

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

**Topoisomerase II- $\alpha$  e Her-2 em Tumores Malignos de Mama e de  
Ovário**

*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 Doutor*

**Aluno: Max Senna Mano**

**Porto Alegre, RS**

2006

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

**Topoisomerase II- $\alpha$  e Her-2 em Tumores Malignos de Mama e de  
Ovário**

*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 Doutor*

**Aluno: Max Senna Mano**

**Porto Alegre, RS**

2006

## Ficha Catalográfica

M825t **Mano, Max Senna**

Topoisomerase II- $\alpha$  e Her-2 em tumores malignos de mama e de ovário / Max Senna Mano. – 2006.  
310 f. : il.

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. Neoplasias ovarianas 3. DNA topoisomerases tipo II 4. Genes erbB-2 5. Quimioterapia 6. Amplificação de genes I. Título.

NLM: WP 840

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **Agradecimentos**

---

À amiga Daniela Dornelles Rosa, por ter-me orientado na realização desta tese, pela sua competência extraordinária, e por ser sempre tão positiva;

À profa. Sandra Costa Fuchs, por ter-me aceitado como aluno, apesar da barreira da distância, pela sua paciência na organização dos detalhes práticos;

Ao prof. Gilberto Schwartsmann, por ser um exemplo de dedicação à ciência, por ter elevado o conceito da medicina brasileira no exterior;

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

Ao prof. e amigo Ahmad Awada, pela nossa amizade, e por ter suscitado o meu interesse na pesquisa clínica;

Ao Programa de Pós-Graduação - Ciência Médicas da UFRGS.

---

## Dedicatórias

---

À minha esposa, *Cátia*, pelo nosso profundo amor e carinho, por ter sido uma companheira incansável nas aventuras que a vida nos proporcionou, por ser um exemplo de paciência e serenidade; por ser, frequentemente, o meu próprio ponto de equilíbrio;

À minha mãe, *Elci*, por acompanhar o nosso progresso tão de perto e vibrar de maneira tão sincera com cada etapa vencida, por ter sempre uma palavra positiva, tão importante nas horas difíceis; por ter tido a paciência de fazer as correções gramaticais da presente tese;

Ao meu pai, *Paulo*, por ser um batalhador, por ter-me proporcionado a oportunidade de ter chegado até este ponto, por vibrar com o progresso das nossas carreiras;

Ao meu irmão, *Alex*, pela sua gentileza, pela nossa amizade e companheirismo sinceros, que manteremos até o final das nossas vidas;

Aos meus sogros, *Guido e Tânia*, por terem feito da minha esposa o que ela é, pela nossa amizade, por terem-me acolhido tão carinhosamente na família.

---

## Lista de Abreviaturas da Tese

---

Her-2: receptor epidérmico humano 2

T2A: topoisomerase II- $\alpha$

CO: câncer de ovário

CM: câncer de mama

BRCA1: gene supressor de tumor localizado no cromossomo 17

BRCA2: gene supressor de tumor localizado no cromossomo 13

FIGO: *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

QT: quimioterapia

CC: cirurgia de citorredução

Her-2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

uPA: ativador do plasminogênio do tipo uroquinase

PAI-1: inibidor de ativação de plasminogênio

HT: hormonoterapia

RT: radioterapia

CMF: ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil

CD-20: antígeno celular marcador de linhagem B

K-RAS: proto-oncogenes da família RAS

KIT: receptor tirosino-quinase

PDGFRA: receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas

EGFR: receptor do fator de crescimento epitelial

LMC= leucemia mielocítica crônica

GIST= tumor estromal gastro-intestinal

FISH= hibridização in situ fluorescente

CISH= hibridização in situ cromogênica

PCR= reação em cadeia por polimerase

IHC= imuno-histoquímica

NSCLC= câncer de pulmão não de pequenas células

CMF= ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracil

CEP17= centrômero 17

## Lista de Tabelas da Tese

---

Tabela 1. Estadiamento do câncer de ovário de acordo com a FIGO.....	26
Tabela 2. Grupos de estadiamento.....	27
Tabela 3a. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (tumor primário).....	30
Tabela 3b. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (linfonodos regionais).....	31
Tabela 3c. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (linfonodos regionais–classificação patológica)..	32
Tabela 3d. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (Metástases à distância).....	33
Tabela 4. Sobrevida de 5 anos aproximada para pacientes com câncer de mama, de acordo com o estágio clínico AJCC.....	34



## Sumário

---

Resumo.....	14
Abstract.....	17
1. Introdução.....	20
2. Revisão da literatura.....	23
2.1 Câncer de ovário (CO).....	23
2.1.1 Epidemiologia.....	23
2.1.2 Dados histológicos.....	24
2.1.3 Estadiamento e prognóstico.....	24
2.1.4 Tratamento.....	27
2.2 Câncer de mama (CM).....	28
2.2.1 Epidemiologia.....	28
2.2.2 Dados histológicos.....	28
2.2.3 Estadiamento e prognóstico.....	29
2.2.4 Tratamento.....	33
3. Justificativa dos estudos.....	35
3.1 Importância da identificação de marcadores biológicos no CO e CM.....	35
3.1.1 Obstáculos a uma mais ampla utilização dos tratamentos oncológicos.....	35
3.1.1.1 Quimioterapia.....	35
3.1.1.2 Hormonoterapia.....	38

3.1.1.3	Custo.....	38
3.1.1.4	Relação custo-benefício desfavorável.....	39
3.1.2	Padrões de expressão de genes.....	40
3.1.3	Her-2 e topoisomerase II- $\alpha$ (T2A).....	40
4.	Referências.....	43
5.	Objetivos.....	57
5.1	Objetivos do primeiro artigo.....	57
5.2	Objetivos do segundo artigo.....	57
5.3	Objetivos do terceiro artigo.....	57
6.	Artigos em inglês	
6.1	Artigo 1 em inglês.....	58
6.1.1	Abstract.....	61
6.1.2	Introduction.....	63
6.1.3	Her-2 amplification and overexpression.....	65
6.1.4	Her-2 as a prognostic marker in solid tumours.....	68
6.1.5	Her-2 as a predictive marker.....	68
6.1.6	The 17q12-q21 <i>amplicon</i> .....	71
6.1.7	T2A gene and protein (T2A enzyme) as predictors of response to cytotoxic chemotherapy .....	72
6.1.8	Conclusion.....	76
6.1.9	References.....	78
6.1.10	Figures and tables.....	103
6.2	Artigo 2 em inglês.....	110

6.2.1 Abstract.....	112
6.2.2 Article Outline.....	114
6.2.3 Introduction.....	116
6.2.4 Patients and methods.....	119
6.2.5 Results.....	124
6.2.6 Discussion.....	130
6.2.7 References.....	137
6.2.8 Figures and tables.....	144
6.3 Artigo 3 em inglês.....	149
6.3.1 Abstract.....	152
6.3.2 Introduction.....	154
6.3.3 Material and methods.....	156
6.3.4 Results.....	160
6.3.5 Discussion.....	163
6.3.6 References.....	170
6.3.7 Figures and tables.....	177
7. Artigos em português	
7.1 Artigo 1 em português.....	182
7.1.1 Resumo.....	185
7.1.2 Introdução.....	187
7.1.3 Amplificação e superexpressão do Her-2.....	189
7.1.4 Her-2 como um marcador prognóstico em tumores sólidos.....	192

7.1.5 Her-2 como um marcador preditivo.....	193
7.1.6 O <i>amplicon</i> 17q12-q21.....	196
7.1.7 Gene e proteína (enzima) T2A como marcadores preditivos de resposta à quimioterapia citotóxica.....	197
7.1.8 Conclusão.....	201
7.1.9 Referências.....	204
7.1.10 Figuras e tabelas.....	229
7.2 Artigo 2 em português.....	236
7.2.1 Resumo.....	238
7.2.2 Sumário.....	240
7.2.3 Introdução.....	242
7.2.4 Pacientes e métodos.....	245
7.2.5 Resultados.....	250
7.2.6 Discussão.....	255
7.2.7 Referências.....	262
7.2.8 Figuras e tabelas.....	269
7.3 Artigo 3 em português.....	274
7.3.1 Resumo.....	277
7.3.2 Introdução.....	279
7.3.3 Material e métodos.....	281

7.3.4 Resultados.....	285
7.3.5 Discussão.....	289
7.3.6 Referências.....	296
7.3.7 Figuras e tabelas.....	303
8. Conclusões e perspectivas.....	308

## **Resumo**

Introdução. O receptor epidérmico humano 2 (Her-2) e a topoisomerase-II $\alpha$  (T2A) são dois marcadores biológicos importantes, ambos tendo um valor prognóstico e preditivo potencial em pacientes com tumores sólidos. A amplificação dos genes Her-2 e T2A são eventos independentes, embora o último seja mais frequente em tumores com amplificação do Her-2 (34-90%), do que em tumores sem amplificação do Her-2 (5-10%). Existe uma melhor correlação entre amplificação e superexpressão do Her-2 no câncer de mama (CM) do que em outros tumores. No entanto, no CM, a correlação entre amplificação e superexpressão da T2A tem sido inconsistente, e existe uma carência de tais dados em outros tipos de tumores. A expressão da proteína T2A tem mostrado uma boa correlação com o índice de proliferação tumoral, particularmente no CM.

Objetivos. *Artigo 1:* Sintetizar o conhecimento atual sobre a importância dos marcadores Her-2 e T2A nos tumores sólidos. *Artigo 2:* Investigar a prevalência de amplificação e superexpressão do Her-2 e da T2A, a correlação entre estas variáveis e a correlação entre as variáveis e estágio clínico, em amostras de câncer de ovário (CO) fixadas em parafina. *Artigo 3:* Investigar a prevalência de amplificação da T2A, assim como a correlação entre esta variável e a expressão da proteína T2A e do marcador de proliferação celular Ki-67, em amostras de CM fixadas em parafina, mostrando uma amplificação do Her-2.

Métodos. *Artigo 1:* Os dados foram identificados através de busca em bases de dados eletrônicas (medline), livros de resumos de congressos e referências de

artigos de revisão e originais. *Artigo 2:* 73 amostras de CO foram testadas para amplificação e superexpressão do Her-2 e T2A, por hibridização in situ fluorescente (FISH) e imuno-histoquímica (IHC), respectivamente. *Artigo 3:* 103 amostras de CM, com amplificação do Her-2, foram testadas para amplificação do gene T2A (por FISH) e superexpressão das proteínas T2A e Ki-67 (por IHC).

Resultados. *Artigo 2:* Com base nos pontos de corte  $\geq 1.5$  e  $\geq 2$  (relação cópias/CEP17), as taxas de amplificação do Her-2 foram 15/64(23.4%) e 8/64(12.5%), versus 16/64(25%) e 5/64(7.8 %) para a T2A. Encontramos somente 3/72(4.2%) casos de superexpressão do Her-2(3+), contra 15/70(21.4%) para a T2A (marcagem em >10% das células). Foi observada uma modesta correlação entre amplificação e superexpressão da T2A ( $p= 0.01$ ) e uma forte correlação entre amplificação da T2A e do Her-2, quando analisados como variáveis contínuas ( $p<0.001$ ). A amplificação da T2A correlacionou-se com estágio FIGO avançado ( $p= 0.02$ ). *Artigo 3:* Uma amplificação do gene T2A foi observada em 36.9%(38/103) dos casos. Os níveis de amplificação do Her-2 (número de cópias) não se correlacionaram com a amplificação da T2A. A porcentagem média de células positivas para a T2A (por IHC) foi de 5% e 10%, para casos T2A não-amplificados e amplificados, respectivamente. Uma correlação fraca, mas ainda significativa, foi observada entre amplificação do gene T2A e porcentagem de células T2A-positivas por IHC (Spearman=0.23,  $p=0.02$ ); a correlação entre estas duas variáveis foi mais forte em tumores Ki-67 positivos.

Conclusões. *Artigo 2 :* A avaliação da amplificação e da superexpressão do Her-2 e da T2A, por FISH e IHC, respectivamente, é realizável em amostras de CO. Foi

observada uma boa correlação entre a amplificação dos genes Her-2 e T2A, mas a correlação entre amplificação do gene e superexpressão da proteína foi fraca para ambos marcadores. As taxas de amplificação dos genes Her-2 e T2A são mais elevadas quando não é realizada correção para o número de cópias do CEP17. Parece existir uma boa correlação entre amplificação da T2A e estágio clínico avançado. Estudos adicionais serão necessários para determinar o melhor ponto de corte para estes marcadores. *Artigo 3:* Contrariamente ao Her-2, a amplificação do gene T2A não parece necessariamente levar à superexpressão da proteína no CM. Outros fatores, como o índice de proliferação celular, podem interferir na síntese da proteína T2A. Embora a maioria dos casos de aberrações do gene T2A ocorram em tumores Her-2 positivos, os níveis de amplificação do Her-2 não se correlacionaram com a amplificação do gene T2A.

**Palavras-chave:** topoisomerase-II $\alpha$ , Her-2, amplificação, superexpressão, tumores sólidos, câncer de ovário, quimioterapia, câncer de mama.



## **Abstract**

Background. The human epidermal receptor 2 (Her-2) and topoisomerase-II $\alpha$  (T2A) are two important biomarkers, with potential prognostic and predictive value in patients with solid tumours. Her-2 and T2A gene amplification are separate events, although the latter is more frequently seen in Her-2 amplified (34-90%) than in Her-2 non-amplified (5-10%) tumours. There is a better correlation between Her-2 amplification and protein overexpression in breast cancer (BC) than in other tumour types. Nevertheless, there is a doubtful correlation between T2A amplification and overexpression in BC, with virtually no data available in other tumour types. In BC, the expression of the T2A protein has shown a good correlation with tumour proliferation rate.

Objectives. *Article 1:* To summarise the available literature on Her-2 and T2A in solid tumours. *Article 2:* To investigate the prevalence of Her-2 and T2A amplification and overexpression, the correlation between these variables and with clinical stage, in paraffin-embedded samples of ovarian cancer (OC). *Article 3:* To investigate the prevalence of T2A amplification, as well as the correlation between this variable and the expression of T2A protein and the proliferation marker Ki-67, in paraffin-embedded samples of Her-2 amplified BC.

Methods. *Article 1:* The data were identified through search in electronic databases (medline), abstract books and references from review and original articles. *Article 2:* 73 samples of OC were tested for Her-2 and T2A amplification and overexpression, by fluorescence in situ hybridisation (FISH) and immunohistochemistry (IHC),

respectively. *Article 3*: 103 samples of Her-2 amplified BC were tested for T2A amplification (by FISH) and overexpression (by IHC), and Ki-67 expression (by IHC).

Results. *Article 2*: Based on cut-offs of  $\geq 1.5$  and  $\geq 2$  (ratio copies/CEP17), amplification rates for Her-2 were 15/64(23.4%) and 8/64(12.5%) versus 16/64(25%) and 5/64(7.8%) for T2A. We found only 3/72(4.2%) cases of Her-2 overexpression(3+) versus 15/70(21.4%) for T2A (staining in >10% of the cells). There was a modest correlation between T2A amplification and overexpression ( $p=0.01$ ) and a strong correlation between T2A and Her-2 amplification when these markers were analysed as continuous variables ( $p<0.001$ ). T2A amplification significantly correlated with advanced FIGO stage ( $p=0.02$ ). *Article 3*: T2A gene amplification was observed in 36.9%(38/103) of the Her-2 amplified samples. Her-2 amplification level (i.e. copy number) was not predictive of T2A amplification. The median percentage of T2A positive cells for T2A non-amplified and amplified cases were 5% and 10%, respectively. A weak but still significant correlation was observed between T2A gene amplification level and percentage of positively stained cells (Spearman=0.23,  $p=0.02$ ), the observed correlation being higher in patients with positive staining for Ki-67.

Conclusions. *Article 2*: The assessment of Her-2 and T2A amplification and overexpression by FISH and IHC, respectively, is feasible in OC samples. There was a good correlation between Her-2 and T2A gene amplification, but the correlation between gene amplification and protein overexpression was poor for both markers. Amplification rates were higher in the absence of correction for the number of copies of the CEP17. Finally, we found a good correlation between T2A amplification and

advanced disease stage. Further studies should aim to determine the optimal cut-offs for these markers. *Article 3:* Contrary to Her-2, T2A gene amplification does not always lead to protein overexpression in BC. Other factors, especially tumour proliferation rate, may interfere with the T2A protein status. Although the majority of the cases of T2A gene aberrations are seen in Her-2 positive tumours, the level of Her-2 amplification does not predict for T2A amplification.

**Key Words:** topoisomerase-II $\alpha$ , Her2, amplification, overexpression, solid tumours, ovarian cancer, chemotherapy, breast cancer.

## 1. Introdução

A quimioterapia tem adquirido uma importância crescente no manejo de pacientes com tumores sólidos. No entanto, nos estágios iniciais, o benefício obtido com sua adição pode ser modesto, com efeitos adversos que não devem ser subestimados. Na doença avançada, ainda é considerada o pilar do tratamento, mas a sua utilização deve ser considerada levando-se em conta o risco de efeitos tóxicos, custo e questões ligadas à qualidade de vida.

O efeito apenas modesto da quimioterapia no prognóstico pode ser explicado, ao menos em parte, pela ausência de alvos moleculares relevantes. A baixa especificidade da maioria dos tratamentos anti-neoplásicos resulta em uma certa 'diluição' do seu efeito global, além de explicar, em grande parte, os efeitos tóxicos frequentemente associados à utilização destas drogas. Este panorama poderia ser melhorado pela identificação de alvos moleculares relevantes para as drogas anti-neoplásicas, o que ajudaria a identificar pacientes com maior probabilidade de beneficiarem-se de um certo tratamento. Esta abordagem tem sido empregada com sucesso no desenvolvimento de vários compostos anti-neoplásicos, particularmente no caso dos novos agentes biológicos [1-11]. Além disso, uma melhor seleção dos pacientes poderia levar a uma melhor racionalização dos recursos financeiros destinados à área da saúde.

