin Oncol 2003 (abstract 16).

65. Emens LA, Davidson NE. Adjuvant hormonal therapy for premenopausal women with breast cancer. Clin Cancer Res 2003, 9(1 Pt 2):486S-94S.

66. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987, 235(4785):177-82.

67. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 2001, 344(11):783-92.

68. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005, 353(16) 1659-72.

69. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer NEJM 2006; 354:8, 808-820.



70. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005, 353(16): 1673-84.
71. Foy TM, Bannink J, Sutherland RA et al. Vaccination with Her-2/neu DNA or protein subunits protects against growth of a Her-2/neu-expressing murine tumor. *Vaccine* 2001, 19(17-19):2598-606.
72. Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR, Cheever MA. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin Cancer Res*. 1999, 5(6):1289-97.
73. Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002, 62(11):3151-8.
74. Allen LF, Eiseman IA, Fry DW, Lenehan PF. CI-1033, an irreversible pan-erbB receptor inhibitor and its potential application for the treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2003, 30(5 Suppl 16):65-78.
75. Rusnak DW, Lackey K, Affleck K et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2001, 1(2):85-94.
76. Bence AK, Anderson EB, Halepota MA et al. Phase I pharmacokinetic studies evaluating single and multiple doses of oral GW572016, a dual EGFR-ErbB2 inhibitor, in healthy subjects. *Invest New Drugs* 2005, 23(1):39-49.

77. Jones SF, Burris HA, Yardley DA et al. Lapatinib (an oral dual kinase inhibitor) plus weekly or every 3 week paclitaxel. *Breast Cancer Res Treat* 2004 (abstract 1069).
78. Burris III HA, Storniolo AM, Overmoyer EA et al. A phase I, open-label study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of lapatinib (GW572016) in combination with trastuzumab. . *Breast Cancer Res Treat* 2004 (abstract 3043).
79. Chu Q, Cianfrocca ME, Murray N et al. A phase I, open-label study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of lapatinib (GW572016) in combination with letrozole in cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 88 (1) (abstract 6044).
80. Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2003, 3(4):371-7.
81. Rudloff J, Boulay A, Zumstein-Mecker S et al. The mTOR pathway in estrogen response: a potential for combining the rapamycin derivative RAD001 with the aromatase inhibitor letrozole in breast carcinoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2004, 45 (abstract 5619).
82. Awada A, Cardoso F, Fontaine C et al. A phase Ib study of the mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in combination with letrozole (Femara) investigating safety and pharmacokinetics in patients with advanced breast cancer stable or slowly progressing on letrozole. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 88 (1) (abstract 6043).

## **Capítulo III – Biologia Molecular do Câncer de mama e o uso de trastuzumab**

---

## **Biologia molecular do câncer de mama**

Os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do CM têm sido exaustivamente estudados, porém ainda não completamente compreendidos. Acredita-se que o início do CM resulta de uma proliferação não controlada e/ou apoptose (morte celular programada) aberrante, decorrentes de um acúmulo de danos no material genético das células. Estes danos levam a alterações responsáveis pela ativação de proto-oncogenes e pela inativação de genes supressores da carcinogênese (1).

O gene do receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) ou proto-oncogene HER-2, é responsável pela produção de uma proteína de superfície celular de 185 kDalton conhecida como proteína ou receptor HER-2/*neu* ou c-erbB-2 (2-5). *Neu* foi primeiramente descoberta em ratos tratados com etilnitrosuréia, que ocasionava a mutação deste gene (6). Esta versão mutada, *neu*, que resulta na produção de uma forma ativa de receptor, é um potente oncogene (2).

Células normais expressam uma pequena quantidade de proteína HER-2 nas suas membranas plasmáticas. O receptor HER-2 não possui ligante conhecido, contudo, tem se mostrado como formador de heterodímeros com o receptor HER-1 (receptor para o fator de crescimento epidérmico, ou epidermal growth factor receptor - EGFR) HER-3 e HER-4 em um complexo de ligantes com estes receptores. A formação de heterodímeros resulta na ativação do receptor HER-2 e conseqüente transmissão de sinais do meio extracelular para o núcleo, levando a alterações no controle do crescimento e divisão celular (7).

Em células tumorais, erros na replicação do DNA podem resultar em múltiplas cópias de um gene em um único cromossomo. Esta alteração é conhecida como amplificação do gene. A amplificação do gene HER-2 leva à superexpressão da proteína HER-2, resultando em aumento da divisão celular e uma maior taxa de crescimento celular (Figura 1). A amplificação do gene HER-2 parece estar associada com a oncogênese (2,7).

Em torno de 20% dos pacientes com câncer de mama tem amplificação do gene do receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) ou proto-oncogene HER-2 com resultante superexpressão da glicoproteína. A amplificação e a superexpressão estão correlacionadas na maioria dos casos, mas aproximadamente 5% dos pacientes têm superexpressão sem amplificação gênica. Ambas estão associadas com um menor grau de diferenciação tumoral, com a ausência de receptores de estrogênio, com níveis mais elevados de indicadores de proliferação celular como o MIB-1 e o Ki-67 e com um pior prognóstico (8).

### **Uso de trastuzumab no CM em estádios avançados**

Vários anticorpos monoclonais murinos contra os domínios extra-celulares da proteína HER-2 foram capazes de inibir a proliferação de células neoplásicas humanas que superexpressavam HER-2, tanto *in vitro* como *in vivo* (9-11). Para minimizar a imunogenicidade, a região ligante ao antígeno de um dos mais efetivos anticorpos foi fundida a uma estrutura molecular de uma molécula de Imunoglobulina humana IgG34 e este agente foi testado, *in vitro* e *in vivo*, contra células tumorais que superexpressavam HER-2 (12,13). Este anticorpo, denominado trastuzumab,

inibe o crescimento tumoral quando utilizado sozinho, mas tem efeito sinérgico (11, 13-15) quando utilizado em combinação com cisplatina, carboplatina (11,14), docetaxel (15) e radiação ionizante (16) e efeitos aditivos quando usado com doxorubicina, ciclofosfamida, metotrexate e paclitaxel (13-17).

O status HER-2 é o maior fator preditivo para a resposta ao trastuzumab (Herceptin®) (18). A amplificação e a superexpressão do HER-2 pode ser útil como fator preditivo de resposta à quimioterapia (19) e à hormonioterapia (20).

O anticorpo monoclonal trastuzumab oferece uma singular abordagem terapêutica, específica para o seu alvo imunológico, a proteína HER-2. São três os mecanismos de ação do trastuzumab no câncer com superexpressão de HER-2:

- 1) Potencialização da quimioterapia (citotóxico): sinergismo com agentes quimioterápicos (13-17). Demonstrou-se *in vitro* que o tratamento com trastuzumab previne o reparo do DNA após os danos causados pelos agentes quimioterápicos. O mecanismo de sinergia entre o trastuzumab e os citados agentes quimioterápicos ainda não é completamente esclarecido.
- 2) Inibição da proliferação celular tumoral (citostático): a regulação e desaceleração celular promovida pelo trastuzumab ocorre quando este se liga imunologicamente à proteína HER-2 na superfície celular. Isto leva a alguns receptores à endocitose, ou seja, são retirados da superfície celular e colocados no interior da célula, limitando os sinais para o crescimento celular.
- 3) Facilitação da função imune (citotóxico): através da citotoxicidade celular

mediada e dependente de anticorpos, células *natural killer* (NK) são atraídas pelo complexo anticorpo-receptor na superfície celular. As células NK detectam que as células que contêm o complexo são anormais, e se ligam ao trastuzumab, e eventualmente, destroem ou fagocitam as células tumorais.

Estudos clínicos de Fase I mostraram que o trastuzumab tem um adequado perfil de toxicidade. Estudos subseqüentes de Fase II demonstraram que muitas mulheres com doença metastática com superexpressão do HER-2 que recidivavam após o tratamento quimioterápico, tinham resposta ao trastuzumab (21,22); a taxa de resposta do trastuzumab quando combinado com a quimioterapia foi superior à resposta quando utilizado isoladamente (22,23).

### **Trastuzumab no Tratamento do CM: Uso em Primeira Linha em Combinações com Quimioterápicos**

Os estudos originais com trastuzumab selecionaram pacientes cujos tumores superexpressavam HER-2 pelo método da IHQ. Como monoterapia na primeira linha de tratamento nestas pacientes, o trastuzumab alcançou taxas de resposta na ordem de 20% a 25% (24). Entre pacientes previamente tratadas com quimioterapia para câncer de mama metastático, o trastuzumab manteve taxas de resposta entre 10% a 15% (21,22). Na análise retrospectiva destes estudos, as maiores respostas ao trastuzumab foram observadas entre pacientes cujos tumores tinham uma expressão mais pronunciada de HER-2 (3+ pela IHQ). Os efeitos colaterais do trastuzumab são moderados, particularmente quando comparados aos da quimioterapia. Há poucos efeitos colaterais gastrointestinais, e não há significativa

toxicidade hematológica ou alopecia. O evento adverso mais comumente descrito é uma síndrome de infusão caracterizada por tremores, calafrios ou febre, que acompanha a infusão inicial de trastuzumab em aproximadamente 1/3 dos pacientes. Uma rara, porém possivelmente fatal hipertensão pulmonar é descrita, afetando menos de 1 em cada 1.000 pacientes (21,22).

Slamon *et al* seguiram o racional de sinergismo pré-clínico do trastuzumab com a QT (13) e conseguiram comprovar a eficácia da combinação. Num estudo clínico de fase III randomizado em pacientes com superexpressão de HER-2 (25), randomizando 234 a receberem quimioterapia padrão e 235 a receberem quimioterapia padrão combinada ao trastuzumab. Pacientes que não receberam quimioterapia prévia (tratamento adjuvante) foram tratadas com doxorubicina 60 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias (ou epirrubina 75 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias no caso de 36 pacientes) e ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias (143 mulheres) com ou sem trastuzumab com dose de ataque de 4 mg/kg, seguida de 2 mg/kg semanalmente (138 mulheres). Pacientes que receberam antraciclinas na adjuvância foram tratadas com paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias isolado (92 mulheres) ou paclitaxel com trastuzumab nas mesmas dosagens já citadas (92 mulheres). A adição do trastuzumab à quimioterapia foi associada com um tempo livre de progressão de doença maior (mediana de 7,4 meses *versus* 4,6 meses, p<0,001), uma maior taxa de resposta (50% *versus* 32%, p<0,001), uma maior duração de resposta (mediana de 9,1 meses *versus* 6,1 meses, p<0,001) uma menor taxa de óbito com 1 ano de seguimento (22% *versus* 33%, p=0,008), maior sobrevida (sobrevida mediana 25,1 meses *versus* 20,3 meses, p=0,046) e 20% de redução no risco de óbito. O mais importante evento adverso descrito neste estudo foi a disfunção cardíaca, a qual



ocorreu em 27% do grupo que recebeu antracíclicos, ciclofosfamida e trastuzumab, 8% no grupo que recebeu uma antraciclina e ciclofosfamida sem trastuzumab, 13% no grupo com paclitaxel e trastuzumab e 1% no grupo que recebeu paclitaxel isolado. Apesar da cardiotoxicidade ser potencialmente grave, e em alguns casos, com risco à vida, os sintomas em geral melhoraram com manejo clínico padrão. Este estudo consolidou a combinação de trastuzumab semanal e paclitaxel a cada 21 dias no tratamento do câncer de mama avançado HER-2 positivo, incluindo a aprovação do *Food and Drug Administration (FDA)* deste regime na indicação como tratamento de primeira linha para o câncer de mama metastático para pacientes com HER-2 positivo.

Recentes estudos avaliaram o impacto da combinação destas mesmas drogas em diferentes regimes. Um estudo canadense (26) avaliou a farmacocinética e o perfil de segurança da combinação de trastuzumab com paclitaxel a cada 21 dias em mulheres portadoras de câncer de mama com superexpressão de HER-2. Trinta e duas pacientes receberam uma dose de ataque de trastuzumab na dose de 8 mg/kg no D1 e paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> no D0. A partir daí, a cada 21 dias as pacientes receberam trastuzumab 6 mg/kg e paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> no mesmo dia por sete ciclos. Nas pacientes com resposta clínica, a monoterapia com trastuzumab era continuada até a progressão da doença ou retirada da paciente. A meia-vida do trastuzumab foi estimada entre 18 e 21 dias, e a combinação de trastuzumab e paclitaxel foi, em geral, bem tolerada. Os eventos adversos mais frequentes foram mialgia, parestesias, alopecia, artralgia e fadiga. Efeitos colaterais relacionados ao trastuzumab incluem reações relacionadas à infusão e disfunção cardíaca. Os investigadores acessaram uma taxa de resposta objetiva de 59% (4 respostas

completas e 15 respostas parciais) e 22% de doença estável. A duração mediana de resposta foi de 10,5 meses e a mediana para o tempo livre de progressão da doença foi de 12,2 meses.

Por outro lado, um estudo alemão (27) acessou a resposta da combinação de trastuzumab com paclitaxel, ambos em regimes semanais. Enquanto o trastuzumab foi administrado na dose de ataque de 4 mg/kg, seguido de 2 mg/kg semanalmente, o paclitaxel foi usado na dose de 90 mg/m<sup>2</sup>, administrado nas semanas 1 a 6 e 8 a 13. Após o término do regime com paclitaxel, o trastuzumab foi continuado por pelo menos 48 semanas ou até a progressão da doença. Foram tratadas 109 pacientes com câncer de mama metastático com superexpressão de HER-2, todas com tratamento prévio com antraciclinas, conseguindo-se uma taxa de resposta clínica de 75% (sendo 23% respostas completas), 14% de estabilização da doença e apenas 11% das pacientes progrediram. Além da alopecia, a toxicidade hematológica foi a mais importante com leucopenia, anemia e trombocitopenia com grau > 2 em 31%, 41% e 5% das pacientes, respectivamente. Neuropatia periférica grau > 2 foi descrita em 14% das pacientes e apenas 3 pacientes apresentaram reações alérgicas à infusão. Em 30% das pacientes o trastuzumab foi continuado além das 48 semanas preconizadas pelo protocolo. Dados preliminares de um estudo italiano (28) também demonstraram melhores taxas de respostas na combinação de trastuzumab e paclitaxel semanal quando comparada ao paclitaxel semanal isolado.

**Agregando Carboplatina à Combinação Trastuzumab e Paclitaxel**

Robert *et al* apresentaram o resultado de um estudo de fase III que comparou trastuzumab e paclitaxel *versus* trastuzumab, paclitaxel e carboplatina (29). Neste estudo com 160 pacientes, a adição da carboplatina (AUC de 6, a cada 21 dias), aumentou a taxa de resposta (57% *versus* 38%,  $p < 0,01$ ) e levou a um aumento significativo no tempo livre de progressão da doença (13 *versus* 7 meses). Em pacientes com HER-2 3+, as taxas de resposta clínica com e sem carboplatina foram de 67% *versus* 37%, e o tempo livre de progressão foi de 17 *versus* 9 meses. Houve também uma tendência para o aumento na sobrevida global, com sobrevida aos 36 meses de 62% *versus* 47%. Embora a incidência de neutropenia e trombocitopenia tenha sido maior no grupo tratado com carboplatina, a incidência de neutropenia febril foi a mesma nos dois grupos. A atualização dos dados de eficácia e segurança foi recentemente publicada (30). Já com 188 pacientes, a tripla combinação foi associada a uma maior atividade, quando comparada à combinação de trastuzumab e paclitaxel. Enquanto o braço que recebeu trastuzumab, paclitaxel e carboplatina apresentou uma taxa de resposta de 52%, o braço com a combinação de trastuzumab e paclitaxel ficou em 36% ( $p=0,04$ ). A mediana do tempo para progressão de doença também foi maior com a tripla combinação (10,7 meses *versus* 7,0 meses,  $p=0,02$ ). Apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa na sobrevida global entre os dois grupos, observou-se uma tendência para uma maior sobrevida global nas pacientes que receberam trastuzumab, paclitaxel e carboplatina (36,0 meses *versus* 32 meses,  $p=0,49$ ). Neutropenia e trombocitopenia grau 3 e 4 foram mais comuns nas pacientes que receberam a adição da carboplatina. Outros eventos adversos como neutropenia febril, neuropatia e fadiga ocorreram com freqüências similares nos dois grupos.

Dois casos de insuficiência cardíaca congestiva foram descritos no grupo que recebeu trastuzumab e carboplatina, mas a avaliação seriada da fração de ejeção do ventrículo esquerdo não apresentou decréscimo significativo em nenhum dos dois grupos. A conclusão foi de que a tripla combinação de trastuzumab, paclitaxel e carboplatina foi associada a uma significativamente maior taxa de resposta e tempo para progressão da doença e uma tendência para maior sobrevida quando comparada à combinação de trastuzumab e paclitaxel em pacientes com CMM com superexpressão de HER-2.

Um outro estudo de fase II randomizado (31) com 70 pacientes comparou dois diferentes regimes para a combinação de trastuzumab, paclitaxel e carboplatina: 36 pacientes receberam em regime de 3 semanas (trastuzumab na dose de ataque de 8 mg/kg, seguido de 6 mg/kg a cada 21 dias, paclitaxel 200 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias e carboplatina AUC 6 a cada 21 dias), enquanto 34 pacientes receberam regime semanal (trastuzumab na dose de ataque de 4 mg/kg, seguido de 2 mg/kg semanalmente, paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> e carboplatina AUC 2, estas últimas 2 drogas no D1, D8 e D14, com ciclos a cada 28 dias). Ambos os braços receberam 6 meses de terapêutica e depois seguiram com trastuzumab semanal até progressão da doença ou retirada da paciente. Os resultados sugerem que a combinação de trastuzumab com paclitaxel e carboplatina administrados semanalmente é tão ativo e mais bem tolerado que a mesma combinação administrada a cada 3 semanas.

## Trastuzumab e Docetaxel

Ainda na combinação do trastuzumab com taxanos, Pegram *et al* descreveram uma interação sinérgica entre trastuzumab e docetaxel em células de câncer de mama humano com superexpressão de HER-2 transplantadas em ratos (32). A combinação resultou em significativa redução do volume do xenoinxerto submetido à terapia de combinação quando comparado à quimioterapia isolada. Este sinérgismo estabeleceu o racional para teste desta combinação na prática clínica. Esteve *et al* através de um estudo fase II avaliaram a segurança e a eficácia do trastuzumab combinado ao docetaxel semanal em mulheres com câncer de mama metastático com superexpressão de HER-2 (33). Trinta mulheres foram tratadas com trastuzumab na dose de ataque de 4 mg/kg, seguido de 2 mg/kg semanalmente, e docetaxel 35 mg/m<sup>2</sup> no D1, D8 e D14, com ciclos a cada 28 dias. A taxa de resposta foi de 63%. Nota-se que, em pacientes com níveis séricos elevados de HER-2 a resposta clínica atingiu 73%. O tempo para progressão de doença mediano foi de 9 meses. A toxicidade, incluindo mielotoxicidade foi moderada. Os eventos adversos mais frequentes foram fadiga, retenção hídrica e lacrimejamento excessivo, especialmente nas pacientes com maiores doses cumulativas.

Recentemente, Tedesco *et al* apresentaram um novo estudo fase II (34) que avaliou a eficácia e a segurança do docetaxel semanal combinado ao trastuzumab como primeira ou segunda linha de tratamento em mulheres com CMM com superexpressão de HER-2, determinada por IHQ (2 e 3+). Vinte e seis mulheres foram recrutadas e submetidas à combinação de trastuzumab (4 mg/kg de dose de

ataque, seguido de 2 mg/kg/sem) e docetaxel (35 mg/m<sup>2</sup> por 6 semanas, ciclos a cada 8 semanas). A resposta clínica obtida foi de 50%. Oito pacientes (31%) tiveram doença estável. Entre as pacientes HER-2 3+, a resposta clínica global foi de 63%, comparada a 14% para as pacientes HER-2 2+ (p=0,07). Pacientes com tumor FISH + apresentaram uma resposta global de 64%. A mediana para o tempo de progressão da doença foi de 12,4 meses e a mediana de sobrevida, 22,1 meses. As toxicidades de grau 4 ocorreram em 4 pacientes. Este estudo contribuiu para demonstrar que a combinação de trastuzumab com docetaxel é ativa e bem tolerada para a citada indicação.

Considerando a eficácia da combinação do trastuzumab com docetaxel e que estudos recentes demonstraram que o trastuzumab poderia ser administrado a cada 21 dias, um estudo espanhol seguiu o racional para avaliar a combinação de trastuzumab e docetaxel administrados a cada 21 dias em pacientes com câncer de mama metastático e superexpressão de HER-2 (35). Foi avaliado um total de 26 pacientes, sendo estas submetidas ao tratamento com docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> a cada 3 semanas, por 6 ciclos e trastuzumab 8 mg/kg no primeiro ciclo, seguido de 6 mg/kg nos ciclos subsequentes, a cada 21 dias, até progressão da doença. Do total, 16 pacientes foram avaliáveis para eficácia e 23 para segurança. Foram observadas 3 (18,8%) respostas completas e 4 respostas parciais (25%), contabilizando uma taxa de resposta de 43,8%. O tempo mediano para progressão foi de 7,1 meses, não se alcançando a mediana da sobrevida global à época da publicação dos resultados. Durante o tratamento de combinação houve incidência de 8,2% de neutropenia grau 3 ou 4. Estes dados preliminares sugerem que a combinação de

trastuzumab e docetaxel a cada 21 dias seguido de monoterapia com trastuzumab é um regime efetivo e bem tolerado.

Um estudo multicêntrico europeu (36) comparou em um estudo randomizado a combinação de trastuzumab com docetaxel com docetaxel isolado em mulheres com CMM com HER-2 superexpresso. As pacientes eram randomizadas a receberem trastuzumab semanal associado ao docetaxel (100mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias, 6 ciclos) ou docetaxel isolado. As pacientes que receberam docetaxel isolado que progredissem poderiam receber trastuzumab após a progressão. O braço da combinação (94 pacientes) apresentou uma taxa de resposta de 61% enquanto as pacientes que receberam docetaxel isolado (94 pacientes) apresentaram uma taxa de 36% (p=0,001). As pacientes que receberam a combinação também obtiveram um maior tempo livre de progressão (mediana de 10,6 meses *versus* 6,1 meses). Nas 44% das pacientes que receberam docetaxel isolado, e trastuzumab após progressão, o braço que recebeu a combinação de trastuzumab e docetaxel alcançou uma sobrevida global estatisticamente superior (mediana de 27,7 meses *versus* 18,3 meses). Toxicidade grau 3/4 foi, em geral, similar nos dois grupos, embora leucopenia e neutropenia tenham sido mais frequentes no braço da combinação. A conclusão é de que a adição do trastuzumab ao docetaxel significativamente aumenta a taxa de resposta, o tempo livre de progressão e a sobrevida global sem grande incremento na toxicidade.

Modelos pré-clínicos apontam também para uma combinação sinérgica do trastuzumab com docetaxel e sais de platina (cisplatina e carboplatina) (32). Slamon *et al* (37) avaliaram dois estudos, cada um deles com 62 pacientes com CM

avançado HER-2 positivo pela IHQ (2+/3+) ou por FISH, e submetidas ao tratamento de combinação de trastuzumab, cisplatina e docetaxel ou trastuzumab, carboplatina e docetaxel. Docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>) e cisplatina (75 mg/m<sup>2</sup>) ou carboplatina (AUC 6) foram administradas no D2 e então a cada 21 dias, com uma mediana de 6 ciclos. O trastuzumab foi administrado no D1 (4 mg/kg) e a partir daí semanalmente (2 mg/kg). Foi alcançada uma taxa de resposta de 79% (IC 95%: 66%-89%) para as pacientes que receberam trastuzumab, cisplatina e docetaxel e 58% (IC 95%: 44%-70%). Com seguimento mediano de 37,7 meses para as pacientes que receberam trastuzumab, cisplatina e docetaxel, a mediana da sobrevida global alcançada foi de 28,1 meses. As pacientes que receberam trastuzumab, carboplatina e docetaxel apresentaram seguimento mediano de 34,3 meses, e a mediana da sobrevida global não foi alcançada, com 34/62 pacientes (54,8%) ainda vivas. Este estudo apontou para a eficácia da combinação trastuzumab, docetaxel e sais de platina. As taxas de sobrevida global de 28,1 meses para trastuzumab, cisplatina e docetaxel superior a 34,3 meses para trastuzumab, carboplatina e docetaxel, foram as maiores já descritas para uma população de pacientes com CM avançado e HER-2 superexpresso. Estudos fase III randomizados utilizando esta combinação de drogas estão em andamento tanto no cenário de doença metastática como no cenário de doença adjuvante.

Os estudos envolvendo a combinação de trastuzumab e taxanos mostraram significativo incremento nas respostas clínicas e na sobrevida quando comparada ao uso dos taxanos isoladamente.

Outro aspecto relevante da combinação do trastuzumab com taxanos é a



baixa incidência de cardiotoxicidade. Ao contrário do que é descrito nos estudos que envolveram a combinação do trastuzumab com antraciclinas, onde a incidência de cardiotoxicidade é invariavelmente significativa (38), os estudos que avaliaram a combinação trastuzumab e taxanos apresentam em sua maioria um perfil de segurança bastante aceitável considerando a cardiotoxicidade. Um estudo de fase II recente (39) acessou o perfil de segurança cardíaco em pacientes com câncer de mama metastático submetidas à combinação de trastuzumab (8 mg/kg de dose inicial, seguido de 6 mg/kg a cada 21 dias) com paclitaxel ou docetaxel (administrado em doses padrões a cada 21 dias e escolhidos a critério do médico assistente). A ecocardiografia padrão foi utilizada para avaliar eventuais mudanças na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, com avaliações na entrada do estudo, nas semanas 9 e 18 e após, a critério clínico. Das 44 pacientes envolvidas no estudo, apenas 2 tiveram queda na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, sendo que uma delas, após ter o seu tratamento continuado teve uma elevação na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, concluindo-se que este regime de combinação oferece uma baixa incidência de cardiotoxicidade.

#### Trastuzumab e Vinorelbina

Outro quimioterápico que vem sendo muito estudado para combinação com o trastuzumab é a vinorelbina. A vinorelbina é um alcalóide da vinca com considerável atividade contra o câncer de mama. Como primeira linha de tratamento, a vinorelbina é tipicamente associada com uma taxa de resposta entre 35% e 50%, mantendo um valor entre 16 a 30% na segunda linha de tratamento (40-43). A

maioria dos estudos de fase II e III de vinorelbina para câncer de mama metastático utilizou uma dose de 19 a 21 mg/m<sup>2</sup>/sem. Os principais efeitos colaterais da vinorelbina são neutropenia, neuropatia periférica, constipação e flebite. Não é uma droga usualmente associada à cardiotoxicidade, alopecia ou significativa náuseas e/ou vômitos.

Estudos pré-clínicos demonstraram sinergismo na combinação trastuzumab e vinorelbina (13,14,44). Estudos experimentais sugerem que o trastuzumab poderia induzir aumento da citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos através da estimulação de granulócitos e células *NK* (*natural killer*). Recente um estudo levantou a possibilidade da vinorelbina aumentar a *ADCC* mediada pelo trastuzumab através da análise de células efectoras em mulheres com câncer de mama metastático e com HER-2 superexpresso (45).

Seguindo o racional para utilização da combinação de trastuzumab e vinorelbina na prática clínica, Burstein *et al* (46) publicaram o primeiro grande estudo de fase II aonde foi avaliado a taxa de resposta e o perfil de segurança do trastuzumab administrado concomitantemente à vinorelbina no tratamento de mulheres com câncer de mama metastático com superexpressão de HER-2. Quarenta pacientes com câncer de mama avançado e HER-2 positivo (+3 pela IHQ, n=30, +2 ou positivo n=10) foram recrutadas e submetidas ao tratamento com trastuzumab (dose de ataque de 4 mg/kg, seguido de 1,2 mg/kg/sem) e vinorelbina (25 mg/m<sup>2</sup>/sem, com dose ajustada semanalmente conforme contagem de neutrófilos). Oitenta e dois por cento das mulheres haviam recebido quimioterapia prévia como tratamento adjuvante (30%), metastático (25%), ou ambos (28%),

incluindo pacientes que receberam previamente antraciclina (20%), taxanos (15%) ou ambos (38%) nos regimes quimioterápicos. Respostas foram observadas em 30 das 40 pacientes (taxa de resposta global de 75%, intervalo de confiança 95%: 57-89%). A taxa de resposta foi de 84% em pacientes tratadas com trastuzumab e vinorelbina na primeira linha para doença metastática, e de 80% para pacientes com HER-2 3+. Elevadas taxas de respostas também foram observadas em pacientes tratadas na segunda e na terceira linha de tratamento, e também em pacientes previamente tratadas com antraciclina e/ou taxanos. A combinação mostrou-se executável, com pacientes recebendo concomitantemente trastuzumab e vinorelbina em 93% das semanas de tratamento. Nenhuma paciente teve insuficiência cardíaca sintomática. Cardiotoxicidade grau 2 foi observada em três pacientes, sendo ela associada a uma dose prévia excessiva de doxorubicina ou função cardíaca limítrofe pré-existente. Este estudo mostrou que a combinação do trastuzumab com a vinorelbina é altamente efetiva em pacientes com câncer de mama avançado com HER-2 superexpresso, além de ser muito bem tolerado, com um perfil de segurança bastante aceitável.

Um estudo multicêntrico europeu também avaliou a combinação trastuzumab e vinorelbina para estas pacientes (47). De uma população de 69 pacientes com câncer de mama metastático, 66 foram avaliáveis para resposta clínica e 68 para toxicidade. As pacientes já haviam sido tratadas previamente (neo-adjuvante ou adjuvante) nas seguintes porcentagens: quimioterapia 65,2% (antraciclina 51,1%, antraciclina e taxanos 28,9%, CMF 20%) e hormonioterapia 49,3%. As pacientes receberam vinorelbina 30 mg/m<sup>2</sup>/sem e trastuzumab 4 mg/kg no D1, 2 mg/kg no D8 e ciclos a cada 4 semanas. As pacientes foram reavaliadas a cada 8 semanas. Os

exames de imagem foram revistos por um comitê independente. A taxa de resposta clínica global foi 58,5%, incluindo 14% de respostas completas. O benefício clínico (respostas completas, respostas parciais e doença estável) foi de 80%. A sobrevida livre de progressão foi de 10 meses, com sobrevida global não alcançada à época da publicação. Nove pacientes tratadas com esta combinação receberam o tratamento por mais de um ano, sendo o regime bem tolerado, com neutropenia grau 3-4 ocorrendo em 44,6% dos ciclos, com 2 episódios de neutropenia febril. Reações à infusão do trastuzumab foram pouco freqüentes (grau 3:1,5%), astenia grau 3 foi relatada em 8,8% dos pacientes, neuropatia grau 3 em 4% dos pacientes e infecção grau 3 em 6% dos pacientes. Uma paciente foi excluída por cardiotoxicidade grau 3 com declínio sintomático da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Não se reportou náusea, vômito ou alopecia significativa. Conclui-se que esta combinação é um dos tratamentos mais ativos para pacientes com câncer de mama metastático com HER-2 superexpresso, mesmo após pré-tratamentos com antraciclinas e/ou taxanos, mostrando um perfil de segurança bastante favorável.

Um outro estudo multicêntrico, este alemão, também avaliou a combinação da vinorelbina com o trastuzumab na primeira linha de tratamento em pacientes com câncer de mama metastático com HER-2 positivo (48). As 39 pacientes receberam vinorelbina (25 mg/m<sup>2</sup> semanalmente e trastuzumab 2 mg/kg/sem por 24 semanas. Em caso de mielossupressão relevante, a vinorelbina não era administrada. Trastuzumab foi continuado até progressão. A taxa de resposta global foi de 50% (02 respostas completas e 11 respostas parciais), com 5 das 26 pacientes elegíveis para resposta ainda não avaliadas à época da publicação. Duas pacientes tiveram doença estável e seis progrediram. A maioria das pacientes apresentaram

leucopenia (73,1%), com neutropenia (53,8%) ou anemia (76,9%). Seis pacientes apresentaram neutropenia grau 3 ou 4 e o mesmo número de pacientes apresentaram reações à infusão do trastuzumab.

Um estudo multicêntrico espanhol de fase II recente também apontou para resultados semelhantes para esta combinação (49). De 52 pacientes com câncer de mama e HER-2 3+ ou 2+ confirmado com FISH e submetidas a um tratamento com trastuzumab (dose de ataque de 4 mg/kg, seguido de 2 mg/kg semanalmente) e vinorelbina 25 mg/m<sup>2</sup> (D1-D8 e D15, ciclos a cada 21 dias), com a vinorelbina sendo feita em 6 ciclos trastuzumab continuado conforme o critério de cada investigador, 28 (54%) não haviam realizado nenhum tratamento prévio e 24 (46%) já haviam realizado uma ou mais linhas de tratamento. Obteve-se uma resposta clínica em 30 pacientes (60%; intervalo de confiança 95%: 45-74%), sendo 7 respostas completas e 23 respostas parciais; 11 pacientes tiveram doença estável (22%; intervalo de confiança 95%:12-36%) e 9 (18%; intervalo de confiança 95%: 9-31%) tiveram progressão de doença. A mediana de duração de resposta foi 7,3 meses (intervalo de confiança 95%: 6,6-11 meses). A toxicidade foi bastante tolerável, com toxicidade hematológica grau 3-4 foram: anemia 0,4%, neutropenia 8,4% e leucopenia 2,9%. Eventos cardíacos não foram observados. Este estudo mostra portando uma marcante atividade do regime, com uma boa tolerância, para o cenário do câncer de mama metastático com HER-2 superexpresso.

Um estudo italiano mostrou que esta combinação mantém respostas elevadas mesmo no tratamento de segunda linha para estas pacientes (50). Em 31 pacientes com câncer de mama metastático com HER-2 superexpresso e que receberam

quimioterapia de primeira linha que continham antraciclina, a combinação do trastuzumab (dose de ataque de 4 mg/kg, seguido de 2 mg/kg semanalmente) e vinorelbina (25 mg/m<sup>2</sup>/sem) atingiu 6% de resposta clínica completa, 13% de resposta parcial e 39% de pacientes conseguiram manter a doença estável. O perfil de segurança foi tolerável (neutropenia grau 3-4: 39%, neuropatia periférica: 10%, reações à infusão do trastuzumab: 16%).

Outro estudo italiano avaliou ainda a combinação da vinorelbina com o trastuzumab para pacientes com câncer de mama metastático e HER-2 positivo (3+ ou *FISH* +), só que com o trastuzumab sendo administrado a cada 21 dias (51). De 34 pacientes, 26 eram elegíveis para avaliação de resposta (20 na primeira e 06 na segunda linha de tratamento) e todas foram avaliadas quanto à toxicidade. O tratamento foi efetuado com vinorelbina (30 mg/m<sup>2</sup> nos dias 1 e 8, com ciclos a cada 21 dias) e trastuzumab (8 mg/kg no D1 e a partir daí com 6 mg/kg a cada 21 dias), com vinorelbina planejada para um máximo de 9 ciclos, com trastuzumab sendo continuado até a progressão da doença. De 18 pacientes com seguimento de pelo menos um reestadiamento, ocorreram 10 respostas (04 completas e 06 parciais), com uma taxa de resposta global de 56%. Ocorreu um óbito por toxicidade renal, 07 casos de neutropenia grau 4 e 03 casos de neutropenia febril, com 2 pacientes com declínio assintomático da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Conclui-se que a combinação de vinorelbina e trastuzumab, com este último agente sendo administrado a cada 21 dias, também pode gerar respostas clínicas similares aos regimes que utilizam esta combinação com trastuzumab semanal.

Considerando os estudos até agora descritos, a combinação de vinorelbina,

docetaxel e trastuzumab poderia constituir uma estratégia interessante de tratamento do câncer de mama HER-2 positivo. A tripla combinação de trastuzumab, docetaxel e vinorelbina para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático com HER-2 superexpresso, foi investigada em um estudo multicêntrico americano (52). Pacientes com doença metastática mensurável, previamente não tratadas, HER-2 positivas (IHQ 3+ e/ou FISH +), fração de ejeção do ventrículo esquerdo normal e com bom *performance status* (ECOG 0-2) foram elegíveis e submetidas ao tratamento com vinorelbina (25 mg/m<sup>2</sup>) e docetaxel (30 mg/m<sup>2</sup>) nos dias 1 e 8, e ciclos a cada 21 dias associadas ao trastuzumab administrado semanalmente (4 mg/kg na primeira dose e 2 mg/kg nas semanas subseqüentes). A taxa de resposta obtida foi de 70%, com 11 respostas completas (32%) e 13 respostas parciais (38%). A sobrevida mediana livre de progressão foi de 17,1 meses. Uma mediana de 6 ciclos foi administrada, com 225 ciclos avaliáveis para toxicidade. Neutropenia foi a mais comumente reportada toxicidade grau 3-4 (24%), sendo que 19% das pacientes apresentaram neutropenia febril. Outras toxicidades grau 3-4 incluem fadiga (11%), hiperglicemia (11%) e mialgias (05%). Ocorreram 3 óbitos por intercorrências (infarto do miocárdio, insuficiência renal e pneumonia). Este estudo concluiu que a tripla combinação de trastuzumab, docetaxel e vinorelbina neste cenário é bastante efetiva, e apresenta um perfil de segurança manejável. O recrutamento e o seguimento deste estudo prossegue para a avaliação da sobrevida global.

#### Combinação do Trastuzumab com Outros Agentes

Novos agentes têm sido testados em combinação com o tratuzumab para o

cenário de doença metastática em pacientes com CMM com HER-2 superexpresso. Apesar do uso de trastuzumab em combinação com a doxorrubicina não ser atualmente aprovada fora de estudos clínicos, vários estudos em andamento investigam se regimes que contenham trastuzumab e antraciclinas menos cardiotoxicas têm um perfil de segurança cardiológico mais favorável, enquanto é mantido um alto nível de benefícios clínicos. Dentro deste racional, um estudo multicêntrico espanhol de fase II (53) avaliou os resultados e o perfil de segurança da combinação de doxorrubicina lipossomal (50 mg/m<sup>2</sup>, ciclos a cada 21 dias, total de 6 ciclos) com paclitaxel (80 mg/m<sup>2</sup>/semana) e trastuzumab (2 mg/kg/sem), com estas duas últimas drogas administradas por 52 semanas, ou até progressão da doença. Nas 54 pacientes com CMM com HER-2 superexpresso, a função cardíaca foi averiguada a cada 3 semanas e a resposta clínica a cada 6 semanas durante o tratamento. Do total, 30 pacientes tinham doença localmente avançada e 24 tinham CMM. A taxa de resposta em pacientes com doença localmente avançada foi 93,3% (21 respostas completas e 7 respostas parciais) e em pacientes com doença metastática, obteve-se resposta clínica em 91,7% das pacientes (5 respostas completas e 17 respostas parciais). Neutropenia foi o evento adverso 3-4 mais comum, ocorrendo 13 episódios de neutropenia febril. Outras toxicidades citadas foram: alopecia, náusea, vômito, síndrome mão-pé, e toxicidade ungueal. Apenas 3 pacientes interromperam o tratamento pela diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo para abaixo de 50%, mas não houve casos de insuficiência cardíaca sintomática. A conclusão é de que esta combinação é altamente efetiva e bem tolerada, com um perfil de segurança cardíaca bastante aceitável. Este estudo teve os seus dados atualizados em publicação recente (54), aonde a taxa de



resposta clínica e o perfil de segurança foram mantidos.

Um estudo multicêntrico americano de fase II vem avaliando a taxa de resposta, tempo para progressão e sobrevida global, além do perfil de toxicidade da combinação do trastuzumab com a gemcitabina como primeira linha de tratamento para pacientes com câncer de mama metastático (55). Pacientes com doença metastática mensurável, superexpressão de HER-2 (IHQ 3+ ou FISH +), sem tratamento prévio para a doença metastática (tratamento adjuvante foi permitido), e com bom *performance status* (ECOG 0-2) receberam gemcitabina (1.250 mg/m<sup>2</sup> nos dias 1 e 8) associada ao trastuzumab (8 mg/kg no ciclo 1, e então 6 mg/kg nos ciclos subsequentes) com ciclos a cada 21 dias até progressão da doença ou toxicidade inesperada. Os resultados de taxa de resposta e o perfil de toxicidade foram publicados com uma população inicial de 25 pacientes. Uma taxa de resposta de 64% (intervalo de confiança 95%: 45-83%) foi atingida, com 3 respostas completas (12%) e 13 respostas parciais (52%). A toxicidade foi, em geral, modesta. Nenhum paciente até a fase da publicação dos primeiros resultados descontinuaram a terapêutica por causa de eventos adversos. Neutropenia grau 4 ocorreu em 4 ciclos (3%) e nenhuma outra toxicidade grau 4 foi documentada. Neutropenia grau 3 foi vista em 14 ciclos (9%), trombocitopenia em 2 ciclos (1%), anemia em 1 ciclo (<1%). Toxicidade não-hematológica grau 3 incluem edema, elevação de transaminases, vômitos e *rash* (01 paciente para cada uma destas toxicidades citadas). Uma paciente com prévia exposição a antraciclina evoluiu com diminuição grau 2 da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Nenhuma toxicidade cardíaca sintomática foi registrada. Estes resultados apontam que a combinação do trastuzumab com a gemcitabina mostra uma elevada taxa de resposta associada a uma amena

toxicidade. Este estudo está em andamento, com recrutamento de mais pacientes para a avaliação dos dados de tempo para a progressão da doença e sobrevida global.

Outro agente que vem apontando um potencial para a combinação com o trastuzumab é a capecitabina. Esta droga tem mostrado consistentemente uma elevada eficácia associada a um perfil de segurança favorável no tratamento do CM. A capecitabina combinada ao trastuzumab para o tratamento do CMM foi recentemente avaliada em um estudo multicêntrico chinês (56). Pacientes com doença metastática mensurável, com HER-2 positivo (IHQ 3+ ou IHQ 2+, com FISH +), Karnofsky acima de 60 e adequada função hematopoética, renal e hepática foram elegíveis. Quimioterapia prévia para o tratamento de doença metastática não foi permitida. As pacientes receberam capecitabina (1.250 mg/m<sup>2</sup>/dia em duas tomadas diárias, D1-D14, a cada 21 dias, com um máximo de 6 ciclos) mais trastuzumab (4 mg/kg na semana 1 e 2 mg/kg nas semanas subseqüentes) até a progressão da doença. Os resultados de eficácia foram obtidos através da análise das primeiras 25 pacientes incluídas no estudo, obtendo-se uma taxa de resposta de 76% (5 respostas completas e 14 respostas parciais), com 16% das pacientes obtendo estabilidade da doença e apenas 2 pacientes (08%) progredindo com a citada combinação. Nas 30 pacientes disponíveis para avaliação para segurança, os eventos adversos mais comuns foram: síndrome mão-pé (27%), elevação de transaminases (13% para TGO e 10% para TGP) e leucopenia (07%). A toxicidade grau 3 mais comum foi a síndrome mão-pé (13%), com melhora ou resolução após interrupção ou redução da dose de capecitabina ou tratamento sintomático. O estudo permanece em recrutamento e andamento para a análise dos dados de

sobrevida livre de progressão e sobrevida global, mas estes dados iniciais demonstram que a combinação da capecitabina com o trastuzumab é altamente efetiva e bem tolerada como primeira linha no tratamento do câncer de mama metastático.

### **Avaliação laboratorial do estado HER-2**

Com o advento do uso do trastuzumab, um anticorpo monoclonal contra o receptor de tirosina-quinase, a avaliação do status do receptor HER-2 se tornou importante do ponto de vista clínico. O trastuzumab (Herceptin®) foi aprovado para o uso terapêutico no câncer de mama metastático, como agente único demonstrando 35% de resposta objetiva em primeira linha de tratamento (57,58) como em combinação com quimioterapia (59), também seu uso demonstrou superior atividade anti-tumoral (50% de taxa de resposta quando em comparação à quimioterapia sozinha), tempo para progressão da doença (mediana de 7.4 *versus* 4.6 meses) e aumento significativo da sobrevida global (mediana de 25.1 *versus* 20.3 meses). Recentemente, a primeira análise interina do uso de trastuzumab concomitante ou logo após a quimioterapia adjuvante demonstrou uma melhora significativa no intervalo livre de recidiva (60) e na sobrevida global (61) dos pacientes com CM em estádios iniciais. Diante disto, a avaliação laboratorial do status HER-2 se tornou um procedimento básico e fundamental para o manejo apropriado das pacientes com câncer de mama (62).

O método de rotina de avaliação do status HER-2 é a imunohistoquímica (IHQ). Estudos originais com trastuzumab selecionaram pacientes cujos tumores

superexpressavam HER-2 pelo método da IHQ. A IHQ detecta a presença do HER-2 em amostras de tecidos (Figura 3). A técnica utiliza anticorpos contra o HER-2 e um método de detecção química que colore a proteína HER-2 nas amostras teciduais que são analisadas pela microscopia ótica, numa graduação de 0, 1+, 2+ e 3+, conforme a intensidade da coloração. A técnica é rápida, não radioativa e requer pequena quantidade tumoral. É utilizada para identificar a proteína HER-2 superexpressa em tecidos embebidos em parafina, fixados por formalina, congelados ou a fresco (63,64,65).

A fluorescência hibridizada *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* – FISH) é um método que acessa as cópias do gene HER-2 amplificadas por fluorescência. Este método tem um alto grau de concordância com o método imunohistoquímico (66) e é muito usado em situações onde é necessária a confirmação de casos de IHQ duvidosos (2+) (67). O FISH pode ser utilizado para identificar amplificação do gene em tecido embebido em parafina e fixado em formalina. Dois kits diferentes de detecção do oncogene HER-2 foram aprovados para uso pelo FDA. Um deles é o *PathVysion* (*Vysis, Downers Grove, IL*) que inclui um sistema de sonda dupla para detecção simultânea do gene HER-2/*neu* e do centrômero do cromossomo 17, considerando o HER-2/*neu* amplificado quando a razão das cópias de genes HER-2/*neu* pelo número de centrômeros 17 é maior ou igual a 2. O outro kit é o *Inform* (*Ventana Medical Systems, Tucson, AZ*) que não leva em conta o número de cópias do cromossomo 17 mas somente o número de cópias do oncogene HER-2/*neu*, considerado como positivo quando for maior do que 4.

A hibridização *in situ* cromogênica (CISH) é um método onde a sonda de DNA

pode ser detectada usando uma simples reação de peroxidase similar à IHQ. O sinal é avaliado por microscopia ótica. Os casos com pelo menos 6 cópias de genes por núcleo são definidos como positivos (68). Este último método ainda não foi aprovado pelo FDA para seleção das pacientes candidatas ao uso de trastuzumab.

A *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA) é um método de amplificação contínua dos ácidos nucléicos que ocorre em dois passos: uma amplificação inicial enzimática dos alvos de ácidos nucléicos seguida pela detecção dos amplicons. As vantagens desta técnica englobam o fato de ser uma reação isotérmica (não requer um termociclador) e os amplicons são de cadeia única, isto é, não requerem um passo de desnaturação adicional antes da detecção. A detecção quantitativa do RNA é realizada pela eletroquimioluminescência (69). Esta técnica mostrou excelente concordância quando comparada ao PCR quantitativo e ao método ELISA para o *Her-2/neu* (AUC ROC 0.938, sensibilidade 75,3%, especificidade 100% e AUC ROC 0.98, sensibilidade 100%, especificidade 91,5%, respectivamente). Desta forma, ela pode ser utilizada para a avaliação do estado *Her-2/neu* nos tumores de mama. Esta abordagem é rápida, altamente sensível e se constitui um método estandardizado que complementa as técnicas existentes, especialmente para tumores de mama pequenos (70).

### **Aneussomia do cromossomo 17**

A aneussomia do cromossomo 17 é a aberração do número de cópias mais frequentemente encontrada no câncer de mama invasivo (38% a 46%). Está correlacionada com o aparecimento de metástases e com a diminuição da sobrevida

dos pacientes (71). O número de cópias do cromossomo 17 pode afetar o status HER2/*neu*, especialmente através da demonstração de uma forte supexpressão da proteína por imunohistoquímica ou por um aumento no número de cópias do gene pelo método FISH (72). Entretanto, alguns casos podem se apresentar com um resultado discordante ao final, dependendo do critério utilizado para a positividade do FISH (*Ventana* ou *PathVision*). Para estes casos, não existe informação clara se devem ser considerados como amplificados ou não e conseqüentemente, se são ou não são candidatos ao tratamento com trastuzumab.

## Referências

---

1. De Vita V, Hellman S, Rosenberg S. Cancer Principles and Practice of Oncology, 2005, 6<sup>th</sup> Edition.
2. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Bioch Ciophys Acta* 1994; 1198 (2-3): 165-184.
3. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230(1):132-1139.
4. King CR, Kraus MH, Aaronson AS. Amplification of a novel v-erb-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985; 229: 974-976.
5. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, et al. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232: 1644-1646.
6. Shih C, Padhy LC, Murray M, et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981;290: 261-264.
7. Sundaresan S, Penuel E, Sliwkowski M. The biology of human epidermal growth factor receptor 2. *Curr Oncol Rep* 1999; 1: 16-22.

8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987; 235(4785):177-82.
9. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, et al. p185HER2 Monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1165-1172.
10. Shepard HM, Lewis GD, Sarup JC, et al. Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol* 1991; 11: 117-127.
11. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, et al. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994; 9: 1829-1838.
12. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992; 89: 4285-4289.
13. Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, et al. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 1998;17: 2235-2249.
14. Pegram M, Hsu S, Lewis G, et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999; 18: 2241-2251.



15. Konecny G, Pegram MD, Beryt M, et al. Therapeutic advantage of chemotherapy drugs in combination with Herceptin against human breast cancer cells with HER-2/neu overexpression. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 57: 114.
16. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, et al. Monoclonal antibody to HER-2/neu receptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res* 1999; 59: 1347-1355.
17. Baselga J, Norton L, Albanell J, et al. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1999; 59: 2020.
18. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(8):2334-56.
19. Ravdin PM. Is Her2 of value in identifying patients who particularly benefit from anthracyclines during adjuvant therapy? A qualified yes. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;(30):80-4.
20. Pietras RJ. Interactions between estrogen and growth factor receptors in human breast cancers and the tumor-associated vasculature. *Breast J*. 2003;9(5):361-73.

21. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 737-744.
22. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER-2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2639-2648.
23. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2659-2671.
24. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al: Efficacy and safety of Herceptin (trastuzumab, humanized anti-HER-2 antibody) as a single agent in first line treatment of HER-2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC), *Breast Cancer Res Treat* 1998; 50: 232 (abstract 21).
25. Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, et al: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpress HER-2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-792.

26. Leyland-Jones B, Gelmon K, Ayoub JP, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel. *J Clin Oncol* 2003; 21 (21): 2965-2971.
27. John M, Kriebel-Schmitt R, Stauch M, et al. Weekly paclitaxel plus trastuzumab shows promising efficacy in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; Vol 82, Supplement 1 (abstract 221).
28. Gasparini G, Morabito A, De Sio L, et al. Preliminary clinical results of a randomized phase IIb study of weekly paclitaxel ± trastuzumab as first-line therapy of patients (pts) with HER-2/neu positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; Vol 82, Supplement 1 (abstract 227).
29. Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, et al. Phase III comparative study of trastuzumab and paclitaxel with and without carboplatin in patients with HER-2/neu positive advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76, Supplement 1 (abstract 35).
30. Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, et al. Updated results of a randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel and carboplatin versus trastuzumab and paclitaxel in patients with HER-2 overexpressing metastatic breast cancer: efficacy and safety. *Ann Oncol* 2004; 15, Supplement 3 (abstract 144).
31. Rowland KM, Suman VJ, Ingle JN, et al. NCCTG 98-32-52: Randomized phase II trial of weekly versus every 3-week administration of paclitaxel, carboplatin and trastuzumab in women with HER2 positive metastatic breast cancer. *Proc ASCO* 2003; 22:8 (abstract 31).

32. Pegram MD, Lopez A, Konecny G, et al. Trastuzumab and chemotherapeutics: Drug interactions and synergies. *Semin Oncol* 2000; 27: 21-25 (supplement 11).
33. Esteva FJ, Valero V, Booser D, et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2 Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1800-1808.
34. Tedesco KL, Thor AD, Johnson DH, et al. Docetaxel combined with trastuzumab is an active regimen in HER-2 3+ overexpressing and fluorescent in situ hybridization-positive metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II trial. *J Clin Oncol* 2004; 22 (6): 1071-1077.
35. Tuquets I, Ramos M, Gil M, et al. Study of docetaxel and trastuzumab combination, administered every 21 days, in patients with metastatic breast cancer and HER-2 over-expression. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88, Supplement 1(abstract 3054).
36. Extra JM, Coggnetti F, Chan S, et al. First-line trastuzumab (Herceptin®) plus docetaxel versus docetaxel alone in women with HER2-positive metastatic breast cancer (MBC): results from a randomised phase II trial (M77001). *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82, Supplement 1(abstract 217).
37. Slamon D, Yeon C, Pienkowski, et al. Survival analysis from two open-label non-randomized phase 2 trials of trastuzumab combined with docetaxel and platinum (cisplatin or carboplatin) (TCH) in women with HER-2 positive advanced breast cancer. *Proc ASCO* 2004 (abstract 642).

38. Perez AP, Rodeheffer R. Clinical Cardiac Tolerability of Trastuzumab. *J Clin Oncol* 2004; 22 (2): 322-329.
39. Stewart JA, Fehrenbacher L, Blanchard RA, et al. Standardized echocardiographic monitoring in a trial of trastuzumab plus a taxane administered every 3 weeks as first-line therapy for HER-2+ metastatic breast cancer detects a low rate of asymptomatic cardiac dysfunction. *Breast Cancer Research Treat* 2004; 88, Supplement 1 (abstract 3052).
40. Canobbio L, Boccardo F, Pastorino G, et al. Phase II trial of Navelbine advanced breast cancer. *Semin Oncol* 1989; 16:33-36 (Supplement 4).
41. Fumoleau P, Delgado FM, Delozier T, et al. Phase II trial of weekly intravenous vinorelbine in first-line advanced breast cancer chemotherapy. *J Clin Oncol* 1993; Volume 11: 1245-1252.
42. Romero A, Rabinovich MG, Vallejo CT, et al. Vinorelbine as first-line chemotherapy for metastatic breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12:336-341.
43. Weber BL, Vogel C, Jones S, et al. Intravenous vinorelbine as first-line and second-line therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:2722-2730.
44. Soriano A, Helfrich B, Holden S, et al. Synergistic effects of chemotherapy (CT) and radiation (RT) and Herceptin against human non-small cell lung cancer (NSCLC) expressing HER-2 $neu$  receptor. 12<sup>th</sup> International Conference on Monoclonal Antibodies for Cancer 1999; 14-16 (abstract 40).

45. Schwartz GN, Kaufman PA, Tretter CPG, et al. Vinorelbine and trastuzumab enhance effector cell function in patients with HER-2/*neu* overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88, Supplement 1 (abstract 3048).
46. Burstein HJ, Kuter I, Campos SM, et al. Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19 (10): 2722-2730.
47. Untch M, Kahlert S, Petruzelka L, et al. A multinational phase II study of Navelbine (N) and Herceptin (H) as first-line therapy for patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 2004;2(3): 127 (abstract 243).
48. Wit M, Becker K, Thomssen C, et al. Vinorelbine and trastuzumab as first line therapy in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer – interim analysis of a prospective, open-label, multicentre phase II trial. *Ann Oncol* 2004;15, Supplement 3 (abstract 138)
49. Bayo-Calero JL, Mayordomo-Cámara JI, Sánchez-Rovira P, et al. A multicenter study with trastuzumab and vinorelbine as first and second line treatment in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88, Supplement 1 (abstract 5069).
50. Gebbia V, Chiarenza M, Aiello R, et al. Trastuzumab in combination with iv vinorelbine in advanced breast cancer patients with HER2 overexpression. *Ann Oncol* 2004;15, Supplement 3 (abstract 137).

51. De Maio E, Pacilio C, Gravina A, et al. A single-centre phase 2 study of vinorelbine plus 3-weekly trastuzumab in metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2004;15, Supplement 3 (abstract 139).
52. Yardley D, Grecco A, Porter LL, et al. First-line treatment of HER2-positive metastatic breast cancer with trastuzumab, docetaxel and vinorelbine: results of a Minnie Pearl Cancer Research Network trial. *Ann Oncol* 2004;15, Supplement 3: 39 (abstract 146).
53. Cortés J, Climent MA, Lluch A, et al. Results of a phase II study of liposomal doxorubicin (myocet) in combination with weekly paclitaxel and trastuzumab (Herceptin®) in patients with HER2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 2004;2 (3): 132 (abstract 262).
54. Cortés J, Climent MA, Lluch A, et al. Updated results of a phase II study (M77035) of Myocet® and paclitaxel in patients with HER2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88, Supplement 1 (abstract 3041).
55. Brufsky A, Orlando M, Fox K, et al. Phase II study of gemcitabine and trastuzumab combination therapy in patients with HER2-overexpression metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88, Supplement 1 (abstract 3047).
56. Santai Song, Jianxin Zhu, Rongcheng Luo, et al. Capecitabine combined with trastuzumab as first-line therapy in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2004;15, Supplement 3 (abstract 141).

57. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* 1999; 17(9):2639-48.
58. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002; 20(3):719-26.
59. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001; 344(11):783-92.
60. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(16):1659-72.
61. Romond EH, Perez EA, Bryant J et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1673-84
62. Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol.* 1999;26(4 Suppl 12):71-7.
63. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol.* 2000;53(12):890-2.



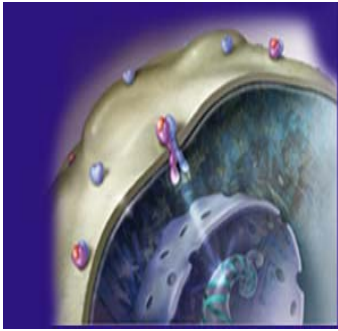
64. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol.* 2003; 16(2):173-82.
65. Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M et al. Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol.* 2004;57(3):233-7.
66. Larsimont D, Di Leo A, Rouas G et al. HER-2/neu evaluation by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in breast cancer: implications for daily laboratory practice. *Anticancer Res.* 2002 ;22(4):2485-90.
67. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA.* 2004; 291(16):1972-7.
68. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1467-72.
69. Polstra AM, Goudsmit J, Cornelissen M. Development of real-time NASBA assays with molecular beacon detection to quantify mRNA coding for HHV-8 lytic and latent genes. *BMC Infectious Diseases* 2002;2:1-10.
70. Lamy PJ, Verjat T, Paye M et al. NASBA : a novel approach to assess hormonal receptors and ERBB2 status in breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 44 (1):3-12.

71. Watters AD, Going JJ, Cooke TG et al. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 77(2):109-14.
72. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(12):4393-9.