Por esta razão, existe, atualmente, um grande interesse na investigação de marcadores preditivos de resposta à quimioterapia, um tratamento potencialmente mais tóxico do que terapias hormonais e biológicas. Resultados promissores têm

sido obtidos com a técnica de avaliação do padrão de expressão de genes [12-15], que é, no entanto, relativamente complexa e onerosa e que ainda precisa ser validada no contexto clínico [16]. Outros marcadores biológicos, de realização mais simples, e que têm sido largamente investigados como fatores preditivos de resposta à quimioterapia (neste caso, às antraciclinas), são os genes Her-2 e topoisomerase-II $\alpha$  (T2A) e as suas respectivas proteínas. Embora, atualmente, a superexpressão e/ou amplificação do Her-2 sejam amplamente aceitos como fatores prognósticos no CM, o seu papel como fator preditivo de resposta à quimioterapia citotóxica não está bem estabelecido. A explicação para isto pode vir de um melhor entendimento da biologia do *amplicon* Her-2, que é sede de uma série de genes importantes como o da T2A, frequentemente co-amplificado ou deletado em tumores com amplificação do Her-2, e que pode ser o verdadeiro marcador preditivo de resposta às antraciclinas. Entre os diversos eventos genéticos de interesse que podem ocorrer neste sítio cromossômico, a relação entre a amplificação dos genes Her-2 e T2A permanece pouco estudada. No CM, a correlação entre a amplificação do gene e a expressão da proteína Her-2 é excelente, mas tal relação não tem sido claramente demonstrada em outros tumores sólidos. A correlação entre a amplificação do gene e a expressão da proteína T2A tem sido estudada no CM, com resultados variáveis, mas existem poucos dados em outros tumores sólidos.

Em resumo, o estudo da relação entre estas variáveis – amplificação do gene e expressão da proteína Her-2 e T2A – da mesma forma que da relação entre estas variáveis e outros parâmetros clínico-biológicos, em tumores de mama e ovário, tem sido uma linha de pesquisa tradicional na nossa instituição, tendo um valor preditivo

e prognóstico potencial nestes dois tipos de tumores. Isto justifica, portanto, a escolha deste tema para desenvolvimento da tese.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1 Câncer de ovário (CO)

#### 2.1.1 Epidemiologia

O CO é considerado uma importante causa de mortalidade no sexo feminino a nível mundial [17]. No entanto, a incidência parece ser maior em países ocidentais desenvolvidos; na América do Norte, por exemplo, o CO é considerado a quinta causa de mortalidade por câncer em mulheres [18,19]. Somente nos Estados Unidos, o número estimado de novos casos em 2006 é de 20.180, com 15.310 mortes previstas [20]. Na Europa, o CO é considerado o quinto tumor maligno mais frequente em mulheres [21]. Existem poucos dados sobre a real incidência de CO no Brasil, mas assumindo que esta siga a mesma tendência do câncer de mama (CM), especula-se que a incidência deva ser mais elevada nas regiões de maior desenvolvimento sócio-econômico, como Sul e Sudeste.

A grande maioria dos casos de CO são diagnosticados no período da peri- e pós-menopausa, com um pico de incidência aos 60 anos [22]. Os tumores epiteliais malignos de ovário são raramente vistos antes dos 20 anos de idade. Enquanto 90% dos casos de CO são ditos 'esporádicos', aproximadamente 10% são 'hereditários' (associados a uma mutação dos genes BRCA1 ou BRCA2). Estes últimos ocorrem numa idade média 10 anos inferior a dos casos esporádicos [23].

### 2.1.2 Dados histológicos

Os tumores malignos de ovário são histologicamente divididos em epiteliais, germinativos e de células da granulosa. Apesar da localização em comum, estes três tipos representam entidades distintas. Somente os tumores epiteliais (carcinomas), de longe os mais frequentes (90%), serão abordados neste trabalho. Estes últimos podem ser ainda subdivididos em serosos, endometrióides, mucinosos e de células claras [24]. Algumas vezes, os carcinomas de ovário apresentam características histológicas mistas (de vários dos subtipos acima); outras vezes, a distinção é impossível, como no caso de tumores pouco diferenciados. Os tumores epiteliais malignos primários do peritônio são extremamente semelhantes ao CO, em relação aos aspectos histológicos e ao comportamento clínico e, em geral, são abordados de forma idêntica [25]; estes tumores também foram incluídos no presente trabalho.

### 2.1.3 Estadiamento e prognóstico

Infelizmente, os diversos métodos de rastreamento do CO têm-se mostrado pouco eficazes. Além disso, a doença tende a evoluir de forma 'silenciosa' nos estágios iniciais [26]. Em vista disto, em cerca de 80% dos casos o diagnóstico é feito somente em estágios tardios (estágios III e IV, de acordo com a *International Federation of Gynecology and Obstetrics* [FIGO]; tabelas 1 e 2) [27,28]. O prognóstico deste grupo de pacientes é considerado reservado, com uma sobrevida média de apenas 2-4 anos, mesmo com tratamento adequado [29,30]. Em cerca de 20% dos casos nos quais a doença é fortuitamente diagnosticada em estágio inicial



(FIGO I ou II), o prognóstico melhora de forma significativa, com taxas de sobrevida em 5 anos superiores a 70% (quase comparáveis as do CM não-metastático) [31]. Nos estágios mais precoces, alguns fatores têm sido associados a um maior risco de recidiva, como tipo histológico (células claras ou mucinoso), alto grau histológico, presença de invasão da serosa e/ou aderências, citologia peritoneal positiva [32] e, possivelmente, níveis séricos de CA-125 (em pacientes com estágio I) [33]. No caso de recidiva, o prognóstico é bastante desfavorável; o tratamento torna-se essencialmente paliativo, embora a administração de quimioterapia (QT) venha sendo associada a um certo aumento da sobrevida neste contexto [34,35].

Tabela 1. Estadiamento do câncer de ovário de acordo com a FIGO. (Cortesia da Dra. Daniela Dornelles da Rosa)

Categoria TNM	Estágio FIGO	
<b>Tumor primário (T)</b>		
TX		Tumor primário não pode ser avaliado
T0		Sem evidência de tumor primário
T1	I	Tumor limitado aos ovários (um ou ambos)
T1a	IA	Tumor limitado a um ovário; cápsula intacta, sem tumor na superfície ovariana. Sem células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal*
T1b	IB	Tumor limitado a ambos os ovários; cápsula intacta, sem tumor na superfície ovariana. Sem células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal*
T1c	IC	Tumor limitado a um ou ambos os ovários, com qualquer um dos seguintes: ruptura de cápsula, tumor na superfície ovariana, células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal
T2	II	Tumor envolve um ou ambos os ovários, com extensão pélvica e/ou implantes
T2a	IIA	Extensão e/ou implantes no útero e/ou trompa(s). Sem células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal
T2b	IIB	Extensão e/ou implantes em outros tecidos pélvicos. Sem células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal
T2c	IIC	Extensão pélvica e/ou implantes (T2a ou T2b) com células malignas no líquido de ascite ou no lavado peritoneal
T3	III	Tumor envolve um ou ambos os ovários, com metástases peritoniais fora da pelve confirmadas microscopicamente
T3a	IIIA	Metástases peritoniais microscópicas extra-pélvicas (sem tumor macroscópico)
T3b	IIIB	Metástases peritoniais macroscópicas extra-pélvicas, com 2 cm ou menos na sua maior dimensão
T3c	IIIC	Metástases peritoniais extra-pélvicas, com mais de 2 cm na sua maior dimensão e/ou metástases em linfonodos regionais
*Nota: a presença de ascite não afeta o estadiamento, a não ser que haja células malignas. Nota: metástases para cápsula do fígado são consideradas T3/estadio III; metástases para parênquima hepático são consideradas M1/estadio IV. Derrame pleural deve ter citologia positiva para ser considerado M1/estadio IV.		
<b>Linfonodos regionais (N)</b>		
NX		Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0		Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	IIIC	Metástases em linfonodos regionais
<b>Metástases à distância (M)</b>		
MX		Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0		Ausência de metástases à distância
M1	IV	Metástases à distância (exclui metástases peritoniais)

Tabela 2. Grupos de estadiamento (Cortesia da Dra. Daniela Dornelles Rosa)

Estágio I	T1	N0	M0
Estágio IA	T1a	N0	M0
Estágio IB	T1b	N0	M0
Estágio IC	T1c	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio IIA	T2a	N0	M0
Estágio IIB	T2b	N0	M0
Estágio IIC	T2c	N0	M0
Estágio III	T3	N0	M0
Estágio IIIA	T3a	N0	M0
Estágio IIIB	T3b	N0	M0
Estágio IIIC	T3c	N0	M0
	Qualquer T	N1	M0
Estágio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

#### 2.1.4 Tratamento

Em geral, o tratamento do CO consiste em uma cirurgia de citoredução (CC) máxima, seguida de QT com um sal de platina combinado a um taxano [29,30,36]. Em alguns casos, a QT pode preceder a cirurgia. É um fato atualmente bem estabelecido que, pacientes nas quais uma CC máxima pôde ser obtida (doença residual <1-2 cm), terão uma sobrevida mais longa [37]. Mais recentemente, e mais particularmente neste subgrupo de pacientes, a QT intraperitoneal mostrou-se superior à QT sistêmica [38,39]. Na doença recorrente sensível à platinas (recidiva  $\geq$  6 meses após o término da QT de primeira linha), a carboplatina, associada ao paclitaxel ou à gemcitabina, são atualmente considerados tratamentos de escolha

[34,35]. O papel da cirurgia no tratamento da doença recorrente é considerado incerto [40-42].

## **2.2 Câncer de mama (CM)**

### 2.2.1 Epidemiologia

Os tumores malignos de mama constituem a doença maligna mais frequente em mulheres na maior parte dos países desenvolvidos, assim como em algumas regiões da América do Sul. Nos Estados Unidos, o número de novos casos estimados para 2006 é de 212.920, com 40.970 mortes previstas [43]. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para 2006 é de aproximadamente 48.000 novos casos; a maior incidência é observada nas regiões Sul e Sudeste. Os maiores valores das taxas médias de incidência anuais ajustadas por idade por 100 mil mulheres foram vistos em São Paulo (1997-1998: 94,0); Distrito Federal (1996-1998: 86,1) e Porto Alegre (1993-1997: 66,5) [44]. As taxas de incidência do CM aumentam com a idade, alcançando seu pico na faixa etária de 65 a 70 anos.

### 2.2.2 Dados histológicos

A grande maioria dos tumores malignos de mama são do tipo epitelial (70-80% carcinomas ductais, 10-20% carcinomas lobulares, além de outros tipos

histológicos mais raros) [45]. Somente os tumores epiteliais serão abordados neste trabalho.

### 2.2.3 Estadiamento e prognóstico

Em geral, o CM é associado a um prognóstico favorável, particularmente quando diagnosticado em estágios iniciais. Pacientes com menos de 35 anos, tumores maiores, invasão de linfonodos axilares, invasão linfo-vascular, tumores altamente proliferativos e/ou outras características biológicas (como ausência de receptores hormonais, superexpressão do Her-2, presença de marcadores de invasividade como ativador do plasminogênio do tipo uroquinase [uPA] e inibidor de ativação de plasminogênio [PAI-1]) [46] estão sujeitas a um maior risco de recidiva e óbito e, em geral, devem ser tratadas de maneira mais agressiva. Já o CM metastático deve ser visto como uma doença incurável, associado a uma sobrevida média de 2-4 anos. Detalhes sobre o estadiamento do CM e taxas de sobrevida por estágio podem ser encontrados nas tabelas 3a,3b,3c e 4.

Tabela 3a. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (tumor primário)

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

Tabela 3b. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (linfonodos regionais)

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

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

Tabela 3c. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (linfonodos regionais– classificação patológica)

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

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

\*\* Células tumorais isoladas (CTI) são definidas como células únicas ou pequeno grupo de células (cluster) (≤0.2 mm), geralmente detectadas por imunohistoquímica (IHC) ou métodos moleculares mas que podem ser verificadas por coloração de H&E. Em geral, CTIs não apresentam evidência de atividade maligna, como proliferação ou reação estromal.

- pN0(I-): Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), IHC negativa

- pN0(I+): Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), IHC positiva, ausência de cluster >0.2 mm

- pN0(mol-): Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), marcadores moleculares negativos (RT-PCR)\*\*\*

- pN0(mol+): Ausência de metástase(s) histológica(s) para linfonodo(s) regional(is), marcadores moleculares positivos (RT-PCR)\*\*\*

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

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



Tabela 3d. Estadiamento do câncer de mama de acordo com as definições do sistema TNM, utilizado pela AJCC (Metástases à distância)

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

Tabela 4. Sobrevida de 5 anos aproximada para pacientes com câncer de mama, de acordo com o estágio clínico AJCC (Fonte: *American Cancer Society*)

<b>Estágio</b>	<b>Sobrevida relativa a 5 anos</b>
<b>0</b>	100%
<b>I</b>	98%
<b>IIA</b>	88%
<b>IIB</b>	76%
<b>IIIA</b>	56%
<b>IIIB</b>	49%
<b>IV</b>	16%

O rastreamento tem-se mostrado uma medida eficaz na redução da mortalidade por CM [47]. Infelizmente, a porcentagem de casos diagnosticados em estágio localmente avançado ou metastático ainda é relativamente alta nos países em desenvolvimento, em relação aos países desenvolvidos.

#### 2.2.4 Tratamento

O tratamento do CM não-metastático deve ser sempre considerado como potencialmente curativo, consistindo em um procedimento de ressecção cirúrgica (algumas vezes realizado inicialmente, outras vezes após um período de tratamento sistêmico), seguido, em alguns casos, de radioterapia (RT), frequentemente de QT (em geral contendo uma antraciclina **[1]**, com ou sem a adição de um taxano **[48-54]**) e de uma hormonoterapia (HT), no caso de pacientes com tumores responsivos a manipulações hormonais (isto é, com expressão de receptores hormonais) **[1]**. Mais recentemente, o anticorpo monoclonal trastuzumab tem sido também empregado em pacientes com tumores que apresentam superexpressão e/ou amplificação do Her-2 **[55-58]**.

No entanto, apesar da disponibilidade de tratamentos sistêmicos cada vez mais eficazes, o CM metastático continua sendo uma doença letal. Em geral, estas pacientes são tratadas de maneira paliativa, com a utilização sequencial de tratamentos do tipo HT, QT e RT, além de um número crescente de tratamentos biológicos **[2-4,59]**.

### 3. Justificativa dos estudos

#### 3.1 Importância da identificação de marcadores biológicos no CO e no CM

Embora a cirurgia tenha um papel importante no manejo de grande parte dos tumores sólidos, outras modalidades de tratamento têm-se mostrado eficazes e complementares à cirurgia neste contexto. No CO, por exemplo, a QT pré ou pós-operatória tem tido um papel fundamental no aumento da sobrevida das pacientes [29,30]. Já no CM, além da QT [1], deve-se também destacar o papel importante da HT [1], da RT [1] e, mais recentemente, de novos tratamentos biológicos como o trastuzumab [55-58].

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

Apesar destes dados encorajantes, uma série de obstáculos têm dificultado a utilização rotineira de alguns destes tratamentos, discutidos em detalhe a seguir.

###### 3.1.1.1 Quimioterapia

No caso da QT, um dos inconvenientes é o risco de efeitos tóxicos, muitas vezes às custas de ganhos de sobrevida relativamente modestos. No CM não-metastático, por exemplo, a QT resulta em um ganho absoluto de sobrevida de apenas 2-3% em pacientes pós-menopáusicas, e de 8-12% em pacientes pré-menopáusicas [1]. No entanto, os efeitos adversos imediatos são bem conhecidos, incluindo alopecia, mielotoxicidade (neutropenia/infecção, anemia e

trombocitopenia), fadiga, mucosite, êmese, flebite periférica, eventos tromboembólicos [60], menopausa precoce [61], além de problemas psicológicos e cognitivos diversos [62]. Para os taxanos, é preciso ainda acrescentar o risco de neuropatia periférica sensitiva e dores ósteo-articulares [48-54]. Existem, também, alguns efeitos adversos tardios potencialmente graves, como a cardiomiopatia (0.3-1.5%) [63,64] e a leucemia secundária (0.2-1.7%) [65-67] com as antraciclinas, e a neuropatia sensitiva persistente no caso dos taxanos [48-54]. É importante salientar que a administração de antraciclinas resulta num ganho absoluto de sobrevida de apenas 4% em relação aos regimes sem antraciclinas (em geral, ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil [CMF] ou variações deste esquema) [1]. Similarmente, a adição de taxanos parece resultar num ganho absoluto de menos de 5% (em termos de redução do risco de recidiva), com um impacto ainda incerto sobre a sobrevida a longo prazo [48-54]. Estes fatos nos levam a questionar o valor da utilização sistemática destas drogas, particularmente em pacientes com um menor risco de recidiva [46].

No CO avançado, a QT tem tido um papel central no manejo da doença, com um impacto inquestionável no aumento da sobrevida das pacientes [68]. Em estágios mais precoces, o aumento da sobrevida é mais modesto, de ordem de aproximadamente 10% [31]. No CO, a administração de QT resulta em efeitos adversos imediatos semelhantes aos descritos para o CM (acima), além de um risco provavelmente maior de neuropatia periférica persistente [69], devido ao maior número de ciclos de paclitaxel administrados, e/ou à utilização ocasional de cisplatina em vez da carboplatina. Embora o papel da QT no CO seja atualmente

inquestionável, o benefício pode ser pequeno em pacientes com tumores em estágio inicial (estágio I, histologia favorável, grau I/II), nas quais o risco de recidiva é baixo. Finalmente, os resultados (controversos) de alguns estudos randomizados recentes, questionando o valor da adição do paclitaxel aos sais de platina no CO avançado [70,71], da mesma forma que o papel incerto do primeiro no tratamento do CO inicial (estágio I e IIa), reforçam a necessidade de se identificar fatores preditivos de resposta a estes agentes potencialmente tóxicos.

Até recentemente, existia ainda um certo interesse na investigação do papel das antraciclinas no CO, baseado principalmente em dados de uma antiga (e contestada) meta-análise, que mostrou uma modesta superioridade de regimes contendo antraciclinas em relação ao tratamento padrão na época (ciclofosfamida e cisplatina) [72]. Além disso, no estudo ICON-2, o regime cisplatina, ciclofosfamida e doxorubicina (PAC) foi considerado equivalente à carboplatina (AUC=6) [73], enquanto no estudo ICON-3, o braço experimental (carboplatina ou PAC, segundo escolha do investigador) mostrou-se tão eficaz quanto o braço controle (carboplatina-paclitaxel) [70]. Mesmo que, até o momento, nenhum estudo tenha provado o valor da adição de uma terceira droga no tratamento do CO [74,75], baseado nos dados acima, dois grandes ensaios randomizados foram recentemente realizados, investigando o valor da adição da epirubicina ao regime carboplatina-paclitaxel. Infelizmente, os resultados destes estudos foram negativos [76,77], mas não se pode atualmente excluir que alguns pacientes, cujos tumores apresentam certas características biológicas, possam ter um benefício seletivo com a adição destas drogas.

### 3.1.1.2 Hormonoterapia

Embora o tamoxifeno venha sendo considerado a HT de escolha para pacientes com CM de qualquer idade e estágio clínico, este dogma tem sido questionado devido à aparição dos inibidores da aromatase, cuja eficácia tem sido superior a do tamoxifeno em ensaios clínicos randomizados, mais particularmente em pacientes pós-menopáusicas [78-84]. No entanto, estes agentes têm sido associados a um risco maior de osteoporose [85-87], sintomas ósteo-articulares [78-84] e dislipidemia [88]. Na maior parte dos estudos, o efeito destas drogas (em termos de redução do risco de recidiva) foi relativamente modesto (13-40%), e o impacto sobre a sobrevida ainda não foi claramente demonstrado.

### 3.1.1.3 Custo

Um outro aspecto a ser considerado é o aumento galopante do custo dos tratamentos oncológicos, uma questão particularmente importante para países em desenvolvimento, mas também para países desenvolvidos com sistemas de saúde baseados numa filosofia 'igualitária' (ou seja, essencialmente financiados por fundos públicos) [16]. Infelizmente, o custo tem-se tornado um fator limitante à utilização de certos tratamentos a nível populacional, como no caso dos novos agentes hormonais utilizados no tratamento do CM [78-84], ou dos novos compostos biológicos, indicados para tratamento de vários tipos de tumores sólidos e hematológicos [2-4,6,7,89,90].

#### 3.1.1.4 Relação custo-benefício desfavorável

Uma das explicações para o efeito frequentemente modesto dos tratamentos oncológicos é a falta de critérios que permitam a identificação de indivíduos com maior probabilidade de se beneficiar de uma determinada intervenção, o que resulta numa certa ‘diluição’ do efeito do tratamento administrado. Neste contexto, a identificação de alvos terapêuticos relevantes poderia permitir uma melhor individualização dos tratamentos contra o câncer, resultando numa melhor racionalização dos recursos financeiros, numa redução do número de pacientes desnecessariamente expostos a terapias potencialmente tóxicas e, talvez, numa melhora dos resultados obtidos com alguns tipos de tratamento, até então considerados de eficácia limítrofe, quando utilizados em uma população não selecionada.

A pesquisa nesta área tem sido intensa e alguns resultados promissores têm sido relatados. Em tumores hematológicos, por exemplo, o anticorpo monoclonal rituximab foi especificamente desenvolvido para uso em linfomas não-Hodkinianos que exprimem o antígeno CD-20 [89]; já o inibidor da tirosino-quinase imatinib deve ser empregado unicamente em casos de pacientes com leucemia linfocítica crônica positiva para o cromossomo Philadelphia [6]. Em tumores sólidos, o imatinib tem mostrado uma excelente atividade em tumores estromais gastro-intestinais, mas somente na presença de uma mutação do KIT (CD 117) ou PDGFRA [7]. Dois outros agentes ‘anti-EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial)’ – os inibidores da tirosino-quinase erlotinib e gefitinib – têm mostrado uma atividade modesta em pacientes não selecionados com câncer de pulmão não de pequenas células, mas

estudos recentes têm sugerido um benefício mais robusto ou, por vezes, mesmo restrito a pacientes com tumores apresentando uma mutação ou amplificação do gene EGFR, uma superexpressão da proteína EGFR e uma ausência de mutação do gene K-RAS [8-11]. No CM, deve-se citar o exemplo dos tratamentos hormonais, exclusivamente para pacientes com tumores que exprimem receptores hormonais [1] e o anticorpo monoclonal trastuzumab, ativo somente em pacientes com tumores mostrando uma superexpressão e/ou amplificação do Her-2 [2,3]. Na maioria dos exemplos acima, a identificação de vias que sejam relevantes para a sobrevivência das células tumorais, da mesma forma que a identificação de tratamentos especificamente direcionados para certos 'alvos', em algum ponto destas vias, provavelmente expliquem o sucesso no desenvolvimento destes compostos.

### 3.1.2 Padrões de expressão de genes

Existe atualmente um grande interesse na investigação de padrões de expressão de genes como fatores prognósticos e preditivos em tumores sólidos e hematológicos [12-15]. No entanto, estas técnicas têm-se mostrado complexas e custosas, e serão dificilmente realizáveis em larga escala fora de centros de referência, ressaltando a necessidade de identificar-se testes mais simples e facilmente reproduzíveis.

### 3.1.3 Her-2 e topoisomerase II- $\alpha$ (T2A)



O Her-2 é um gene localizado no braço longo do cromossomo 17, responsável pela síntese da proteína de mesmo nome, que, por sua vez, pode ser detectada na superfície das células tumorais. O interesse maior deste gene é o seu valor prognóstico em diversos tumores sólidos, da mesma forma que o seu valor preditivo de resposta ao tratamento com compostos 'anti Her-2' (como o anticorpo monoclonal trastuzumab e o inibidor da tirosino-quinase lapatinib) e, de uma forma menos clara, mas ainda em investigação, a certos tipos de QT (mais particularmente no CM).

A topoisomerase II- $\alpha$  (T2A) é um gene localizado à vizinhança do Her-2 **[91]**, no braço longo do cromossomo 17. O gene T2A é responsável pela síntese da proteína de mesmo nome, que, por sua vez, é uma enzima com um papel importante no controle do processo de replicação celular, além de ser o alvo de um grupo de agentes de QT conhecidos por inibidores da T2A (antraciclinas, etoposide e teniposide). Embora a expressão da enzima T2A não pareça ser um fator preditivo confiável de resposta a estes agentes, estudos têm sugerido que a amplificação do gene T2A possa ser um poderoso fator preditivo de resposta às antraciclinas.

A maior parte dos dados atualmente disponíveis para estes dois marcadores são provenientes de estudos em CM. O nosso grupo é um entre vários que se tem dedicado ao estudo destes marcadores, principalmente no CM, mas ocasionalmente em outros tumores sólidos, como no caso de um estudo pioneiro realizado em tumores epiteliais malignos de ovário (apresentado a seguir). Apesar da sua proximidade no genoma, existe, na verdade, uma relação complexa entre a expressão destes dois genes, e parece haver uma relação igualmente complexa entre a expressão destes genes e das suas respectivas proteínas nos diferentes

tumores sólidos. Um bom exemplo da complexidade do processo de regulação da expressão da proteína T2A nos tumores sólidos são os dados gerados por alguns autores, sugerindo que a expressão desta enzima seja altamente dependente da proliferação celular, medida, por exemplo, pela expressão do marcador Ki-67 [92]. Um melhor entendimento destes processos é uma etapa fundamental na elucidação da utilidade clínica destes dois marcadores, justificando a atual linha de pesquisa.

#### 4. 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 May 14-20;365(9472):1687-717.
- [2] 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 Sep;17(9):2639-48.
- [3] 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 Feb 1;20(3):719-26.
- [4] Geyer CE, Cameron D, Lindquist D, et al. A phase III randomized, open-label, international study comparing lapatinib and capecitabine vs capecitabine in women with refractory advanced or metastatic breast cancer (EGF100151). ASCO 2006 (late breaking abstract).
- [5] Ghilmini M, Schmitz SF, Cogliatti SB, et al. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. Blood. 2004 Jun 15;103(12):4416-23.

- [6] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
- [7] Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347:472-480, 2002.
- [8] Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):133-44.
- [9] Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005 May 4;97(9):643-55.
- [10] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.
- [11] Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):5900-9.
- [12] Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*. 2003 Aug 2;362(9381):362-9.
- [13] Ayers M, Symmans WF, Stec J, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and

cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 15;22(12):2284-93.

**[14]** Folgueira MA, Carraro DM, Brentani H, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 15;11(20):7434-43.

**[15]** Thuerigen O, Schneeweiss A, Toedt G, et al. Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 20;24(12):1839-45.

**[16]** Mano M. The burden of scientific progress: growing inequalities in the delivery of cancer care. *Acta Oncol*. 2006;45(1):84-6.

**[17]** Boring C. et al, *CA-A Cancer J Clin* 1994; 44(1):7-26.

**[18]** Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, et al. Trends in cancer incidence and mortality. 121 ed. Lyon, France: IARC Scientific Publications, 1993.

**[19]** Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51(1):15-36.

**[20]** American Cancer Society.: *Cancer Facts and Figures 2006*. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2006.

**[21]** Ferlay J, Bray F, Sankila R, Parkin D (1999) *EUCAN: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence in the European Union 1997*, version 4.1, Vol. IARC CancerBase No. 4. Lyon, France: IARC Press.

**[22]** Yancik R. Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer* 1993; 71(2 Suppl):517-523.

- [23]** Heintz AP, Hacker NF, Lagasse LD. Epidemiology and etiology of ovarian cancer: a review. *Obstet Gynecol* 1985; 66(1):127-135.
- [24]** <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/ovarianepithelial/HealthProfessional/page2>
- [25]** Jaaback KS, Ludeman L, Clayton NL, Hirschowitz L. Primary peritoneal carcinoma in a UK cancer center: comparison with advanced ovarian carcinoma over a 5-year period. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Jan-Feb;16 Suppl 1:123-8.
- [26]** Smith LH, Morris CR, Yasmeeen S, et al.: Ovarian cancer: can we make the clinical diagnosis earlier? *Cancer* 104 (7): 1398-407, 2005.
- [27]** Ovary. American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. New York, NY: Springer, 2002: 275-284.
- [28]** Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer* 2000; 89(10):2068-2075.
- [29]** Piccart MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 3;92(9):699-708.
- [30]** McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med*. 1996 Jan 4;334(1):1-6.
- [31]** Trimbos JB, Parmar M, Vergote I, et al.: International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95 (2): 105-12, 2003.

- [32]** Ahmed FY, Wiltshaw E, A'Hern RP, et al.: Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 14 (11): 2968-75, 1996.
- [33]** Paramasivam S, Tripcony L, Crandon A, et al. Prognostic importance of preoperative CA-125 in International Federation of Gynecology and Obstetrics stage I epithelial ovarian cancer: an Australian multicenter study. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):5938-42. Epub 2005 Aug 8.
- [34]** Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, et al.: Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* 361 (9375): 2099-106, 2003.
- [35]** Pfisterer J, Vergote I, Du Bois A, Eisenhauer E; AGO-OVAR; NCIC CTG; EORTC GCG. Combination therapy with gemcitabine and carboplatin in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 May-Jun;15 Suppl 1:36-41.
- [36]** Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, et al; Scottish Gynaecological Cancer Trials Group. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Nov 17;96(22):1682-91.
- [37]** Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1248-59.
- [38]** Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, et al; Gynecologic Oncology Group. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2006 Jan 5;354(1):34-43.

- [39] Jaaback K, Johnson N. Intraperitoneal chemotherapy for the initial management of primary epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006 Jan 25;(1):CD005340. Review.
- [40] Hoskins WJ, Rubin SC, Dulaney E, et al.: Influence of secondary cytoreduction at the time of second-look laparotomy on the survival of patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 34 (3): 365-71, 1989.
- [41] Segna RA, Dottino PR, Mandeli JP, et al.: Secondary cytoreduction for ovarian cancer following cisplatin therapy. *J Clin Oncol* 11 (3): 434-9, 1993.
- [42] Morris M, Gershenson DM, Wharton JT, et al.: Secondary cytoreductive surgery for recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 34 (3): 334-8, 1989.
- [43]<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdg/treatment/breast/HealthProfessional/page1>.
- [44]<http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=comentarios.asp&ID=13>.
- [45]<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/HealthProfessional/page2>
- [46] Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol.* 2005 Oct;16(10):1569-83.
- [47] Shen Y, Yang Y, Inoue LY, Munsell MF, Miller AB, Berry DA. Role of detection method in predicting breast cancer survival: analysis of randomized screening trials. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Aug 17;97(16):1195-203.



**[48]** Martin M, Pienkowski T, Mackey J, et al; Breast Cancer International Research Group 001 Investigators. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jun 2;352(22):2302-13.

**[49]** 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 (D) for the adjuvant treatment of node positive breast cancer. *Br Cancer Res Treat* 2004 (abstract 27).

**[50]** Mamounas E.P., Bryant J., Lembersky B.C. et al., Paclitaxel (T) following doxorubicin/cyclophosphamide (AC) as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP-28, *Proc Am Soc Clin Oncol* 22 (2003), p. A12.

**[51]** Henderson C., Berry D.A., Demetri G.D. et al., Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer, *J Clin Oncol* 21 (2003), pp. 976–983.

**[52]** Martín M, Rodríguez-Lescure A, Ruiz A, et al. Multicenter, randomized phase III study of adjuvant chemotherapy for node positive breast cancer comparing 6 cycles of FE<sub>90</sub>C versus 4 cycles of FE<sub>90</sub>C followed by 8 weekly paclitaxel administrations: interim efficacy analysis of GEICAM 9906 Trial. *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium* 2005 [39].

**[53]** Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*. 2006 May 1;24(13):2019-27.

- [54]** Heys SD, Hutcheon AW, Sarkar TK, et al; Aberdeen Breast Group. Neoadjuvant docetaxel in breast cancer: 3-year survival results from the Aberdeen trial. *Clin Breast Cancer*. 2002 Oct;3 Suppl 2:S69-74.
- [55]** Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1659-72.
- [56]** Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1673-84.
- [57]** 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. *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2005* [1].
- [58]** Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al; FinHer Study Investigators. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Feb 23;354(8):809-20.
- [59]** Miller KD, Wang M, Gralow J, et al. A randomized phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel plus bevacizumab as first-line therapy for locally recurrent or metastatic breast cancer: a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2100). *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2005* [3].
- [60]** Pritchard KI, Paterson AH, Paul NA, et al.: Increased thromboembolic complications with concurrent tamoxifen and chemotherapy in a randomized trial of

adjuvant therapy for women with breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Breast Cancer Site Group. *J Clin Oncol* 14 (10): 2731-7, 1996.

**[61]** Shapiro CL, Manola J, Leboff M: Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 19 (14): 3306-11, 2001.

**[62]** Stewart A, Bielajew C, Collins B, Parkinson M, Tomiak E. A meta-analysis of the neuropsychological effects of adjuvant chemotherapy treatment in women treated for breast cancer. *Clin Neuropsychol*. 2006 Feb;20(1):76-89.

**[63]** Fumoleau P, Roche H, Kerbrat P, et al; French Adjuvant Study Group. Long-term cardiac toxicity after adjuvant epirubicin-based chemotherapy in early breast cancer: French Adjuvant Study Group results. *Ann Oncol*. 2006 Jan;17(1):85-92.

**[64]** 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 Aug 1;22(15):3070-9.

**[65]** Smith RE, Bryant J, DeCillis A, et al.: Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. *J Clin Oncol* 21 (7): 1195-204, 2003.

**[66]** Crump M, Tu D, Shepherd L, et al.: Risk of acute leukemia following epirubicin-based adjuvant chemotherapy: a report from the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 21 (16): 3066-71, 2003.

- [67]** Campone M, Roche H, Kerbrat P, et al. Secondary leukemia after epirubicin-based adjuvant chemotherapy in operable breast cancer patients: 16 years experience of the French Adjuvant Study Group. *Ann Oncol.* 2005 Aug;16(8):1343-51.
- [68]** Aabo K, Adams M, Adnitt P, et al. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group. *Br J Cancer.* 1998 Dec;78(11):1479-87.
- [69]** Pignata S, De Placido S, Biamonte R, et al. Residual neurotoxicity in ovarian cancer patients in clinical remission after first-line chemotherapy with carboplatin and paclitaxel: the Multicenter Italian Trial in Ovarian cancer (MITO-4) retrospective study. *BMC Cancer.* 2006 Jan 7;6:5.
- [70]** International Collaborative Ovarian Neoplasm Group. Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet.* 2002 Aug 17;360(9332):505-15. Erratum in: *Lancet.* 2003 Feb 22;361(9358):706.
- [71]** Muggia F.M., Braly P.S., Brady M.F. et al., Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J. Clin. Oncol.* 18 (2000), pp. 106–115.
- [72]** The Ovarian Cancer Meta-Analysis Project. Cyclophosphamide plus cisplatin versus cyclophosphamide, doxorubicin and cisplatin chemotherapy of ovarian carcinoma: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 1991;9:1668—74.

**[73]** ICON2: randomised trial of single-agent carboplatin against three-drug combination of CAP (cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin) in women with ovarian cancer. ICON Collaborators. International Collaborative Ovarian Neoplasm Study. *Lancet* 1998;352:1571—6.

**[74]** Scarfone G, Bolis G, Parazzini F, Scambia G, Albanesi D. A multicenter, randomized, phase III study comparing paclitaxel/carboplatin (PC) versus topotecan/paclitaxel/carboplatin (TPC) in patients (pts) with stage III (residual tumor>1 CM-RT) and IV ovarian cancer (OC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003 [abstract 1807].

**[75]** Pfisterer J, Weber B, Reuss A, et al; AGO-OVAR; GINECO. Randomized phase III trial of topotecan following carboplatin and paclitaxel in first-line treatment of advanced ovarian cancer: a gynecologic cancer intergroup trial of the AGO-OVAR and GINECO. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Aug 2;98(15):1036-45.

**[76]** Kristensen G. B., Vergote I., Eisenhauer E., et al. First line treatment of ovarian/tubal/peritoneal cancer FIGO stage IIb-IV with paclitaxel/carboplatin with or without epirubicin (TEC vs TC). A Gynecologic Cancer Intergroup study of the NSGO, EORTC GCG, and NCIC CTG. Results on progression free survival. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004 (abstract 5003).

**[77]** du Bois A, Weber B, Rochon J, et al. Addition of epirubicin as a third drug to carboplatin-paclitaxel in first-line treatment of advanced ovarian cancer: a prospectively randomized gynecologic cancer intergroup trial by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group and

the Groupe d'Investigateurs Nationaux pour l'Etude des Cancers Ovariens. *J Clin Oncol*. 2006 Mar 1;24(7):1127-35

**[78]** Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, et al. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol*. 2003 Jun 1;21(11):2101-9.

**[79]** Paridaens R., Therasse P., Dirix L., et al. First line hormonal treatment (HT) for metastatic breast cancer (MBC) with exemestane (E) or tamoxifen (T) in postmenopausal patients (pts) – A randomized phase III trial of the EORTC Breast Group. *Journal of Clinical Oncology*, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 515.

**[80]** Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, et al; Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Dec 29;353(26):2747-57. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006 May 18;354(20):2200. Wardly, Andrew [corrected to Wardley, Andrew ].