## Figuras

---

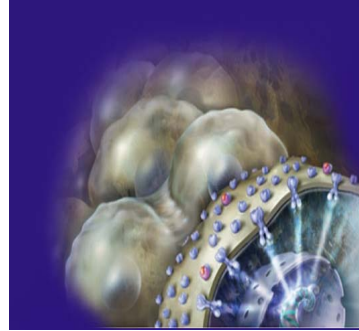
**Figura 1: Expressão do HER-2 e conseqüências biológicas**



Célula normal

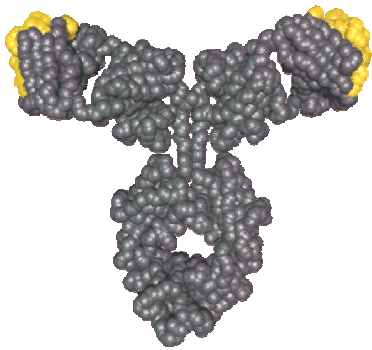


Célula com hiperexpressão

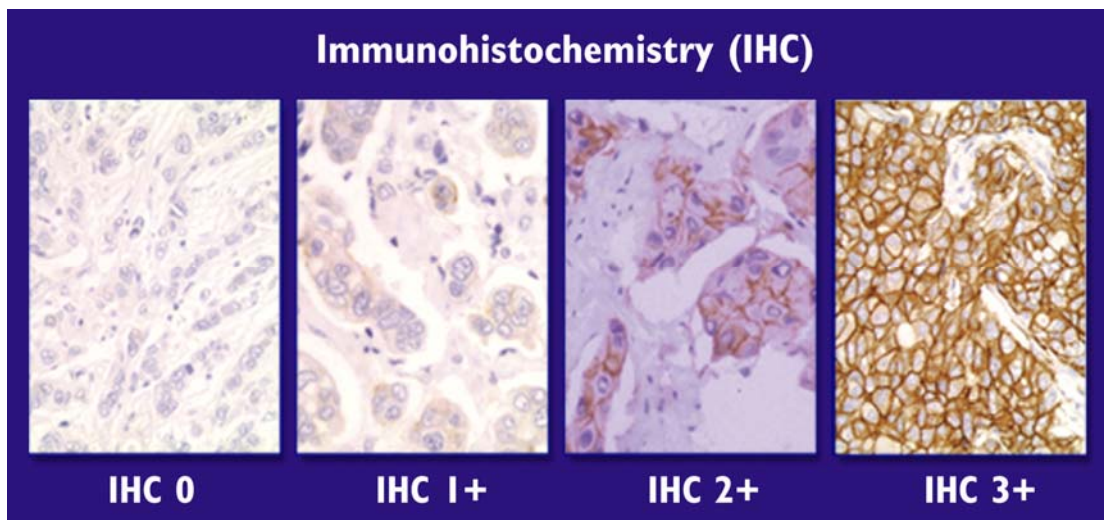


Excessiva divisão celular

Fonte: *Genentech Inc.*



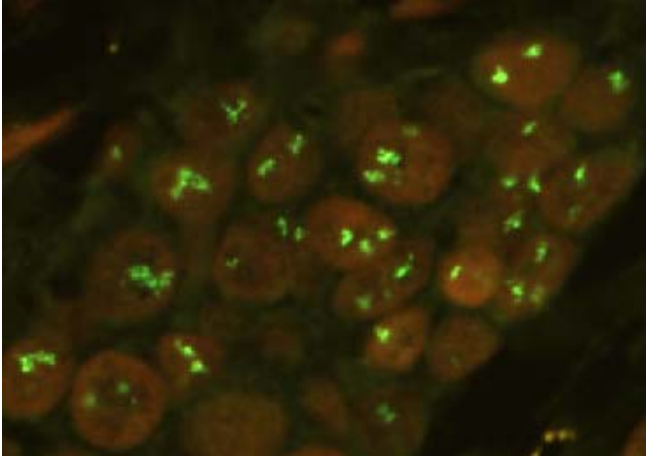
**Figura 2: Estrutura molecular do trastuzumab** Fonte : Genentech Inc.



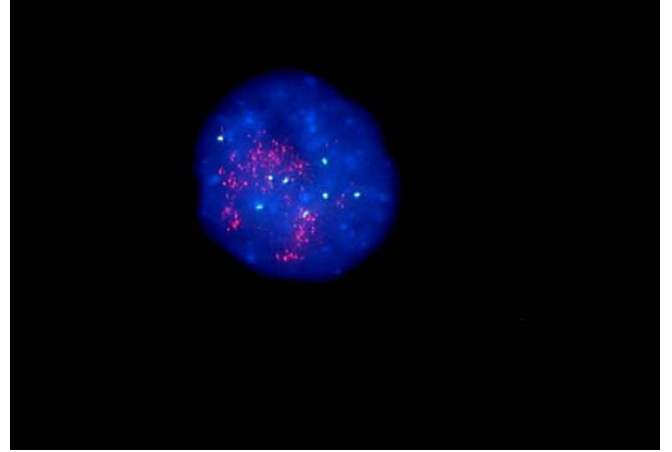
**Figura 3: Cortes histológicos mostrando diferentes padrões na intensidade para coloração para a proteína HER-2 na imunohistoquímica.**

Fonte: *Genentech Inc.*

---



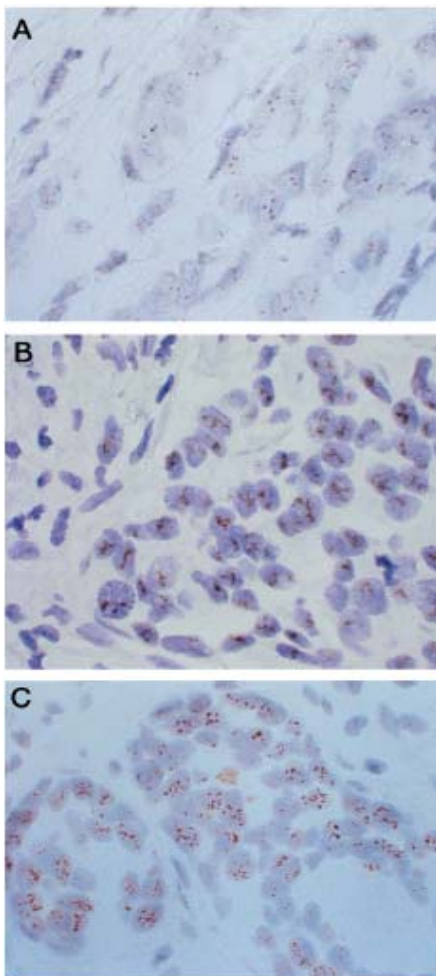
Ventana Inform™ (Her-2>4)



Abbott-Vysis Pathvysion™ (Her-2/CEP17>2)

**Figura 4. Amplificação do gene Her-2 por método FISH (Hibridização in situ por fluorescência)**

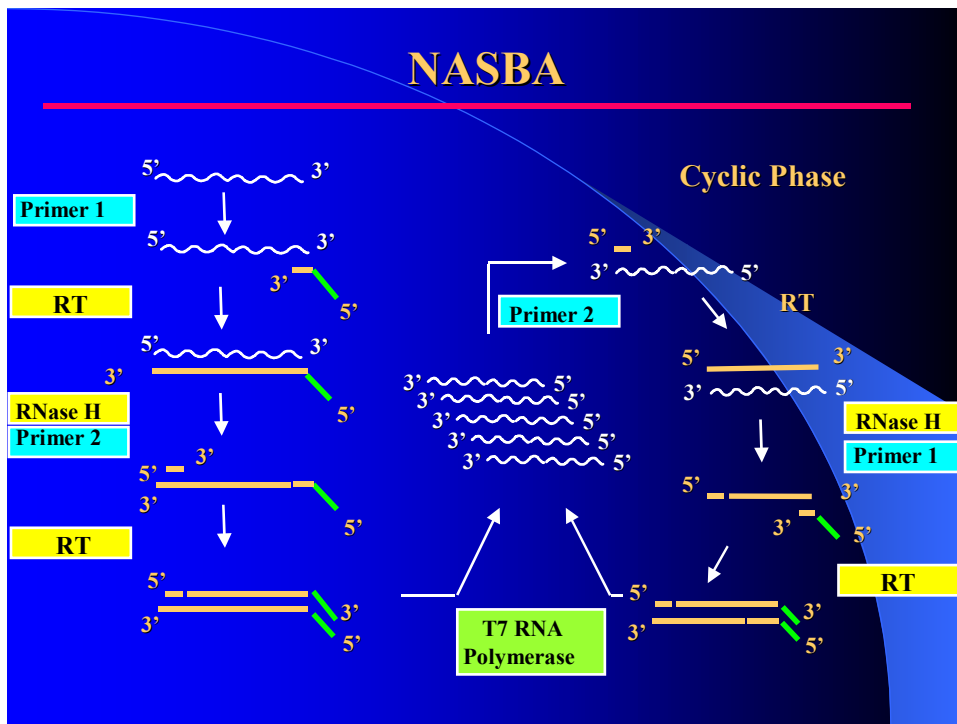
Fonte: Serviço de Patologia, Instituto Jules Bordet



**Figura 5. CISH (Hibridização in situ cromogênica)**

Esta figura mostra exemplos do método CISH para o oncogene Her-2 no CM. **(A)**: tumor com uma a duas cópias identificadas do gene HER-2/*neu* (ausência de amplificação). **(B)** A amplificação característica aparece como um agrupamento de cópias de genes com coloração positiva para a peroxidase ou **(C)** como múltiplas cópias individuais de genes. Aumento de 600x. Coloração por hematoxilina.

Fonte: *Tanner M et al, Am J Pathol. 2000.*



**Figura 6. NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) por passos.**

Trata-se de um método de amplificação isotérmica onde a partir de moléculas de RNA produz-se cDNA com seqüência promotora para RNA polimerase. O uso de RNase H digere a cadeia de RNA do duplex DNA:RNA e permite que nova cadeia de DNA seja sintetizada com *primer* contendo seqüência promotora para RNA polimerase. Na presença de T7 RNA polimerase, o duplex DNA:DNA atua como molde para síntese de RNA, que por sua vez é convertido novamente para cDNA pela transcriptase reversa (RT).

RT : reverse transcriptase ; Fonte: Biomérieux Inc.



## **Justificativa para o estudo**

---

Diante do crescente uso do trastuzumab no CM metastático e mais recentemente no tratamento adjuvante do CM, e considerando que esta terapia se baseia na avaliação laboratorial do estado do HER2, torna-se crítica a avaliação precisa do estado de amplificação deste oncogene. Várias técnicas são disponíveis atualmente, mas alterações tipo polissomia podem confundir o estado de amplificação no método FISH. O objetivo do estudo a seguir foi determinar o melhor escore para dosagem da amplificação (incluindo casos de polissomia) e correlacionar este com os demais escores de avaliação do HER2.

## Segundo artigo em português

---

**A correção do cromossomo 17 é essencial para a determinação do estado de amplificação do gene Her-2/neu no câncer de mama (CM).**

---

Dal Lago L<sup>\*1</sup>, Durbecq V<sup>\*1</sup>, Desmedt C<sup>\*1</sup>, Salgado R<sup>2</sup>, Paesmans M<sup>1</sup>, Verjat T<sup>3</sup>, Lespagnard L<sup>2</sup>, Ma Y<sup>2</sup>, Veys I<sup>2</sup>, Di Leo A<sup>1</sup>, Piccart M<sup>1</sup>, Sotiriou C<sup>1</sup>, Larsimont D<sup>1,2</sup>.

\* DL.L, D.V. and D.C. devem ser considerados como co-autores.

1. Unidade de Pesquisa Translacional, Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica
2. Departamento de patologia, Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica
3. Departamento de Genética Humana, BioMérieux, Marcy l'Etoile, França.

**Agradecimentos :** Os autores agradecem “Les Amis de L’Institut Bordet” e “The Fond Lambeau-Marteaux” por seu financiamento da pesquisa. C Desmedt foi financiada por bolsa do FNRS.

**Correspondência :** Dr Denis Larsimont

Departamento de Patologia

Instituto Jules Bordet

Rua Heger-Bordet, 1

1000 Bruxelas, Bélgica

TEL: 32 2 541 31 15

FAX 32 2 541 32 81

Email: [denis.larsimont@bordet.be](mailto:denis.larsimont@bordet.be)

**Leitura rápida:** Correção do cromossomo 17 é essencial para o estado de amplificação do Her2 no câncer de mama

**Palavras-chave:** Her2, CEP 17, polissomia, câncer de mama

## Sumário

**Objetivo.** O trastuzumab é considerado como medicamento-chave no tratamento das mulheres com câncer de mama (CM) que superexpressam o HER-2, tanto na doença em estádios iniciais como na doença avançada. Logo, a avaliação precisa da amplificação do Her2 é essencial para identificar as pacientes com CM candidatas ao tratamento a base de trastuzumab. Este estudo teve por objetivo determinar o escore ótimo pelo método FISH, atualmente considerado como o teste de referência.

**Métodos.** O estado Her-2 e o número de cópias do CEP17 foram determinados por FISH em 893 amostras de CM. Três escores foram considerados:  $\text{Her2/CEP17} \geq 2$ ,  $\text{Her2} > 4$  ou  $\text{Her2} > 6$ . A expressão de proteína e a expressão gênica foram avaliadas, respectivamente, por imunohistoquímica (IHQ) em 584 amostras e pelo método mRNA-NASBA em 90 amostras.

**Resultados.** As amostras foram divididas em 5 grupos baseados nos resultados do FISH: grupo com (1) dissomia e amplificação, (2) grupo com dissomia e sem amplificação, (3) grupo com polissomia e amplificação, (4) grupo com polissomia e sem amplificação e (5) grupo com polissomia e discordância (10,8% dos casos, a maioria considerados positivos com o escore  $\text{Her2} > 4$  mas negativos com os demais escores). A melhor associação foi observada (1) entre o escore FISH  $\text{Her2/CEP17} \geq 2$  e  $\text{Her2} > 6$  ( $\kappa=0,906$ ,  $p < 10^{-6}$ ), (2) entre FISH, usando  $\text{Her2} > 6$  ou  $\text{Her2/CEP17} \geq 2$  e IHQ (3+ considerado como positivo) ( $\kappa > 0,650$ ,  $p < 10^{-6}$ ) ou NASBA ( $\kappa > 0,536$ ,  $p < 10^{-6}$ ), A polissomia teve um impacto no número de cópias do Her2 (mais elevada nos casos polissômicos em comparação aos dissômicos;  $p < 10^{-6}$ ), mas não teve impacto no

conteúdo de proteína e RNAm. O grupo com discordância apresentou (1) o número mais elevado de cópias do CEP17 ( $p < 3 \times 10^{-5}$ ), (2) Conteúdo similar de proteína Her-2 e RNAm quando comparado ao grupo NA, (3) porcentagem similar de amostras com RE positivo ao grupo sem amplificação e diferente do grupo com amplificação ( $p = ,004$ ), (4) uma concordância perfeita entre FISH/IHQ/NASBA foi observada em 68% dos casos usando  $\text{Her2/CEP17} \geq 2$ , 58% usando  $\text{Her2} > 6$  e 0% usando  $\text{Her2} > 4$ .

**Conclusão.** A melhor associação entre FISH/IHQ/NASBA foi observada com o escore  $\text{Her2/CEP17}$ ; sugere-se a utilização do  $\text{Her2} > 6$  como um escore alternativo.

## Introdução

O oncogene *Her-2/neu*, localizado no cromossomo 17, codifica um receptor transmembrana de tirosina-quinase que pertence à família do receptor do fator de crescimento epidérmico. A superexpressão da proteína é identificada em 20% a 30% dos CM em seres humanos e é causada por uma amplificação gênica em mais de 90% dos casos. A superexpressão e amplificação do oncogene foram associadas a pior prognóstico da doença e à presença de resposta à terapia com o anticorpo monoclonal humanizado anti-HER-2, chamado trastuzumab (Herceptin®), em pacientes com CM avançado, tanto como agente isolado (1,2) como em combinação com quimioterapia (3).

Recentemente, a primeira análise interina do uso de trastuzumab concomitante com ou após a quimioterapia adjuvante, demonstrou uma melhora estatisticamente significativa na sobrevida livre de doença (4,5) e na sobrevida global (5) das pacientes com CM em estádios iniciais. Portanto, a avaliação laboratorial do estado *HER-2/neu* se tornou um procedimento básico para o manejo apropriado das pacientes com CM (6).

O melhor método de identificação daquelas pacientes que devem ser tratadas com trastuzumab tem sido fonte de controvérsia. A imunohistoquímica (IHQ), para a qual vários anticorpos (monoclonais e policlonais) e sistemas de detecção são disponíveis, fornece resultados contraditórios. O HercepTest® (Dako, Glostrup, Denmark) é um método padrão desenvolvido com o intuito de sobrepor ou diminuir a variabilidade dos resultados de IHQ, mas às vezes apresenta resultados insatisfatórios (7). As preocupações a respeito da acurácia da IHQ usando cortes de

tecido fixado em formalina e embebido em parafina (8) estimularam o uso do método da hibridização *in situ* por imunofluorescência (FISH). Além disso, vários estudos demonstraram que o FISH é um melhor preditor de prognóstico e elegibilidade ao trastuzumab do que a análise IHQ (2,9,10), porque o primeiro exclui a maioria dos casos 2+, que parecem ter uma resposta mínima ao tratamento com trastuzumab (1,3) e não possuem mau prognóstico quando comparados com os casos 3+ (9,11). Como resultado, a maioria dos laboratórios costuma fazer a triagem de todos os casos pela IHQ e, então, selecionar casos para o teste FISH, ou utilizar o FISH como único método de quantificação do HER-2/*neu*. Desta forma, uma avaliação exata do estado Her-2/*neu* baseada na amplificação gênica usando FISH se tornou um fator essencial no manejo das pacientes com CM.

Atualmente existem dois métodos de FISH aprovados pelo FDA com definições diferentes de amplificação do gene Her-2/*neu*: (1) o teste Ventana Inform<sup>TM</sup> que mede somente o número de cópias do gene Her-2/*neu*, (2) o teste Vysis PathVysion<sup>TM</sup> que inclui uma sonda dupla para o cromossomo 17. Os tumores com uma contagem absoluta do número de cópias do Her-2 por núcleo maior do que 4 para o sistema Ventana, ou com uma razão do número médio de cópias do gene Her-2 pelo número de cópias do CEP-17 maior ou igual a 2 no sistema Vysis são considerados como amplificados. Todavia, a proporção de amostras identificadas como apresentando amplificação Her-2/*neu* pela razão Her-2/CEP17 pode ser subestimada, já que numa pequena proporção de casos (~3%), o aumento do número de cópias do gene Her-2 é secundário à polissomia do cromossomo 17. Acredita-se que a superexpressão de proteína não seja resultado apenas de um aumento do número de cópias secundárias à amplificação gênica, mas também um

resultado do aumento concomitante do número de cópias do cromossomo 17. Assim sendo, estas pacientes poderiam ser também candidatas potenciais ao tratamento com trastuzumab (12). Por outro lado, considerando somente o número absoluto de cópias do gene Her-2 para definir a amplificação, poderia ser superestimada a presença da amplificação gênica em 15% dos casos que apresentam número de cópias do gene Her-2 >4 e uma razão Her-2/CEP17 <2, neste caso, devido à polissomia (12). Na verdade, não existe nenhum consenso definitivo sobre o sistema de escore ótimo para avaliar o estado Her-2. Alguns investigadores (2,9,10, 13-15) demonstraram que para evitar o aumento do número de cópias do gene Her-2 consequente à polissomia do cromossomo 17, a correção do cromossomo 17 é essencial para determinar o verdadeiro estado de amplificação gênica, enquanto outros autores (16,17) acreditam que isto é desnecessário. Portanto, é imperativo o estabelecimento de um valor de corte ou de um sistema FISH de escore adequado para a avaliação do Her-2, que inclua o subgrupo de pacientes com polissomia do cromossomo 17.

O objetivo principal deste estudo foi determinar o sistema ótimo de escore no método FISH para detectar a amplificação do Her-2/*neu* nas pacientes com CM, particularmente para os tumores com polissomia do cromossomo 17. Também foi examinado como o uso do escore Vysis ou Ventana podem influenciar na determinação de tumores como sendo amplificados ou não amplificados, e estes resultados foram correlacionados com dados de IHQ usando o anticorpo CB11 e a amplificação sequencial de ácidos nucleicos (NASBA) para a análise do RNAm do Her-2.



## **Materiais e Métodos**

### Amostras

As amostras de peças anátomo-patológicas de pacientes com CM utilizadas foram enviadas ao departamento de Patologia do Instituto Jules Bordet, na Bélgica, para avaliação de rotina pelo método FISH (12). O número de cópias do gene *Her-2/neu* e o número de cópias do CEP17 já haviam sido determinados para 893 amostras embebidas em parafina através da técnica PathVision (Abbott-Vysis) do método FISH (12). Destas, 584 já haviam sido avaliadas pelo método de IHQ (anticorpo monoclonal CB11, Novocastra) (12). Para o método NASBA, foram obtidas 90 amostras congeladas deste grupo, todas com mais de 70% de células tumorais invasivas e coletadas no Instituto Jules Bordet. O método NASBA foi executado no Departamento de Genética Humana, em BioMérieux, na França. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto Jules Bordet.

### Critério para positividade do FISH e polissomia

As amostras com uma razão  $Her-2/CEP17 \geq 2,0$  ou com uma contagem absoluta de número de cópias de *Her-2* por núcleo  $> 4,0$  ou  $> 6,0$  foram consideradas como amplificadas. O último escore citado faz parte do método CISH (hibridização cromogênica *in situ*), uma técnica com características e vantagens tanto da IHQ (microscopia de rotina, baixo custo e familiaridade) como do FISH (controle interno próprio, escore subjetivo). No entanto, atualmente, esta técnica não está aprovada

para a seleção de pacientes elegíveis para o tratamento com trastuzumab. Como descrito anteriormente (12), os pontos de corte para as alterações do número de cópias do cromossomo 17 foram estimadas para cada grupo de acordo com padrões publicados (13,18-22) e adaptados para núcleos que tenham sido alterados nos cortes de parafina. Os espécimes com número de cópias do cromossomo 17 no intervalo de 1,5 a 2,25 sinais por célula foram definidos como apresentando dissomia do cromossomo 17. Os demais casos foram considerados como tendo aneussomia do cromossomo 17, tanto hipodissomia ( $< 1,5$  sinal/célula) como polissomia ( $> 2,25$  sinais/célula).

#### Duplex real time NASBA

O RNA total foi extraído de 5 cortes de 10  $\mu\text{m}$  de cada amostra congelada usando o reagente TRIZOL<sup>®</sup> de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Canada). A integridade do RNA e a quantificação foram determinadas com o RNA 6000 Nano LabChip (Agilent, Waldbronn, Germany). A medida quantitativa do RNA mensageiro do Her-2 foi feita com 50ng do RNA total pela reação NASBA duplex usando ciclofilina B (PPIB) como gene normalizador como descrito previamente (23). Os *forward* e *reverse primers*, assim como o *molecular beacon* para o Her-2/*neu* e os genes PPIB são descritos na tabela 1.

## **Análise estatística**

O presente trabalho se concentrou na determinação do ponto de corte ótimo para definir a amplificação do *Her-2/neu* e na associação da expressão do HER-2 a nível transcricional e translacional. Além disso, a associação entre os vários subgrupos, definida com base nos resultados do FISH e em dados clínico-patológicos (RE, Ki-67, tamanho do tumor, grau histológico, envolvimento linfonodal) também foram avaliados. Análises descritivas padronizadas foram conduzidas. A associação entre os parâmetros foi avaliada usando o coeficiente de concordância Kappa (para variáveis binárias), Mann-Whitney (para variáveis binárias versus variáveis contínuas) e testes Qui-quadrado. O valor do  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS para windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## **Resultados**

### **A polissomia do cromossomo 17 é responsável pela discordância no estado *Her-2/neu* como definido pelos diferentes sistemas de escore FISH utilizados.**

O número de cópias do gene *Her-2/neu* e o número de cópias do CEP17, avaliados por FISH, foram disponíveis em 893 amostras (12). Para 96 de 893 (10,75% dos casos), o estado *Her-2/neu* foi considerado como discordante de acordo com os 3 critérios de amplificação do FISH utilizados: a razão  $Her-2/CEP17 \geq 2$ , o número absoluto de genes *Her-2*  $> 4$ , e o número absoluto de gene *Her-2*  $> 6$  (critério CISH).

Entre os 96 casos discordantes: (1) 54 amostras (56%) foram consideradas como amplificadas com escore Her-2>4 mas não pelos demais critérios, (2) 21 amostras (22%) foram consideradas como não-amplificadas com o escore Her-2>6, mas amplificadas com os demais critérios, (3) 13 (13,5%) e 8 amostras (8%) foram consideradas, respectivamente, como não amplificadas e amplificadas, com o escore da razão Her-2/CEP17 contrário aos demais critérios.

Como apresentado na tabela 2, 78% (75/96) da discordância foi observada entre o critério Her-2>4 e os outros dois critérios, e 44% (42/96) entre o critério Her-2>6 e o escore da razão Her-2/CEP17. Portanto, na população em geral, a melhor associação entre os critérios de FISH foi observada entre o sistema da razão Her-2/CEP17 e o sistema de escore de cópias Her-2>6 ( $\kappa=0,906$ ,  $p<10^{-6}$ ), quando comparado com a associação entre as cópias de Her-2>4 e os outros 2 sistemas de escore ( $\kappa=0,832$  com razão Her-2/CEP17 e  $\kappa=0,833$  com Her-2>6,  $p<10^{-6}$ ).

Para a maioria dos casos, a discrepância entre as avaliações do estado Her-2/*neu* foi devida à presença da aneuploidia do cromossomo 17 : 71/96 casos (74%) apresentaram polissomia do CEP17 e 4/96 casos(4%) apresentaram uma hipodissomia do CEP17. As amostras com hipodissomia não foram consideradas nas análises, já que a proporção de casos com hipodissomia foi <10% (80/893) e os casos com hipodissomia e discordantes foram <0,5% (4/893) da população total.

As amostras foram divididas em 5 grupos maiores, de acordo com o número de cópias do CEP17 e o número de cópias do Her-2/*neu* : (1) dissomia e amplificação, (2) grupo com dissomia e sem amplificação, (3) grupo com polissomia e amplificação, (4) grupo com polissomia e sem amplificação e (5) grupo com

polissomia e discordância (em relação à amplificação). A comparação dos diferentes grupos revelou que a polissomia-17 tem um impacto no número de cópias do Her-2, já que o número de cópias do gene foi estatisticamente maior nos grupos com polissomia contra os grupos com dissomia ( $p < 10^{-6}$ ). Adicionalmente, um número estatisticamente maior de cópias do CEP17 foi observado nos casos com polissomia e amplificados contra os casos com polissomia e sem amplificação ( $p = 0,005$ ). No subgrupo discordante e com polissomia, que apresentou o maior número de cópias do CEP17 (todos com  $p < 3 \times 10^{-6}$ ), a polissomia por si só foi responsável por um número estatisticamente maior de cópias do gene Her-2/*neu*, quando comparada ao subgrupo de polissomia e sem amplificação ( $p < 10^{-6}$ ) (veja tabela 3).

### **Associação entre a IHQ e os três métodos de escore do FISH**

Para determinar o sistema de escore ótimo de avaliação do estado de amplificação do Her-2/*neu*, a associação entre o estado do FISH, de acordo com os 3 sistemas de escore, e os dados de IHQ foram testadas em 584 casos.

Como descrito na tabela 3, nenhuma diferença estatisticamente significativa pôde ser observada entre os subgrupos com polissomia e dissomia sem amplificação em termos de expressão de proteína HER-2 (0,1+,2+ *versus* 3+). Ainda importante, uma diferença não estatisticamente significativa foi observada entre as amostras sem amplificação e com polissomia e as amostras discordantes ( $p = 0,209$ ). Portanto, as cópias de gene adicionais induzidas pela polissomia, principalmente nos casos discordantes (quando comparados com o subgrupo polissômico e sem amplificação,  $p < 10^{-6}$ ) não foram associadas com a superexpressão do HER-2. Todavia, em 3 dos 161 casos com IHQ 3+, a superexpressão foi atribuída à

polissomia do cromossomo 17 e confirmada em 2 casos pelo uso do Herceptest (dados não mostrados).

Quando foi considerada a IHQ 3+ como positiva para o HER-2, o coeficiente de associação kappa entre os dados de IHQ e o FISH dicotomizados de acordo com os 3 sistemas de escore foi de 0,689 usando o Her-2>6, 0,650 usando a razão Her-2/CEP17 e 0,556 usando Her-2>4 (todos  $p < 10^{-6}$ ). As concordâncias entre os dados de IHQ e FISH de acordo com os 3 sistemas de escore estão resumidas na tabela 4 para o subgrupo dos carcinomas de mama com polissomia e discordantes. Com o escore FISH Her-2>4, 42 amostras classificadas como amplificadas não apresentavam escore de IHQ 3+. Ao contrário, com os outros dois sistemas de escore, somente 1 de 4 amostras classificadas como sem amplificação foram consideradas como 3+ por IHQ. Portanto, a concordância entre o FISH e a IHQ foi observada em 10,6% das amostras quando o escore Her-2>4 foi utilizado, em 87% quando o escore Her-2>6 foi utilizado e 81% quando a razão Her-2/CEP17 foi utilizada.

#### **Associação entre a expressão de RNAm (medido pelo NASBA) e o FISH de acordo com os três métodos de escore.**

Em 90 casos com amostras congeladas disponíveis, o conteúdo de RNAm do Her-2 foi medido pelo método NASBA, com o objetivo de determinar qual o sistema de escore do FISH confere a melhor concordância entre a amplificação gênica e a expressão gênica do Her-2/*neu*. As amostras foram distribuídas em 4 grupos: 24 amostras foram consideradas como dissômicas e com amplificação, 22 como polissômicas e com amplificação, 21 como polissômicas e sem amplificação e 23 como discordantes e com polissomia (de acordo com o critério FISH).

Em termos de conteúdo de RNAm do Her-2, nenhuma diferença estatisticamente significativa pode ser observada entre os grupos com amplificação polissômicos e dissômicos, enquanto que uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos com amplificação e o subgrupo com polissomia e sem amplificação (ambos com  $p < 4 \times 10^{-5}$ ). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os casos com polissomia e sem amplificação em relação aos casos discordantes. Portanto, o número mais elevado de cópias de gene induzidas pela polissomia, nos casos discordantes, não esteve associado com maior expressão gênica.