**[81]** Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Sep 7;97(17):1262-71.

**[82]** Howell A, Cuzick J, Baum M, et al; 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 Jan 1-7;365(9453):60-2.

**[83]** Jakesz R, Jonat W, Gnant M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet*. 2005 Aug 6-12;366(9484):455-62.

**[84]** Coombes R. C., Paridaens R., Jassem J., et al. First mature analysis of the Intergroup Exemestane Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: LBA527.

**[85]** Coleman RE, Banks LM, Girgis SI, et al. Skeletal effect of exemestane in the Intergroup Exemestane Study (IES) –2 year bone mineral density (BMD) and bone biomarker data. *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2005* [5076].

**[86]** Coleman R. E., on behalf of the ATAC Trialists' Group. Effect of anastrozole on bone mineral density: 5-year results from the 'Arimidex', Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) trial. *J Clin Oncol*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 511.

**[87]** Perez EA, Josse RG, Pritchard KI, et al. Effect of letrozole versus placebo on bone mineral density in women completing  $\geq 5$  years (yrs) of adjuvant tamoxifen: ncic ctg ma.17b. *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2004* [404].

- [88]** McCloskey E., Hannon R., Lakner G., Clack G., Miyamoto A., Eastell R.. The letrozole (L), exemestane (E), and anastrozole (A) pharmacodynamics (LEAP) trial: A direct comparison of bone biochemical measurements between aromatase inhibitors (AIs) in healthy postmenopausal women. J Clin Oncol, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 555.
- [89]** Ghilmini M, Schmitz SF, Cogliatti SB, et al. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. Blood. 2004 Jun 15;103(12):4416-23.
- [90]** Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
- [91]** Jarvinen TA, Liu ET. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2003 Apr;78(3):299-311. Review.
- [92]** Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. Genes Chromosomes Cancer. 2004 Apr;39(4):288-97.



## **5. Objetivos**

### 5.1 Artigo 1

Sintetizar o conhecimento atual sobre a importância dos marcadores biológicos Her-2 e T2A na biologia dos diversos tumores sólidos.

### 5.2 Artigo 2

Investigar a prevalência de amplificação e superexpressão do Her-2 e da T2A, assim como a correlação entre estas variáveis, em amostras de CO fixadas em parafina.

### 5.3 Artigo 3

Investigar a prevalência de amplificação do gene T2A, assim como a correlação entre esta variável e a expressão da proteína T2A e do marcador de proliferação celular Ki-67, em amostras de CM fixadas em parafina mostrando uma amplificação do gene Her-2.

## **6.1 Artigo 1 em inglês**

Cancer Treat Rev; in press (Ms. Ref. No.: CTR-D-06-00063R1)

*IF 2005 4.549*

**The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-II $\alpha$  and their importance to  
the biology of solid tumours**

**The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-II $\alpha$**

Max S. Mano<sup>1,2</sup>, Daniela D. Rosa<sup>1</sup>, Evandro De Azambuja<sup>1</sup>, Gustavo F.V. Ismael<sup>1</sup>,  
Virginie Durbecq<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Medical Oncology Unit, Jules Bordet Institut

<sup>2</sup> PhD student from the PPG – Medicina : Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre,  
Brazil

<sup>3</sup> Translational Research Unit, Jules Bordet Institut

Correspondence :

Dr Max S. Mano

Medical Oncology Unit

Jules Bordet Institut

Bd de Waterloo, 125

1000 Brussels, Belgium

Tel : 0032(0)2 541 3111

Fax : 0032(0)2 541 3090

Email: [max.mano@gmail.com](mailto:max.mano@gmail.com)

**The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-II $\alpha$  and their importance to  
the biology of solid tumours**

**The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-II $\alpha$**

## **Abstract**

Her2 and topoisomerase-II $\alpha$  (T2A) gene amplification are separate events, although the latter is more frequently seen in Her2 amplified (34-90%) than in Her2 non-amplified (5-10%) tumours. There is a better correlation between Her2 amplification and protein overexpression in breast cancer (BC) than in other tumour types. This marker is also considered a powerful prognostic factor in BC, with similar data emerging in other solid tumours such as bladder, ovarian, endometrial, gastro-oesophageal and non-small cell lung cancer. Her2 amplification and/or overexpression are highly predictive of response to HER2-targeted compounds such as trastuzumab and lapatinib but have been inconsistent predictors of response to cytotoxic chemotherapy. There is also evidence that these tumours are relatively resistant to anti-oestrogen therapy (tamoxifen) but not to oestrogen deprivation (e.g. with aromatase inhibitors). T2A aberrations are uncommon events in solid tumours, with an overall prevalence of approximately 10%. T2A amplification has shown inconsistent correlation with T2A protein expression in preclinical and clinical studies, mainly because non-genetic events such as proliferation rate can also affect protein expression. Expression of T2A protein has not been shown to reliably predict response to T2A inhibitors, despite the fact that this enzyme is the direct target for these compounds. In BC, T2A amplification appears to be a good predictor of response to anthracyclines, but these data are still in the process of validation. The significance of T2A deletions is currently under investigation, but contrary to what was

previously thought, it may also predict benefit from treatment with T2A inhibitors. The prognostic significance of T2A aberrations is currently unknown.

**Key words:** topoisomerase-II $\alpha$ , Her2, gene amplification, protein overexpression, solid tumours

## Introduction

Surgery remains the only potentially curative treatment for the majority of patients diagnosed with solid tumours at early stage. However, chemotherapy has been increasingly used as an adjunct to surgery. In early stage disease, the benefit obtained with the addition of chemotherapy is often modest albeit toxicity and cost may be significant. For patients with advanced disease, chemotherapy remains the mainstay of treatment but the potential benefit must also be carefully balanced against the risk of toxicity, cost and issues related to quality of life.

One of the explanations for the modest impact of chemotherapy on outcome may be the lack of reliable targets, so that few patients derive a major benefit from the treatment whilst many others derive no benefit altogether, which results in a sort of 'dilution' of the overall treatment effect. Being relatively 'untargeted', cytotoxic drugs may damage not only cancer cells, but also normal and healthy tissue, resulting in toxicity and undesirable side effects. This situation could be much improved by the identification of relevant drug targets that would help to select patients most likely to benefit from a given treatment. There are some successful examples in oncology: hormonal therapy for breast cancer (BC) which is effective only for patients whose tumours express hormonal receptors [1]; novel biologic therapies such as trastuzumab [2,3] and lapatinib [4], both targeting Her2 overexpressing and/or amplified BC; rituximab for CD-20+ non-Hodgkin lymphoma [5]; imatinib for patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia (CML) [6] and for patients with KIT or PDGFRA mutated gastrointestinal

stromal tumours (GIST) [7]; small anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as erlotinib and gefitinib which have shown activity mainly in subgroups of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) whose tumours harbour either an EGFR mutation, amplification, protein overexpression and lack K-RAS mutations [8-11]. Although most of the novel biological agents have not been associated with prohibitive toxicity, the cost of these compounds may greatly restrict their widespread use in clinical practice so that the identification of relevant targets has become a crucial step in their clinical development.

There has also been a great deal of interest in the investigation of predictive markers of response to cytotoxic chemotherapy, which is potentially more toxic than hormonal and biological therapies. The most promising results have been seen with the technique of gene array, in which gene signatures predictive of response to docetaxel [12], paclitaxel [13], doxorubicin [14], gemcitabine/epirubicin/docetaxel [15] have already been reported. However, these techniques are complex (usually requiring frozen tissue), time-consuming and costly and therefore unlikely to become widely available in the near future [16]. Furthermore, most such 'signatures' are still awaiting validation in prospective clinical trials.

Other potentially simpler and more cost-efficient 'targets' that have been extensively investigated as potential predictors of response to anthracyclines are the Her2 and topoisomerase-II $\alpha$  (T2A) genes and the respective proteins encoded by these genes. Although Her2 is now widely accepted as a powerful prognostic marker in BC and possibly also in other solid tumours, its role as a predictor of response to



cytotoxic chemotherapy has not been firmly established. The explanation for this may come from a better understanding of the biology of the Her2 amplicon, which harbours several important genes including T2A, frequently co-amplified or deleted in Her2 amplified tumours and believed to be the ultimate predictor of responsiveness to anthracyclines. In this article, we review the evidence supporting these conclusions and provide some insight into the complex function and oncogenic potential of these two important genes in solid tumours.

### **Her-2 amplification and overexpression**

The Her2 gene is located at the long arm of the chromosome 17 (17q12-q21). The most popular test for assessing Her2 amplification is fluorescence in situ hybridisation [FISH] [17]. However, other techniques can also be employed such as chromogenic in situ hybridisation [CISH] and real time polymerase chain reaction [PCR], which in some studies have been shown to be more cost-efficient and less laborious [18-20]. In daily practice, one common approach is to screen patients for protein overexpression with immunohistochemistry (IHC) and confirm the presence of gene amplification only for cases with scores of 2+ [21,22,23]. However, the identification of the protein (usually by IHC) can be subject to more variability. The risk of error can be minimised when IHC is performed in laboratories with extensive experience in Her2 testing [24]. Although FISH has been considered more reproducible than IHC, the artificial nature of the cut-off ( $\geq 2$  copy number ratio), derived in the pioneering Her2 FISH study [25] and still widely used, should also be taken into account.

The oncogenic potential of mammary cells may include point mutations, truncation of proteins, and amplification of non-mutated proto-oncogenes. In BC, the main mechanism appears to be gene amplification [26]. Her2 amplification causes a dramatic increase in the risk of heterodimer formation with other members of the EGFR family in the cell surface. Heterodimer formation is believed to be at least in part responsible for the activation of this survival pathway [26]. However, Her2 amplification also increases the formation of Her2 homodimers, which are presumed to be oncogenic, and in some studies have even been suggested as the main oncogenic mechanism [27, 28]. Her2 amplification can be found in around 15-30% of BC, and in most studies has been associated with poor histological features and aggressive behaviour [17,18,29-37] although other authors have not confirmed these findings [22]. Similar data is also available in other solid tumours such as endometrial cancer, in which Her2 amplification and/or overexpression correlated with higher histological grade and tumour stage [38].

In BC, numerous studies have demonstrated an excellent correlation between Her2 gene amplification and protein overexpression [39]. Both methods can reliably identify patients most likely to benefit from treatment with the HER2 targeted monoclonal antibody trastuzumab [40]. It is important to point out that several large scale studies have demonstrated equivalence between the four most commonly used tests – namely FISH, CISH and PCR (for gene amplification) and IHC (for protein overexpression) in predicting the outcome of BC patients treated with anthracyclines [18,41,42] as well as benefit from trastuzumab [43]. In other solid tumours, the correlation between gene amplification and protein expression has been less clear.

Our group and others have previously demonstrated a poor correlation in ovarian carcinoma [44-47], with similar data available in endometrial cancer [38]. Nevertheless, a good correlation has been occasionally reported in other tumour types, such as gastric [48] and oesophageal cancer [49]. Furthermore, true cases of HER2 overexpression (3+, Herceptest®) were uncommon in ovarian tumours [44,50,51], although lower staining may be more commonly found. Similar findings were reported in NSCLC, in which very few cases of true Her2 amplification or overexpression were found, and with no obvious correlation between gene and protein expression [52-55]. In other words, amplifications as they are defined in BC are relatively infrequent in other tumour types such as ovarian, gastric, endometrial and NSCLC. Many studies have been biased by the lack of findings, which has tempted the authors to use less stringent criteria for amplification and overexpression [44,52,53]. These findings, together with the unclear prognostic value of Her2 (discussed below), and the generally disappointing results obtained with trastuzumab in other tumour types suggest that this marker does not play such a significant role in tumour development and progression in patients with non breast malignancies, raising doubts about its relevance as a target for novel anti-cancer compounds in other solid tumours. Three possible exceptions – in which Her2 amplification and/or overexpression appear to be more prevalent and where the role of trastuzumab is still under investigation are oesophageal, gastric (particularly of intestinal type) and endometrial cancer (with particular interest in the serous papillary type and high grade tumours in general).

## **Her-2 as a prognostic marker in solid tumours**

The EGFR family plays an important role in tumour development and growth in many tumour types. The prognostic value of Her2 in breast and gynaecologic malignancies has been described in a memorable work published almost two decades ago [56]. Ever since, data has been accumulating and it is now widely accepted that patients with early or advanced BC whose tumours are amplified and/or overexpressed for HER2 carry a poor prognosis [57]. The most convincing evidence comes from the adjuvant trastuzumab trials, in which a large number of (prospectively followed) patients with Her2-positive disease not treated with trastuzumab (control arms) had an extremely high risk of early recurrence and death [43,58-60]. In all these studies, this pejorative effect of Her2 amplification and/or overexpression on outcome appeared to be reverted by trastuzumab, though longer follow-up is necessary for a full understanding of the biologic behaviour of trastuzumab-treated Her2 positive BC in the long term. However, the association between Her2 and prognosis has been conflicting in other tumour types. Such an association has been reported in gastric and gastro-esophageal junction [61], oesophageal [49,62], endometrial [38] (particularly in cases of 'pure' papillary serous histology [38,63,64]), ovarian [51], NSCLC [65,66] and bladder cancer [67], but the level of evidence is certainly lower than for BC [57].

## **Her-2 as a predictive marker**

The growing understanding of the importance of EGFR family in cancer has opened a window of opportunities for the investigation of novel compounds targeting one or several points of this pathway. Trastuzumab, a 95% humanised monoclonal antibody targeted against the extracellular domain of the HER2 receptor, was the first anti-EGFR compound to show evidence of clinical activity. In phase II studies of heavily pretreated BC patients, trastuzumab resulted in response rates (RR) of 15% [2], and 25-35% in the first line [3,68]. Although this was not anticipated, only patients with higher levels of HER2 protein overexpression (3+ by IHC; Herceptest®) or gene amplification derived a meaningful benefit from trastuzumab [2,3]. In combination with chemotherapy, trastuzumab resulted in higher RR, improved time to progression (TTP) and overall survival (OS) [69,70]. Most importantly, in the adjuvant setting, trastuzumab resulted in a dramatic reduction in the risk of recurrence (of approximately 50%) and death [43,58-60,71] when used concurrently [43,58,60] or sequentially with chemotherapy [59] in patients with Her2 amplified and/or overexpressed BC, and is now also considered standard treatment in this setting. As previously mentioned, the activity of trastuzumab has been usually disappointing in other tumour types such as ovarian [50], endometrial [72] and lung cancer [53-55,73], though there are anecdotal reports of responses in endometrial [74] and gastric cancer [75]. Trastuzumab's low activity in other solid tumours may be due either to the rarity of true Her2 amplification and/or overexpression or simply to the lack of biological significance of this pathway in these types of cancer. However, it is possible that the activity of trastuzumab has been underestimated in some of these trials, because of inclusion of non-eligible patients (i.e. not truly Her2-positive).

Molecular targeted therapy is a 'tailored medicine', so that small prevalences should not preclude carefully selected patients from benefiting from potentially active treatment. Of interest, Her2 amplification has been shown to be predictive of response to the anti-EGFR small molecule TKI gefitinib, in a retrospective study of patients with NSCLC [76].

Besides the use of monoclonal antibodies, novel approaches for targeting the HER2 (other than monoclonal antibodies) have been intensively investigated, such as anti-HER2 vaccines, small anti-HER2 molecules, antibodies with radionuclides and vaccines with cytokine therapy [77]. Some of these novelties are now in late clinical development and may be commercially available in the near future. Lapatinib, for instance, a dual HER1/HER2 inhibitor that has been developed mainly for use in Her2 amplified and/or overexpressed BC, has shown promising results in phase II studies (even in tumours resistant to trastuzumab) [78,79] and also in a phase III trial in combination with capecitabine in patients progressing after anthracyclines, taxanes and trastuzumab [4]. This oral compound is being further evaluated in the adjuvant and neoadjuvant settings in two large multinational trials run by the Breast International Group and NCCTG, as well as in other tumour types such as head and neck and endometrial cancer. Of note, probably due to the small size of the molecule, lapatinib has also shown evidence of activity against brain metastases [80].

In the late 1990s, there was a great deal of interest in the investigation of Her2 amplification and /or overexpression as markers of sensitivity to certain types of cytotoxic chemotherapy and hormonal therapy. Indeed, a number of retrospective studies suggested that Her2 amplification and/or overexpression were markers of

increased sensitivity to anthracyclines and resistance to cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) and tamoxifen (table 1). However, other studies have not supported these findings (table 1). There is also some data suggesting that Her2 may be mainly a predictive marker of benefit from dose-dense **[93]** or dose-intensive anthracycline-based chemotherapy **[41,81]**, but this hypothesis still needs to be validated by further studies. The TOP trial, currently recruiting patients in Belgium, Luxembourg, France and Brazil, is a prospective study specifically designed to investigate the relation between T2A, Her2 and other biologic markers and responsiveness to anthracyclines. Finally, despite contradictory evidence from preclinical studies **[120]**, recent studies have suggested that Her2 amplification and/or overexpression may be a strong predictive marker of response to taxanes (table 1).

### **The 17q12-q21 amplicon**

The human chromosomal locus 17q12-q21 harbours, in addition to Her2, a number of other relevant genes (table 2). Among these genes, T2A may be particularly important in cancer. This gene encodes for the T2A enzyme, which is vital for the cell cycle because of its important role of resolving topological problems of DNA metabolism (transcription, recombination, replication, chromosomal segregation) during the cell division. This enzyme is also the target of a number of cytotoxic agents, namely T2A inhibitors (anthracyclines, etoposide, teniposide) **[26]**.

Experiments have shown that when both Her2 and T2A are amplified, they are in fact located in different amplicons [126]. This means that the so called 'Her2 amplicon' is in fact composed of at least two different amplicons, and that Her2 and T2A amplification are separate events (i.e. not explained by amplification of a large chromosomal segment as previously thought). In other studies, the number of copies of Her2 and T2A were not identical, thus providing further support for this conclusion [34,39]. Similar data is available in other solid tumours such as gastric and pulmonary cancer [127,128].

Another gene of potential interest in this chromosomal site is the HSD17B1, which encodes for the enzyme involved in the process of formation of androgens and oestrogens (catalization E1 → E2). Amplification of this gene has been hypothesised as a potential explanation for the resistance to tamoxifen frequently observed in Her2 amplified BC [129].

Although Her2 amplification remains the primary event in the 17q21 chromosome locus, other genetic events at this site may occur more commonly than previously thought even when Her2 is not amplified. In BC, the prevalence of T2A aberrations in Her2 non-amplified tumours is in the range of 5-10% and has also been reported in gastric, lung and bladder cancer (table 3).

**T2A gene and protein (T2A enzyme) as predictors of response to cytotoxic chemotherapy**



The T2A gene and encoded protein have been known for over two decades, but their importance as potential markers of response to cytotoxic agents has been intensively investigated in the last decade only. Extensive research has been undertaken in BC, with some data also becoming available to other solid tumours.

The T2A enzyme occurs in 2 isoforms: T2 $\alpha$  170kd and T2 $\beta$  18kd, which are encoded by different genes located at 17q21 and 3p, respectively [138]. T2 $\beta$  has no cycle dependency, and its function is currently unknown. T2A is cycle dependent; it peaks during G2/M and decreases at the end of the mitosis. Expression of T2A is only seen in proliferating cells [139-141], and this is in line with the data showing that a number of non genetic events (high proliferation rate as measured by MIB-1 or Ki-67), aggressive clinical course, advanced clinical stage) can also induce T2A expression [142,143]. This may in part explain the inconsistent results of studies assessing the utility of T2A enzyme in predicting response to T2A inhibitors [85,144,145], as well as the inconsistent correlation between T2A gene amplification and protein expression [44,139,144,146]. It has also been suggested that Her2 amplification can directly activate the T2A enzyme [89,147]. However, it is important to point out that the T2A protein is probably the primary molecular target of T2A inhibitors, such as anthracyclines; this binding is believed to stabilise the DNA double-strand breaks, which leads to apoptosis.

In a number of preclinical studies, T2A protein expression correlated with response to T2A inhibitors [132,148-154]. In previous studies, T2A amplification correlated well with increased T2A protein expression [132,136] and with increased sensitivity to T2A inhibitors [129,155], whilst T2A deletion correlated with lower levels

of protein expression and with resistance to T2A inhibitors [132,150]. In the clinical setting, the correlation between increased T2A expression and sensitivity to T2A inhibitors has been difficult to demonstrate [139], mainly because this enzyme is highly cell cycle-dependant and has been considered a marker of cell proliferation [146], which is itself highly predictive of response to chemotherapy [156-159]. However, technical differences may in part explain these discrepancies: studies in which the protein was assessed by IHC have shown a better correlation with cell proliferation [146] than with gene amplification [139], whilst studies in which the protein was evaluated by western blot have shown a clear correlation between gene and protein expression [132]. In addition, a study using flow cytometry reported that more than 50% of the T2A-positive cells were in G0/G1 phase [160].

Initial reports suggested that T2A gene aberrations (i.e. gene amplification or deletion) could be found in up to 90% of Her2 amplified breast tumours [126,132]. More recent studies have reported rates of 32-57% (table 3). Overall, T2A amplification should be considered an uncommon event in BC, with a prevalence of approximately 5-10% in the most important studies [22,89,135]. T2A aberrations have been more commonly assessed by FISH (with the possibility of performing Her2 and T2A in a single test, with the use of a triple probe), though one recent study suggested a 100% concordance between FISH and PCR [19]. Chromogenic in situ hybridization has also been successfully employed in other studies [161]. As a note of caution, the problem of 'artificial cut-off' may be particularly relevant for T2A; although a copy number ratio of  $\geq 1.5$  has been proposed to define amplification in BC, this cut-off has not been fully validated. In particular, the analytical accuracy of FISH

assays in detecting T2A deletions on formalin-fixed tissue sections has never been examined in deeper detail, and may in part explain the variations seen in different clinical studies.

A number of studies has evaluated the role of T2A amplification as a predictive marker of response to anthracyclines in BC. Most of these studies were retrospective in nature (table 4), and have usually supported the hypothesis that T2A amplification is the actual event predicting response to anthracyclines in Her2 amplified tumours in both early (table 4) and advanced BC [134,144,155,162]. In the large adjuvant trial BCRIG 006, in which the correlation between response to anthracyclines and T2A aberrations was prospectively planned, only patients with T2A amplification appeared to benefit from the addition of anthracyclines, although these results were preliminary and require further follow-up and validation before they can be applied into clinical practice [130]. The design and results of this landmark study are summarised in figure 1. The previously mentioned study TOP, in which approximately 400 patients with hormonal receptor negative, non-metastatic BC will be treated with preoperative epirubicin 100 mg/m<sup>2</sup> (given every 3 weeks for 4 cycles if tumours >2cm, or every 2 weeks with growth factor support for 6 cycles if tumours >5cm or inflammatory BC), is specifically designed to answer this question.

T2A deletions remain one of the most intriguing genetic events occurring in the 17q12-q21 amplicon. Although previous studies have associated T2A deletions with resistance to T2A inhibitors [132,150], recent studies have shown just the opposite [22,155]. The overall prevalence of T2A deletions in BC has varied from 2-11% in

different studies (these variations can be partly explained by population heterogeneity and use of different types of probes).

The prognostic value of T2A aberrations in solid tumours is currently unknown. Studies in BC have failed to show any correlation, but the number of patients available for these analyses was extremely small [18,135]. However, T2A genetic changes have been reported to correlate with poor histological features such as high grade [34,135] and absence of hormonal receptors [34]. One recent study suggested that patients with muscle-invasive bladder cancer whose tumours amplified and/or overexpressed T2A carried a worse prognosis [67].

## **Conclusion**

Her2 and T2A gene amplification are separate events, though the latter occurs much more frequently in Her2 amplified (32-90%) than in Her2 non-amplified (5-10%) cancer cells. Her2 amplification correlates well with protein overexpression in BC but usually not in other tumour types. Her2 amplification and/or overexpression are powerful prognostic factors in BC, with similar data emerging in other solid tumours such as bladder, ovarian, endometrial, gastro-oesophageal and NSCLC. Her2 amplification and/or overexpression are highly predictive of response to HER2 targeted compounds such as trastuzumab and lapatinib but have been inconsistent predictors of response to cytotoxic chemotherapy. There is growing (though at times conflicting) evidence that Her2 amplified and/or overexpressed tumours are relatively

resistant to anti-oestrogen therapy (tamoxifen) but not to oestrogen deprivation (e.g. with an aromatase inhibitor).

T2A aberrations are considered uncommon events in BC, with an overall prevalence of approximately 10%. T2A amplification has shown a rather inconsistent correlation with T2A protein expression in preclinical and clinical studies, mainly because non-genetic events such as proliferation rate can also affect protein expression. In line with these findings, T2A protein expression has not been a reliable predictor of benefit from T2A inhibitors, despite the fact that the T2A enzyme is the direct target of these compounds. Numerous studies have shown that T2A amplification can reliably predict benefit from treatment with T2A inhibitors, particularly anthracyclines. Such data is only available in BC, and is currently being validated by prospective studies. The significance of T2A deletions is still under investigation, but contrary to what was previously thought, it may also be predictive of benefit from cytotoxic therapy with T2A inhibitors. The prognostic significance of T2A aberrations is currently unknown.

## 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 May 14-20;365(9472):1687-717.
- [2] 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 Sep;17(9):2639-48.
- [3] 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 Feb 1;20(3):719-26.
- [4] Geyer CE, Cameron D, Lindquist D, et al. A phase III randomized, open-label, international study comparing lapatinib and capecitabine vs capecitabine in women with refractory advanced or metastatic breast cancer (EGF100151). ASCO 2006 (late breaking abstract).
- [5] Ghilmini M, Schmitz SF, Cogliatti SB, et al. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4416-23.

- [6] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
- [7] Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347:472-480, 2002.
- [8] Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):133-44.
- [9] Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005 May 4;97(9):643-55.
- [10] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.
- [11] Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):5900-9.
- [12] Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*. 2003 Aug 2;362(9381):362-9.
- [13] Ayers M, Symmans WF, Stec J, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and

cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 15;22(12):2284-93.

**[14]** Folgueira MA, Carraro DM, Brentani H, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 15;11(20):7434-43.

**[15]** Thuerigen O, Schneeweiss A, Toedt G, et al. Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 20;24(12):1839-45.

**[16]** Mano M. The burden of scientific progress: growing inequalities in the delivery of cancer care. *Acta Oncol*. 2006;45(1):84-6.

**[17]** Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996 Jul 4;13(1):63-72.

**[18]** Scandinavian Breast Group Trial 9401; Tanner M, Isola J, Wiklund T, et al. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 1;24(16):2428-36.

**[19]** Murthy SK, Magliocco AM, Demetrick DJ. Copy number analysis of c-erb-B2 (HER-2/neu) and topoisomerase IIalpha genes in breast carcinoma by quantitative real-time polymerase chain reaction using hybridization probes and fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med*. 2005 Jan;129(1):39-46.



- [20]** Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G. Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Pathology*. 2006 Apr;38(2):120-4.
- [21]** 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 Jul-Aug;22(4):2485-90.
- [22]** Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, et al; Danish Breast Cancer Cooperative Group. retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7483-90. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):1015.
- [23]** Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Apr;3(4):379-98. Epub 2004 Feb 3. Review.
- [24]** Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19):3032-8.
- [25]** Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by

fluorescence in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 15;89(12):5321-5.

**[26]** Jarvinen TA, Liu ET. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2003 Apr;78(3):299-311. Review.

**[27]** Worthylake, R., Opresko, L. K. and Wiley, H. S. (1999). ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both erbB-2 and epidermal growth factor receptors. J. Biol. Chem. 274, 8865-8874.

**[28]** Baeckstrom, D., Alford, D. and Taylor, P. J. (2000). Morphogenetic and proliferative responses to heregulin of mammary epithelial cells in vitro are dependent on HER2 and HER3 and differ from the responses to HER2 homodimerisation or hepatocyte growth factor. Int. J. Oncol. 16, 1081-1090.

**[29]** Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. J Clin Oncol 1992;10:1049-56.

**[30]** Paik S, Bryant J, Park C, et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst. 1998 Sep 16;90(18):1361-70.

**[31]** Berger MS, Locher GW, Saurer S, et al. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. Cancer Res. 1988 Mar 1;48(5):1238-43.

**[32]** Huang HJ, Neven P, Drijckoningen M, et al. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. J Clin Pathol. 2005 Jun;58(6):611-6.

- [33]** Press MF, Bernstein L, Thomas PA, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*. 1997 Aug;15(8):2894-904.
- [34]** Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, et al. The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Hum Pathol*. 2005 Apr;36(4):348-56.
- [35]** Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1120-1128.
- [36]** Paik S, Hazan R, Fisher ER, et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8: 103-112.
- [37]** Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1044-1048.
- [38]** Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol*. 2006 May 20;24(15):2376-85.
- [39]** Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, et al; Danish Breast Cancer Cooperative Group. Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol*. 2004;43(1):35-42.
- [40]** Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical

trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Sep;93(1):3-11.

**[41]** Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, et al; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006 May 18;354(20):2103-11.

**[42]** Dressler LG, Berry DA, Broadwater G, et al. Comparison of HER2 status by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry to predict benefit from dose escalation of adjuvant doxorubicin-based therapy in node-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2005 Jul 1;23(19):4287-97.

**[43]** Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006 Feb 23;354(8):809-20.

**[44]** Mano MS, Awada A, Di Leo A, et al. Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004 Mar;92(3):887-95

**[45]** Lee CH, Huntsman DG, Cheang MC, et al. Assessment of Her-1, Her-2, And Her-3 expression and Her-2 amplification in advanced stage ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2005 Apr;24(2):147-52.

**[46]** Wu Y, Soslow RA, Marshall DS, Leitao M, Chen B. Her-2/neu expression and amplification in early stage ovarian surface epithelial neoplasms. *Gynecol Oncol.* 2004 Dec;95(3):570-5.

**[47]** Fajac A., Bernard J., Lhomme C. et al., c-erb2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic

significance by multivariate analysis. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 64 (1995), pp. 146–151.

**[48]** Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2006 Jan;15(1):65-71.

**[49]** Mimura K, Kono K, Hanawa M, et al. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2005 Apr 11;92(7):1253-60.

**[50]** Bookman M., Darcy K., Clarke-Pearson D. et al. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 21 (2003), pp. 283–290.

**[51]** Serrano-Olvera A, Duenas-Gonzalez A, Gallardo-Rincon D, Candelaria M, De la Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Rev.* 2006 May;32(3):180-90. Epub 2006 Feb 17. Review.

**[52]** Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer.* 2002 May 6;86(9):1449-56.

**[53]** Langer CJ, Stephenson P, Thor A, et al. Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group study 2598. *J Clin Oncol.* 2004 Apr 1;22(7):1180-7.

- [54]** Gatzemeier U, Groth G, Butts C, et al. Randomized phase II trial of gemcitabine-cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2004 Jan;15(1):19-27.
- [55]** Zinner RG, Glisson BS, Fossella FV, et al. Trastuzumab in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with Her2-overexpressing, untreated, advanced non-small cell lung cancer: report of a phase II trial and findings regarding optimal identification of patients with Her2-overexpressing disease. *Lung Cancer.* 2004 Apr;44(1):99-110.
- [56]** Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
- [57]** Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003;8(4):307-25. Review.
- [58]** Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20;353(16):1673-84.
- [59]** Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20;353(16):1659-72.
- [60]** 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. San Antonio Breast Cancer Symposium [abstract 1].

**[61]** Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol.* 2005 Feb;16(2):273-8.

**[62]** Brien TP, Odze RD, Sheehan CE, McKenna BJ, Ross JS. HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2000 Jan;31(1):35-9. Erratum in: *Hum Pathol* 2000 Apr;31(4):524.

**[63]** Slomovitz BM, Broaddus RR, Burke TW, et al. Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. *J Clin Oncol.* 2004 Aug 1;22(15):3126-32.

**[64]** Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, et al. Amplification of c-erbB2 oncogene: a major prognostic indicator in uterine serous papillary carcinoma. *Cancer.* 2005 Oct 1;104(7):1391-7.

**[65]** Meert AP, Martin B, Paesmans M, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer.* 2003 Sep 15;89(6):959-65. Review.

**[66]** Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Association of HER-2 overexpression with prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: a metaanalysis. *Cancer.* 2005 May 1;103(9):1865-73.

- [67]** Simon R, Atefy R, Wagner U, et al. HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer*. 2003 Dec 10;107(5):764-72.
- [68]** Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V, Morales S, Barton C, Ghahramani P. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2162-71.
- [69]** Marty M, Cognetti F, Maraninchi D et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 1;23(19):4265-74.
- [70]** 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 Mar 15;344(11):783-92.
- [71]** The HERA Study Team. Trastuzumab (H: Herceptin®) following adjuvant chemotherapy (CT) significantly improves disease-free survival (DFS) in early breast cancer (BC) with HER2 overexpression: the HERA Trial. San Antonio Breast Cancer Symposium 2005 [abstract 11].
- [72]** Fleming G. F., Sill M. A., Thigpen J. T., et al. Phase II evaluation of trastuzumab in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: A report on GOG 181B. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 2003 (abstr 1821).
- [73]** Krug LM, Miller VA, Patel J, et al. Randomized phase II study of weekly docetaxel plus trastuzumab versus weekly paclitaxel plus trastuzumab in patients



with previously untreated advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2005 Nov 15;104(10):2149-55.

**[74]** Jewell E, Secord AA, Brotherton T, Berchuck A. Use of trastuzumab in the treatment of metastatic endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 May-Jun;16(3):1370-3

**[75]** Rebischung C, Barnoud R, Stefani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer*. 2005;8(4):249-52.

**[76]** Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, et al. Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5007-18.

**[77]** Järvinen TAH, Liu ET: Novel cancer therapies targeted at the product of the HER-2/neu gene. *Appl genom Proteom* 1:3-14, 2002.

**[78]** Gomez HL, Chavez MA, Doval DC. A phase II, randomized trial using the small molecule tyrosine kinase inhibitor lapatinib as a first-line treatment in patients with FISH positive advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23 (16S): 203s.

**[79]** Spector NL, Blackwell K, Hurley, J et al. EGF103009, a phase II trial of lapatinib monotherapy in patients with relapsed/refractory inflammatory breast cancer (IBC) clinical activity and biological predictors of response. *J Clin Oncol* 2006; 18S: 3s

- [80]** Lin N. U., Carey L. A., Liu M. C., et al. Phase II trial of lapatinib for brain metastases in patients with HER2+ breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 503
- [81]** Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 16;90(18):1346-60.
- [82]** Petit T, Wilt M, Velten M, et al. Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2004 Jan;40(2):205-11.
- [83]** Bitran JD, Samuels B, Trujillo Y, Klein L, Schroeder L, Martinec J. Her2/neu overexpression is associated with treatment failure in women with high-risk stage II and stage IIIA breast cancer (>10 involved lymph nodes) treated with high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell support following standard-dose adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 1996 Sep;2(9):1509-13.
- [84]** Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, et al. Amplification and overexpression of topoisomerase IIalpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Apr;8(4):1061-7.
- [85]** Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, et al. HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol*. 2001 Aug;12(8):1081-9.

- [86]** Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Dec 20;92(24):1991-8.
- [87]** 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 (ER) and/or progesterone (PgR) receptor-positive breast cancer: mature outcomes and new biologic correlates on phase III intergroup trial 0100 (SWOG-8814). *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2004* [abstract 37].
- [88]** Colozza M, Sidoni A, Mosconi AM, et al; Italian Oncology Group for Clinical Research. HER2 overexpression as a predictive marker in a randomized trial comparing adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil with epirubicin in patients with stage I/II breast cancer: long-term results. *Clin Breast Cancer.* 2005 Aug;6(3):253-9.
- [89]** Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, et al. HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1107-16.
- [90]** Moliterni A, Menard S, Valagussa P, et al. HER2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Feb 1;21(3):458-62.

- [91]** De Laurentiis M., Caputo F., Massarelli E. HER2 Expression and Anthracycline Effect: Results from the Naples GUN3 Randomized Trial. Proc Am Soc Clin Oncol 20: 2001 (abstr 133).
- [92]** Arnould L, Fargeot P, Bonneterre J, et al. Epirubicin dose-response effect in node-positive breast cancer patients is independent of HER2 overexpression: 10-year retrospective analysis of French Adjuvant Study Group 05 trial. Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2003 [abstract 538]
- [93]** Del Mastro L, Bruzzi P, Nicolo G, et al. HER2 expression and efficacy of dose-dense anthracycline-containing adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Br J Cancer. 2005 Jul 11;93(1):7-14.
- [94]** Gregory RK, Powles TJ, Salter J, Chang JC, Ashley S, Dowsett M. Prognostic relevance of cerbB2 expression following neoadjuvant chemotherapy in patients in a randomised trial of neoadjuvant versus adjuvant chemoendocrine therapy. Breast Cancer Res Treat. 2000 Jan;59(2):171-5.
- [95]** Tetu B, Brisson J, Plante V, Bernard P. p53 and c-erbB-2 as markers of resistance to adjuvant chemotherapy in breast cancer. Mod Pathol. 1998 Sep;11(9):823-30.
- [96]** Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. J Clin Oncol. 1998 Feb;16(2):470-9.
- [97]** Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B, et al. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. Int J Cancer. 1998 Feb 20;79(1):27-33.