A melhor associação entre o método NASBA e o FISH foi observada usando o escore da razão Her-2/CEP17 ( $Z = -5,376$ ) e Her-2>6 ( $Z = -5,392$ ) quando comparado com o critério Her-2>4 ( $Z = -3,992$ ) (todos com  $p < 7 \times 10^{-5}$ ). Usando um corte de  $> 0,078$  (razão do número de cópias Her-2/PPIB) para NASBA como previamente publicado (24), a associação kappa entre FISH e NASBA foi de 0,564 para Her-2>6, 0,536 para a razão Her-2/CEP17 e 0,325 para Her-2>4 (todos com  $p < 3 \times 10^{-5}$ ). A concordância entre o sistema de escore FISH e o NASBA para o subgrupo de carcinomas de mama discordante está resumido na tabela 5. Com o escore de FISH Her-2>4, 19 pacientes classificados como com amplificação pelo método FISH não expressaram o RNAm; este número decresceu para 3 e 1 pacientes com os outros dois sistemas de escore. Pelo contrário, 3 e 4 pacientes com altos níveis de RNAm (todos com IHQ 2+) foram classificados como sem amplificação pelos critérios de FISH Her-2>6 e razão Her-2/CEP17. Portanto, 17%, 74% e 83% das amostras foram concordantes de acordo com o NASBA e escore Her-2>4, Her-2>6 e razão Her-2/CEP17, respectivamente.

Uma concordância perfeita entre FISH, IHQ e NASBA foi observada em 68% dos casos com o critério razão Her-2/CEP17, em 58% com o critério Her-2>6 e em 0% com o critério Her-2>4. Portanto, a correção para o cromossomo 17 apareceu como o sistema de escore ótimo para a avaliação da amplificação por FISH. O escore Her-2>6 poderia ser usado como um critério alternativo, mesmo se entre as 5 amostras com estado discordante para os critérios Her-2>6 ou a razão Her-2/CEP17 não tenham mostrado nenhuma proteína (IHC<3+) e nenhuma expressão de RNAm (exceto uma) em 4 amostras com uma contagem absoluta de cópias de gene >6. O critério Her-2>4 apareceu como o pior sistema de escore como mostrado na figura 1. Os autores observaram que o ponto de corte mínimo para um número absoluto de cópias de Her-2 deve ser > 6 cópias a fim de obter uma boa associação entre FISH e NASBA ou IHQ ; a associação com IHQ ou NASBA sendo aumentada para em 1,5 com ponto de corte >6 preferido a >4.

### **Características biológicas dos tumores com polissomia com estado Her-2/neu discordante de acordo com os 3 métodos de escore do FISH.**

Para a maioria das 584 amostras para as quais os dados IHQ são apresentados, outros parâmetros clínico-patológicos como o Ki-67, o estado do receptor de estrogênio, o tamanho do tumor, o grau histológico e o estado linfonodal estavam disponíveis (veja tabela 6). Houve uma porcentagem estatisticamente mais elevada de tumores altamente proliferativos (Ki-67 > 25%) na amostras com amplificação quando comparadas às amostras sem amplificação ( $p=0,034$ ). No entanto, quando a polissomia foi considerada, observou-se que a proporção de tumores altamente proliferativos no subgrupo de tumores com polissomia e sem amplificação foi estatisticamente maior quando comparada ao subgrupo dissômico



não amplificado ( $p=0,032$ ), uma proporção similar àquela dos subgrupos dissômicos e polissômicos com amplificação.

A porcentagem de tumores com RE positivo não foi estatisticamente diferente entre os subgrupos com polissomia e com dissomia, mas foi menor nos grupos amplificados quando comparado aos grupos sem amplificação ( $p=0,004$ ). Interessante notar que os casos discordantes apresentaram uma porcentagem de tumores com RE positivo similar àquela dos grupos sem amplificação. Nenhuma diferença estatística foi observada de acordo com o tamanho do tumor, o grau histológico e o estado linfonodal.

## **Discussão**

Para determinar o sistema ideal de escore do FISH que permita selecionar os pacientes que poderiam se beneficiar do tratamento com trastuzumab, 3 critérios para a positividade do FISH foram considerados e os estados resultantes foram comparados com os dados da IHQ e do NASBA-RNA. Como previamente publicado (25,26), uma boa concordância entre os critérios do FISH (razão Her-2/CEP17 $\geq 2$  e Her-2 $>4$ ) foi observada para os casos com dissomia e para os casos com polissomia baixa, bem como para os casos com um aumento nítido do número de cópias do Her-2 consequente à amplificação do gene Her-2. Os casos problemáticos, para os quais as discrepâncias foram observadas dependendo do critério FISH utilizado, foram amostras sem amplificação gênica, mas com um número aumentado de cópias do gene Her-2 secundária à elevada polissomia do cromossomo 17 ( $>3$  cópias por célula); um resultado que está de acordo com a observação de Lal e col (26). Na população estudada, estas amostras correspondem

a 10% dos casos, para os quais os pacientes são elegíveis para o uso de trastuzumab segundo o critério Her-2>4, mas não elegíveis com o critério razão Her-2/CEP17.

Observou-se claramente que a polissomia do cromossomo 17 teve um impacto no número de cópias do Her-2. Por um lado, um número de cópias de Her-2 estatisticamente mais elevado foi observado nos grupos com polissomia quando comparados com os grupos com dissomia; por outro lado, o grupo com amplificação e polissomia apresentou um número maior de cópias do CEP17 quando comparado ao grupo sem amplificação e com polissomia, como previamente publicado (19,27). O desafio foi de determinar se as cópias adicionais do gene Her-2 consequentes à polissomia do cromossomo 17 poderiam ser suficientes para induzir uma superexpressão da proteína HER-2, e consequentemente, que estes pacientes poderiam ser elegíveis para o tratamento com trastuzumab. Os resultados demonstraram claramente que, na ausência da amplificação do gene Her-2, a polissomia do cromossomo 17 resultou em um aumento modesto do número de cópias do gene *Her-2/neu* e, consequentemente, no raro aumento da proteína HER-2 e no conteúdo de RNAm, como publicado anteriormente (14,19,28-30), exceto para um pequeno número de casos (3/161 com IHQ 3+) que tiveram mais de 10 cópias de CEP17 por célula. Como consequência, a correção do cromossomo 17 se torna essencial para a determinação do verdadeiro estado de amplificação do gene Her-2 no câncer de mama. Estes resultados foram corroborados pelo fato de que a melhor associação entre FISH, IHQ e NASBA foi observada com o critério razão Her-2/CEP17, o que está de acordo com outros estudos (26,28). Wang e col (28) demonstraram que o método FISH utilizando o critério Her-2/CEP17 atingiu maior

concordância com a quantificação IHQ assistida por analisador de imagem do que o critério Her-2>4. Desse modo, Lal e col (26) observaram que mais tumores IHQ negativos eram FISH positivos com o critério Her-2>4. Portanto, a razão Her-2/CEP17, que considerou a maioria destes casos como não amplificados, apareceu como um melhor sistema de escore para refletir a verdadeira biologia do tumor. Adicionalmente, a comparação das características biológicas demonstraram que as amostras com polissomia e discordantes são biologicamente mais similares às amostras sem amplificação e com polissomia. Além disso, os autores observaram, como já previamente publicado (27,31) que a superexpressão/amplificação foi associada com uma menor proporção de sem amplificação.

Alternativamente à razão Her-2/CEP17, o critério absoluto Her-2>6 poderia ser usado como um bom sistema de escore. Uma publicação recente recomendou a mudança da média do ponto de corte do número de sinais de Her-2 para igual ou superior a 6 pelo método Ventana-Inform, a fim de englobar os casos discrepantes com polissomia do cromossomo17 (32). Os autores observaram neste presente trabalho que o número mínimo de cópias do gene Her-2 para que haja uma boa correlação entre FISH, IHQ e NASBA deve ser maior do que 6. Este sistema de pontuação poderia também ser muito útil para os casos com mais de 10 cópias de CEP17 por célula e IHQ 3+. Esta hipótese precisa ser confirmada em um número maior de amostras.

Os três estudos clínicos randomizados adjuvantes recentemente publicados com a administração de trastuzumab na terapia adjuvante utilizaram tanto a IHQ e /ou o FISH para avaliar o grau de superexpressão da proteína e/ou a amplificação

gênica do Her-2. Todavia, com o advento dos primeiros resultados significativamente positivos destes estudos clínicos, torna-se muito importante limitar o número de casos falso-positivos, principalmente porque o trastuzumab foi adotado recentemente como parte do tratamento adjuvante do CM em estádios iniciais que apresentam positividade para o Her-2. Apesar dos resultados de um perfil de toxicidade adequado num seguimento mediano de 1 a 2 anos nestes estudos clínicos, ainda existe a preocupação sobre a cardiotoxicidade a longo prazo do trastuzumab. Logo, limitando o número de casos falso-positivos, o uso da razão Her-2/CEP17 limitaria o número de pacientes que seriam expostos aos potenciais efeitos indesejáveis da terapia com o trastuzumab e que não teriam benefício terapêutico. Além disto, a correlação entre o sistema de escore e a eficácia ao tratamento deveria ser avaliada nos pacientes tratados com trastuzumab.

Finalmente, os autores descrevem que as amostras com polissomia, independentemente da amplificação do Her-2, são altamente proliferativas. Várias publicações apontaram a possível relação entre a proliferação e a polissomia, mas nenhuma conclusão definitiva foi cogitada. Este resultado poderia sugerir tanto que a polissomia do cromossomo 17 seria capaz de induzir a superexpressão da proteína implicada na proliferação, como sugerir que a hipodissomia seja um artefato ocasionado pela divisão celular. As análises dos estados de outros cromossomos estão em andamento para corroborar uma destas duas hipóteses.

Em conclusão, os autores demonstraram que a correção do cromossomo 17 é o sistema de escore ótimo para a avaliação da amplificação por FISH. Alternativamente, um número absoluto de cópias do gene Her-2 maior ou igual a 6

poderia ser usado; este ponto de corte é superior ao ponto de corte de mais de 4 cópias, já que inclui menos resultados falso-positivos. Os resultados deste trabalho sugerem que o carcinoma do subgrupo com polissomia para o cromossomo 17 sem a amplificação do gene *Her-2/neu* se comporta da mesma forma que os tumores sem amplificação. Todavia, esta afirmativa ainda precisa ser confirmada nos pacientes tratados com trastuzumab.

## Referências

1. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al: Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648, 1999
2. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al: Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726, 2002
3. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *N Engl J Med* 344: 783-792, 2002
4. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 353:1659-1672, 2005
5. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-1684, 2005
6. Shak S: Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol* 26: 71-77, 1999

7. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al: Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 17:1983-1987, 1999
8. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al: Real-world performance of HER2 testing—National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 94: 852–854, 2002
9. Pauletti G, Dandekar S, Rong HM, et al: Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 18: 3651-3664, 2000
10. Mass R, Sanders C, Charlene K, et al: The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Herceptin pivotal trials. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19:75a, 2000 (abstr)
11. Birner P, Oberhuber G, Stani J, et al: Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 7:1669-75, 2001
12. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, et al: Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 11:4393-9, 2005
13. McCormick SR, Lillemoe TJ, Beneke J, et al: HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization:

- comparison of HercepTest and PathVysion commercial assays. *Am J Clin Pathol* 117:935-943, 2002
14. Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, et al: Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn* 5:155-159, 2003
  15. Lehr HA, Jacobs TW, Yaziji H, et al: Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. *Am J Clin Pathol* 115:814-822, 2001
  16. Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, et al: Determination of HER-2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 13:37-45, 2000
  17. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, et al: Discrepancies in laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 19:2714-2721, 2001
  18. Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, et al: HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 77:148-54, 2002
  19. Bose S, Mohammed M, Shintaku P, et al: Her-2/neu gene amplification in low to moderately expressing breast cancers : possible role of chromosome 17/HER-2/NEU polysomy. *Breast J* 7:337-344, 2001



20. Varshney D, Zhou Y-Y, Geller S-A, et al: Determination of Her-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing Herceptests and pathvision FISH assay. *Am J Clin Pathol* 121: 70-77, 2004
21. Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, et al: Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancers. *Cancer Res* 62:1481-8, 2002
22. Grushko TA, Dignam JJ, Das S, et al: MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. *Clin Cancer Res* 10: 499-507, 2004
23. Verjat T, Cerrato E, Jacobs M, et al: Multiparametric duplex real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for mRNA profiling. *Biotechniques* 37: 476-81, 2004
24. Lamy PJ, Verjat T, Paye M et al. NASBA : a novel approach to assess hormonal receptors and ERBB2 status in breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 44 (1):3-12.
25. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E et al: Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays. *J Clin Pathol* 53: 374-381, 2000
26. Lal P, Salazar PA, Hudis CA, et al: HER-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridisation. *Am J Clin Pathol* 121: 631-36, 2004

27. Espinosa AB, Taberner MD, et al: Her-2/neu gene amplification in familial vs sporadic breast cancer impact on the behavior of the disease. *Am J Clin Pathol* 120: 917-27, 2003
28. Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP, et al: Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Mod Pathol* 15:137-145, 2002
29. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, et al: The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: A fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol* 29:1221-27, 2005
30. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, et al: The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 29: 1221-1227, 2005
31. Taucher S, Rudas M, Mader RM, et al: Do we need HER-2/neu testing for all patients with breast carcinoma? *Cancer* 98: 2547-2553, 2003
32. Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA: Comparative assays for the Her-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 128: 62

Tabela 1. *Primers* e seqüências de *molecular beacons* para ensaio de NASBA RNA mensageiro

<b>Primer</b>	<b>Seqüência (5'&gt;3')</b>	<b>Posição</b>
ERBB2 P1(T7)	aattctaatacgcactcactatagggagaaggGAGCCAGCCCGAAGTCTGTA	2567-2586
ERBB2 P2	TCTTAGACCATGTCCGGGAAA	2733-2752
PPIB P1(T7)	aattctaatacgcactcactatagggagaaggCAGGCTGTCTTGACTGTCGTGA	449-470
PPIB P2	AGGAGAGAAAGGATTTGGCT	231-250
<b>Molecular Beacon</b>		
<b>Molecular Beacon</b>	<b>Seqüência (5'&gt;3')</b>	<b>Posição</b>
ERBB2	FAM- <i>cgatcg</i> GGAGGATGTGCGGCTCGTAC <i>cgatcg</i> -Dabsyl	2658-2677
PPIB	ROX- <i>cgatcg</i> GATCCAGGGCGGAGACTTC <i>cgatcg</i> -Dabsyl	291-310

Os *primers* oligonucleotídeos *antisense* 3' são alongados com uma seqüência de reconhecimento promotora T7, indicada em letras minúsculas. As seqüências *stem* dos *beacons* são indicadas em letras minúsculas em itálico. As posições referem-se aos números de acesso no GenBank, MN\_00448 para ERBB2 e M60857 para PPIB.

Tabela 2. Associação entre os três sistemas de escore do FISH

Cópias de Her-2 >4	Cópias de Her-2 >6		N° total de casos	Cópias de Her-2 >4	Razão Her2/CEP17		N° total de casos	Cópias de Her-2 >6	Razão Her-2/CEP17		N° total de casos
	Negativo	Positivo			Negative	Positive			Negativo	Positivo	
Negativo	8	0	8	Negativo	0	<b>8</b>	8	Negativo	54	<b>29</b>	83
Positivo	<b>75</b>	13	88	Positivo	<b>67</b>	21	88	Positivo	<b>13</b>	0	13
N° total de casos	83	13	96	N° total de casos	67	29	96	N° total de casos	67	29	96

Tabela 3. Número de cópias de Her-2 e CEP17 e expressão da proteína HER-2 nos 5 subgrupos

Subgrupos Marcadores Biológicos	Dissomia e amplificação	Dissomia e sem amplificação	Polissomia e amplificação	Polissomia e sem amplificação	Polissomia e discordância
Número de cópias Her-2 (mediana)	14,75	2,08	16,30	3,2	4,98
Número de cópias CEP-17 (mediana)	1,94	1,87	2,9	2,62	<b>3,26</b>
HER-2 IHQ 0/1+	1,85%	36,34%	1,7%	31,51%	17%
2+	25,8%	<b>63%</b>	29,2%	<b>65,75%</b>	<b>74,5%</b>
3+	<b>72,35%</b>	0,66%	<b>69,1%</b>	2,74%	8,5%

Tabela 4. Associação entre IHQ e FISH de acordo com o sistema de escore

HER-2 IHQ	Cópias de Her-2 >4		N° total de casos	Cópias de Her-2 >6		N° total de casos	Razão Her-2/CEP17		N° total de casos
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
0,1+,2+	1	<b>42</b>	43	38	5	43	38	5	43
3+	0	4	4	<b>1</b>	3	4	<b>4</b>	0	4
N° total de casos	1	46	47	39	8	47	46	17	47

Tabela 5. Associação entre NASBA e FISH de acordo com o sistema de escore

NASBA	Cópias de Her-2 >4		N° total de casos	Cópias de Her-2 >6		N° total de casos	Razão Her-2/CEP17		N° total de casos
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
Negativo	0	<b>19</b>	19	16	<b>3</b>	19	18	<b>1</b>	19
Positivo	0	4	4	<b>3</b>	1	4	<b>4</b>	0	4
N° total de casos	0	23	23	19	4	23	22	1	23

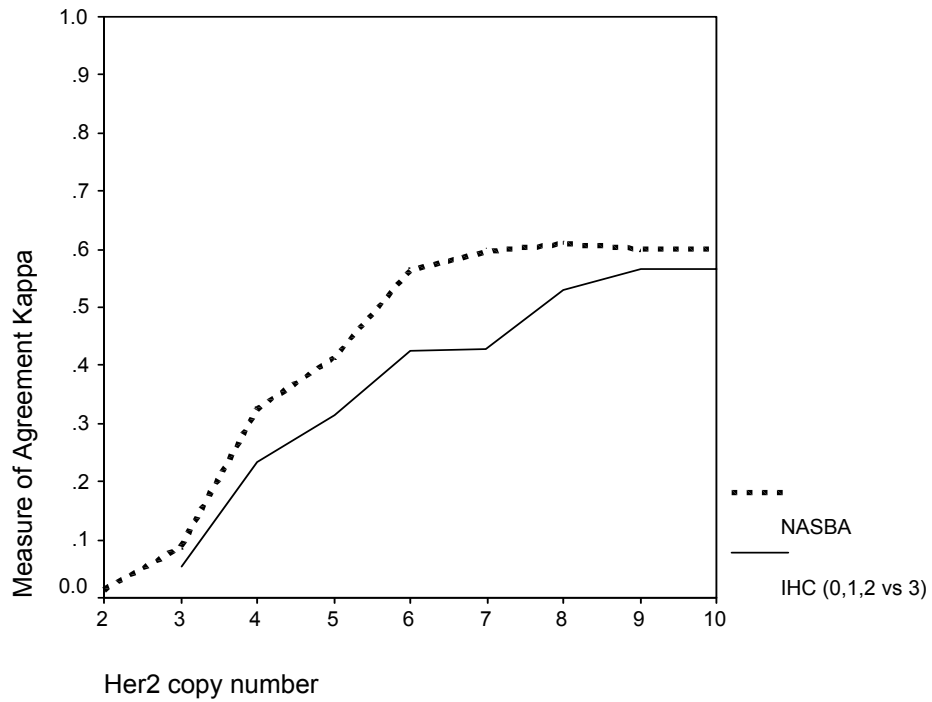
---

Tabela 6. Características biológicas dos 5 subgrupos

Subgrupos Marcadores Biológicos	Dissomia e amplificação	Dissomia e sem amplificação	Polissomia e amplificação	Polissomia e sem amplificação	Polissomia e discordantes
Ki-67 >25% (%)	34/76 (44.7)	29/106 (27.36)	31/67 (46.27)	24/53 (45.3)	11/33 (33.3)
RE ≥ 2 (%)	41/76 (53.94)	91/121 <b>(75.2)</b>	46/76 (60.5)	36/54 (66.6)	28/34 <b>(82.35)</b>
Tamanho > 2 cm (%)	31/66 (46.97)	36/81 (44.45)	21/57 (36.8)	16/43 (37.2)	13/27 (48.1)
Grau 3 (%)	50/81 <b>(61.73)</b>	47/106 (44.33)	43/63 <b>(68.25)</b>	29/53 (54.7)	13/27 (48)
Tipo ductal (%)	70/85 (82.35)	92/111 (82.88)	67/72 (93)	51/57 (89.5)	28/32 (87.5)
>4 linfonodos positivos (%)	24/51 (47)	42/73 (57.5)	31/49 (63.26)	23/37 (62.16)	11/20 (55)
Contagem	123	152	120	73	47



Figura 1. Associação entre NASBA ou IHQ e FISH de acordo com a média de corte do número de sinais do Her-2



Número de cópias de Her-2	>2	>3	>4	>5	>6	>7	>8	>9	>10
% nasba positivo	39	42	51	54	60	63	63	63	60
% IHQ 3+	32	34	41	46	52	56	63	69	68

## **Artigos da tese em inglês**

---

# Adjuvant treatment of early breast cancer

Lissandra Dal Lago, Chantal Bernard-Marty, Martine J. Piccart

*Medical Oncology Clinic, Institut Jules Bordet, Brussels, Belgium*

## Introduction

The 2005 St. Gallen consensus guidelines represent a major shift from adjuvant treatment decision making based primarily on "risk of relapse" towards treatment decision-making based primarily on endocrine responsiveness.

For tumours exhibiting a molecular profile that leaves little doubt about response to hormonal manipulation, the selection of the endocrine treatment offering the best benefit versus risk ratio for the individual woman is the priority. The addition of a few chemotherapy (CT) cycles prior to the start of adjuvant endocrine therapy will be considered in patients at high risk of relapse (such as those with  $\geq 4$  positive nodes).

For tumours exhibiting molecular features that leave uncertainty about responsiveness to endocrine therapy, more weight will be given to the role of sequential chemo-endocrine treatment and of the selection of endocrine agents that may have a greater chance of activity when these molecular features are present.

Finally, it is for non-endocrine responsive tumours that extreme care will need to be taken in selecting the adjuvant CT regimen, since it will represent the only "weapon" against potential micrometastases. These tumours are likely to be the ones that benefit most from the introduction of non cross resistant cytotoxic agents in the treatment scheme, as well as from fine tuning of cytotoxic dose and schedule.

In order to make these delicate treatment decisions in the optimal way, oncologists need to have broad knowledge of the benefits and risks associated with adjuvant treatment modalities.

This article attempts to provide this knowledge in a concise way.

## Tailoring adjuvant therapies: a high priority in 2005

The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) meta-analysis, updated with 15 years of follow up of all randomised trials in this setting, reinforces the evidence of efficacy of adjuvant systemic therapies in reducing disease recurrence and

mortality in early breast cancer (EBC) [1]. These data provide average estimations of relative and absolute treatment benefits in the global population studied and are suboptimal for the appraisal of the complex heterogeneity of breast cancer (BC) [2].

Tailoring of adjuvant endocrine therapy (tamoxifen, ovarian ablation) has been based on the hormone receptor status of tumours: additional molecular markers or molecular 'signatures' are urgently needed now that aromatase inhibitors (AI) are entering the adjuvant scene, in order to identify subgroups that derive particular benefit from these more expensive agents.

Tailoring of adjuvant CT has been lacking so far: patients at higher risk of relapse (typically those with node positive disease) have been offered the more aggressive regimens in view of the incremental average gain in efficacy provided by these regimens in randomised trials. Retrospective, but now overwhelming, evidence indicates a much greater magnitude of CT benefit in estrogen receptor (ER) negative disease as compared to ER positive disease [3]. The next generation of prospective trials should ideally be run separately in hormone receptor positive and negative BC, allowing sufficient power for the identification of optimal systemic treatments for these two different diseases.

The use of microarray technology as a tool to dissect the molecular heterogeneity of BC and to improve treatment tailoring is increasing exponentially, with no routine clinical application thus far. Perou et al. [4] first described differences in gene expression profiles between clinically ER positive and ER negative BC tumours. Sorlie et al. [5] later refined the ER positive and negative tumour classification with the identification of different subgroups with distinct molecular signatures, each associated with distinct clinical outcomes.

Van de Vijver et al. [6] discovered a 70-gene prognostic signature in node negative BC patients without prior exposure to systemic therapy: the expression profile outperformed traditional clinical and pathological criteria in identifying patients with or without distant metastases. They claimed that the use of this signature would reduce the fraction of

women receiving adjuvant CT by about 30%. These challenging hypotheses need to be validated before such a prognostic molecular signature is implemented in clinical practice. For this reason, prior to the launch of a large prospective randomised trial (MINDACT), an external, independent validation of the 70-gene Amsterdam signature [6] based on 301 patients followed for a median of 10 years was conducted [7]. The 70-gene prognostic signature outperformed the Nottingham Prognostic Index, the St. Gallen 2003 criteria, and 'Adjuvant! On Line' in predicting time to distant metastases and overall survival. The women classified as low risk by the gene signature had a projected 5-year distant metastases free survival of 95% and a projected 10-year survival of 88%.

The European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) TRANSBIG multinational project MINDACT is the first large prospective trial that will investigate the role of the gene expression signature identified by Dutch researchers [6] as a tool to improve CT decision making for node negative EBC. This very ambitious trial could upgrade the gene signature level of evidence from a score of 3 to a score of 1, and lead to a major change in BC clinical practice.

This 'bench to bed-side' research process is critical if one wants to avoid both over-treatment, with its potential for severe complications, and under-treatment with deleterious consequences for patient survival.

### **Cytotoxics brought onto the adjuvant scene in the last decade**

The role of new cytotoxics such as taxanes, capecitabine, gemcitabine, and platinum compounds in the adjuvant setting is reviewed in this section.

#### *Taxanes*

The role of taxanes in the adjuvant setting is still under evaluation, despite promising preliminary results. In the literature, 19 trials evaluated the role of taxanes in this setting, with an expected accrual of 35,500 patients. So far, 8 trials have generated mature results, which are summarized in Table 1. The latest St. Gallen Consensus expert panel [16] has confirmed that there is still no level-1 evidence for the use of taxanes in the adjuvant setting for node negative BC. Regarding node positive BC patients, the expert panel remains divided in view of the suboptimal design of these trials, which mix hormone responsive and non-responsive populations and lack proper control of other variables, such as treatment duration.

The Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 9344 study [8], in which 3,121 node positive BC patients were included, evaluated whether increasing the dose of doxorubicin or adding of paclitaxel to a standard adjuvant CT regimen would improve disease free (DFS) and overall survival (OS). At 69 months median follow up, there was a statistically significant reduction in the risk of recurrence (17%) and death (18%) in the paclitaxel-containing arm. An unplanned subset analysis demonstrated a significant improvement in recurrence free survival (RFS) only for patients with ER negative tumours.

In the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) B-28 trial [9], 3,060 node positive BC patients were randomly treated either with the combination of cyclophosphamide and doxorubicin or the same regimen followed by paclitaxel. After a median follow up of 64 months, there was a statistically significant reduction in the risk of relapse, but no statistically significant reduction in the risk of death in the paclitaxel arm. The subset analysis according to HR and lymph node status did not demonstrate a significant difference regarding DFS, RFS and OS between the two arms. Of note, concomitant CT and tamoxifen administration in this trial is a potential confounding factor.

In the Breast Cancer International Research Group (BCIRG) 001 trial [11], 1,491 node positive BC patients were randomised to receive either FA<sub>50</sub>C (fluorouracil, doxorubicin 50 mg/m<sup>2</sup>, and cyclophosphamide) or TAC (docetaxel, doxorubicin 50 mg/m<sup>2</sup>, and cyclophosphamide). At a median follow up of 55 months, there was a statistically significant reduction in the risk of relapse (28%) and death (30%) in the docetaxel-containing arm. The improved DFS was independent of both HR and HER2 status. The magnitude of taxane-associated benefit appeared to be larger in the subset of 1–3 positive nodes as compared to the subset with more extensive nodal involvement.

The PACS 01 trial [13] compared 6 cycles of FE<sub>100</sub>C (fluorouracil, epirubicin 100 mg/m<sup>2</sup>, cyclophosphamide) to 3 cycles of FE<sub>100</sub>C followed by 3 cycles of docetaxel (100 mg/m<sup>2</sup>) in 1,999 women with node positive BC. At 60 months of follow up, there was a statistically significant reduction in the risk of recurrence and death for the sequential docetaxel arm (17% and 23%, respectively). A preplanned subset analysis suggests that the benefit is confined to patients with 1–3 positive nodes and to patients older than 50 years.

In a small M.D. Anderson trial [10], 524 patients were randomised to receive either 4 cycles of paclitaxel followed by 4 cycles of fluorouracil,

Table 1  
Taxanes in the adjuvant setting<sup>a</sup>

Study	Eligibility	Patients (n)	Regimens	Follow-up (mo)	Outcome	Comments
<b>Paclitaxel monotherapy</b>						
CALGB9344 (Henderson et al 2003 [8])	Node positive	3121	AC × 4 AC × 4 → P × 4 (A = 60, 75 or 90)	69	Increased DFS (HR 0.83; CI 0.73–0.94) and increased OS (HR 0.82; CI 0.71–0.95)	Subset analysis showed paclitaxel more beneficial in ER negative/unknown
NSABP B28 (Mamounas et al 2005 [9])	Node positive	3060	AC × 4 AC × 4 → P × 4	64	Increased RFS (HR 0.83; CI 0.73–0.95) No difference in OS	paclitaxel equally effective in ER positive and ER negative
MDACC (Buzdar et al 2002 [10])	N0 or node positive	524 <sup>b</sup>	FAC × 4 P × 4 → FAC × 4	60	No significant difference in RFS	Non-significant trend suggesting paclitaxel beneficial in ER negative patients
<b>Docetaxel monotherapy/combination</b>						
BCIRG 001 (Martin et al 2003 [11])	Node positive	1491	FAC × 6 DAC × 6	55	DFS: absolute benefit of 7% at 5 years (HR 0.72); also increased OS (HR 0.70) No significant difference in DFS and OS	Subgroup with 1–3 positive nodes seems to benefit the most
NSABP B-27 (Bear et al 2004 [12])	Neoadjuvant	2411	AC × 4 AC × 4 → D × 4			
PACS 01 (Fumoleau et al 2004 [13])	Node positive	1999	FEC (100) × 6 FEC(100) × 3 → D × 3	60	DFS improved with docetaxel (HR 0.83; CI 0.69–0.99); OS also improved (HR 0.77)	More pts in the FEC100 group with receptor negative tumor (22% vs 19%); women older than 50 years and those with 1–3 positive nodes benefit the most
US Oncology 9735 (Jones et al 2001 [14])	Stage I–III Node positive and negative	1015	AC × 4 DC × 4	43	Not reported	Long-term follow up needed
E 2197 (Goldstein et al 2005 [15])	Node negative (T > 1 cm) or Node positive	2952	AC × 4 AD × 4	59	No difference in DFS or OS	Better than expected outcome for both regimens

<sup>a</sup> D: docetaxel; F: 5-fluorouracil; A: doxorubicin; C: cyclophosphamide; E: epirubicin; P: paclitaxel; RFS: relapse-free survival; DFS: disease-free survival; OS: overall survival; HR: hazard ratio; CI: confidence interval

<sup>b</sup> 174 neoadjuvant; 350 adjuvant.

doxorubicin, and cyclophosphamide (FAC) or 8 cycles of FAC alone. At 60 months follow up, there was no statistically significant difference in RFS and OS between the two arms, although a trend favoured the taxane regimen.

In the neoadjuvant setting, the NSABP B-27 trial [12], conducted in 2,411 patients with operable BC, was designed to determine the effect of adding docetaxel after 4 cycles of preoperative doxorubicin and cyclophosphamide (AC). Despite a doubling in pathologic complete response rate, there was no statistically significant difference in terms of DFS and OS favouring the taxane arm. Like in NSABP-B28, tamoxifen was given concurrently with CT.

One relatively small but interesting trial, US Oncology 9735 [14], suggests that a non anthracycline, taxane-based regimen (docetaxel + cyclophosphamide) might be as good as 4 cycles of AC (doxorubicin-cyclophosphamide), while the larger Intergroup/E2197 trial found no advantage of AT × 4 (doxorubicin-docetaxel) over AC × 4 [15].

Up to now, adequately dosed anthracycline regimens remain an acceptable standard of adjuvant CT. The EBCTCG meta-analysis [1] with 15 years follow up, demonstrates that on average these regimens continue to be significantly more effective than CMF regimens in reducing disease recurrence and mortality from BC. There was no significant excess of secondary leukaemia and cardiac deaths, but long-term cardiac sequelae may occur and are not detected by overviews.

Unfortunately the place of taxanes in the adjuvant setting has not yet been validated with a level-1 evidence, due to trial design limitations. However, the threshold for prescribing anthracyclines followed by taxanes has been lowered for tumours devoid of HR, those showing a worrisome genetic make-up or when there is a fear of anthracycline-induced cardiotoxicity (HER2 overexpressing tumours fulfil the last two criteria).

Another important aspect to be considered is the high cost of treatment due to the increased use of epirubicin and taxanes in CT regimens [17]. Our public health systems are in jeopardy and this aspect should motivate an accelerated transition from empirical oncology ('one shoe fits all') to molecular oncology which will depend on high quality translational research linked to the clinical trials [18].

### Capecitabine

Capecitabine with its oral bioavailability and favourable side-effect profile is a very attractive drug for the

adjuvant setting. Capecitabine has demonstrated to be active in the metastatic setting, both as a single agent [19] and in combination with other agents such as docetaxel, paclitaxel, vinorelbine and anthracyclines [20]. Moreover, capecitabine combined with docetaxel has shown an improved OS when compared to docetaxel alone in metastatic BC [21].

Recently, the interim analysis of a randomised phase II trial in the neoadjuvant setting has shown that docetaxel/capecitabine provided higher clinical and pathological response rates compared to doxorubicin/cyclophosphamide (AC) in 121 eligible patients with stage II/III BC [22].

Capecitabine as a single agent is currently being evaluated in a phase III trial comparing capecitabine with CMF or AC regimens in elderly patients with early BC (NO17629). Capecitabine-based combinations, with paclitaxel and docetaxel, are also being evaluated in phase III trials as treatment for EBC (IDO1-580) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). A large registration study, conducted by US Oncology, compares post-operative treatment with four cycles of AC followed by four cycles of either docetaxel monotherapy or capecitabine/docetaxel. Capecitabine/docetaxel will be compared to anthracycline-based regimens in the large MINDACT trial, with particular attention paid to long-term sequelae, which are hoped to be reduced in the non anthracycline-based arm.

### Gemcitabine

This pyrimidine nucleoside antimetabolite has shown activity in a variety of solid tumours, with a favourable toxicity profile. As a single agent, gemcitabine yields response rates ranging from 14% to 37% as first-line treatment for advanced BC, and 12% to 30% as salvage therapy for patients previously treated with anthracyclines and/or taxanes. Phase II studies reported high response rates in combination with vinorelbine, platinum, and taxanes [23].

Five hundred and twenty-nine metastatic breast cancer (MBC) patients were randomly assigned to receive either paclitaxel (every 3 weeks) and gemcitabine, or paclitaxel alone. The combination arm reported higher response rates, longer time to progression, and longer survival [24].

Many randomised phase III trials are ongoing to identify the place of gemcitabine in the adjuvant setting: the Cancer Research Campaign Clinical Trials is comparing the effectiveness of adjuvant paclitaxel, epirubicin, and cyclophosphamide with or without gemcitabine in 3,000 patients ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). The tAnGo trial [25] will examine the sequence

of epirubicin and cyclophosphamide (EC) followed by paclitaxel alone or combined with gemcitabine in 3,000 EBC patients. Finally, a phase III trial conducted by the NSABP is comparing the DFS of three treatment arms in 4,800 node positive EBC patients: a dose dense (every 2 weeks) regimen of doxorubicin, cyclophosphamide, paclitaxel with or without gemcitabine and docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide.

#### *Platinum compounds*

Platinum compounds, which are widely used in oncology, are also active in metastatic BC, especially in first-line treatment [26], but the availability of less toxic drugs with more convenient ways of administration has limited their use in this setting. Preclinical studies have indicated that there is a synergy between platinum salts and the monoclonal antibody trastuzumab in human BC cell lines that overexpress HER2/neu [27].

These findings have led to two open-label phase II trials conducted by the Breast Cancer International Research Group (BCIRG) in HER2 overexpressing metastatic BC patients [28]. BCIRG 101 and UCLA-ORN have evaluated 2 platinum compounds, cisplatin and carboplatin, respectively, in combination with docetaxel and trastuzumab, in 124 patients. Overall response rates were 79% and 58%, respectively.

Both overall response (52% versus 32%;  $p=0.04$ ) and time to progression (11.2 months versus 6.9 months;  $p=0.007$ ) were significantly improved by the addition of platinum salts in a randomised phase III study in 188 HER2 overexpressing MBC patients treated with trastuzumab and paclitaxel, with or without carboplatin [29]. The ongoing BCIRG 007, which plans to enrol 466 patients with stage IIIb/IV BC that overexpress HER2, compares docetaxel and trastuzumab with or without carboplatin.

In the adjuvant setting, BCIRG is also running a large randomised study of 3,150 patients (BCIRG 006) comparing docetaxel, trastuzumab and carboplatin to doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab.

#### **New uses of older cytotoxic drugs**

The development of new drugs is not the only way to improve the survival impact of adjuvant CT. The manipulation of 'old' drugs with new doses and schedules, such as with the dose dense and metronomic approaches, could further improve the efficacy of adjuvant CT for EBC patients, particularly for those with HR negative tumours.

#### *Dose dense chemotherapy*

Historically, the interval between CT cycles has been dictated by neutrophil recovery kinetics. With most myelosuppressive agents used alone or in combination, peripheral granulocyte nadirs are reached around days 10–15 following CT administration and recovery is achieved around day 21. Norton and Simon [30] developed a mathematical kinetic model in order to determine the most effective way of administering non cross resistant cytotoxic drugs in an attempt to eradicate the cancer cell population. As a result of this work, they recommended sequential administration of these agents given in a dose-dense fashion.

A large phase III adjuvant trial was designed to validate this concept: the Intergroup Trial 9741, coordinated by the Cancer and Leukaemia Group B (CALGB) [31]. The study included 2,005 node positive BC patients in a two by two factorial design to test the two hypotheses that dose dense (every two weeks) and sequential (instead of concurrent) administration of CT regimens incorporating doxorubicin, cyclophosphamide and paclitaxel would improve DFS and OS. At a median follow up of 36 months, the sequential dose dense regimen demonstrated a statistically significant improvement in terms of DFS (85% versus 81%) and OS (92% versus 90%). The estimated 4-year DFS was 82% versus 75%.

Venturini et al. [32] used accelerated FEC (every 2 weeks) versus standard FEC in 1,214 node negative high risk, and node positive BC patients. This smaller study showed only a trend of improved OS in the dose dense arm.

The toxicity data in these two trials did not show statistically significant differences between the conventional and dose dense arms, at least in terms of short-term risks.

The majority of the other dose dense trials published have had negative results, probably explained by several trial design limitations. These include insufficient power, asymmetric arms with respect to drug administered, and/or use of sub-optimal doses [33].

#### *Metronomic chemotherapy*

Preclinical models elegantly show that the frequent administration of chemotherapeutic agents at lower doses (the so called 'metronomic' schedule) may optimize their anti-angiogenic properties [34]. Metronomic CT may be able to circumvent drug resistance by targeting normal tumour endothelial cells rather than genetically unstable tumour cells [35].

The IBCSG-22-00 trial is an ongoing randomised, open-label, multicenter study exploring the role of

metronomic CT (oral cyclophosphamide and methotrexate for 1 year) as consolidation therapy after completion of anthracycline or CMF-based adjuvant CT in approximately 1,330 EBC patients with HR negative BC ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Weekly paclitaxel has been successfully used in the treatment of advanced BC. The CALGB 9840 trial [36] conducted in 577 patients showed superiority of the weekly schedule over the 3-weekly schedule in terms of time to disease progression. Regarding toxicity, there was slightly less myelosuppression but more neurotoxicity with the weekly schedule when compared to the 3-weekly schedule of paclitaxel.

The ECOG1199/Intergroup trial should provide important information related to the relative merits of conventionally timed (3-weekly) versus metronomic CT. Around 5,000 patients have been randomised in one of four arms, containing standard AC followed by either docetaxel or paclitaxel given according to a weekly or 3-weekly schedule ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

### Optimal adjuvant endocrine therapy

Endocrine therapy is a key player in the adjuvant treatment of early BC, as evidenced by the demonstration that tamoxifen and, more recently, the AI, have had a profound impact on the course of early endocrine-responsive BC.

#### *Postmenopausal EBC patients (Table 2)*

The results of the 2005 EBCTCG meta-analysis [1] confirm that adjuvant hormone therapy for ER positive EBC in postmenopausal patients has a major long-term impact on DFS and BC mortality. Until recently, tamoxifen has been considered the gold standard treatment for all HR positive patients. However, several large trials using AI are now challenging this privileged position. AI have so far been explored (a) as replacement for or in combination with tamoxifen (ATAC and BIG 1-98 trials), (b) sequentially after 2–3 years of tamoxifen (ITA, IES, ARNO 95 and ABCSG 8 trials), and (c) sequentially after 5 years of tamoxifen (MA.17 trial).

#### *Benefits associated with the introduction of AI in the adjuvant setting*

**(a) AI upfront.** In the ATAC (Arimidex and Tamoxifen Alone or in Combination) trial [37], a randomised double-blind placebo controlled study, 9,366 postmenopausal patients with operable BC were randomised to receive anastrozole (1 mg daily),

tamoxifen (20 mg daily), or the combination for 5 years. In this very large trial, 84% of patients had ER positive and/or PgR positive tumours. The combination arm was discontinued, as this arm showed no benefit over tamoxifen alone on the second analysis. The last update of results at a median follow-up of 68 months [38] favours anastrozole in patients with ER positive disease, with statistically significant hazard ratios (HR) for DFS (primary endpoint of the study), time to recurrence, contralateral BC, and time to distant recurrence. However, there is as yet, no statistically significant difference between the anastrozole and tamoxifen arms in terms of OS. A retrospective subgroup analysis shows a 57% reduction in the HR for recurrence with anastrozole compared to tamoxifen in women with ER positive and PgR negative tumours [44].

The IBCSG 18-98/BIG 1-98 trial compared (A) tamoxifen (5 years) to (B) letrozole (5 years), to (C) tamoxifen (2 years) followed by letrozole (3 years), to (D) letrozole (2 years) followed by tamoxifen (3 years). Accrual was completed in May 2003 with the inclusion of 8,028 patients. First results based on the comparison of initial treatment assignment to letrozole in arms B and D versus initial assignment to tamoxifen in arms A and C were presented after a median follow-up of 25.8 months [41]. A statistically significant difference in DFS, time to recurrence, and time to distant metastases favours the use of letrozole.

**b) Sequence of tamoxifen followed by AI.** In the small Italian Tamoxifen Arimidex (ITA) randomised trial, 426 postmenopausal patients treated with adjuvant tamoxifen for around 2 years continued treatment either with tamoxifen or anastrozole for a total of 5 years of endocrine therapy. Updated analysis at a median follow-up of 52 months confirms that the risk of relapse was statistically significantly lower in the sequential arm [40].

The Intergroup Exemestane Study (IES)/BIG 2-97 was a large double-blind, randomised trial that enrolled 4,742 postmenopausal women with ER positive or unknown primary BC who were disease-free after completion of 2–3 years of tamoxifen adjuvant therapy. Patients were randomised to receive exemestane or to continue tamoxifen in order to complete a total of 5 years of adjuvant endocrine therapy. At the time of a third planned interim analysis with a median follow-up of 37.4 months [39], the HR for DFS, the primary study endpoint, and for contralateral BC showed a statistically significant reduction in the exemestane group compared to the tamoxifen group. So far, only a trend for improved in OS is seen in favour of the sequential arm.



Table 2  
Adjuvant phase III trials incorporating aromatase inhibitors in postmenopausal patients<sup>a</sup>

Trial	Patient characteristics	Treatment arms	FU (mo)	Results (Hazard Ratio)					Comments
				DFS	OS	TTR	CLBC	TTDR	
ATAC Trialists group [37,38]	9366 pts 84% HR+ 61% N neg 64% tu ≤ 2 cm 20% CT	Tamoxifen × 5 years Anastrozole × 5 years Tamoxifen + Anastrozole (discontinued)	68	0.87 (0.78–0.97) p = 0.01	0.97 (0.85–1.12) p = 0.7	0.79 (0.70–0.90) p = 0.0005	0.58 (0.38–0.88) p = 0.01	0.86 (0.74–0.99) p = 0.04	Subgroup analysis for DFS: HR+: 0.79 ER+PgR+: 0.84 ER+PgR-: 0.43
IES trial BIG 2-97 [39]	4742 pts 81% HR+ 51% N neg 37% CT	Tamoxifen 5 years Tamoxifen 2–3 years → Exemestane 2–3 years	37.4	0.73 (0.62–0.85) p = 0.0001	0.83 (0.67–1.02) p = 0.08	Not reported	0.50 (0.26–0.97) p = 0.04	Not reported	No significant detrimental impact on QoL (FACT-ES) (Fallowfield LJ et al, Breast Cancer Res Treat 2004)
ITA trial [40]	426 pts All ER+ N+	Tamoxifen 5 years Tamoxifen 2–3 years → Anastrozole 2–3 years	52	0.42 (0.26–0.66) p = 0.0001 (EFS)	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	HR of PFS 0.43 (0.25–0.73) p = 0.001
BIG 1-98 [41]	8028 pts All HR+ 52% N- 37% tu > 2cm 25% CT	A. Tamoxifen 5 years B. Letrozole 5 years C. Tamoxifen 2 years → Letrozole 3 years D. Letrozole 2 years → Tamoxifen 3 years	25.8	0.81 (0.70–0.93) p = 0.003	0.86 (p = 0.16)	0.72 (p = 0.0002)	0.4% vs 0.7% (p = 0.125)	0.73 (p = 0.0012)	Subgroup analysis: N+ HR 0.71 Previous CT HR 0.70
MA.17 BIG 1-97 [42]	5187 pts 98% HR+ 50% N- 46% CT	Tamoxifen 4.5–6.0 years → Placebo Tamoxifen 4.5–6.0 years → Letrozole 5 years	2.4 yr	0.57 (p = 0.00008)	No difference	Local, metastatic recurrence, or contralateral BC 0.57 (0.43–0.75) p = 0.00008	Not reported	Subgroup analysis: N+ (40% reduction risk) and N- (53% reduction risk) for 3-year DFS in letrozole arm Survival benefit in N+ No detrimental impact on QoL (SF-36 and MENQOL)	
ABCSG 8/ ARNO 95 [43]	3123 pts All HR+ 74% N- 70% T1	Tamoxifen 5 years Tamoxifen 2 years → Anastrozole 3 years	26	0.60 (0.44–0.81) p < 0.0009 (EFS)	0.76 (0.52–1.12) p = 0.16	Not reported	0.61 (0.42–0.87) p = 0.0067	↓ DRFS	

<sup>a</sup> DFS: disease-free survival; OS= overall survival; TTR: time to recurrence; CLBC: contralateral breast cancer; TTDR: time to distant recurrence; HR: hormone receptor; ER: estrogen receptor; PgR: progesterone receptor; EFS: event-free survival; DRFS: distant recurrence free survival; CT: chemotherapy; tu: tumour size.

Table 3  
Risk associated with adjuvant AI (AI versus tamoxifen in all trials except MA 17: AI versus placebo)

Bone	Vascular	Other
<b>Anastrozole (ATAC [37,38,45] and ABCSG 8/ARNO 95 [43] trials)</b>		
Arthralgias: 35.6% vs 29.4% (p < 0.0001) OR 1.32 (1.19–1.47) (ATAC)	Cardiovascular: 4.1% vs 3.4% (p = 0.1) OR 1.23 (ATAC) 0.37% vs 0.19% (p = 0.51) OR 2.0 (ABCSG8/ARNO)	Endometrial invasive cancer (ATAC): 0.2% vs 0.8% (p = 0.02) OR 0.29
Fractures: 11% vs 7.7% (p < 0.0001) OR 1.49 (1.25–1.77) (ATAC) 1.0% vs 2.1% (p = 0.01, NS) OR 2.14 (ABCSG 8/ARNO 95)	Cerebrovascular: 2.0% vs 2.8% (p = 0.03) OR 0.70	Hot flushes (ATAC): 35.7% vs 40.9% (p < 0.0001) OR 0.80
	Venous thromboembolic: 2.8% vs 4.5% (p = 0.0004) OR 0.61 (ATAC) 0.4% vs 0.1% (p = 0.17) OR 0.28 (ABCSG8/ARNO)	Vaginal bleeding (ATAC): 5.4% vs 10.2% (p < 0.001) OR 0.50
		Vaginal discharge (ATAC): 3.5% vs 13.2% (p < 0.0001) OR 0.24
<b>Letrozole (MA.17 [42] and BIG 1-98 [41] trials)</b>		
Arthralgias: 21.3% vs 16.6% (p < 0.001) (MA.17)	Cardiovascular: 4.1% vs 3.6% (p = 0.40) (MA.17) 3.6% vs 2.5% (p-value not reported) (BIG 1-98)	Endometrial cancer: OR 0.40 (p = 0.078) (BIG 1-98)
Fractures: 5.8% vs 4.1% (p = 0.0006) OR 1.44 (BIG 1-98) 3.6% vs 2.9% (p = 0.24) (MA.17)		Hot flushes: 47.2% vs 40.5% (p < 0.001) (MA.17)
<b>Exemestane (IES trial [39])</b>		
Arthralgias: 19.8% vs 13.1% (p < 0.001)	Cardiovascular: 0.9% vs 0.4% (p = 0.02, NS)	Gynaecological symptoms: 5.8% vs 9% (p < 0.001)
Fractures: 3.1% vs 2.3% (p = 0.08)	Venous thromboembolic: 1.9% vs 3.3% (p < 0.001)	Hot flushes: 42% vs 40% (p = 0.28)

The results from ABCSG 8 (2,262 postmenopausal patients with endocrine sensitive BC) and ARNO 95 (962 postmenopausal patients with endocrine sensitive BC) were combined for the efficacy analysis of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole after two years of tamoxifen [43]. At a median follow-up of 28 months, there was a statistically significant 40% reduction in events, which included recurrences, second BC and deaths – and a highly significant improvement in the distant RFS in the anastrozole-containing arm.

**c) Extended AI.** One large trial was designed to test whether the extension of adjuvant treatment beyond 5 years with an AI could improve outcome. In the NCIC CTG MA.17/BIG 1-97 trial, 5,187 postmenopausal women treated with approximately 5 years (4.5–6) of tamoxifen were randomised to receive either letrozole or a placebo for 5 more years [42]. A first planned interim analysis, at a

median follow-up of 2.4 years, showed a significantly higher rate of DFS in the letrozole group: an absolute difference of 2.2% with an actuarial projection of an absolute difference of 6% in the rate of events over 4 years. This unexpected and robust difference led to the early unblinding of the study.

#### Safety of AI (Table 3)

Given all these “positive” trials and the optimistic view that OS benefits will emerge with longer patient follow-up, the main concern with adjuvant use of AI is their long-term side effects. Whereas tamoxifen has been shown to prevent bone loss and maintain an appropriate lipid balance, AI may affect bone turnover and lipid balance due to estrogen deprivation. Several safety issues, including bone fractures, lipid profile changes, cardiac and vascular events, were defined as important for specific clinical investigations. Table 3

summarizes our current knowledge in this field at a point with relatively short follow-up.

In the ATAC trial, patients treated with anastrozole had significantly lower rates of hot flushes, vaginal bleeding and discharge, endometrial cancer, and cerebrovascular or venous thromboembolic events than those receiving tamoxifen. On the other hand, anastrozole-treated women showed significantly higher rates of joint symptoms and bone fractures [45].

Preliminary results from the ABCSG 8/ARNO 95 [43] trial did not demonstrate any statistically significant detrimental effect for the anastrozole arm in terms of bone fractures, thromboembolic and cardiovascular events.

In comparison with placebo (MA.17 trial) [42], letrozole induced more arthralgias and hot flushes, while the slightly higher incidence of bone fractures and cardiovascular events is not statistically different from the rate observed in the placebo group.

In comparison with tamoxifen (BIG 1-98) [41], letrozole induced significantly more bone fractures. As far as severe ischemic cardiovascular disease is concerned, the incidence figures reported so far are 3.6% for letrozole and 2.5% for tamoxifen (p-value not reported).

In comparison with tamoxifen, exemestane induced less venous thromboembolic events, gynaecological symptoms and a similar rate of hot flushes (Table 3). In contrast, arthralgias were more common and particular attention will need to be paid to cardiovascular events, which show a non significant higher rate in the exemestane group [39].

More mature data are clearly awaited.

#### *Practical recommendations for clinical practice*

There has been an attempt to produce therapeutic guidelines given the rapidly growing body of knowledge gained from these large adjuvant trials.

ASCO's 2005 Technology Assessment Committee concluded that optimal adjuvant hormonal therapy for a postmenopausal woman with HR positive BC should include an AI either as initial therapy or after treatment with tamoxifen [46]. However, based on the published trials, it is not possible to determine the optimal strategy for the individual patient.

In 2005, three BC responsiveness categories were identified by the St. Gallen Consensus Panel [16]: endocrine responsive, endocrine response uncertain and endocrine non-responsive. Patients in the former group are likely to benefit most from endocrine therapy alone, while those in the latter group are likely to benefit from CT alone. Adjuvant use of CT followed

by endocrine therapy should be preferred for the newly defined intermediate category.

Of note, endocrine responsiveness is becoming the most important feature for adjuvant therapy decision making, surpassing 'risk of relapse'. Tamoxifen, AI or a sequence of tamoxifen followed by AI are all considered valid options by the St. Gallen Consensus Panel and choice must be based on comorbidities and patient or physician preference.

#### *Future hope: choice of optimal endocrine therapy based on the tumour molecular profile*

Current research efforts are directed at the discovery of molecular signatures that might identify those patients most responsive to tamoxifen or to an AI. The assumption is that the former group will be an ideal candidate for the sequencing strategy while the latter should be offered an AI upfront. However, none of this research has reached level-1 evidence today. The most mature data are those generated by Paik and colleagues [47] (level-2): their recurrence score, obtained by the RT-PCR evaluation of 21 genes in paraffin-embedded tumour material from node-negative BC patients, identifies a group of women with excellent prognosis following adjuvant tamoxifen.

#### *Premenopausal EBC patients*

The optimal management of premenopausal EBC patients remains an area with many uncertainties.

#### *EBCTCG Overview*

The 2005 EBCTCG overview, including almost 8,000 women aged under 50 with ER positive or unknown EBC with a minimum of 5-years follow up convincingly confirms the positive impact of ovarian ablation (OA) or suppression on both BC recurrence and mortality [1]. However, these effects are not as extreme as seen in earlier meta-analyses, when OA was not tested against effective systemic therapy. No data indicate that these effects are different between OA and ovarian suppression and between women aged <40 and women aged 40–49.

#### *Ovarian ablation*

**a) As alternative to CT (Table 4).** The ZEBRA trial [48] is the largest study to directly compare ovarian suppression and CT. This trial randomised 1,640 premenopausal women with node positive BC to receive either 6 cycles of CMF or 2 years of goserelin. For those women with ER positive tumours, the two arms resulted in equivalent DFS and OS at a median follow-up of 6 years. In contrast, CMF yielded

Table 4  
Randomized clinical trials assessing ovarian ablation (OA) versus chemotherapy (CT) in premenopausal EBC patients<sup>a</sup>

Trial	Patient characteristics	Treatment arms	FU (y)	Hazard ratio			Comments
				EFS	DFS	OS	
ZEBRA (Kaufmann et al 2003 [48])	1640 pts 70% 1-3 LN+, 25% 4-9 LN+ 80% ER+	Z × 2 years vs CMF × 6	6	-	1.18 (1.02-1.37) p=0.29	1.21 (0.99-1.49) p=0.067	In the 270 ER+ pts, improved OS with OA; CMF better for ER- (HR: 1.76; p=0.0006) No differences on basis of nodal status
Scottish trial, 2002 [49]	332 pts LN- or LN+ 60% ER+	OA vs Oral CMF × 6-8 (± prednisolone)	10.7	0.95 (0.71-1.26) p=0.70 1.00 (0.75-1.32) p=0.97	-	1.01 (0.74-1.37) p=0.96 1.06 (0.78-1.44) p=0.71	10% crossover treatment or TAM or no tx after randomization (potential bias)
Scandinavian trial (Ejlertsen et al 1999 [50])	732 pts LN+ and/or TU > 5 cm HR+	OA vs IV CMF × 9	68 mo	-	67% vs 66% (5-year) (ns)	78% vs 82% (5-year) (ns)	68% of pts in the CMF arm became amenorrheic
GABG IV A 93 (Von Minckwitz et al 2004 [51])	771 pts	Z × 2 years vs IV CMF × 3	4.9	-	0.81 (0.56-1.17) p=0.24		

<sup>a</sup> EFS: event-free survival; OS: overall survival; DFS: disease-free survival; HR: hormone receptor; ER: estrogen receptor; C: cyclophosphamide; M: methotrexate; F: 5-fluorouracil; OA: ovarian ablation; LN: lymph nodes; TU: tumour; mo: months; FU: follow up; ns= not statistically significant; IV: intravenous.

superior DFS and OS compared to goserelin in the subgroup of women with ER negative tumours.

The Scottish [49], Scandinavian [50] and German [51] trials did not demonstrate statistically significant differences between the CMF and OA arms regarding DFS and OS. Interestingly, in the Scottish trial improved survival was demonstrated in the subgroups of women with significant levels of ER who were treated with ovarian ablation and in women with low scores of ER treated with 6 months of oral CMF.

The trials comparing OA plus tamoxifen to CT in premenopausal women with HR positive EBC did not demonstrate significant differences in DFS and OS (Table 5).

The GROCTA trial, which enrolled 244 node positive EBC patients, compared OA (by surgery, radiation, or 2 years of goserelin) plus 5 years of tamoxifen with 6 cycles of oral CMF [52]. At a follow-up of 76 months, there was no statistically significant difference in DFS and OS. This trial was considered underpowered, particularly for survival.

In the FASG 06 trial, 3 years of triptorelin plus tamoxifen was compared to 6 cycles of FEC<sub>50</sub> in 333 node positive EBC patients [53]. At a median follow-up of 54 months, there was no statistically significant difference between the two treatment approaches regarding DFS and OS.

Another small French trial [54] compared FAC with OA and tamoxifen in 162 node positive EBC patients. This trial was stopped early due to poor accrual and is thus underpowered.

The ABCSG 5 trial compared goserelin for 3 years plus tamoxifen for 5 years to 6 cycles of IV CMF in 1,045 EBC patients [55]. At a median follow-up of 42 months, combination endocrine therapy was associated with a statistically significant improvement in DFS compared to CMF, with no difference in OS.

A recent trial has compared 2 years of leuproreline with 6 cycles of IV CMF in 599 node positive BC patients and has failed to demonstrate a difference in both DFS and OS [56].

Unfortunately, the absence of tamoxifen in the CT arms of all these trials and the use of different CMF regimens with a variable propensity for ovarian failure undermine in part their clinical relevance.

**b) Following CT (Table 6).** CT-induced amenorrhea has been shown to have an impact on survival [59]. The trials incorporating OA after adjuvant CT did not establish definitive benefit. However, the subgroup of HR positive premenopausal patients who do not become amenorrheic with CT may benefit from the addition of OA (IBCSG VIII) [58].

Intergroup 0101 [57] is a randomised trial involving 1,504 premenopausal eligible patients that compared CAF for 6 cycles, or CAF for 6 cycles followed by LH-RH agonist for 5 years, or CAF for 6 cycles followed by the combination of LH-RH plus tamoxifen for 5 years. At 6 years of follow up, only the tamoxifen-containing arm demonstrated a statistically significant improvement in time to treatment relapse (TTR).

The IBCSG coordinated PERCHE trial will enrol 1,750 premenopausal women with HR positive EBC to evaluate the efficacy and safety of adding adjuvant CT to OA plus either tamoxifen or exemestane for 5 years ([www.ibcsg.org](http://www.ibcsg.org)).