- [98] Fritz P, Cabrera CM, Dippon J, Gerteis A, Simon W, Aulitzky WE, van der Kuip H. c-erbB2 and topoisomerase IIalpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):R374-84.
- [99] Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, Hietanen P, Wasenius VM. Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(7):917-22.
- [100] Sjostrom J, Krajewski S, Franssila K, et al. A multivariate analysis of tumour biological factors predicting response to cytotoxic treatment in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1998 Sep;78(6):812-5.
- [101] Jarvinen TA, Holli K, Kuukasjarvi T, Isola JJ. Predictive value of topoisomerase IIalpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1998 Jun;77(12):2267-73.
- [102] Menard S, Valagussa P, Pilotti S, et al. Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):329-35
- [103] Miles DW, Harris WH, Gillett CE, Smith P, Barnes DM. Effect of c-erbB(2) and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer.* 1999 Aug 20;84(4):354-9

- [104]** Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol.* 1992 Apr;10(4):599-605.
- [105]** De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 1;11(13):4741-8.
- [106]** Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol.* 1996 Oct;14(10):2702-8.
- [107]** Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol.* 1998 Feb;16(2):462-9.
- [108]** Ferrero-Pous M, Hacene K, Bouchet C, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Spyrtatos F. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec;6(12):4745-54.
- [109]** Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER+) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol.* 2001 Apr;12(4):525-33.
- [110]** De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, et al. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Mar;9(3):1039-46.
- [111]** Ellis MJ, Coop A, Singh B, et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen

receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol*. 2001 Sep 15;19(18):3808-16.

**[112]** Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, et al; IMPACT Trialists Group. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5108-16.

**[113]** Berry DA, Muss HB, Thor AD, et al. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2000 Oct 15;18(20):3471-9

**[114]** Elledge RM, Green S, Ciocca D, et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res*. 1998 Jan;4(1):7-12.

**[115]** Learn PA, Yeh IT, McNutt M, et al. HER-2/neu expression as a predictor of response to neoadjuvant docetaxel in patients with operable breast carcinoma. *Cancer*. 2005 Jun 1;103(11):2252-60.

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

**[117]** Gonzalez-Angulo AM, Krishnamurthy S, Yamamura Y, et al. Lack of association between amplification of her-2 and response to preoperative taxanes in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2004 Jul 15;101(2):258-63.

- [118] Konecny GE, Thomssen C, Luck HJ, et al. Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Aug 4;96(15):1141-51.
- [119] Van Poznak C, Tan L, Panageas KS, et al. Assessment of molecular markers of clinical sensitivity to single-agent taxane therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002 May 1;20(9):2319-26.
- [120] Yu D, Jing T, Liu B, et al. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* 1998;2(5):581-91.
- [121] Luoh SW. Amplification and expression of genes from the 17q11 approximately q12 amplicon in breast cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002 Jul 1;136(1):43-7.
- [122] Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, et al. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6240-5.
- [123] Clark J, Edwards S, John M, et al. Identification of amplified and expressed genes in breast cancer by comparative hybridization onto microarrays of randomly selected cDNA clones. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 May;34(1):104-14.
- [124] Kauraniemi P, Kuukasjarvi T, Sauter G, Kallioniemi A. Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *Am J Pathol.* 2003 Nov;163(5):1979-84.
- [125] Jacobson KK, Morrison LE, Henderson BT, et al. Gene copy mapping of the ERBB2/TOP2A region in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 May;40(1):19-31.



- [126] Jarvinen TA, Tanner M, Barlund M, Borg A, Isola J. Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Oct;26(2):142-50.
- [127] Varis A, Wolf M, Monni O, et al. Targets of gene amplification and overexpression at 17q in gastric cancer. *Cancer Res*. 2002 May 1;62(9):2625-9.
- [128] Wikman H, Kettunen E, Seppanen JK, et al. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene*. 2002 Aug 22;21(37):5804-13.
- [129] Gunnarsson C, Ahnstrom M, Kirschner K, et al. Amplification of HSD17B1 and ERBB2 in primary breast cancer. *Oncogene*. 2003 Jan 9;22(1):34-40.
- [130] Press MF, Bernstein L, Sauter G, et al. Topoisomerase II-alpha gene amplification as a predictor of responsiveness to anthracycline-containing chemotherapy in the Cancer International Research Group 006 clinical trial of trastuzumab (herceptin) in the adjuvant setting. *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2005* [abstract 1045].
- [131] Bofin AM, Ytterhus B, Hagmar BM. TOP2A and HER-2 gene amplification in fine needle aspirates from breast carcinomas. *Cytopathology*. 2003 Dec;14(6):314-9.
- [132] Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J. Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):839-47.

- [133] Durbecq V, Di Leo A, Cardoso F, et al. Comparison of topoisomerase-IIalpha gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Feb;77(3):199-204.
- [134] Villman K, Sjostrom J, Heikkila R, et al. TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol.* 2006;45(5):590-6.
- [135] Park K, Han S, Gwak GH, Kim HJ, Kim J, Kim KM. Topoisomerase II-alpha gene deletion is not frequent as its amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Feb 24.
- [136] Bhargava R, Lal P, Chen B. HER-2/neu and topoisomerase IIa gene amplification and protein expression in invasive breast carcinomas: chromogenic in situ hybridization and immunohistochemical analyses. *Am J Clin Pathol.* 2005 Jun;123(6):889-95.
- [137] Varis A, Zaika A, Puolakkainen P, et al. Coamplified and overexpressed genes at ERBB2 locus in gastric cancer. *Int J Cancer.* 2004 Apr 20;109(4):548-53.
- [138] Wang JC: DNA Topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65:635-592,1996.
- [139] Durbecq V, Desmed C, Paesmans M, et al. Correlation between topoisomerase-IIalpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. *Int J Oncol.* 2004 Nov;25(5):1473-9.
- [140] Sandri MI, Hochhauser D, Ayton P, et al. Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta genes in human breast cancers. *Br J Cancer.* 1996 Jun;73(12):1518-24.

- [141] Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *J Pathol.* 1999 Jan;187(2):207-16.
- [142] Isaacs RJ, Davies SL, Sandri MI, Redwood C, Wells NJ, Hickson ID. Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Oct 1;1400(1-3):121-37. Review.
- [143] Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol.* 2000 May;13(5):542-7.
- [144] Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, et al. Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol.* 2004 Jan;24(1):201-9.
- [145] Tinari N, Lattanzio R, Natoli C, et al. Changes of topoisomerase IIalpha expression in breast tumors after neoadjuvant chemotherapy predicts relapse-free survival. *Clin Cancer Res.* 2006 Mar 1;12(5):1501-6.
- [146] Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 Apr;39(4):288-97.
- [147] Harris LN, Yang L, Liotcheva V, et al. Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1497-504.

**[148]** Asano T, Zwelling LA, An T, et al. Effect of transfection of a *Drosophila* topoisomerase II gene into a human brain tumour cell line intrinsically resistant to etoposide. *Br J Cancer*. 1996 Jun;73(11):1373-80.

**[149]** Asano T, An T, Mayes J, Zwelling LA, Kleinerman ES. Transfection of human topoisomerase II alpha into etoposide-resistant cells: transient increase in sensitivity followed by down-regulation of the endogenous gene. *Biochem J*. 1996 Oct 1;319 (Pt 1):307-13.

**[150]** Withoff S, Keith WN, Knol AJ, et al. Selection of a subpopulation with fewer DNA topoisomerase II alpha gene copies in a doxorubicin-resistant cell line panel. *Br J Cancer*. 1996 Aug;74(4):502-7.

**[151]** Withoff S, de Vries EG, Keith WN, et al. Differential expression of DNA topoisomerase II alpha and -beta in P-gp and MRP-negative VM26, mAMSA and mitoxantrone-resistant sublines of the human SCLC cell line GLC4. *Br J Cancer*. 1996 Dec;74(12):1869-76.

**[152]** Zhou Z, Zwelling LA, Kawakami Y, et al. Adenovirus-mediated human topoisomerase IIalpha gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1999 Sep 15;59(18):4618-24.

**[153]** Asano T, Kleinerman ES, Zwelling LA, Zhou Z, Fukunaga Y. Adenovirus-mediated human topoisomerase IIalpha gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human and mouse breast cancer cells. *Acta Oncol*. 2005;44(3):240-7.

- [154] Gudkov AV, Zelnick CR, Kazarov AR et al. Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II Cdna. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3231-3235, 1993.
- [155] Tanner M, Järvinen TAH, Kauraniemi P, Holli K, Joensuu H: Topoisomerase II $\alpha$  amplification and deletion predict response to chemotherapy in breast cancer. *Proc Am Soc Cancer Res* 41:803, abstract, 2000.
- [156] Wilt M, Millon R, Velten M, et al. Comparative value of SBR grade, hormonal receptors, KI 67, HER-2 and topo-isomerase II alpha (topo II alpha) status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracyclin-based chemotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 32a (Abstr 123).
- [157] Penault-Llorca FM, Amat S, De Latour M, et al. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: from predictive to prognostic significance in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy (CT). *Br Cancer Res Treat* 2002; 76: (Suppl 1) (Abstr 153).
- [158] Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, et al. Evaluation of Ki67 proliferation index before and during neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Br Cancer Res Treat* 2002; 76: (Suppl 1) (Abstr 229).
- [159] Billgren A, Rutqvist L, Tani E, et al. Proliferating fraction during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer in relation to objective local response and relapse-free survival. *Acta Oncol* 1999; 38: 597–601.
- [160] Villman K, Stahl E, Liljegren G, Tidefelt U, Karlsson MG. Topoisomerase II-alpha expression in different cell cycle phases in fresh human breast carcinomas. *Mod Pathol*. 2002 May;15(5):486-91.

**[161]** Park K, Kim J, Lim S, Han S. Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2003 Mar;39(5):631-4

**[162]** Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Kornmeier A, Rack B, Rjosk D, Gerber B, Braun S, Sommer H, Friese K. Isolated tumor cells in the bone marrow (ITC-BM) of breast cancer patients before and after anthracyclin based therapy: influenced by the HER2- and Topoisomerase IIalpha-status of the primary tumor? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 Aug;131(8):539-46.

Table 1. Her2 amplification and/or overexpression as predictors of benefit from chemotherapy and hormonal therapy in breast cancer.

	<b>Author</b>	<b>n</b>	<b>Design and method</b>	<b>Result</b>
Anthracyclines (adjuvant and neoadjuvant settings)	Paik et al 1998[30]	638	Retrospective (IHC) LN+ and ER-	Predicted benefit from anthracyclines (DFS only)
	Thor et al 1998[81]	397 (set A) + 595 (set B)	Retrospective (IHC and PCR)	Predicted benefit from dose- intensive anthracycline-based CT
	Petit et al 2004[82]	119	Retrospective (IHC and PCR) Neoadjuvant	Failed to predicted benefit from anthracycline-based CT
	Bitran et al 1996[83]	25	Retrospective (IHC)	Failed to predicted benefit from high- dose anthracycline-based CT
	Coon et al 2002[84]	35	Retrospective (IHC and FISH) Neoadjuvant	Amplification, but not overexpression, predicted response to anthracycline-based CT
	Di Leo et al 2001[85]	481	Retrospective (IHC) LN+	Trend only
	Knoop et al 2005[22]	805	Retrospective (IHC and FISH if IHC++)	Failed to predicted benefit from anthracycline-based CT
	Paik et al 2000[86]	2034	Retrospective (IHC)	Trend only
	Albain et al 2004[87]	782	Retrospective (IHC) LN+,ER and/or PgR+	Predicted benefit from anthracycline- based CT
	Tanner et al 2006[18]	391	Retrospective (CISH) heavily LN+	Failed to predict benefit from dose- intensive anthracycline-based CT (over a standard dose anthracycline arm)
	Colozza et al 2005[88]	266	Retrospective (IHC)	Trend only
	Pritchard et al 2006[41]	639	Retrospective (FISH, IHC and PCR) Premenopausal, LN+	Predicted benefit from a highly dose- intensive anthracycline regimen
	Di Leo et al 2002[89]	454	Retrospective (FISH)	Trend only
	Moliterni et al 2003[90]	506	Retrospective (IHC)	Trend only
	De Laurentiis et al 2001[91]	123	Retrospective (IHC)	Predicted benefit from anthracycline- based CT
	Dressler et al 2005[42]	524	Retrospective (IHC,FISH and PCR)	Predicted benefit from doxorubicin dose-escalation
	Arnould et al 2003[92]	332	Retrospective (IHC)	Superiority of dose-intensive anthracycline-based CT is independent of Her2 status
Del Mastro et al 2005[93]	731	Retrospective (IHC)	Predicted benefit from dose-dense anthracycline-based CT (over a standard anthracycline regimen)	

Table 1 (cont.)

Anthracyclines (adjuvant and neoadjuvant settings)	Gregory et al 2000[94]	268	Retrospective (IHC) Neoadjuvant	HER2 overexpression associated with resistance to chemoendocrine therapy
	Tetu et al 1998[95]	458	Retrospective (IHC)	Absence of HER2 overexpression was associated with benefit from longer course of chemotherapy
	Clahsen et al 1998[96]	441	Retrospective (IHC) Premenopausal, LN-	Failed to predict benefit from 1 cycle of perioperative anthracycline-based CT
	Rozan et al 1998[97]	167	Retrospective (IHC) Neoadjuvant	Failed to predict benefit from anthracycline-based CT
	Fritz et al 2005[98]	225	Retrospective (IHC)	Failed to predict benefit from anthracycline-based CT
Anthracyclines (metastatic setting)	Niskanen et al 1997[99]	127	Retrospective	Failed to predict responsiveness to anthracyclines
	Sjöstrom et al 1998[100]	103	Retrospective	Failed to predict responsiveness to anthracyclines
	Jarvinen et al 1998[101]	55	Retrospective	Associated with lower responsiveness to anthracyclines
CMF	Gusterson et al 1992[29]	262	Retrospective (IHC)	HER2 was associated with resistance to CMF
	Menard et al 2001[102]	324	Retrospective (IHC)	Associated with resistance to CMF
	Miles et al 1999[103]	274	Retrospective (IHC)	Associated with resistance to CMF
	Allred et al 1992[104]	613	Retrospective (IHC)	Associated with resistance to CMF
Tamoxifen	Laurentiis et al 2005[105]	1059	Meta-analysis (various methods) MBC	Her2 positive tumours are more resistant to endocrine therapy
	Carlomagno et al 1996[106]	145	Retrospective (IHC)	Associated with resistance to tamoxifen
	Sjogren et al 1998[107]	315	Retrospective (IHC)	Associated with resistance to tamoxifen
	Ferrero-Pous et al 2000[108]	488	Retrospective (IHC)	Associated with resistance to tamoxifen
	Pinto et al 2001[109]	306	Retrospective (IHC)	Associated with resistance to tamoxifen
	De Placido et al 2003[110]	433	Retrospective (IHC)	Associated with resistance to tamoxifen
	Ellis et al 2001[111]	36 (for this subgroup analysis)	Retrospective (IHC) Neoadjuvant	HER1/HER2 associated with resistance to tamoxifen, but not to aromatase inhibitors
	Smith et al 2005[112]	34 (for this subgroup analysis)	Retrospective (IHC and FISH in selected cases) Neoadjuvant	Her2 associated with resistance to tamoxifen, but not to aromatase inhibitors
	Berry et al 2000[113]	651	Retrospective (IHC, PCR and FISH)	Not associated with resistance to tamoxifen
Elledge et al 1998[114]	205	Retrospective (IHC)	Failed to correlate her2 positivity with resistance to tamoxifen	



Table 1 (cont.)

Taxanes	Learn et al 2005[115]	121	Retrospective (IHC)	Predictive benefit from preoperative docetaxel
	Di Leo et al 2004[116]	176	Retrospective (IHC and FISH) MBC	Her2 positive tumours were more sensitive to docetaxel than to doxorubicin
	Gonzales-Angulo et al 2004 [117]	71	Retrospective (FISH)	Failed to predict responsiveness to preoperative taxanes
	Konecny et al 2004[118]	297	Retrospective (FISH) MBC	Her2 amplification may predict benefit from taxane-containing regimens
	Van Poznak et al 2002[119]	144	Retrospective (IHC) MBC	Failed to predict responsiveness to taxanes

DFS= disease-free survival; IHC= immunohistochemistry; FISH= fluorescence in situ hybridization; CISH= chromogenic in situ hybridization; PCR= polymerase chain reaction; MBC= metastatic breast cancer; ER= oestrogen receptor; LN+= lymph node positive; LN-= lymph node negative; CT= chemotherapy; CMF= cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracyl

Table 2. Relevant genes found at the 17q12-q21 amplicon

Luoh et al 2002[121] Hyman, Wolf 2002[122] Clark, Edwards 2002[123] Kauraniemi, Sauter 2003[124] Jacobson, Morrison 2004[125]	HER2	Human epidermal receptor 2
	T2A	Topoisomerase II $\alpha$
	THRA1	Thyroid hormone receptor $\alpha$
	RARA	Retinoid acid receptor $\alpha$
	MLNs 50,51,62 and MLN 64/CAB1	Steroidogenic acute regulatory protein-related protein
	PBP/PARBPT/TRAP-220	Peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein
	TRAP-100	Thyroid hormone receptor-associated protein complex component 100
	GASTRIN	
	GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7
	DARPP-32	Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein
	HOXB2 and HOXB7	Homeobox genes 2 and 7
	JUP	Junction plakoglobin
	CrkRS	CDC2-related protein kinase-7
	TCP	titin cap protein
	PNMT	Phenylethanolamine N-methyltransferase
MGC9753 and MGC14832	Two hypothetical proteins	
Aiolos and HSD17B1	17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1	

Table 3. Prevalence of T2A aberrations in Her2 amplified and non-amplified breast cancer.