#### *Combined endocrine therapy*

Few trials have compared tamoxifen with or without OA (Table 7) and only very recent trials, which have just started accrual, are investigating OA in association with an AI. The ZIPP trial [60] included 2,631 women randomised in four arms: a 2-year treatment of either tamoxifen, LH-RH agonist, or the combination of both, and a control arm without any treatment. At 4.3 years median follow up, there was a statistically significant event-free survival and OS in favour of the LH-RH agonist arm. INT0142 was a prospective randomised trial designed to compare DFS, OS and quality of life of adjuvant tamoxifen 5 years alone or with OA. The study accrued slowly and was closed before obtaining its accrual target, and survival analyses consequently are underpowered [61].

Tamoxifen alone may also be an effective adjuvant therapy, but there are no trials comparing its efficacy to CT or to OA in the adjuvant setting.

Two trials coordinated by the IBCSG and run under the BIG umbrella will contribute to answering these important questions. SOFT is an ongoing phase III trial aiming to recruit 3,000 patients that will compare the efficacy of OA associated with tamoxifen or exemestane to tamoxifen alone in premenopausal women with HR positive tumour. TEXT is a phase III randomised study in 1,845 HR positive premenopausal patients that will evaluate the efficacy and safety of OA (LH-RH) plus exemestane compared with OA plus tamoxifen for 5 years ([www.ibcsg.org](http://www.ibcsg.org)).

The ABCSG-12 trial is another ongoing study with a projected accrual of 1,250 premenopausal women with HR positive EBC that compares adjuvant endocrine treatment with ovarian suppression (goserelin) plus anastrozole or tamoxifen for 3 years [62].

**Table 5**  
Randomized clinical trials assessing ovarian ablation (OA) + Tamoxifen vs chemotherapy (CT) in premenopausal EBC patients<sup>a</sup>

Trial	Patient characteristics	Treatment arms	FU (mo)	Hazard ratio		Comments
				RFS	OS	
GROCTA (Boccardo et al 2000 [52])	244 pts ER+ 86% LN+ 91% premenop	OA (Surg/Rtx/Z×2y) + T×5y vs Oral CMF×6	76	No difference	No difference	Underpowered particularly for survival
FASG 06 (Roche et al 2000 [53])	333 pts HR+ LN+	Triptoreline + T×3y vs FEC 50 × 6	54	91.7% vs 80.9% (p=0.12)	97% vs 92.9% (p=0.18)	
Roche et al (1996) [54]	162 pts HR+ LN+ 84% premenop	OA + T×2y vs FAC×6	84	No difference	No difference	Low accrual, unbalance between arms, prematurely stopped
ABCSG 5 (Jakesz et al 2002 [55])	1045 pts HR+ 50% LN+	Z×3y + T×5y vs CMF×6 (i.v.)	5y	5-year: 81% vs 76% (p = 0.037)	No difference	
Wallwiener et al (2004) [56]	599 pts HR+ LN+	Leuprorelin × 2y vs CMF (i.v.) × 6		83% vs 80.9% (ns)	98.7% vs 97.2% (ns)	

RFS: relapse-free survival; OS: overall survival; DFS: disease-free survival; HR: hormone receptor; ER: estrogen receptor; C: cyclophosphamide; A: adriamycin; M: methotrexate; F: 5-fluorouracil; OA: ovarian ablation; LN: lymph nodes; TU: tumour; mo: months; FU: follow up; ns: not statistically significant; Z: Zoladex; i.v.: intravenous.

**Table 6**  
Randomized clinical trials assessing chemotherapy (CT) vs CT+OA ± Tam in premenopausal EBC patients<sup>a</sup>

Trial	Patient characteristics	Treatment arms	FU (y)	Hazard ratio		Comments
				DFS	OS	
Intergroup 0101 (Davidson et al 1999 [57])	1504 pts HR+ 59% 1-3 LN+ 29% <40 y	CAF × 6 CAF × 6 → Z × 5y CAF × 6 → Z+T × 5y	6	-	-	Addition of T to CAF improved TTR (1-sided p values <0.01) No arm CAF × 6 → T
IBCSG VIII, 2003 [58]	1063 pts 68% ER+ T1-T3N0 Pre- and perimenopausal	Z × 2y CMF × 6 CMF × 6 → Z × 1.5y	5.7	No difference	No difference	Subgroup analysis: better survival for ER- treated with CMF (with or without Z), Z equivalent to CMF for ER+

<sup>a</sup> EFS: event-free survival; OS: overall survival; DFS: disease-free survival; HR: hormone receptor; ER: estrogen receptor; C: cyclophosphamide; A: adriamycin; M: methotrexate; F: 5-fluorouracil; OA: ovarian ablation; LN: lymph nodes; TU: tumour; mo: months; FU: follow up; ns: not statistically significant; Z: Zoladex.

**Table 7**  
Randomized clinical trials assessing Tamoxifen (T) vs T+OA in premenopausal EBC patients<sup>a</sup>

Trial	Patient characteristics	Treatment arms	FU (y)	Hazard ratio		Comments
				EFS	OS	
ZIPP trial (Lars 1999 [60])	2631 pts 42% LN+ 43% previous CT	T × 2 years Z × 2 years T + Z × 2 years No hormonal therapy	4.3	Better with Z (HR 0.77 p=0.001)	Better with Z (HR 0.84 p=0.12, NS)	Benefit independent of adjuvant T or CT
INT 0142 (Robert et al 2003 [61])	345 pts LN- HR+	T T+OA	5	underpowered	underpowered	Prematurely closed

<sup>a</sup> EFS: event-free survival; OS: overall survival; DFS: disease-free survival; HR: hormone receptor; ER: estrogen receptor; C: cyclophosphamide; A: adriamycin; M: methotrexate; F: 5-fluorouracil; OA: ovarian ablation; LN: lymph nodes; TU: tumour; mo: months; FU: follow up; ns: not statistically significant; Z: Zoladex.

## New biological agents

### Trastuzumab

Trastuzumab is a therapeutic monoclonal antibody targeting the human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), a cell-surface tyrosine kinase receptor overexpressed in 25–30% of BC [63]. Active as a single agent, trastuzumab in combination with standard CT prolongs the survival of women with advanced BC [64]. This activity in the metastatic setting and the known association of HER2 overexpression with poor prognosis prompted the launch of adjuvant clinical trials examining its potential role in early BC.

Four randomised trials of adjuvant trastuzumab have recruited more than 13,500 overexpressing HER2, node positive, or high risk node negative EBC patients worldwide [65]. Three of these trials disclosed early,

highly positive results at the 2005 ASCO meeting, which are summarized in Table 8.

In the NSABP B-31, a phase III trial sponsored by US National Cancer Institute, a total of 2,700 patients were randomised to receive either AC followed by 3-weekly paclitaxel alone or in combination with trastuzumab weekly for a total of 52 weeks. The primary endpoint was OS.

The NCCTG N9831 trial aimed to include 3,300 patients randomised to receive one of three treatment arms: AC for 4 cycles followed by weekly paclitaxel for 12 cycles, or AC followed by weekly paclitaxel followed by trastuzumab weekly for 1 year, or the same CT schedule but trastuzumab administered upfront in combination with paclitaxel. The primary endpoints are DFS and cardiac tolerability. A decision was taken by the National-Cancer Institute to pool the NSABP

Table 8  
Phase III randomized trials of adjuvant trastuzumab in EBC<sup>a</sup>

	Pooled analysis of NSABP-B31/NCCTG-N9831		HERA	
	Control: AC → P	AC → P + trastuzumab	Control: NIL	Trastuzumab × 1 year <sup>b</sup>
Number of patients	1679	1672	1693	1694
Median follow up		2 years		1 year
HR for disease-free survival		0.48 (2p = 3 × 10 <sup>-12</sup> )		0.54 (p < 0.0001)
HR for time to distant recurrence		0.47 (2p = 8 × 10 <sup>-10</sup> )		NA
HR for distant-disease free survival		NA		0.51 (p < 0.0001)
HR for overall survival		0.67 (2p = 0.015)		0.76 (p = 0.26)
Cumulative incidence of severe cardiac events	0.6%	4%	0.1%	0.5%

<sup>a</sup> EBC: early breast cancer; A: doxorubicin; C: cyclophosphamide; P: paclitaxel; HR: hazard ratio; NA: not available.

<sup>b</sup> No results available as yet for trastuzumab × 2 years.

B-31 and NCCTG N9831 trials in order to increase the power of treatment comparisons.

The HERA trial, a collaboration between the Breast International Group, F. Hoffmann-La Roche, non-affiliated collaborative groups and independent centres, investigates the role of trastuzumab independently from previous neo/adjuvant chemotherapeutic regimens in 5,082 patients. In this 3-arm design, trastuzumab is administered every 3 weeks for 1 or 2 years, and compared with an observation arm. The primary endpoint is DFS.

The interim analyses of the HERA results and pooled results from the Northern American trials presented at the 2005 ASCO meeting indicate a drastic reduction in the risk of relapse as well as distant relapse ([www.asco.org](http://www.asco.org)). Overall survival is also enhanced in the US trials, while a favourable trend emerges in HERA (HR 0.78, p-value NS), which has the shortest median follow-up (1 year instead of 2). Severe congestive heart failure is a potential serious adverse effect of trastuzumab in all three trials. The risk appears to be higher in the US trials, which initiated trastuzumab sooner than in HERA, where trastuzumab was administered at completion of adjuvant CT and radiotherapy. Longer follow-up is essential in order to better quantify this risk in all three studies.

The BCIRG trial has not yet reported results: it has three arms comparing AC for 4 cycles followed by docetaxel every 3 weeks for 4 cycles with AC

for 4 cycles followed by docetaxel every 3 weeks for 4 cycles with concomitant administration of trastuzumab weekly and then trastuzumab alone every 3 weeks for 1 year, or carboplatin and docetaxel every 3 weeks for 6 cycles concomitant with trastuzumab weekly followed by trastuzumab alone every 3 weeks for one year. The recruitment was completed with 3,150 patients and first results are expected by the end of 2005.

#### Perspectives

Several new agents appear to be good candidates for incorporation into adjuvant regimens, pending the availability of more safety and efficacy data in advanced disease. Four examples are given below.

The HER2 antigen is a compelling antigen for a cancer vaccine because it is overexpressed on some cancer cells relative to normal tissues, and it is known to be immunogenic in both animal models [66] and humans [67]. There are good reasons to speculate that HER2 vaccines, capable of eliciting both antibody and T cell responses, could be more effective than antibody therapy alone, at least in some BC patients. Based on this rationale, phase I trials of vaccination in the adjuvant setting of high risk BC patients are ongoing to evaluate the safety and immunogenicity of serial vaccinations of HER2 recombinant protein (GSK 719125).



One contributing factor to the ultimate failure of trastuzumab may be the collateral activation of the other members of the HER family in tumour cells [68]. The development of additional targeted molecular therapies against multiple members of the HER family may thus have a greater impact on inhibiting cell proliferation and angiogenesis. CI 1033 is an orally available targeted therapy that interferes directly with the ATP binding site of the HER family members (EGFR, HER2, HER3, HER4), resulting in irreversible inhibition of the activation of these receptors and their subsequent downstream mitogenic signalling pathways [69]. Phase I trials have been conducted with doses ranging from 2 to 1000 mg, and with weekly and chronic daily schedules. The most common adverse effects were diarrhoea, rash, and nausea/vomiting at low grades. Results of an open-label, randomised multicenter phase Ib study with 3 dose levels of CI 1033 conducted in 168 patients with MBC are pending.

Lapatinib is a reversible potent inhibitor of both HER1 and HER2 tyrosine kinases. It induces growth arrest and/or tumour cell apoptosis in HER1 and HER2 dependent tumour cell lines and xenografts [70]. This oral drug is well tolerated in phase I trials as single agent, in doses ranging from 175 to 1800 mg/day. The most frequent adverse events were cutaneous rash, diarrhoea, anorexia, fatigue, stomatitis and nausea/vomiting, usually grade 1 or 2 [71]. This drug has also been evaluated in phase I trials in combination with CT (paclitaxel) [72], trastuzumab [73], and letrozole [74]. Phase II and III trials as single agent or in combination with these agents are ongoing in advanced and inflammatory BC (EGF 30008, EGF 30001, EGF 100151, EGF 20002, EGF 20008) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

RAD001 is a potent oral inhibitor of the mTOR pathway, which plays a central role in the regulation of cell growth and survival as well as angiogenesis in BC. Preclinical results with RAD001 show high sensitivity of BC cell lines in vitro [75]. The combination of RAD001 and letrozole has demonstrated in vitro additive/synergistic effects in inhibiting the proliferation of aromatase expressing MCF7 breast cancer cells [76]. A phase I trial [77] was conducted in metastatic BC patients treated with letrozole for a minimum of 4 months and for whom no objective response had been observed. The combination of letrozole (2.5 mg/day) and RAD001 (up to 10 mg/day) had a good toxicity profile, with no grade 3/4 toxicities. One complete response was reported.

Finding the optimal way to introduce these new agents into the adjuvant treatment of HER2 overex-

pressing BC presents us with an exciting challenge for the coming years.

## References

- 1 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005, **365**, 1687–1717.
- 2 Gelber RD, Bonetti M, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A. International Breast Cancer Study Group (IBCSG). Tailoring adjuvant treatments for the individual breast cancer patient. *Breast* 2003, **12**(6), 558–568.
- 3 Colleoni M, Gelber S, Coates AS, *et al*. Influence of endocrine-related factors on response to preoperative chemotherapy for patients with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2001, **19** (21), 4141–4149.
- 4 Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al*. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, **406**(6797), 747–752.
- 5 Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, *et al*. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, **98**(19), 10869–10874.
- 6 van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, *et al*. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002, **347**(25), 1999–2009.
- 7 Piccart MJ, Loi S, Van't Veer L, *et al*. Multi-center external validation study of the Amsterdam 70-gene prognostic signature in node negative untreated breast cancer: are the results still outperforming the clinical-pathological criteria? *Breast Cancer Res Treat* 2004, **88**(1), abstr 38.
- 8 Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, *et al*. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003, **21**(6), 976–983.
- 9 Mamounas EP, Bryant J, Lembersky C, *et al*. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol* 2005, **23**(16), 3686–3696.
- 10 Buzdar AU, Singletary SE, Valero V, *et al*. Evaluation of paclitaxel in adjuvant chemotherapy for patients with operable breast cancer: preliminary data of a prospective randomized trial. *Clin Cancer Res* 2002, **8**(5), 1073–1079.
- 11 Martin M, Pienkowski T, Mackey J, *et al*. TAC improves disease free survival and overall survival over FAC in node positive early breast cancer patients, BCIRG 001: 55 months follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2003, **82**(1), abstr 43.
- 12 Bear HD, Anderson S, Smith RE, *et al*. A randomized trial comparing preoperative doxorubicin/cyclophosphamide to preop AC followed by preop docetaxel and to preop AC followed by postoperative docetaxel in patients with operable carcinoma of the breast: results of NSABP B-27. *Breast Cancer Res Treat* 2004, **88**(1), abstr 26.
- 13 Fumoleau RH, Spielmann M, Canon JL, *et al*. Five years of the PACS 01 trial: 6 cycles of FEC100 vs 3 cycles of FEC100 followed by 3 cycles of docetaxel for the adjuvant treatment of node positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004, **88**(1), abstr 27.
- 14 Jones SE, Savin M, Holmes FA, *et al*. Preliminary results of a prospective randomized trial of adjuvant chemotherapy for patients (pts) with stage I-III operable, invasive breast cancer

- comparing 4 courses of adriamycin/cyclophosphamide (AC) to 4 courses of taxotere/cyclophosphamide (TC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001, abstr 128.
- 15 Goldstein L, O'Neill A, Sparano J, et al. E2197: Phase III AT (doxorubicin/docetaxel) vs. AC (doxorubicin/cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive and high risk node negative breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005, abstr 512.
  - 16 Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005 (in press).
  - 17 Hamilton A, Hortobagyi G. Chemotherapy: what progress in the last 5 years? *J Clin Oncol* 2005, 23(8), 1760-1775.
  - 18 Piccart-Gebhart MJ. Moving away from the 'one shoe fits all' strategy: the key to future progress in chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005, 23(8), 1611-1613.
  - 19 Blum JL, Jones SE, Buzdar AU, et al. Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17(2), 485-493.
  - 20 Fumoleau P, Cameron D. Future options with capecitabine (Xeloda) in (neo)adjuvant treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2004, 5(Suppl 10), 45-50.
  - 21 O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 2002, 20(12), 2812-2823.
  - 22 Ahn J-B, Oh J-H, Kwon Y, et al. Interim analysis findings from a phase III randomized trial of docetaxel/capecitabine vs. doxorubicin/cyclophosphamide as primary chemotherapy for stage II/III breast cancer. *Ann Oncol* 2004, 15(Suppl 3), abstr 215PD.
  - 23 O'Shaughnessy J. Gemcitabine combination chemotherapy in metastatic breast cancer: phase II experience. *Oncology (Huntingt)* 2003, 17(12 Suppl 14), 15-21.
  - 24 Albain KS, Nag S, Calderillo-Ruiz G, et al. Global phase III study of gemcitabine plus paclitaxel (GT) vs. paclitaxel (T) as frontline therapy for metastatic breast cancer (MBC): First report of overall survival. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004, abstr 510.
  - 25 Poole C. Adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer: the tAnGo trial. *Oncology (Huntingt)* 2004, 18(14 Suppl 12), 23-26.
  - 26 Sledge GW Jr, Loehrer PJ Sr, Roth BJ, et al. Cisplatin as first-line therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1988, 6(12), 1811-1814.
  - 27 Pegram MD, Slamon DJ. Combination therapy with trastuzumab (Herceptin) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: evidence for receptor-enhanced chemosensitivity. *Semin Oncol* 1999, 26(4 Suppl 12), 89-95.
  - 28 Pegram MD, Pienkowski T, Northfelt DW, et al. Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96(10), 759-769.
  - 29 Robert NJ, Leyland-Jones B, Asmar L, et al. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin versus trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2 overexpressing metastatic breast cancer: An update including survival. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004, abstr 573.
  - 30 Norton L, Simon R. The Norton-Simon hypothesis revisited. *Cancer Treat Res* 1986, 70, 163-169.
  - 31 Citron ML, Berry DA, Cirincione C, et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003, 21(8), 1431-1439.
  - 32 Venturini M, Aitini E, Del Mastro L, et al. Phase III adjuvant trial comparing standard versus accelerated FEC regimen in early breast cancer patients. Results from GONO-MIG1 study. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 82, abstr 12.
  - 33 Piccart-Gebhart MJ. Mathematics and Oncology: a match for life? *J Clin Oncol* 2003, 21(8): 1425-1428.
  - 34 Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000, 60(7), 1878-1886.
  - 35 Drevs J, Fakler J, Eisele S, et al. Antiangiogenic potency of various chemotherapeutic drugs for metronomic chemotherapy. *Anticancer Res* 2004, 24(3a), 1759-1763.
  - 36 Seidman AD, Berry D, Cirincione C, et al. CALGB 9840: Phase III study of weekly (W) paclitaxel (P) via 1-hour (h) infusion versus standard (S) 3h infusion every third week in the treatment of metastatic breast cancer (MBC), with trastuzumab (T) for HER2 positive MBC and randomized for T in HER2 normal MBC. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004, abstr 512.
  - 37 ATAC Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002, 359, 2131-2139.
  - 38 ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005, 365, 60-62.
  - 39 Coombes RC, Hall E, Snowdon CF, et al. The Intergroup Exemestane Study: a randomized trial in postmenopausal patients with early breast cancer who remain disease-free after two to three years of tamoxifen-updated survival analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 88(1), abstr 3.
  - 40 Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M, et al. on behalf of the Italian Tamoxifen Arimidex (ITA) trial. Switching to anastrozole (ANA) vs continued tamoxifen (TAM) treatment of early breast cancer (EBC). Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005, abstr 526.
  - 41 Thurlimann BJ, Keshaviah A, Mouridsen H, et al. Letrozole versus Tamoxifen as adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with receptor-positive breast cancer. BIG 1-98: a prospective randomised double-blind phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005, abstr 511.
  - 42 Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003, 349(19), 1793-1802.
  - 43 Jakesz R, Kaufmann M, Gnant M, et al. Benefits of switching postmenopausal women with hormone-sensitive early breast cancer to anastrozole after 2 years adjuvant tamoxifen: combined results from 3,123 women enrolled in the ABCSG Trial 8 and the ARNO 95 Trial. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 88(1), abstr 2.
  - 44 Dowsett M, on Behalf of the ATAC Trialists' Group. Analysis of time to recurrence in the ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial according to estrogen receptor and progesterone receptor status. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 82(1), abstr 4.
  - 45 Howell A. The ATAC ('Arimidex', Tamoxifen, Alone or in Combination) trial in postmenopausal women with early breast cancer- update efficacy results based on median follow-up of 5 years. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 88(1), abstr 1.

- 46 Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, *et al.* American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005, **23**(3), 619–629.
- 47 Paik S, Shak S, Tang G, *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004, **351**(27), 2817–2826.
- 48 Kaufmann M, Jonat W, Blamey R, *et al.* Survival analyses from the ZEBRA study: goserelin (Zoladex) versus CMF in premenopausal women with node-positive breast cancer. *Eur J Cancer* 2003, **39**(12), 1711–1717.
- 49 Scottish Cancer Trials Breast Group: Adjuvant ovarian ablation versus CMF chemotherapy in premenopausal women with pathological stage II breast carcinoma: the Scottish trial. *Lancet* 1993, **341**, 1293–1298.
- 50 Ejlersten B, Dornberowski P, Mouridsen HT, *et al.* Comparable effect of ovarian ablation (OA) and CMF chemotherapy in premenopausal hormone receptor positive breast cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999, **18**, abstr 248.
- 51 Von Minckwitz G, Graf E, Geberth M, *et al.* Goserelin versus CMF as adjuvant therapy for node-negative, hormone receptor-positive breast cancer in premenopausal patients. The GABG IV-A-93 Trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004, **23**, 10; abstr 534.
- 52 Boccardo F, Rubagotti A, Amoroso D, *et al.* Cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus tamoxifen plus ovarian suppression as adjuvant treatment of estrogen receptor-positive pre-/perimenopausal breast cancer patients: results of the Italian Breast Cancer Adjuvant Study Group 02 randomized trial. *J Clin Oncol* 2000, **18**(14), 2718–2727.
- 53 Roche H, Kerbrat P, Bonnetterre J, *et al.* Complete hormonal blockade versus chemotherapy in premenopausal early-stage breast cancer patients with positive hormone-receptor and 1-3 node-positive tumour: Results of the FASG 06 trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, **19**, abstr 279.
- 54 Roche H, Mihura J, de Lafontan B, *et al.* Castration and tamoxifen vs chemotherapy (FAC) for premenopausal, node and receptors positive breast cancer patients: a randomized trial with a 7 years follow-up. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996, abstr 134.
- 55 Jakesz R, Hausmaninger H, Kubista E, *et al.* Randomized adjuvant trial of tamoxifen and goserelin versus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil: evidence for the superiority of treatment with endocrine blockade in premenopausal patients with hormone-responsive breast cancer – Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 5. *J Clin Oncol* 2002, **20**(24), 4621–4627.
- 56 Wallwiener D, Possinger K, Schmid P, *et al.* A phase III trial comparing adjuvant treatment with leuprorelin acetate 3M-Depot for 24 months with CMF chemotherapy in ER/PR + node + preperimenopausal breast cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004, **22**, abstr 533.
- 57 Davidson N, O'Neill A, Vukov A, *et al.* Effect of chemohormonal therapy in premenopausal, node (+), receptor (+) breast cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group phase III Intergroup Trial (E5188, INT-0101). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999, abstr 249.
- 58 International Breast Cancer Study Group (IBCSG). Adjuvant chemotherapy followed by goserelin versus either modality alone for premenopausal lymph node negative breast cancer: a randomised trial. *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**(24): 1833–1846.
- 59 Collichio F, Pandya K. Amenorrhea following chemotherapy for breast cancer: effect on disease-free survival. *Oncology (Huntingt)* 1994, **8**(12), 45–52.
- 60 Lars R. Zoladex™ and Tamoxifen as adjuvant therapy in premenopausal breast cancer: a randomised trial by the Cancer Research Campaign (C.R.C.) Breast Cancer Trials Group, the Stockholm Breast Cancer Study Group, The South-East Sweden Breast Cancer Group & the Gruppo Interdisciplinare Valutazione Interventi in Oncologia (G.I.V.I.O.). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999, abstr 251.
- 61 Robert NJ, Wang M, Cella D, *et al.* Phase III comparison of tamoxifen versus tamoxifen with ovarian ablation in premenopausal women with axillary node-negative receptor-positive breast cancer  $\leq 3$  cm. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003, abstr 16.
- 62 Emens LA, Davidson NE. Adjuvant hormonal therapy for premenopausal women with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003, **9**(Pt 2), 486S–494S.
- 63 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987, **235**(4785), 177–182.
- 64 Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that over expresses HER2. *N Engl J Med* 2001, **344**(11), 783–792.
- 65 Baselga J, Gianni L, Geyer C, Perez EA, Riva A, Jackisch C. Future options with trastuzumab for primary systemic and adjuvant therapy. *Semin Oncol* 2004, **31**(5 Suppl 10), 51–57.
- 66 Foy TM, Bannink J, Sutherland RA, *et al.* Vaccination with Her-2/neu DNA or protein subunits protects against growth of a Her-2/neu-expressing murine tumour. *Vaccine* 2001, **19**(17–19), 2598–2606.
- 67 Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR, Cheever MA. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin Cancer Res* 1999, **5**(6), 1289–1297.
- 68 Motoyama AB, Hynes NE, Lane JA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002, **62**(11), 3151–3158.
- 69 Allen LF, Eiseman IA, Fry DW, Lenchan PF. CI-1033, an irreversible pan-erbB receptor inhibitor and its potential application for the treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2003, **30**(5 Suppl 16), 65–78.
- 70 Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, *et al.* The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumour-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2001, **1**(2), 85–94.
- 71 Bence AK, Anderson EB, Halepota MA, *et al.* Phase I pharmacokinetic studies evaluating single and multiple doses of oral GW572016, a dual EGFR-ErbB2 inhibitor, in healthy subjects. *Invest New Drugs* 2005, **23**(1), 39–49.
- 72 Jones SF, Burris HA, Yardley DA, *et al.* Lapatinib (an oral dual kinase inhibitor) plus weekly or every 3 week paclitaxel. *Breast Cancer Res Treat* 2004, abstr 1069.
- 73 Burris III HA, Storniolo AM, Overmoyer EA, *et al.* A phase I, open-label study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of lapatinib (GW572016) in combination with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 2004, abstr 3043.
- 74 Chu Q, Cianfrocca ME, Murray N, *et al.* A phase I, open-label study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of lapatinib (GW572016) in combination with letrozole in cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2004, **88**(1), abstr 6044.
- 75 Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signalling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2003, **3**(4), 371–377.

- 76 Rudloff J, Boulay A, Zumstein-Mecker S, et al. The mTOR pathway in estrogen response: a potential for combining the rapamycin derivative RAD001 with the aromatase inhibitor letrozole in breast carcinoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2004, **45**, abstr 5619.
- 77 Awada A, Cardoso F, Fontaine C, et al. A phase Ib study of the mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in combination with letrozole (Femara) investigating safety and pharmacokinetics in patients with advanced breast cancer stable or slowly progressing on letrozole. *Breast Cancer Res Treat* 2004, **88**(1), abstr 6043.

**Correction for chromosome 17 is critical for determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer (BC)**

Dal Lago L<sup>\*1</sup>, Durbecq V<sup>\*1</sup>, Desmedt C<sup>\*1</sup>, Salgado R<sup>2</sup>, Verjat T<sup>3</sup>, Lespagnard L<sup>2</sup>, Ma Y<sup>2</sup>, Veys I<sup>2</sup>, Di Leo A<sup>1</sup>, Sotiriou C<sup>1</sup>, Piccart M<sup>1</sup>, Larsimont D<sup>1,2</sup>.

\* DL.L, D.V. and D.C. should be considered as co-first authors.

1. Translational Research Unit. Bordet Institute. Brussels. Belgium
2. Pathology department. Bordet Institute. Brussels. Belgium
3. Human Genetic Dpt, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France.

**Acknowledgements:** The authors thank “Les Amis de L’Institut Bordet” and “The Fond Lambeau-Marteaux” for their research support. C Desmedt was supported by a grant from the FNRS.

**Correspondance to :** D. Larsimont, MD

Department of Pathology

Jules Bordet Institute

1, rue Heger-Bordet

1000 Brussels

TEL: 32 2 541 31 15

FAX 32 2 541 32 81

Email: denis.larsimont@bordet.be

**Running Head: Correction for CEP17 is critical for Her2 amplification status in breast cancer**

**Keywords:**

## Abstract

**Purpose.** Trastuzumab is the cornerstone for treatment of women with HER2 overexpressing breast cancer (BC), both in the adjuvant and in the metastatic settings. Accurate assessment of HER2 is, therefore, critical to identifying patients who may benefit from trastuzumab-based therapy. This project aimed to determine the optimal scoring method for the FISH assay.

**Methods.** FISH assay was realised on 893 BC. Three scoring methods were evaluated: Her2/CEP17 $\geq$ 2, Her2 $>$ 4 or Her2 $>$ 6. Protein and gene expression were evaluated by IHC (N= 584) and mRNA-assay-NASBA (N= 90).

**Results.** Samples were divided into 5 groups based on FISH results: disomic amplified and non-amplified, polysomic amplified, non-amplified and discordant (10.8% of cases, mostly positive with Her2 $>$ 4 scoring, but negative with the others). Her2/CEP17 $\geq$ 2 and Her2 $>$ 6 scoring methods showed the best association 1) with regard to FISH scoring ( $\kappa=.906$ ,  $p<10^{-6}$ ) and 2) between FISH and IHC (3+ as positive) ( $\kappa>.650$ ,  $p<10^{-6}$ ) or NASBA ( $\kappa>.536$ ,  $p<10^{-6}$ ). Polysomy had an impact on Her2 copy number ( $p<10^{-6}$ ), but had no impact on protein and mRNA content. Therefore, within the discordant subgroup, for which additive Her-2 gene copies is due to high polysomy, protein and mRNA levels were similar to those of the non-amplified samples. For this subgroup, the best concordance between FISH/IHC/NASBA was observed with the Her2/CEP17 ratio and Her-2 $>$ 6 scoring (68% and 58% of perfect match). No perfect matches were observed using the Her2 $>$ 4 scoring method.