Author	Rates of T2A aberrations	Tumour type
<b>Her2 amplified</b>		
Press et al 2005[130]	~40% (35% A+, 4% deletions)	2120 early breast cancer patients, all with Her2 amplified tumours
Bofin et al 2003[131]	80% (aspirates)	Breast cancer
Jarvinen et al 2000[132]	80-90%	
Jarvinen et al 1999[126]		
Durbecq et al 2003[133]	38%	
Di Leo et al 2002[89]	51%	
Olsen et al 2004[39]	53%	
Knoop et al 2006[22]	57% (of Her2 +ve, some assessed by IHC only)	
Villman et al 2006[134]	32%	
Park et al 2006[135]	33%	
Tanner et al 2006[18]	37%	
Hicks et al 2005[34]	50%	
Bhargava et al 2005[136]	50%	
Murthy et al 2005[19]	42%	
Simon et al 2003[67]	56%	
Varis et al 2004[137]	100%	Gastric
Tanner et al 2005[61]	63%	Gastric
	68%	Gastro-oesophageal junction
<b>Her2 non-amplified</b>		
Simon et al 2003[67]	17%	Bladder
Varis et al 2004[137]	0	Gastric
Bofin et al 2003[131]	10% (aspirates)	Breast cancer
Bhargava et al 2005[136]	5%	
Hicks et al 2005[34]	5%	
Knoop et al 2005[22]	7,6%	
Jacobson et al 2004[125]	24%	
Park et al 2006[135]	7,7%	
Coon et al 2002[84]	0	
Olsen et al 2004[39]	13%	
Durbecq et al 2003[133]	0	
Villman et al 2006[134]	4%	
Jarvinen et al 2000[132]	0	
Jarvinen et al[126]		

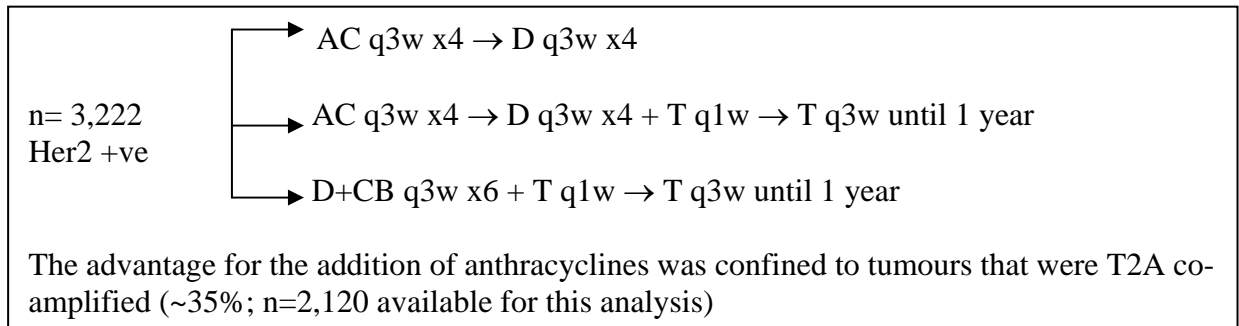
T2A= topoisomerase II $\alpha$ ; CT= chemotherapy; A+= amplification; +ve=positive

Table 4. Studies correlating response to anthracyclines with T2A aberrations

	<b>Author</b>	<b>n</b>	<b>Design, method and population</b>	<b>Result</b>
T2A and responsiveness to anthracyclines (adjuvant or neoadjuvant setting)	Coon et al 2002[84]	35	Retrospective (IHC and FISH) Neoadjuvant	T2A A+ predicted benefit from anthracyclines
	Di Leo et al 2002[89]	354	Retrospective (FISH) Adjuvant	Superiority of anthracyclines over CMF in Her2-amplified patients could be confined to the subgroup of T2A-amplified tumours
	Park et al 2003[161]	67	Retrospective (CISH) Neoadjuvant	T2A A+ predicted benefit from anthracyclines
	Knoop et al 2005[22]	773	Retrospective (IHC and FISH if IHC++) Adjuvant	T2A A+ (and possibly deletion) seemed to predict benefit from anthracycline-based therapy
	Press et al 2005[130]	2120	Prospectively planned (FISH) Adjuvant, LN+ or LN- high risk	Benefit from anthracyclines seemed to be restricted to T2A co-amplified tumours
	Tanner et al 2006[18]	391	Retrospective (CISH) Adjuvant, heavily LN+	T2A A+ predicted benefit from dose-intensive anthracycline-based CT (over a standard dose anthracycline arm)
	Petit et al 2004[82]	119	Retrospective Neoadjuvant	Failed to predicted benefit from anthracyclines

T2A= topoisomerase II $\alpha$ ; IHC= immunohistochemistry; FISH= fluorescence in situ hybridization; CISH= chromogenic in situ hybridization; LN+= lymph node positive; LN-= lymph node negative; CT= chemotherapy; CMF= cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracyl; A+= amplification

Figure 1. Design of BCRIG 006 [60,130].



n= number of patients; A= doxorubicin; C= cyclophosphamide; D= docetaxel; CB= carboplatin; q3w= every 3 weeks; q1w= weekly; T= trastuzumab; +ve= positive; BCRIG= Breast Cancer Research International Group

## **6.2 Artigo 2 em inglês**

Gynecol Oncol. 2004 Mar;92(3):887-95

IF 2004: 2.083

**Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplification and expression  
in epithelial ovarian carcinoma**

**M. S. Mano <sup>a</sup>, A. Awada <sup>a</sup>, A. Di Leo <sup>a</sup>, V. Durbecq <sup>b</sup>, M. Paesmans <sup>c</sup>, F. Cardoso <sup>a</sup>,  
D. Larsimont <sup>b</sup> and M. Piccart <sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Unité de Chimiothérapie, Institut Jules Bordet, Brussels, Belgium

<sup>b</sup> Service d'Anatomopathologie, Institut Jules Bordet, Brussels, Belgium

<sup>c</sup> Data Centre, Institut Jules Bordet, Brussels, Belgium

Received 16 July 2003. Available online 24 January 2004.

## **Abstract**

*Objectives.* Topoisomerase II-alpha (T2a) is being actively investigated as a potential predictive marker of response to anthracyclines in breast cancer (BC). Although the role of T2a inhibitors as upfront and salvage treatment for epithelial ovarian carcinoma (EOC) remains unclear, we speculated that a small subgroup of ovarian cancer patients could derive a selective benefit from these agents. In this study, we investigated the actual rates of T2a and HER-2 amplification and overexpression by fluorescence in situ hybridisation (FISH) and immunohistochemistry (IHC), respectively.

*Methods.* Seventy-three samples of chemotherapy-naive patients with EOC were selected from our archives. FIGO stage and histology were available for most patients.

*Results.* Based on arbitrary cut-offs of  $\geq 1.5$  and  $\geq 2$  (ratio copies/centromere17), amplification rates for HER-2 were 15/64 (23.4%) and 8/64 (12.5%) versus 16/64 (25%) and 5/64 (7.8%) for T2a. We found only 3/72 (4.2%) cases of HER-2 overexpression (3+) versus 15/70 (21.4%) for T2a (staining of > 10% of the cells). There was a modest correlation between T2a amplification and overexpression ( $P = 0.01$ ) and a strong correlation between T2a and HER-2 amplification when these markers were analysed as continuous variables ( $P < 0.001$ ). T2a amplification significantly correlated with advanced FIGO stage ( $P = 0.02$ ).



*Conclusion.* The assessment of HER-2 and T2a amplification and overexpression by FISH and IHC, respectively, is feasible in EOC. These tests can be used for large-scale evaluation of the potential predictive and prognostic value of these markers in the future. Further studies with a special focus on T2a are needed to determine the best cut-offs for potential clinical use in the future.

**Author Keywords:** Author Keywords: Ovarian cancer; Topoisomerase II-alpha; HER-2; Chemotherapy

## **Article Outline**

- Introduction
- Patients and methods
- Patient selection
- Immunohistochemistry
- Fluorescence in situ hybridisation
- Potential limitations related to sample age
- Statistical methods
- Results
- HER-2 by IHC
- HER-2 by FISH (copies/CEP17)
- HER-2 by FISH (without correction for CEP17)
- Association between HER-2 gene amplification and protein overexpression (as assessed by FISH and IHC, respectively)
- T2a by IHC
- T2a by FISH (copies/CEP17)

- T2a by FISH (> 4 copies)
- Association between T2a gene amplification and protein overexpression (as assessed by FISH and IHC, respectively)
- Association between HER-2 and T2a amplification
- Associations of the variables with FIGO stage
- Discussion
- Acknowledgements
- References

## Introduction

Ovarian cancer is one of the leading causes of cancer death in women [1]. Unfortunately, the disease is diagnosed in advanced stages in 70–80% of the cases. Most patients receive upfront platin–taxane combinations [2,3], but median survival remains as low as 24 months, with most patients eventually relapsing and needing salvage chemotherapy. In platin-refractory disease, numerous agents have shown comparable activity (response rates ranging from 15% to 30%). In this setting, the modest activity of topoisomerase II inhibitors such as anthracyclines and etoposide is also well documented [4-6]. In first line treatment, randomised trials have failed to establish a clear role for anthracyclines [7-9]. The possibility that a subgroup of patients, such as those with amplified and/or overexpressed T2a, might derive a selective benefit from these agents has not yet been investigated.

T2a is a gene located on the locus q21 of chromosome 17, responsible for coding a nuclear enzyme that plays a crucial role in the cell cycle and is also the target of several chemotherapeutic agents, such as etoposide, teniposide, novobiocin and anthracyclines [10]. In breast cancer (BC), T2a amplification is seen to be closely associated with HER-2 amplification. This finding has led to speculation that T2a might be the actual predictive factor of response to anthracyclines, instead of HER-2 [11]. Indeed, a correlation between T2a amplification and response to anthracyclines has already been reported in the clinical setting by Isola et al. [11] and Di Leo et al. [12,13]. Whether gene amplification or protein overexpression (or any combination of

both) might be the best potential predictive factor of response to topoisomerase II inhibitors remains a source of debate **[14]**.

So far, there is limited data on the actual rates of T2a amplification in epithelial ovarian carcinoma (EOC), and no studies have used fluorescence in situ hybridisation (FISH), a reliable, reproducible and widely available test for DNA assessment (allowing testing on paraffin-embedded tissue) **[15,16]**. In contrast, the T2a protein appears to be overexpressed in 30–70% of the EOCs **[16-19]**, depending on the method used. Pre-clinical data have supported T2a protein overexpression as a potential predictive factor of response to topoisomerase II inhibitors in EOC **[17,20]**, but to our knowledge, the potential predictive value of T2a amplification has never been investigated. As in BC, one study found no correlation between T2a gene amplification and expression, but so far the relationship between HER-2 and T2a amplification has not been explored **[16,21]**.

HER-2 amplification has been reported in around 15% of BC, and in this disease, there seems to be a good correlation between amplification and protein overexpression. HER-2 amplification has also been demonstrated in EOC, but some of these studies used methods other than FISH **[22-24]**. In contrast, and contrary to initial reports, rates of protein overexpression appear to be very low in ovarian carcinomas when assessed by immunohistochemistry (IHC) **[25]**.

In this study, we primarily investigated the actual rates of T2a and HER-2 gene amplification and protein overexpression (as assessed by FISH and IHC, respectively), and whether gene amplification might be the principal determinant of

T2a and HER-2 protein overexpression in EOC. We also evaluated the relationship between T2a and HER-2 amplification and explored the potential prognostic value of these parameters by correlating them with FIGO stage.

## **Patients and methods**

### **Patient selection**

Seventy-three paraffin-embedded tumour samples from patients with EOC operated at the Institut Jules Bordet from 1987 to 2002 were selected, based on the regular gynaecologic surgical lists. Only one patient was not chemotherapy-naive (this information became available only after the analysis). Information on histology and FIGO stage was available for 73 and 71 patients, respectively. The clinical and pathological characteristics are shown in Table 1.

### **Immunohistochemistry**

T2a protein expression was evaluated by IHC as described previously [12]. Briefly, the sections were dewaxed, rehydrated and incubated for 30 min in 0.5% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in methanol. After pretreatment (0.1% trypsin in 0.1% CaCl<sub>2</sub> pH 7.8 for 10 min at 37°C), non-specific staining was blocked by incubating in 10% normal serum for 1 h at 4°C and performing all steps in buffer PBS/0.1%BSA/1%Tween 20. After incubation with the primary antibody (1 µg ml<sup>-1</sup> overnight at 4°C, clone KiS1, Boehringer-Manheim), the sections were incubated at room temperature with a secondary biotinylated anti-mouse antibody for 30 min, and Streptavidin-HRP (Zymed) (1/20) for 10 min. 3'-3 diaminobenzidine was used as a chromogen. The sections were counterstained with Mayer's haematoxylin. Negative controls composed

serial sections incubated with buffer alone instead of the primary antibody. As no scoring system has been defined for T2a, the analysis was only based on percentage of positively stained cells, as evaluated by the pathologist. Analyses were carried out in a blinded fashion (protein evaluation unaware of the gene status and vice versa). In cases with marked heterogeneity, the zones with the most intense staining were considered. In BC, a cut-off of > 10% staining cells (IHC) has been proposed, although this remains controversial. The appropriate cut-off is not known in EOC. Therefore, we analysed the T2a protein primarily as a continuous variable, although we also performed an illustrative, exploratory analysis based on the two arbitrary cut-offs of  $\geq 10\%$  and  $> 10\%$  of stained cells.

HER-2 was evaluated by IHC with the mouse monoclonal antibody CB-11, dilution 1/40 (Novocastra, Newcastle, UK), according to the following procedures: sections from paraffin-embedded blocks routinely fixed in neutral buffered formalin were cut on poly-L-lysine-coated slides. The slides were dewaxed and rehydrated. The tissue was pre-treated in a water bath at 94°C for 30 min in 10 mmol/l ethylene diamine tetraacetic acid buffer (EDTA), pH8. The sections were then stained with the Ventana Nexes System using standard Nexes reagents and biotin endogen blockers (Ventana Medical Systems, Tucson, Az). The sections were incubated for 30 min at 37°C with the primary antibody and 10 min at 37°C with the biotinylated secondary antibody before incubation with avidin-peroxydase for the same amount of time. The chromogen was the 3'-3 diaminobenzidine. All the products needed for these steps were included in the DAB detection kit provided by the manufacturer. The slides were then counterstained with Mayer's haematoxylin, dehydrated and mounted.



Membranous staining was defined as positivity. The scoring system used was that of the Herceptest (DAKO, Carpinteria, CA). The assessment was based on the percentage of positively stained cells and staining intensity. Analyses were carried out in a blinded fashion (protein evaluation unaware of the gene status and vice-versa). We analysed HER-2 as a continuous variable, although we also performed two exploratory analyses using the cut-offs of 2+/3+ and 3+, according to previous studies in BC and EOC.

### **Fluorescence in situ hybridisation**

FISH assays were performed using the Vysis Multi-color T2a Spectrum orange, HER-2 Spectrum green and CEP17 Spectrum aqua probe (Vysis, Chicago, IL, USA) as previously described [26]. Briefly, the sections were deparaffined and incubated in pretreatment buffer at 80°C for 30 min. Enzymatic digestion was carried out with pepsin (10–20 min at 37°C), and the slides were dehydrated in graded dilutions of ethanol. The probe (10 µl) was applied to the slides under coverslips. The slides were co-denatured on a hot plate (73°C for 5 min), followed by overnight hybridisation at 37°C. After being stringently washed (2XSSC/0.3% Nonidet P-40 at 73°C for 2 min), the slides were counterstained with 10 µl of 0.2 µM 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in antifade solution (Vectashield, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). FISH was evaluated using an Olympus BX51 epifluorescence microscope equipped as previously described [27]. The Invasive parts of the tumour were surrounded on the slides with a diamond, superimposed by HE-stained sections previously analysed

by a pathologist (DL). Signals from at least 60 non-overlapping nuclei with intact morphology were evaluated to determine the mean number of signals/cell (ratio between the mean number of T2a or HER-2 signals and the mean number of chromosome 17 centromere signals [copies/CEP17]). In BC, amplification of the HER-2 gene has been defined as a relative copy number ratio  $\geq 2$  [28]. In EOC, two small studies have used a cut-off of  $\geq 1.5$ . In contrast, T2a amplification has never been assessed by FISH in EOC, although in BC, a relative copy number ratio of  $\geq 1.5$  has already been proposed as a cut-off [28]. Since little experience exists with the FISH test in EOC, we analysed these markers primarily as continuous variables. In addition, we performed exploratory analyses of HER-2 and T2a amplification, using either a cut-off of  $\geq 1.5$  or  $\geq 2.0$  to illustrate the potential impact this could have on the final results.

### **Potential limitations related to sample age**

We have previously evaluated the potential influence of block age on the results during our previous retrospective studies. The non-parametric correlation coefficients between the biologic marker's distribution and block age did not show any significant influence of the latter, either by IHC or FISH (Spearman coefficients between 0 and 0.18, non-significant). Therefore, we have no evidence that age could have influenced our results.

## **Statistical methods**

The purpose of this analysis is essentially descriptive. The univariate distribution of the continuous variables were described by position (mean and median) and dispersion parameters (standard deviation and range). Binary variables were described by the observed rates of protein overexpression and/or gene amplification. The association between two continuous variables was assessed by calculating ranks Spearman's correlation coefficients (with significance testing on the equality to zero of these coefficients). Rates of positivity of binary variables were done on pairs using McNemar tests.

## Results

### HER-2 by IHC

Seventy-two cases were available for this analysis (one was excluded due to technical problems, related to problems with tissue conservation). The most recurrent score was 0 ( $n = 52$ , 72%); the distribution of scores is shown in Fig. 1. Considering as positive those cases with  $\geq 2+$ , 6/72 (8.3%), tumours were defined as HER-2 overexpressing. Taking only the 3+ (as currently accepted in BC tumours), the HER-2 positivity rate was 4.2% (3/72 cases).

### HER-2 by FISH (copies/CEP17)

Sixty-three cases were available for this analysis (nine were excluded due to problems with tissue conservation and one case was assessed as amplified but without any accurate measure of the ratio copies/CEP17 and therefore not taken into account in calculating the parameters of the observed distribution of HER-2). The median and mean FISH values were 1.20 and 1.40, respectively (with a standard deviation of 0.63, the variable ranged from 0.96 to 3.46). Their distribution is shown in Fig. 1. In the analysis of the continuous distribution of this variable, one amplified case was not taken into account because the amplification could not be quantified ( $n = 63$ ). Considering as positive those cases with a ratio of copies/CEP17  $\geq 1.5$ , 15/64

(23.4%), tumours were amplified. With a cut-off of  $\geq 2$ , the amplification rate dropped to 12.5% (8/64 cases).