**Conclusion.** Correction for chromosome-17 is the method of choice for clinical practice; Her-2 $>$ 6, but not Her-2 $>$ 4, could be used as an alternative.

## Introduction

The *Her-2/neu* oncogene, located on chromosome-17, encodes a transmembrane-tyrosine kinase-receptor protein belonging to the epidermal-growth-factor-receptor family. Protein overexpression, identified in 20-30% of human breast cancer (BC) tumors, is due to gene amplification in more than 90% of cases. Overexpression and amplification have been linked to poor prognosis and response to therapy with the anti-HER-2-humanized monoclonal antibody, trastuzumab (Herceptin®), in patients with advanced metastatic BC, when used either as single agent<sup>1,2</sup> or in combination with chemotherapy<sup>3</sup>. Recently, trastuzumab used in sequence or in combination with adjuvant chemotherapy has demonstrated an impressive improvement in disease-free survival<sup>4-7</sup> and overall survival<sup>5</sup> in women with HER-2 overexpressing early BC enrolled in 5 randomized clinical trials. Therefore, laboratory assessment of *Her-2/neu* status has become a basic procedure for the appropriate management of BC patients<sup>8</sup>.

Determining the best method to identify patients who should be treated by trastuzumab-based therapy has been a source of controversy. Indeed, immunohistochemistry (IHC), which relies on several antibodies (monoclonal and polyclonal) and detection systems, produces contradictory results. HercepTest® (Dako), a more standardized IHC method, was developed to overcome or decrease this variability, though with sometimes disappointing results<sup>9</sup>. These concerns about IHC accuracy using standard formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections<sup>10</sup> have stimulated the use of the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) assay. Moreover, several studies have demonstrated that FISH is a better predictor of prognosis and a better determinant of trastuzumab eligibility than IHC<sup>2,11,12</sup>, as it excludes the majority of 2+ cases, which seem to have a low probability of response to trastuzumab treatment<sup>1,3</sup>. As a result, most laboratories either screen all cases by IHC and triage selected cases for FISH testing, or use FISH as the primary method for *HER-2/neu* testing. Therefore, accurate assessment of *Her-2/neu* status based on gene amplification using FISH has become a critical factor in the management of BC patients.

Currently, there are two FDA-approved FISH assays with different definitions of *Her-2/neu* gene amplification: 1) the Ventana Inform™ test that measures only *Her-2/neu* gene copies; and 2) the Vysis PathVysion™ test that includes a chromosome-17 probe in a dual color format. Tumors with an

absolute Her-2 copy number per nucleus of more than 4.0 (Ventana), or with a ratio of Her-2 gene copies to that of CEP-17 of 2.0 or more (Vysis), are considered as amplified.

Several genomic situations can be observed (Figure 1). For disomic samples, the situation is usually easy; samples will be amplified or non-amplified, whatever the FISH scoring method used. The situation is more complex for polysomic samples (chromosome-17 copy number alteration) with Her-2 gene copies >4 because in some cases, a FISH status discrepancy is observed depending on the scoring method. On the one hand, considering only the absolute number of Her-2 gene copies to define amplification might overestimate the presence of gene amplification since 15% of cases with a Her-2 gene copies >4 present a Her-2/CEP17 < 2 ratio because of polysomy<sup>13</sup>; on the other hand, the proportion of samples identified as Her-2/*neu* amplified by the Her-2/CEP17 ratio might be underestimated, since a small proportion of cases (≈3%) show increased numbers of Her-2 gene copies secondary to polysomy-17. It is conceivable that protein overexpression can result not only from an increased number of gene copies secondary to gene amplification, but also from concomitant increased numbers of chromosome-17, with the consequence that patients whose tumours show these characteristics might also be potential candidates for trastuzumab treatment<sup>13</sup>. Today, there is no definite consensus about the optimal scoring system for assessing Her-2 gene status. Some investigators<sup>2,11,12,14-16</sup> have found correction for chromosome-17 to be critical for the determination of true gene amplification status as opposed to increased Her-2 gene copy number due to polysomy-17, while others<sup>17,18</sup> believe it is not required. Therefore, it is essential to establish a cut-off value or scoring system for Her-2 FISH amplification that takes into account this subset of patients with polysomy-17.

The main objective of our study was to determine the optimal FISH scoring method to detect Her-2/*neu* amplification in BC tumors, with a special focus on tumors with polysomy-17. We examined how the use of dual-color versus single-color FISH scoring might affect the assignment of tumors to an amplified or non-amplified status and correlated these results with IHC data using the CB11 antibody and real-time NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) analysis for Her-2 mRNA.



## Material and Methods

### Patient samples

The BC samples used were sent to the Pathology Department of the Bordet Institute for routine clinical FISH assessment<sup>13</sup>. For 893 paraffin-embedded samples, FISH assay was realized using the PathVision (Vysis)<sup>13</sup>. For 584/893, HER-2 expression was also evaluated by IHC (CB11, Novocastra)<sup>13</sup>. For the NASBA assay, performed in collaboration with BioMérieux, frozen samples containing >70% of invasive tumor cells were collected from 90/893 patients. This study was approved by the ethics committee of the Institute.

### Criteria for FISH positivity and polysomy

Samples with a Her-2/CEP17 ratio  $\geq 2.0$  or with an absolute Her-2 copy number per nucleus  $>4.0$  or  $>6.0$  were considered as amplified. This last scoring system is used for the CISH assay (chromogenic *in situ* hybridization). As described previously<sup>12</sup>, the cut-off points for chromosome-17 copy number alterations were estimated for each group according to published standards<sup>14,19-23</sup> adapted for truncated nuclei on paraffin sections. Specimens with chromosome-17 copies in the range of 1.5-2.25 signals/cell were defined as having disomy-17. The other cases were considered to have aneusomy-17: either hypodisomy-17 ( $< 1.5$  signal/cell) or polysomy ( $> 2.25$ /cell).

### Duplex real time NASBA

Total RNA was extracted from five 10- $\mu$ m frozen sections/patient case using the TRIZOL® reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Canada). RNA integrity and quantification were determined with the RNA 6000 Nano LabChip (Agilent, Germany). Quantitative measurement of Her-2 mRNA was performed with 50ng of total RNA per duplex-NASBA reaction using cyclophilin B (PPIB) as the normalizing gene, as described previously<sup>24</sup>. Forward and reverse primers as well as molecular beacon for Her-2/neu and PPIB genes are described in table 1.

### Statistical analysis

The present work focused on determining of the optimal cut-off to define Her-2/neu amplification and on its association with HER-2 expression at the transcriptional and translational levels. Moreover, the

association between the various subgroups, defined on the basis of the FISH results and some clinico-pathological data were also evaluated. Standard descriptive analyses were conducted. Association between parameters was assessed using the concordance coefficient Kappa (for binary variables), Mann-Whitney (for binary versus continuous variables) and Chi-square tests. P-values<.05 were considered as statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS11.5 (Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

### **Polysomy-17 is responsible for discordance in Her-2/*neu* status as defined by different FISH scoring systems**

The CEP17 and Her-2/*neu* gene copies, evaluated by FISH, were available for 893 samples<sup>13</sup>. For 96/893 (10.75%) cases, Her-2/*neu* status was considered as discordant according to the 3 FISH scoring methods, namely, 1) the Her-2/CEP17 ratio; 2) the Her-2 copy >4 scoring; and 3) the Her-2 copy >6 scoring (CISH criteria).

As reported in table 2, 78% (75/96) of discordance was observed between Her-2>4 and the two other criteria, and 44% (42/96) between Her-2>6 scoring and the Her-2/CEP17 ratio. This explains that on the overall population, the best association between FISH scoring methods was observed between ratio Her-2/CEP17 and Her-2>6 scoring systems ( $\kappa=.906$ ,  $p<10^{-6}$ ) compared to the association between Her-2>4 and the two other systems ( $\kappa=.832$  with ratio Her-2/CEP17 and  $.833$  with Her-2>6,  $p<10^{-6}$ ).

For most of the cases, Her-2/*neu* status discrepancy was due to aneusomy-17: 71/96 (74%) presented polysomy, and 4/96 (4%) hypodisomy. As hypodisomic cases were <10% (80/893) of the total population and reported discordant hypodisomic cases represented <0.5% (4/893), hypodisomic samples were not considered for the subsequent analyses.

According to CEP17 and Her-2/*neu* copy number, samples were divided in five major groups: amplified polysomic, amplified disomic, non-amplified polysomic, non-amplified disomic groups, and discordant polysomic. The comparison of these groups revealed that polysomy-17 had an impact on Her-2 copy number, as gene copy number was statistically higher in polysomic versus disomic groups ( $p<10^{-6}$ ). Additionally, a statistically higher CEP17 copy number was observed in polysomic amplified versus polysomic non-amplified samples ( $p=.005$ ). In the discordant polysomic subgroup, which presented the highest CEP17 copy number (all  $p<3\times 10^{-5}$ ), polysomy by itself accounted for a statistically higher Her-2/*neu* gene copy number when compared to the non-amplified polysomic subgroup ( $p<10^{-6}$ ; Table 3).

### **Association between IHC and the three FISH scoring methods**

In order to determine the optimal scoring methods to evaluate Her-2/*neu* amplification status, we assessed the association between FISH status, according to the 3 scoring systems, and IHC data, available for 584 cases. This assessment is particularly relevant, as the receptor is the target of trastuzumab.

No statistically significant difference could be observed between amplified poly- and disomic subgroups or between non-amplified poly- and disomic subgroups in terms of HER-2 protein expression (0,1+,2+ versus 3+) (Table 3). Importantly, there was no statistically significant difference observed between polysomic not-amplified and discordant samples ( $p=.21$ ). Therefore, additional Her-2 gene copies induced by polysomy mainly in the discordant cases (compared to the non-amplified polysomic subgroup,  $p<10^{-6}$ ) were not associated with HER-2 overexpression. Nevertheless, in 3/161 IHC3+ samples, HER-2 overexpression (as confirmed by Herceptest) was due to polysomy-17. Noteworthy is that for these cases the CEP17 copy number exceeded 10 copies per cell, which resulted in more than 19 Her-2 gene copies/cell as confirmed by the CISH assay (data not shown).

When considering HER-2 IHC3+ as positive, the kappa association between IHC and FISH data dichotomised according to the 3 scoring systems was .689 using Her-2>6, .650 using the Her-2/CEP17 ratio and .556 using Her-2>4 (all  $p<10^{-6}$ ). Concordances between IHC and FISH data, according to the 3 scoring systems, are summarised in table 4 for the discordant polysomic subgroup. With Her-2>4 FISH scoring, 42 samples classified as amplified were not scored as IHC3+. In contrast, with the two other scoring systems, only 1 to 4 samples classified as non-amplified were scored as IHC3+. Therefore, concordance between FISH and IHC was observed in 10.6% samples using Her-2>4 scoring, 87% using Her-2>6 scoring and 81% using the Her-2/CEP17 ratio.

### **Association between mRNA expression and the three FISH scoring methods**

To determine which FISH scoring systems conferred the best concordance between Her-2/neu gene amplification and gene expression, Her-2 mRNA content was assessed by mRNA-assay-NASBA for 90 cases for which frozen samples were available. Samples were distributed in four groups: 24 samples considered as disomic amplified, 22 as polysomic amplified, 21 as polysomic non-amplified and 23 as discordant polysomic (according to FISH criteria).

In terms of Her-2 mRNA content, we observed no statistically significant difference between amplified poly- and disomic groups, whereas there was a statistically significant difference between amplified groups and the non-amplified polysomic subgroup (both  $p < 4 \times 10^{-5}$ ). Interestingly, we found no statistical difference between polysomic non-amplified and discordant cases. Therefore, additional Her-2 gene copies induced by polysomy in the discordant cases were not associated with higher gene expression.

The Her-2/CEP17 ratio scoring ( $Z = -5.376$ ) and the Her-2>6 definition ( $Z = -5.392$ ), when compared to the Her-2>4 ( $Z = -3.992$ ) criterion (all  $p < 7 \times 10^{-5}$ ), provided the best association between NASBA-assay and FISH. Using a cut-off of  $>0.078$  (ratio Her-2/PPIB) for NASBA as previously published<sup>25</sup>, the kappa associations between FISH and NASBA were 0.564 for Her-2>6, 0.536 for ratio Her-2/CEP17, and 0.325 for Her-2>4 (all  $p < 3 \times 10^{-5}$ ). Concordance between the three FISH scoring methods and NASBA for the subgroup of discordant BC is summarised in table 5. With the Her-2>4 FISH scoring, 19 patients classified as amplified by FISH did not overexpress mRNA; this number decreased to 3 and 1 patients with the two other scoring systems. In contrast, 3 and 4 patients with high mRNA levels (all IHC2+) were classified as non-amplified by FISH using the Her-2>6 and the Her-2/CEP17 ratio criteria. Therefore, 17%, 74%, and 83% of samples were concordant according to NASBA and the Her-2>4, Her-2>6 and Her-2/CEP17 ratio scoring systems, respectively.

Perfect concordance between FISH, IHC and NASBA was observed in 68% of cases with the Her-2/CEP17 ratio criteria, in 58% with the Her-2>6 criteria, and in 0% with the Her-2>4 criteria. Therefore, correction for chromosome-17 appeared as the optimal scoring system for FISH amplification evaluation. Her-2>6 scoring could be used as an alternative criterion, even if among the 4/5 samples with conflicting status according to Her-2>6 or ratio Her-2/CEP17 criteria, no protein (IHC<3+) and no mRNA expression (except one) was detected. The Her-2>4 criterion appeared as the worst scoring system (Figure 2). We observed that the minimal cut-off for absolute Her-2 copy number

must be >6 copies in order to obtain a good association between FISH and NASBA or IHC, the association with IHC or NASBA being increased by 1.5 with a cut-off of 6 rather than 4.

### **Biological characteristics of polysomic tumors with discordant Her-2/*neu* status according to the 3 FISH scoring methods**

For most of the 584 samples for which IHC data are presented, other clinico-pathological parameters such as Ki-67, estrogen receptor status as well as tumor size, histological grade and nodal status were also available (Table 6). Regarding tumor proliferation, a statistically higher percentage of highly proliferating tumors (Ki-67>25%) was observed in amplified versus non-amplified samples ( $p=.03$ ). Nevertheless, when only polysomic cases were considered, the proportion of highly proliferating tumors was statistically higher in the non-amplified polysomic subgroup compared to the non-amplified disomic subgroup ( $p=.03$ ), a proportion similar to the one of amplified poly- and disomic subgroups.

The percentage of ER-positive tumors was not statistically different between poly- and disomic subgroups, but it was lower in amplified groups compared to the non-amplified groups ( $p=.004$ ). Interestingly, discordant cases presented a percentage of ER-positive tumors similar to that of non-amplified groups. No statistically significant difference was observed regarding tumor size, histological grade and nodal status.

## Discussion

To determine the optimal FISH scoring system to select patients that might benefit from a trastuzumab-based treatment, three criteria for FISH positivity were considered, and the ensuing status was then compared with IHC and mRNA-NASBA data. Similar to previous studies<sup>26,27</sup>, we found a good concordance between Her-2/CEP17 $\geq$ 2 ratio and Her-2>4 FISH scoring methods, for disomic and low polysomic cases, as well as for cases with increased Her-2 gene copies consecutive to gene amplification. Problematic cases, discrepant for FISH scoring result, are samples with no gene amplification but increased Her-2 gene copies secondary to high polysomy-17 (> 3 copies per cell) in agreement with Lal *et al.*<sup>27</sup>. Here, these samples corresponded to 10% of the patients for which trastuzumab would be given based on Her-2>4 criterion, but not on the Her-2/CEP17 ratio criterion.

We clearly observed that polysomy-17 had an impact on Her-2 copy number. On the one hand, a statistically higher Her-2 gene copy number was found in polysomic groups, but on the other hand, the polysomic amplified group presented a higher number of CEP17 copy compared to the polysomic non-amplified group, as previously reported<sup>20,28</sup>. The challenge was to determine whether additional Her-2 gene copies consecutive to polysomy-17 might be sufficient to induce HER-2 protein overexpression, the target of trastuzumab, with the consequence being that these patients might be candidates for trastuzumab treatment. As previously reported<sup>15,20,29-31</sup>, we clearly demonstrated that, in the absence of Her-2 gene amplification, polysomy-17 resulted in a modest increase of Her-2/neu gene copies and, consequently, a rare increase of HER-2 protein and mRNA content, except for a very small number of cases with more than 10 copies of CEP17 per cell. As a consequence, correction for chromosome-17 seems to be critical for determination of true Her-2 gene status in BC. These results were corroborated by the fact that the best association between FISH and IHC, as reported by other studies<sup>27,29</sup>, as well as between FISH and NASBA appeared with Her-2/CEP17 ratio criteria. Wang *et al.*<sup>29</sup> reported that FISH assay using the Her-2/CEP17 criterion achieved higher concordance with image-analyzer-assisted IHC quantification than did the Her-2>4 criterion. Lal *et al.*<sup>27</sup> observed that more IHC negative tumors were FISH positive with the Her-2>4 criterion. Therefore, the Her-2/CEP17 ratio, which considered most of these discordant cases as non-amplified, appeared as a better scoring system to reflect the real biology of the tumor. Additionally, the comparison of the biological characteristics demonstrated that discordant polysomic samples were biologically similar to

polysomic non-amplified samples. Indeed, like others<sup>28,32</sup> we observed that HER-2 amplification was associated with a lower proportion of estrogen receptors, as opposed to the non-amplified and discordant samples.

As an alternative to the Her-2/CEP17ratio, absolute Her-2 gene copy>6 criterion could be used as a good scoring system. A recent report has recommended changing the cut-off mean Her-2 signal number to 6 or greater for the Ventana-Inform assay to account for the discrepant cases due to polysomy-17<sup>33</sup>. We effectively confirmed that the minimum number of Her-2 gene copies necessary to obtain a good correlation between FISH, IHC and NASBA must be >6. This scoring system might also be useful mainly for cases with more than 10 CEP17 copies per cell and IHC3+. This hypothesis must be confirmed on a higher number of samples.

Three recently published randomised adjuvant trastuzumab trials have considered both IHC and/or FISH to assess HER-2 protein overexpression and/or gene amplification. Nevertheless, with the advent of the significantly positive first results of these trials, it has become crucial to limit the number of false positive cases as trastuzumab is associated with a risk of severe cardiotoxicity. By limiting this number, the use of the Her-2/CEP17 ratio would effectively limit the number of patients exposed to the potential toxic effects without any treatment benefit. However, the correlation between the scoring system and treatment efficacy remains to be assessed in trastuzumab treated patients.

Finally, we showed that polysomic tumors, independently of Her-2 amplification, were highly proliferative. Several reports pointed out a possible relationship between proliferation and polysomy, but no definite conclusions were drawn. This result might suggest that either polysomy-17 is able to induce the overexpression of proteins implicated in proliferation or that low aneusomy is an artifact of cell division. Analyses of the status of other chromosomes are ongoing to corroborate one of these hypotheses.

To conclude, we demonstrated that the correction for chromosome-17 is the optimal scoring system for FISH amplification evaluation. Alternatively, an absolute Her-2 gene copy number of more than 6 could be used. Our results suggest that the CEP-17 polysomic subset of carcinoma without Her-2/*neu* gene amplification behaves similarly to non-amplified tumors. Nevertheless, this hypothesis still needs to be validated in trastuzumab treated patients.



## References

1. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al: Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648, 1999
2. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al: Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726, 2002
3. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *N Engl J Med* 344: 783-792, 2002
4. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 353:1659-1672, 2005
5. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-1684, 2005
6. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, et al. Trastuzumab in combination with docetaxel or vinorelbine as adjuvant treatment of breast cancer: the FinHer Trial. *Breast Cancer Research and Treatment* 94 (1), 2005 (abstract 2)
7. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC→TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Research and Treatment* 94 (1), 2005 (abstract 1)
8. Shak S: Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol* 26: 71-77, 1999
9. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al: Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 17:1983-1987, 1999

10. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al: Real-world performance of HER2 testing—National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 94: 852–854, 2002
11. Pauletti G, Dandekar S, Rong HM, et al: Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 18: 3651-3664, 2000
12. Mass R, Sanders C, Charlene K, et al: The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Herceptin pivotal trials. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19:75a, 2000 (abstr)
13. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, et al: Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 11:4393-9, 2005
14. McCormick SR, Lillemoe TJ, Beneke J, et al: HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: comparison of HercepTest and PathVysion commercial assays. *Am J Clin Pathol* 117:935-943, 2002
15. Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, et al: Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn* 5:155-159, 2003
16. Lehr HA, Jacobs TW, Yaziji H, et al: Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. *Am J Clin Pathol* 115:814-822, 2001
17. Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, et al: Determination of HER-2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 13:37-45, 2000
18. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, et al: Discrepancies in laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 19:2714-2721, 2001
19. Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, et al: HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 77:148-54, 2002

20. Bose S, Mohammed M, Shintaku P, et al: Her-2/neu gene amplification in low to moderately expressing breast cancers : possible role of chromosome 17/HER-2/NEU polysomy. *Breast J* 7:337-344, 2001
21. Varshney D, Zhou Y-Y, Geller S-A, et al: Determination of Her-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing Herceptests and pathvision FISH assay. *Am J Clin Pathol* 121: 70-77, 2004
22. Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, et al: Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancers. *Cancer Res* 62:1481-8, 2002
23. Grushko TA, Dignam JJ, Das S, et al: MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. *Clin Cancer Res* 10: 499-507, 2004
24. Verjat T, Cerrato E, Jacobs M, et al: Multiparametric duplex real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for mRNA profiling. *Biotechniques* 37: 476-81, 2004
25. Lamy et al, 2006 CCML
26. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E et al: Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays. *J Clin Pathol* 53: 374-381, 2000
27. Lal P, Salazar PA, Hudis CA, et al: HER-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridisation. *Am J Clin Pathol* 121: 631-36, 2004
28. Espinosa AB, Taberner MD, et al: Her-2/neu gene amplification in familial vs sporadic breast cancer impact on the behavior of the disease. *Am J Clin Pathol* 120: 917-27, 2003
29. Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP, et al: Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Mod Pathol* 15:137-145, 2002
30. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, et al: The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: A fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol* 29:1221-27, 2005
31. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, et al: The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 29: 1221-1227, 2005

32. Taucher S, Rudas M, Mader RM, et al: Do we need HER-2/enu testing for all patients with breast carcinoma? *Cancer* 98: 2547-2553, 2003
33. Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA: Comparative assays for the Her-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 128: 627-33, 2004

Table 1. Primers and molecular beacons sequences for mRNA NASBA assay

Primer	Sequence (5'>3')	Position
ERBB2 P1(T7)	aattctaatacgcactactatagggagaaggGAGCCAGCCCCGAAGTCTGTA	2567-2586
ERBB2 P2	TCTTAGACCATGTCCGGGAAA	2733-2752
PPIB P1(T7)	aattctaatacgcactactatagggagaaggCAGGCTGTCTTGACTGTCGTGA	449-470
PPIB P2	AGGAGAGAAAGGATTTGGCT	231-250
Molecular Beacon	Sequence (5'>3')	Position
ERBB2	FAM- <i>cgatcg</i> GGAGGATGTGCGGCTCGTAC <i>cgatcg</i> -Dabsyl	2658-2677
PPIB	ROX- <i>cgatcg</i> GATCCAGGGCGGAGACTTCA <i>cgatcg</i> -Dabsyl	291-310

The 3' anti-sense primers are elongated with a T7-promotor recognition sequence indicated in lower-case characters. The stem sequences of the beacons are indicated in lower-case italic characters. The positions are in reference to the GenBank accession numbers, MN\_00448 for ERBB2 and M60857 for PPIB.

Table 2. Association between FISH scoring systems

Her-2 copy >4	Her-2 copy >6		Total N° cases	Her-2 copy >4	Ratio Her2/CEP17		Total N° cases	Her-2 copy >6	Ratio Her-2/CEP17		Total N° cases
	Negative	Positive			Negative	Positive			Negative	Positive	
Negative	8	0	8	Negative	0	<b>8</b>	8	Negative	54	<b>29</b>	83
Positive	<b>75</b>	13	88	Positive	<b>67</b>	21	88	Positive	<b>13</b>	0	13
Total N° cases	83	13	96	Total N° cases	67	29	96	Total N° cases	67	29	96

Table 3. Her-2 and CEP17 copy number as well as HER-2 protein expression in the 5 subgroups

Subgroups Biological Markers	Amplified	Not-Amplified	Amplified	Not-Amplified	Discordant
	Disomic	disomic	polysomic	polysomic	polysomic
Her-2 copy number (median)	14.75	2.08	16.30	3.2	4.98
CEP-17 copy number (median)	1.94	1.87	2.9	2.62	<b>3.26</b>
HER-2 IHC 0/1+	1.85%	36.34%	1.7%	31.51%	17%
2+	25.8%	<b>63%</b>	29.2%	<b>65.75%</b>	<b>74.5%</b>
3+	<b>72.35%</b>	0.66%	<b>69.1%</b>	2.74%	8.5%

Table 4. Association between IHC and the 3 FISH scoring methods

HER-2 IHC	Her-2 copy >4		Total N° cases	Her-2 copy >6		Total N° cases	Ratio Her-2/CEP17		Total N° cases
	Negative	Positive		Negative	Positive		Negative	Positive	
0,1+,2+	1	<b>42</b>	43	38	5	43	38	5	43
3+	0	4	4	<b>1</b>	3	4	<b>4</b>	0	4
Total N° cases	1	46	47	39	8	47	46	17	47

Table 5. Association between NASBA and the 3 FISH scoring methods

NASBA	Her-2 copy >4		Total N° cases	Her-2 copy >6		Total N° cases	Ratio Her-2/CEP17		Total N° cases
	Negative	Positive		Negative	Positive		Negative	Positive	
Negative	0	<b>19</b>	19	16	<b>3</b>	19	18	<b>1</b>	19
Positive	0	4	4	<b>3</b>	1	4	<b>4</b>	0	4
Total N° cases	0	23	23	19	4	23	22	1	23

Table 6. Biological characteristics of the 5 subgroups

Subgroups Biological Markers	Amplified	Not-Amplified	Amplified	Not-Amplified	Discordant
	Disomic	disomic	polysomic	polysomic	polysomic
Ki-67 >25% (%)	34/76 (44.7)	29/106 (27.36)	31/67 (46.27)	24/53 (45.3)	11/33 (33.3)
ER ≥ 2 (%)	41/76 (53.94)	91/121 <b>(75.2)</b>	46/76 (60.5)	36/54 (66.6)	28/34 <b>(82.35)</b>
Size > 2 cm (%)	31/66 (46.97)	36/81 (44.45)	21/57 (36.8)	16/43 (37.2)	13/27 (48.1)
Grade 3 (%)	50/81 <b>(61.73)</b>	47/106 (44.33)	43/63 <b>(68.25)</b>	29/53 (54.7)	13/27 (48)
Type ductal (%)	70/85 (82.35)	92/111 (82.88)	67/72 (93)	51/57 (89.5)	28/32 (87.5)
>4 positives nodes (%)	24/51 (47)	42/73 (57.5)	31/49 (63.26)	23/37 (62.16)	11/20 (55)
Count	123	152	120	73	47

Figure 1. Possible scenarios of genetic alterations of breast cancer regarding Her-2 status

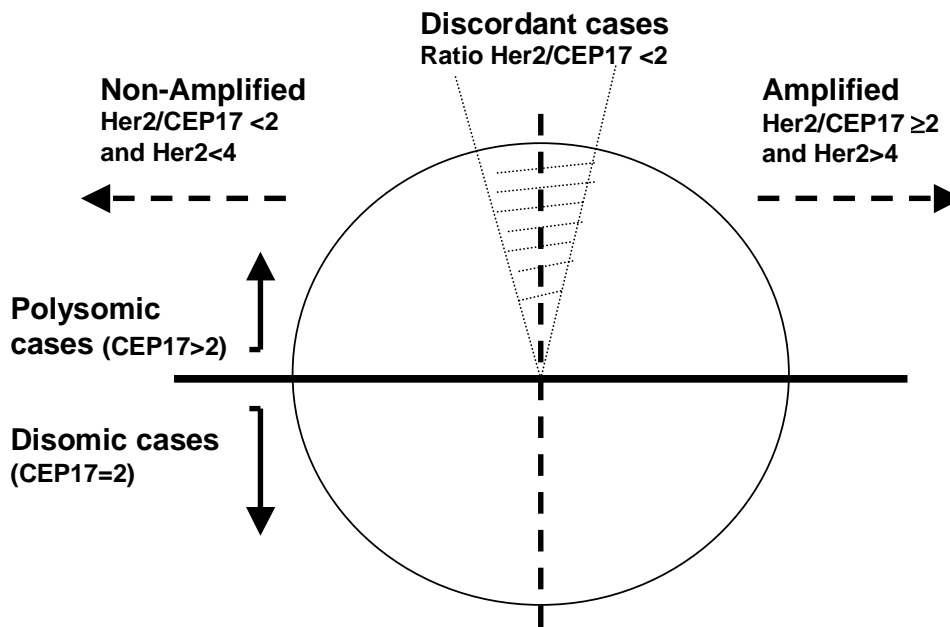
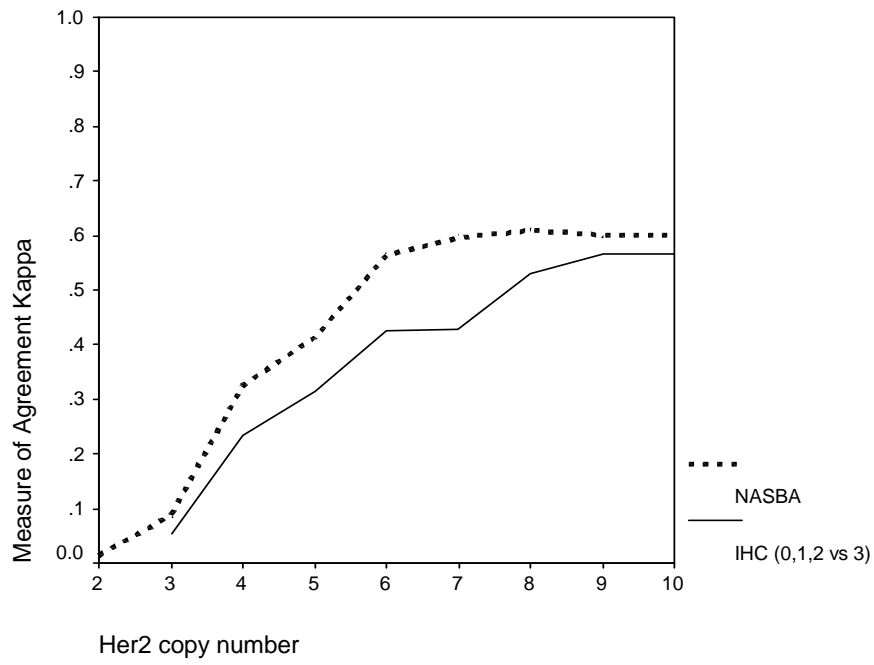


Figure 2. Association between NASBA or IHC and FISH assay according to the absolute Her-2 copy numbers



Her-2 copy number	>2	>3	>4	>5	>6	>7	>8	>9	>10
% nasba positive	39	42	51	54	60	63	63	63	60
% IHC 3+	32	34	41	46	52	56	63	69	68





## ORIGINAL ARTICLE

# Adjuvant chemotherapy in 2005: Standards and beyond

M.J. Piccart<sup>a,\*</sup>, D. de Valeriola<sup>a</sup>, L. Dal Lago<sup>a</sup>, E. de Azambuja<sup>a</sup>,  
G. Demonty<sup>a</sup>, F. Lebrun<sup>a</sup>, Ch. Bernard-Marty<sup>a</sup>, M. Colozza<sup>b</sup>, T. Cufer<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Medical Oncology Clinic, Jules Bordet Institute, Centre des Tumeurs de l'Université Libre de Bruxelles, Rue Heger-Bordet, 1, 1000-Brussels, Belgium

<sup>b</sup>S.C. Oncologia Medica, Azienda Ospedaliera, Perugia, Italy

<sup>c</sup>Institute of Oncology, Ljubljana, Slovenia

**KEYWORDS**

Breast cancer;  
Chemotherapy;  
Adjuvant;  
Anthracyclines;  
Taxanes;  
Oestrogen receptor

**Summary** The 2003 St. Gallen consensus panel divided the many available adjuvant chemotherapy (CT) regimens into those with "standard efficacy" (AC × 4, CMF × 6) and those with "superior efficacy" (FA(E)C × 6, CA(E)F × 6, A(E) → CMF, TAC × 6, AC × 4 → paclitaxel (P) × 4 or docetaxel (D) × 4) but also greater complexity, toxicity and cost. This paper will summarize the latest information on long-term side effects of the "superior" regimens and 5-year benefits reported in taxane trials, including those of a "new" sequential regimen, FEC × 3 → docetaxel × 3. Rapidly expanding evidence of marked heterogeneity in the magnitude of CT benefits according to the tumour oestrogen receptor (ER) status, a claim made for many years by IBCSG investigators, will be reviewed; it will lead to the conclusion that a revolution needs to take place in the way oncologists think about the CT added value and design adjuvant clinical trials. The conclusions proposed to the 2005 St. Gallen consensus panel are that: adequately dosed anthracycline-based CT regimens remain an acceptable standard for many women; a lower threshold for using taxanes in sequence or combination with anthracyclines (A) is justified in the presence of an ER-negative or low-ER tumour status, other aggressive biologic features (such as HER-2 overexpression), fear about A-induced cardiotoxicity; no recommendation can yet be made as far as the optimal taxane-A regimen, the best taxane or the best taxane schedule.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Progress in adjuvant chemotherapy (CT) is possible through (1) the incorporation of new, non-cross-resistant cytotoxic agents, (2) the manipulation of

\*Corresponding author. Tel.: +32 2 541 32 06;  
fax: +32 2 538 08 58.

E-mail address: [martine.piccart@bordet.be](mailto:martine.piccart@bordet.be) (M.J. Piccart).

dose-size, dose-intensity, dose-density and cumulative dose of our most active cytotoxic agents, (3) a better identification of women who will benefit most from adjuvant CT, and (4) the discovery of molecular “signatures” that predict sensitivity to particular CT regimens.

This paper will focus primarily on issues 1 and 3, since the 2 years that have elapsed since the 2003 St. Gallen meeting have not brought new, clinically usable information in relation to issues 2 and 4.

### The St. Gallen 2003 “Guidelines” for the use of adjuvant CT

Two “families” of CT regimens were recognized 2 years ago: the one with “standard efficacy” including the old CMF combination (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil for six cycles) and the convenient AC regimen (doxorubicin and cyclophosphamide for four cycles) and the one with “superior efficacy”, featuring the “stronger” anthracycline (A)-based regimens (FA(E)C, 5-fluorouracil, adriamycin 60 mg/m<sup>2</sup> or epiadriamycin 100 mg/m<sup>2</sup>, cyclophosphamide 500 mg/m<sup>2</sup>; CA(E)F, oral cyclophosphamide for 14 days and day 1+8 adriamycin 30 mg/m<sup>2</sup> or epiadriamycin 60 mg/m<sup>2</sup>+5-fluorouracil 500 mg/m<sup>2</sup>; sequential A(E)→CMF, e.g. four cycles of adriamycin 75 mg/m<sup>2</sup> or epiadriamycin 100 mg/m<sup>2</sup> followed by three or four cycles of CMF) and the anthracycline-taxane-based regimens (at that time TAC, e.g. docetaxel+adriamycin+cyclophosphamide for six cycles and sequential AC × 4 followed by either paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> for four cycles or docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> for four cycles). While no clear “winner” was identified among the members of this second family, its associated complexity, toxicity and cost was underscored.

The practical recommendation made to physicians was to weigh the risks and benefits of these regimens for each individual patient and to make a selection that takes the patient’s preference into account.<sup>1</sup>

### New information on CT-associated risks in the long term

Short-term risks of the “more-effective” CT regimens are well known: they include variable rates of neutropenic fever (lowest for the sequential AC→taxane regimen, intermediate for CEF or sequential E→CMF and highest for TAC)<sup>2–8</sup> with

very few documented infections and toxic deaths, and a 3–12% risk of grade 3 neurotoxicity with taxane use. The latter side effect can be long lasting, and its reversibility has been poorly documented so far.

Acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome are rare but frightening side effects of adjuvant CT, typically seen at 3–4 years of median follow-up.

As shown in Table 1, there is now mature follow-up, close to or greater than 5 years, on a number of taxane trials (namely INT 0148 and NSABP-B28, both comparing AC→paclitaxel with AC, MD Anderson Cancer Center paclitaxel→FAC versus FAC, BCIRG TAC versus FAC and PACS 01 FEC→docetaxel versus FEC)<sup>2,3,7–9</sup> with no signal of an increased leukaemia risk in any of the A and taxane arms compared with the A only arms or with published data on thousands of women treated with the softer AC × 4 regimen (data from the NSABP)<sup>10</sup> or with a variety of epiadriamycin (E)-based combinations limiting the E cumulative dose to 720 mg/m<sup>2</sup> (data from the Pharmacia Epirubicin Monitoring Plan).<sup>11</sup>

Table 2 provides a similar overview as far as cardiotoxicity risks of A and taxane regimens or A only regimens are concerned<sup>12,13</sup>: here also, there is no suggestion of an increased incidence of congestive heart failure (CHF) associated with taxane use. The lack of a single case of CHF in regimens sequencing three to four cycles of anthracycline-based regimens with a taxane, such as the MD Anderson paclitaxel→FAC or the French FEC→paclitaxel, is noteworthy (Table 2). However, data on the long-term cardiac functional assessment with all these newer regimens are still lacking; for the older adriamycin or epiadriamycin combinations, these data, gathered from breast cancer (BC) survivors, have documented a 2% incidence of symptomatic decline in left ventricular ejection fraction, exceeding what is encountered in CMF-treated survivors. (<0.5%).<sup>14,15</sup>

Increasing attention is being given to potential cognitive sequelae of adjuvant CT. Unfortunately, many studies so far have suffered from methodological limitations, hampering a reliable assessment of this risk.<sup>16</sup> The first longitudinal and methodologically sound study on cognitive function in 18 women receiving “FAC” adjuvant CT has been published and suggests a disruption of the brain frontal neuron network with partial recovery over time in half of the affected women.<sup>17</sup> Similar investigations need to be conducted for A and taxane-based regimens and potential risk factors for this troublesome side effect need to be identified.

**Table 1** Cumulative incidence of AML/MDS in adjuvant chemotherapy trials for breast cancer with long-term follow-up.

Anthracycline-based regimens		Anthracycline plus taxane regimens					
Doxorubicin N = 4453	Epirubicin N = 6454	Paclitaxel-based N = 6754			Docetaxel-based N = 3490		
NSABP database	Pharmacia database	Trial	mFU (mos)	AML/MDS (%)	Trial	mFU (mos)	AML/MDS (%)
AC × 4 5 years (%)	E < 720 mg/m <sup>2</sup> 8 years (%)						
0.22	0.31	INT 0148	69	AC: 0.6 AC → P: 0.5	BCIRG 001	55	FAC: 0 TAC: 0
		NSABP B-28	67	AC: 0.1 AC → P: 0.4	PACS 01	60	FEC: 0.003 FEC → D: 0.001
		MDACC	60	FAC: 0 P → FAC: 0			

AC = doxorubicin, cyclophosphamide; AML = acute myeloid leukaemia; BCIRG = Breast Cancer International Research Group; D = docetaxel; E = epirubicin; FAC = 5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide; FEC = 5-fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide; mFU = median follow-up; mos = months; INT 0148 = Intergroup trial; MDACC = M.D. Anderson Cancer Center; MDS = myelodysplastic syndrome; NSABP B28 = National Surgical Adjuvant Breast & Bowel Project; P = paclitaxel; PACS = Adjuvant protocols in breast cancer; TAC = docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide.

**Table 2** Cumulative incidence of cardiac death, congestive heart failure (CHF), or severe left ventricular dysfunction (LVD) in adjuvant chemotherapy trials for breast cancer with long-term follow-up.

Anthracycline-based regimens		Anthracycline plus taxanes-based regimens					
Doxorubicin-based	Epirubicin-based	Paclitaxel-based			Docetaxel-based		
(NCI Milan) N = 637 m D = 300 mg/m <sup>2</sup> (%)	(French trials) N = 2553 m E = 600 mg/m <sup>2</sup> (%)	N = 6754			N = 3490		
		Trial	mFU (mos)	CHF (%)	Trial	mFU (mos)	CHF (%)
Cardiac death: 0.6 CHF: 1	Cardiac death: 0.04	INT 0148	69	AC: 1 AC → P: 2	BCIRG 001	55	FAC: 0.1 TAC: 1.2
		NSABP B-28	67	AC: 0.1 AC → P: 0.06	PACS 01	60	FEC: 0.4 FEC → D: 0
LVD < 50% at 11 years (%) (N = 355)	LVD < 50% at 8 years (%) (N = 85)	MDACC	60	FAC: 0.3 P → FAC: 0			

**Abbreviations:** AC = doxorubicin, cyclophosphamide; BCIRG = Breast Cancer International Research Group; CHF = cardiac heart failure; D = docetaxel; E = epirubicin; FAC = 5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide; FEC = 5-fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide; INT 0148 = Intergroup trial; LVD = left ventricular dysfunction; m D = median doxorubicin dose; m E = median epirubicin dose; MDACC = M.D. Anderson Cancer Center; mFU = median follow up; mos = months; NSABP B28 = National Surgical Adjuvant Breast & Bowel Project; P = paclitaxel; PACS = adjuvant protocols in breast cancer; TAC = docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide.

Last but not least, the more effective adjuvant CT regimens also have a financial toxicity! Oncologists should be aware that the drug costs of a

dose-dense AC → paclitaxel regimen given with G-CSF support are 33 times higher than those of a short AC combination.<sup>18</sup>

## New information on CT-associated benefits in the long term

The notion that BC is an heterogeneous disease has been around for many years, but few investigators have had the courage to analyse the effects of adjuvant CT in clinically relevant subgroups, e.g., ER-negative or low-ER, intermediate ER and ER-rich disease. This merit goes to the International Breast Cancer Study Group (IBCSG), which has, over the last decade, systematically dissected the disease in these entities and analysed CT effects for each of them.<sup>19,20</sup> This exercise, long considered as purely “intellectual” and futile, has now been performed by several groups with highly consistent results, pointing to marked heterogeneity in the magnitude of CT benefit according to the level of ER expression (see below).

Microarray technology, with its ability to interrogate thousands of genes simultaneously, is reinforcing the notion that ER-negative and ER-positive BCs are indeed two different diseases.<sup>21,22</sup> Further subgroups can be identified (the HER-2 overexpressing and the basal-like subgroups for ER-negative disease, and the luminal A/B/C subgroups for ER-positive disease) but there are—as yet—no solid data pointing to differential CT effects according to these subgroups.

Given this background, we will review the new information on CT benefits first without glasses—i.e. by looking at the whole BC population—and, second, with glasses, i.e., by analysing its differential effects according to ER expression.

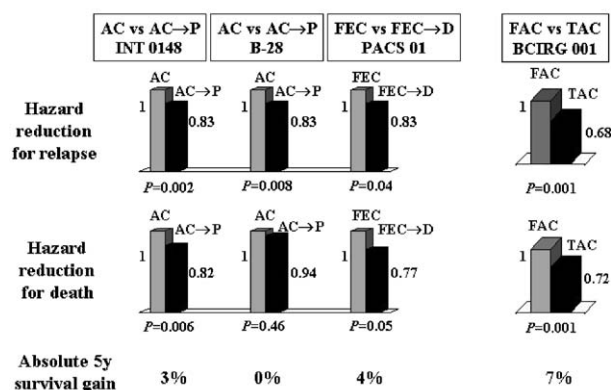
In view of the absence of mature data on the incorporation of capecitabine, gemcitabine and platinum compounds into adjuvant CT regimens, most of the discussion below will focus on taxane-associated benefits.

### “Global” benefits associated with adjuvant taxane use

Figure 1 summarizes the results of four important adjuvant taxane trials conducted in node-positive disease with a median follow-up in excess of 4.5 years: all but one show a 3–7% absolute gain in 5-year survival with the taxane containing arm.<sup>2,3,8,9</sup>

Reductions in the hazards for relapse are fairly consistent with a somewhat more striking effect seen with TAC: it is unclear whether this observation is due to chance, to the choice of a combination rather than a sequential strategy, or to the upfront use of the taxane. Of note, only the PACS 01 trial used a “strong” control arm, consisting of

### TAXANE BENEFITS IN 4 LARGE ADJUVANT TRIALS WITH ≥ 4.5 YEAR FOLLOW-UP All 9671 women with node positive disease



**Figure 1** Results of adjuvant taxane benefits in the larger adjuvant breast cancer trials. AC = doxorubicin, cyclophosphamide; BCI RG = Breast Cancer International Research Group; D = docetaxel; FAC = 5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide; FEC = 5-fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide; INT 0148 = Intergroup trial; NSABP B28 = National Surgical Adjuvant Breast & Bowel Project; P = paclitaxel; PACS = Adjuvant protocols in breast cancer; TAC = docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide; y = years.

six cycles of FEC (with epiadriamycin at 100 mg/m<sup>2</sup>/cycle).<sup>9</sup>

Although many would argue that there is now “level 1” evidence that incorporation of taxanes into A-based regimens improves survival, some discomfort persists in view of the suboptimal design of three out of four trials and because the PACS 01 trial suffers from (1) and imbalance in ER status (more ER-positive cases in the taxane arm), (2) a possible interaction of the taxane effect with age (with a benefit apparently confined to postmenopausal women) and (3) a borderline survival gain after COX regression analysis.<sup>9</sup>

### “Global” benefits associated with neoadjuvant taxane use

The small, elegant and well designed Aberdeen trial, showing an advantage in breast conservation rates, percentages of pathological complete remissions (pCR), 5-year disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) for a sequence of four anthracycline-based cycles followed by four cycles of docetaxel, generated hope that a new “standard” neoadjuvant regimen would soon gain wide acceptance.<sup>23</sup>

Unfortunately, the 5-year results of the large NSABP-B27 trial, comparing neoadjuvant AC alone or sequenced with four postoperative docetaxel cycles to a full preoperative AC→docetaxel sequence, are disappointing: in spite of strikingly improved pCR rates for the latter arm,<sup>24</sup> no long-term DFS or OS has emerged.<sup>25</sup> Decreased relapse-free survival is seen with preoperative docetaxel and fewer local relapses are encountered both with pre- and postoperative docetaxel.<sup>25</sup> These mixed results—together with the use of a suboptimal control arm—do not support the promotion of this regimen—today—as the new standard, but the regimen can be viewed as an option when preoperative CT is indicated.

### CT benefits analysed according to the level of ER expression

As mentioned previously, IBCSG investigators have been the first to detect larger CT effects in ER-negative or low-ER BC compared with ER-intermediate or ER-rich disease.

The last 2 years have accumulated further retrospective, but there is now overwhelming evidence of a much greater magnitude of CT benefit in low-ER or ER-absent disease.

The 2000 overview<sup>26</sup> provides subset analyses of adjuvant treatment benefits according to age and ER status: most provocative is the 8.1% absolute reduction in 10-year mortality seen when CT is given to postmenopausal women with ER-poor BC, contrasting with the 3% absolute reduction observed when it is added to tamoxifen in postmenopausal women with ER-positive or unknown disease. Interestingly, most women in the first cohort had node-negative disease (71%), while 73% were node-positive in the second cohort.

Long-term findings of the NSABP-B20 trial show that the benefit from adding CMF to tamoxifen is inversely related to the quantitative concentration of tumour oestrogen receptors.<sup>27</sup>

In a retrospective review of the CALGB most popular CT trials—namely trial 8541, which compared three different CAF regimens, trial 9344, which incorporated paclitaxel in sequence with AC, and trial 9741, which showed superiority of dose-dense over conventionally timed CT, Donald Berry found a much greater incremental benefit from these successive, more effective regimens, in ER-negative BC.<sup>28</sup>

The MD Anderson team carried out an analysis of pCR rates according to ER status in a series of institutional trials of neoadjuvant CT: a striking

difference was found between “ER-negative” and “ER-positive” tumours, with the former exhibiting four times higher pCR rates than the latter.<sup>29</sup>

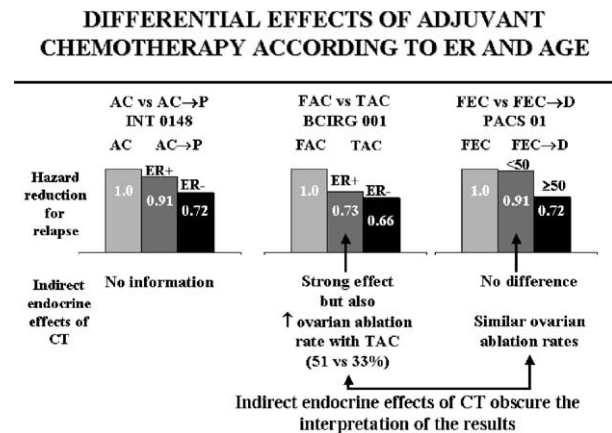
Biologic correlates of the US Intergroup trial INT 100 also strongly suggest that the benefit of adding CAF CT to tamoxifen in postmenopausal women in ER-positive disease is confined to the subset of low-ER tumours.<sup>30</sup>

Age as a surrogate of menopausal status is another important variable that deserves to be examined carefully together with ER status to gain more insight into the effects of adjuvant CT.

Figure 2 displays the results of three adjuvant taxane trials according to ER status and to potential indirect endocrine effects of adjuvant CT occurring through CT-induced ovarian ablation in younger women.<sup>2,8,9</sup>

It is quite puzzling to see that the only trial showing a strong effect of the taxane regimen in the ER-positive subset, namely the BCIRG trial, is also the only trial that reported a significantly higher rate of induction of ovarian ablation for the taxane arm in comparison with the non-taxane arm.

In contrast, the sequential FEC→docetaxel regimen of the PACS O1 trial did not induce more secondary amenorrhea than the classical FEC regimen and, interestingly, did not seem to provide a clinically relevant benefit in women less than 50 years of age.



**Figure 2** Benefits from adjuvant chemotherapy in breast cancer according to age and receptor status. AC = doxorubicin, cyclophosphamide; BCIRG = Breast Cancer International Research group; CT = chemotherapy; D = docetaxel; ER+ = oestrogen receptor positive; ER- = oestrogen receptor negative; FAC = 5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide; FEC = 5-fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide; INT 0148 = Intergroup trial; P = paclitaxel; PACS = adjuvant protocols in breast cancer; TAC = docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide.

## Beyond 2005

Dissecting BC into its relevant entities and designing tailored treatment investigations for each of them becomes a high priority: this means that a revolution needs to happen in the way oncologists are thinking and designing clinical trials for BC.

As shown in Fig. 3, ER-absent or low-ER BC derives striking benefits from adjuvant CT: this subset now deserves clinical trials to itself! These trials are feasible with the current Intergroup collaboration efforts and should examine further requirements in the selection of drugs and doses, schedules and timing of adjuvant CT.

Pending results from “gene expression profiling” studies, smart biological agents need to be incorporated soon in the adjuvant treatment scheme.

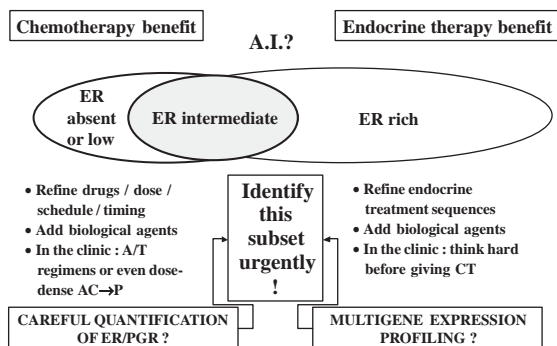
This is also the subgroup of women for whom there should be little hesitation to use the “strongest” CT regimens in the presence of a high risk of relapse.

For ER-rich tumours, the story is quite different: adjuvant CT benefits are more modest and may even become irrelevant with the introduction of aromatase inhibitors in adjuvant endocrine therapy; physicians, here, need to think hard before offering adjuvant chemotherapy.

The priority for these women is the refinement of endocrine treatment sequences, followed by the introduction of smart biological agents aimed at delaying the onset of endocrine resistance.

The intermediate ER subgroup is perhaps the most challenging one: here, there is an urgent need to identify women who do benefit from the addition of CT adjuvant to optimal endocrine therapy.

### BREAST CANCER IS A HETEROGENEOUS DISEASE ! TAILORED TREATMENT INVESTIGATIONS ARE NEEDED



**Figure 3** Tailored treatment investigations in adjuvant breast cancer. AI = aromatase inhibitor; AC → P = doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel; A/T = anthracyclines/taxanes; CT = chemotherapy; ER = oestrogen receptor; PgR = progesterone receptor.

It is presently unclear whether this could be achieved through a careful and detailed quantification of the oestrogen and progesterone receptors or whether more expansive multi-gene signatures such as the one developed by the NSABP, in collaboration with Genomic Health,<sup>31</sup> will be required.

## Conclusions regarding “standard” CT regimens in 2005

Compared with 2003, the threshold for using anthracycline and taxane-based regimens is lower, particularly for women with ER-absent or low-ER tumours or those showing other aggressive biological features. Preference should be given to regimens that have been subjected to a 5-year follow-up: namely the sequence of AC → paclitaxel or docetaxel, the sequence of FEC → docetaxel and the TAC regimen. So far, none of these treatment options seems to be associated with an increased risk of leukaemia, myelodysplastic syndrome or congestive heart failure. Long-term functional cardiac assessment and cognitive function assessment, however, are still lacking.

The “more effective” anthracycline-based regimen, without taxanes, remains an acceptable standard of care.

The relatively slow progress witnessed with adjuvant CT recommendations is due to the conducting of empirical trials, which largely ignore the biological complexity of the disease. Time to start breaking from tradition!

## References

1. Primary Therapy of Early Breast Cancer. Abstracts of the eighth international conference, St. Gallen, Switzerland, March 12–15, 2003. *Breast* 2003;12(Suppl 1):S1–52.
2. Henderson CI, Berry DA, Demetri GD, et al. Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:976–83.
3. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky BC, et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol* 2005;23:3686–96.
4. Sartor CI, Peterson BL, Woolf S, et al. Effect of addition of adjuvant paclitaxel on radiotherapy delivery and locoregional control of node-positive breast cancer: Cancer and Leukemia Group B 9344. *J Clin Oncol* 2005;23:30–40.
5. Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI, et al. Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute

- of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 1998;16: 2651–8.
6. Poole CJ, Earl HM, Dunn JA, et al. NEAT (National Epirubicin Adjuvant Trial) and SCTBG BR9601 (Scottish Cancer Trials Breast Group) phase III adjuvant breast trials show a significant relapse-free and overall survival advantage for sequential ECMF. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:4 [Abstract 13].
  7. Buzdar AU, Singletary SE, Valero V, et al. Evaluation of paclitaxel in adjuvant chemotherapy for patients with operable breast cancer: preliminary data of a prospective randomized trial. *Clin Cancer Res* 2002;8:1073–9.
  8. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;352: 2302–13.
  9. Roché H, Fumoleau P, Spielmann M, et al. Five years analysis of the PACS 01 trial: 6 cycles of FEC100 vs 3 cycles of FEC100 followed by 3 cycles of docetaxel for the adjuvant treatment of node positive breast cancer. *Proc SABCS* 2004;88:1 [Abstract 27].
  10. Smith RE. Risk for the development of treatment-related acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome among patients with breast cancer: review of the literature and the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Clin Breast Cancer* 2003;4:273–9.
  11. Praga C, Bergh J, Bliss J, et al. Risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in trials of adjuvant epirubicin for early breast cancer: correlation with doses of epirubicin and cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 2005;23: 4179–91.
  12. Zambetti M, Moliterni A, Materazzo C, et al. Long-term cardiac sequelae in operable breast cancer patients given adjuvant chemotherapy with or without doxorubicin and breast irradiation. *J Clin Oncol* 2001;19:37–43.
  13. Fumoleau P, Roche H, Kerbrat P, et al. Long-term benefit/risk ratio of epirubicin (EPI)-based adjuvant chemotherapy (CT) in operable breast cancer (BC) patients (pts): 7-year analysis in 3577 pts of French Adjuvant Study Group (FASG) trials. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:23 [Abstract 91].
  14. Zambetti M, Moliterni A, Materazzo C, et al. Long-term cardiac sequelae in operable breast cancer patients given adjuvant chemotherapy with or without doxorubicin and breast irradiation. *J Clin Oncol* 2001;19:37–43.
  15. Bonnetterre J, Roche H, Kerbrat P, et al. Long-term cardiac follow-up in relapse-free patients after six courses of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, with either 50 or 100 mg of epirubicin, as adjuvant therapy for node-positive breast cancer: French adjuvant study group. *J Clin Oncol* 2004;22:3070–9.
  16. Phillips K-A, Bernhard J. Adjuvant breast cancer treatment and cognitive function: current knowledge and research directions. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:190–7.
  17. Wefel JS, Lenzi R, Theriault RL, et al. The cognitive sequelae of standard-dose adjuvant chemotherapy in women with breast carcinoma: results of a prospective, randomized, longitudinal trial. *Cancer* 2004;100:2292–9.
  18. Hamilton A, Hortobagyi G. Chemotherapy: what progress in the last 5 years? *J Clin Oncol* 2005;23:1760–75.
  19. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res* 2004;10:6622–8.
  20. Colleoni M, Bonetti M, Coates AS, et al. Early start of adjuvant chemotherapy may improve treatment outcome for premenopausal breast cancer patients with tumors not expressing estrogen receptors. The International Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2000;18:584–90.
  21. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8418–23.
  22. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10393–8.
  23. Hutcheon AW, Heys SD, Sarkar TK, et al. Docetaxel primary chemotherapy in breast cancer: a five year update of the Aberdeen trial. *Proc SABCS* 2003;82:1 [Abstract 11].
  24. Bear HD, Anderson S, Brown A, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2003;21:4165–74.
  25. Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al. A randomized trial comparing preoperative (preop) doxorubicin/cyclophosphamide (AC) to preop AC followed by preop docetaxel (T) and to preop AC followed by postoperative (postop) T in patients (pts) with operable carcinoma of the breast: results of NSABP B-27. *Proc SABCS* 2004;88:1 [Abstract 26].
  26. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365: 1687–717.
  27. Fisher B, Jeong J-H, Bryant J, Anderson S, Bingam J, Fisher E-R, Wolmark N. Treatment of lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomized clinical trials. *Lancet* 2004;364:858–68.
  28. Berry DA, Cirrincione C, Henderson IC, et al. Effects of improvements in chemotherapy on disease-free and overall survival of estrogen-receptor negative, node-positive breast cancer: 20-year experience of the CALGB & US Breast Intergroup. *Proc SABCS* 2004;88:1 [Abstract 29].
  29. Buzdar AU, Valero V, Theriault RL, et al. Pathological complete response to chemotherapy is related to hormone receptor status. *Proc SABCS* 2003;82:1 [Abstract 302].
  30. Albain K, Barlow W, O'Malley F, et al. Concurrent CAFT versus sequential CAF-T chemohormonal therapy (cyclophosphamide, doxorubicin, 5-fluorouracil, tamoxifen) versus T alone for postmenopausal, node-positive, estrogen and/or progesterone receptor-positive breast cancer: mature outcomes and new biologic correlates on phase III intergroup trial 0100 (SWOG-8814). *Proc SABCS* 2004;88:1 [Abstract 37].
  31. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2865–7.