### **HER-2 by FISH (without correction for CEP17)**

Sixty-four cases were available for this analysis (with nine excluded due to problems with tissue conservation). When the number of CEP17 copies was not taken into account, the median and mean FISH scores were 2.70 and 3.26, respectively (with a standard deviation of 2.04, the variable ranged from 1.00 to 11.60). Their distribution is shown in Fig. 2. As above, in calculating the parameters of the observed distribution, one amplified case was not taken into account because the amplification could not be quantified ( $n = 63$ ). Regarding as positive those cases with  $> 4$  gene copies (as suggested in BC), 21/64 (32.8%), tumours were determined to be HER-2-amplified.

### **Association between HER-2 gene amplification and protein overexpression (as assessed by FISH and IHC, respectively)**

Sixty-two pairs were available for this analysis (nine FISH and one IHC were excluded due to problems with tissue conservation, and one amplified case was excluded because it could not be quantified). The Spearman's rank correlation coefficient had a value of 0.14 and was statistically not different from 0 ( $P = 0.27$ ) (Fig. 3). This means that, when analysed as a continuous variable, there was no

significant correlation between these two variables. In an exploratory analysis, these assessments were also dichotomized and compared as binary variables (HER-2 IHC  $\geq 2+$ , HER-2 IHC  $\geq 3+$ , HER-2 FISH  $\geq 1.5$ , HER-2 FISH  $\geq 2$ ). The proportion of positivity was compared using the McNemar tests (63 pairs available: nine FISH and one IHC excluded due to problems with tissue conservation). In conclusion, the rates of amplification or overexpression were low, and there was no clear correlation between the different methods of assessment.

### **T2a by IHC**

Seventy cases were available for this analysis (with three cases excluded due to problems with tissue conservation). Scores are expressed as the percentage of stained cells. The most recurrent score was 0 ( $n = 21$ , 30%), and the median and mean values were 5.00% and 7.50%, respectively. Considering as positive those cases with  $> 10\%$  of stained cells, 15/70 (21.4%) tumours resulted in being T2a overexpressing.

### **T2a by FISH (copies/CEP17)**

Sixty-four cases were available for this analysis (nine cases were excluded due to problems with tissue conservation). The median and mean FISH scores were 1.15 and 1.34, respectively (with a standard deviation of 0.53, the variable ranged from 0.95 to 3.29), with their distribution shown in Fig. 4. Cases were viewed as positive

when the ratio of copies/CEP17 was  $\geq 1.5$  and 16/64 (25%) tumours were thus amplified. With a higher cut-off of  $\geq 2$ , the amplification rate dropped to 7.8% (5/64 cases).

### **T2a by FISH (> 4 copies)**

Sixty-three cases were available for this analysis (10 FISH excluded due to problems with tissue conservation). When the ratio with the number of CEP17 copies was not taken into account, the median and mean FISH scores were 2.70 and 3.12016, respectively (with a standard deviation of 1.75, the variable ranged from 1.00 to 6.90). Their distribution is shown in Fig. 2. Considering as positive those cases with > 4 gene copies, 20/63 (31.7%) tumours were T2a-amplified.

### **Association between T2a gene amplification and protein overexpression (as assessed by FISH and IHC, respectively)**

Sixty-three pairs were available for this analysis (nine FISH and one IHC were excluded due to problems with tissue conservation). The Spearman's rank correlation coefficient had a value of 0.31 and this was statistically different from 0 ( $P = 0.01$ ) Fig. 5, which means that there was a modest association between these two variables when analysed as continuous. In an exploratory analysis, these assessments were also dichotomized and compared as binary variables (T2a IHC > 10%, T2a IHC  $\geq 10\%$ , T2a FISH  $\geq 1.5$ , T2a FISH  $\geq 2$ ). The proportion of positivity was compared

using the McNemar tests (63 pairs available, with nine FISH and one IHC excluded due to problems with tissue conservation). In conclusion, as for HER-2, there was no correlation between the different methods of assessment.

### **Association between HER-2 and T2a amplification**

When analysed as continuous variables, there was an excellent correlation between HER-2 and T2a amplification (FISH) (with or without correction for the CEP17; Spearman's correlation coefficients of 0.83 [ $P < 0.001$ ;  $n = 63$ ] and 0.93 [ $P < 0.001$ ;  $n = 62$ ], respectively (for HER-2, 9 FISH were excluded due to technical problems [problems with tissue conservation], and another because it could not be quantified; for T2a, 10 FISH were excluded [due to problems with tissue conservation], and another because it could not be quantified) (Fig. 6). Conversely, the association between HER-2 and T2a protein overexpression (IHC) was poor (correlation COEFFICIENT = 0.09,  $P = 0.48$ ;  $n = 70$ ) Fig. 7.

### **Associations of the variables with FIGO stage**

HER-2 overexpression (2+/3+) was associated with FIGO stages I and II ( $P = 0.01$ , Fisher's exact test). Conversely, T2a amplification (FISH) correlated with advanced FIGO stage (III and IV). All cases of amplification (regardless of the definition, i.e., copies/CEP17  $\geq 1.5$ ,  $\geq 2.0$  or copies  $> 4$ ) were seen in FIGO III/IV tumours. This



association reached statistical significance only when uncorrected for CEP17 ( $P = 0.02$ ). There were no other detectable associations.

## Discussion

Amplification of the HER-2 gene is seen in around 15% of breast carcinomas, and the FISH test, which allows testing on paraffin-embedded tissue, has been widely used in the clinical practice. In BC, a cut-off of  $\geq 2$  copies/CEP17 or  $> 4$  copies (without correction for CEP17) has been used to define gene amplification. In EOC, HER-2 amplification rates range from 20% to 30% [29- 32] with methods other than FISH, although Van der Zee et al. [16] found only one case of amplification among 86 cases. By FISH, amplification rates range from 32% to 71% (a cut-off of  $\geq 1.5$  copies/CEP17 was used in most of these studies) [23,33-36]. In our study, we found median and mean FISH values of 1.20 and 1.40, respectively. With a cut-off of  $\geq 2$ , amplification rates were 12.5% [8/64] (versus 23.4% [15/64] with a cut-off of  $\geq 1.5$ ). The assessments were frequently complicated by heterogeneity and high rates of CEP17 polysomy. In fact, 13/64 (20.3%) or 8/64 (12.5%) tumours (cut-off  $\geq 2$  and  $\geq 1.5$ , respectively) were considered non-amplified despite the presence of  $>4$  copies of the gene. Using the number of gene copies ( $> 4$ ) without correction for CEP17 to define amplification, 32.8% (21/64) of the cases were considered as HER-2-amplified. The importance of this finding is that the uncorrected number of gene copies seems to be more representative of the genetic abnormality in the OC cells. Of note, some experts continue to question the utility of the number of CEP17 copies in the clinical practice.

The HER-2 protein is overexpressed in 15–20% of breast carcinomas, and IHC has been the most widely used test for this assessment. In EOC and peritoneal surface epithelial neoplasms (SEN), HER-2 overexpression was reported in 25–30% of the cases, though figures ranged from 9% to 65% in different series [37-41]. Some [22,35,36,39], but not all [34,35,42] of these studies also suggested that HER-2 overexpression might be a poor prognostic factor in EOC and SEN. However, the actual rates of overexpression seem to be much lower. In the largest study ( $n = 837$ ), the GOG Group found only 11.4% and 4% of 2+/3+ and 3+ overexpression, respectively [25], which are very close to our results (2+/3+ = 8.3% [6/72] and 3+ = 4.2% [3/72]). Interestingly, we found no correlation between HER-2 amplification and protein levels, suggesting that many cases of gene amplification do not result in gene expression, contrary to current knowledge in BC. Similar findings were also reported by Fajac et al. [24]. It is possible that, as seen with T2a, factors other than gene amplification might influence HER-2 protein expression, as part of a complex regulation process. Of interest, in the GOG trial, HER-2 overexpressing (2+/3+) tumours showed very low response rates to trastuzumab, a HER-2-targeted monoclonal antibody. In summary, current evidence suggests that the HER-2 pathway does not play an important role in the survival of EOC cells and is therefore unlikely to become an interesting therapeutic target.

When assessed by FISH, the T2a gene is amplified in around 5–10% of breast carcinomas, usually in HER-2 co-amplified tumours. It has also been suggested that T2a amplification may be the actual predictive marker of response to anthracyclines in BC, instead of HER-2 [11]. Actually, pre-clinical and clinical data have supported

the assumption that T2a plays a central role in determining the sensitivity of tumour cells to T2a-targeted agents [43,12,13]. A cut-off of  $\geq 1.5$  copies/CEP17 has been defined in BC [12,13].

So far, amplification of the T2a gene has not been investigated in EOC [16,17]. Most studies have evaluated m-RNA levels or the T2a protein directly, by methods other than FISH. The potential disadvantage is that protein levels may be dependent on other factors such as the proliferation rate [42]. On the other hand, others could argue that the protein is the actual target of T2a inhibitors [26]. In our study, T2a amplification was assessed by FISH. Using a cut-off of  $\geq 1.5$  copies/CEP17 (as defined in BC), 25% (16/64) of the cases was regarded as amplified. With a slightly higher cut-off of  $\geq 2$ , amplification rates would be as low as 7.8% (5/64). The assessments were also complicated by heterogeneity. The rates of CEP17 polysomy were also high, such that in 11.1% (7/63) and 23.8% (15/63) of the cases, the ratio T2a copies/CEP 17 was  $< 1.5$  and  $< 2$  (non-amplified), respectively, despite the presence of  $> 4$  copies of the gene. Using the uncorrected number of gene copies to define amplification, 31.7% (20/63) of the cases would be considered as amplified. These findings might reflect the genetic, histological and biological diversity typical of EOC. As for HER-2, it could also be speculated that the uncorrected number of gene copies best reflects the genetic abnormality of the cell. Additional studies are needed before a reliable cut-off can be proposed. As in BC, we found an excellent correlation between T2a and HER-2 amplification (either corrected or uncorrected for CEP17 copies), when analysed as continuous variables (Fig. 6).

Topoisomerase IIa protein overexpression has been reported in 30% to 70% of EOC. A number of different methods have been used, for example, reverse PCR [20], Western blot [17] and IHC [18,24,44]. Higher levels of T2a have also been reported in ovarian germ cell tumours, one of the most sensitive neoplasms to the T2a inhibitor etoposide [45]. In the present study, using a cut-off of > 10% of staining cells (as previously proposed in BC), we found 15/70 (21.4%) cases of T2a overexpression. We point out that the assessments were sometimes cumbersome due to marked immunostaining heterogeneity. Of note, previous studies have found no correlation between T2a amplification and overexpression in both ovarian [16,17] and BC [15]. One possible explanation is that factors other than T2a gene amplification might be playing a role in the complex process of T2a protein expression. In contrast, our results suggest a modest correlation between T2a gene amplification and protein overexpression, which should be interpreted with caution due to the small sample size in this study (Fig. 5).

Using the cut-offs of  $\geq 2$  for HER-2 gene,  $\geq 1.5$  for T2a gene and > 10% for T2a protein, 62.5% (5/8) of the HER-2-amplified tumours were co-amplified for T2a, but 68.75% (11/16) of T2a-amplified tumours did not show HER-2 amplification. Only 12.5% (1/8) of the HER-2 amplified tumours overexpressed T2a. With a cut-off of  $\geq 1.5$  for HER-2 amplification, 80% (12/15) of the tumours was co-amplified for T2a, while only 20% of those overexpressed T2a. These findings suggest that OC cannot be compared to BC where only 4% of T2a gene amplifications was observed in HER-2 non-amplified cases. Again, we point out the limitations of comparisons based on arbitrary cut-offs. As stated earlier, when analysed as continuous variables, the

correlation between HER-2 and T2a amplification was excellent. Of interest, we found no cases of T2a deletion in our study, at least with the definition used in BC (ratio < 0.67).

With regard to the biologic significance of gene amplification without protein overexpression, it could be argued that the former represents an acquired genetic defect of the cell, while the latter only reflects its protein content at a precise time. Therefore, gene alteration, even without protein overexpression, may still be a marker of altered biology, which could be associated with prognosis and/or response to therapy. Topoisomerase IIa protein regulation, for instance, is a complex process and highly related to the proliferative stage of a tumour, such that a tumour with no protein overexpression despite gene amplification could potentially overexpress the protein if its proliferative stage changes. In BC, we have previously demonstrated that T2a amplification is correlated with T2a expression only in proliferative tumours (defined as positive immunostaining for Ki-67).

In our study, we observed a correlation between T2a amplification and advanced stage (FIGO III/IV), reaching statistical significance ( $P = 0.02$ , Fisher's exact test) only when uncontrolled for CEP17. No cases of T2a amplification were seen among the early stages (FIGO I/II). The potential implications of this finding are (1) it could mean that T2a overexpression has a prognostic significance or that it is a late event and (2) advanced disease could be more responsive to certain types of chemotherapy, if T2a actually has a predictive value. Conversely, HER-2 overexpression seemed to correlate with early FIGO stage ( $P = 0.01$ , Fisher's exact

test). These data should also be interpreted with caution due to the small sample size (only 14 FIGO I/II patients available for this analysis). Nevertheless, concerning the possibility of HER-2 overexpression being an early event in EOC, we point out the high rates of HER-2 overexpression in intraductal breast carcinomas, a potential precursor of invasive disease.

In conclusion, the assessment of T2a and HER-2 amplification and overexpression by FISH and IHC, respectively, is feasible in paraffin-embedded samples of EOC. We confirmed the association between HER-2 and T2a amplification in EOC, as also seen in BC. Contrary to previous reports, we observed a modest correlation between T2a amplification and protein overexpression but, conversely, no correlation between HER-2 gene amplification and expression in ovarian carcinomas. Chromosome 17 polysomy is a frequent finding in EOC, such that an increased number of amplified cases are seen when the number of gene copies is not corrected for CEP17 copies. Finally, T2a amplification seemed to correlate with advanced FIGO stage. Further studies are needed to explore the prognostic significance of T2a amplification. We are also planning a clinical trial to prospectively evaluate the role of T2a as a predictive factor of response to anthracyclines in EOC.

## **Acknowledgements**

We acknowledge Schering-Plough for the partial financial support for the research, Straehle C for the review, and Leroy J-Y for some of the graphics.



## References

- [1] C. Boring *et al.*. *CA-A Cancer J. Clin.* **44** 1 (1994), pp. 7–26.
- [2] W.P. McGuire, W.J. Hoskins, M.F. Brady *et al.*, Cyclophosphamide and cisplatin versus paclitaxel and cisplatin: a phase III randomized trial in patients with suboptimal stage III/IV ovarian cancer (from the Gynecologic Oncology Group). *Semin. Oncol.* **5** (1996), pp. 40–47.
- [3] M.J. Piccart, K. Bertelsen and K. James, Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J. Natl. Cancer Inst.* **92** (2000), pp. 699–708.
- [4] J.B. Vermorken, A. Kobińska, B. Chevallier *et al.*, A phase II study of high-dose epirubicin in ovarian cancer patients previously treated with cisplatin. EORTC Gynecological Cancer Cooperative Group. *Ann. Oncol.* **11** (2000), pp. 1035–1040.
- [5] P.G. Rose, J.A. Blessing, A.R. Mayer and H.D. Homesley, Prolonged oral etoposide as second-line therapy for platinum-resistant and platinum-sensitive ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* **16** (1998), pp. 405–410.
- [6] A.N. Gordon, J.T. Fleagle, D. Guthrie *et al.*, Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J. Clin. Oncol.* **19** (2001), pp. 3312–3322.

- [7] The Ovarian Cancer Meta-Analysis Project. Cyclophosphamide plus cisplatin versus cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy of ovarian carcinoma: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 9 1668–1674.
- [8] A. du Bois, B. Weber, J. Pfisterer *et al.*, Epirubicin/paclitaxel/carboplatin (TEC) vs. paclitaxel/carboplatin (TC) in first-line treatment of ovarian cancer FIGO stages IIb-IV. Interim results of an AGO-GINECO-intergroup phase III trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20** (2001), p. 202a [abstract 805].
- [9] G. Kristensen, I. Vergote, G. Stuart *et al.*, First line treatment of ovarian cancer FIGO stages IIb-IV with paclitaxel/epirubicin/carboplatin (TEC) vs. paclitaxel/carboplatin (TC). Interim results of an NSGO-EORTC-NCIC CTG Gynecological Cancer Intergroup phase III trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21** (2002), p. 202a [abstract 805].
- [10] U. Kellner, M. Sehested, P. Jensen *et al.*, Culprit and victim—DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol.* **3** (2002), pp. 235–243.
- [11] J.J. Isola *et al.*, Amplification of topoisomerase II alpha is strong predictor of response to epirubicin-based chemotherapy in HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. In: *Proc. San Antonio Breast Cancer Meeting* **64** (2000 (December)), p. 31 (abstr. 21).
- [12] A. Di Leo, D. Larsimont, D. Gancberg *et al.*, HER-2 and topoisomerase IIa as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann. Oncol.* **12** (2001), pp. 1081–1089.

- [13] A. Di Leo, D. Gancberg and D. Larsimont, HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* **8** (2002), pp. 1107–1116.
- [14] V. Durbecq, A. Di Leo, G. Rouas *et al.*, Correlation between topoisomerase II-alpha (TOPO-II) gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. *Proc. Am. Soc. Cancer Res.* **44** (2003), p. 937.
- [15] M. Cornarotti, G. Capranico, S. Bohm *et al.*, Gene expression of DNA topoisomerases I, II alpha and II beta and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* **67** (1996), pp. 479–484.
- [16] A.G.J. Van der Zee, E.G.E. de Vries, H. Hollema *et al.*, Molecular analysis of the topoisomerase II alpha gene and its expression in human ovarian cancer. *Ann. Oncol.* **5** (1994), pp. 75–81.
- [17] M. Koshiyama, H. Fujii, M. Kinezaki *et al.*, Correlation between Topo II alpha expression and chemosensitivity testing for Topo II-targeting drugs in gynaecological carcinomas. *Anticancer Res.* **21** (2001), pp. 905–910.
- [18] W. Gotlieb, I. Goldberg, B. Weisz *et al.*, Topoisomerase II immunostaining as a prognostic marker for survival in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **82** (2001), pp. 99–104.

- [19] S. Withoff, A.G.J. van der Zee, de S. Jong *et al.*, DNA topoisomerae II alpha and beta expression in human ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **79** (1999), pp. 748–753.
- [20] M. Koshiyama, H. Fujii, M. Kinezaki *et al.*, Immunohistochemical expression of topoisomerase II alpha (Topo IIalpha) and multidrug resistance-associated protein (MPR), plus chemosensitivity testing, as chemotherapeutic indices of ovarian and endometrial carcinomas. *Anticancer Res.* **21** (2001), pp. 2925–2932.
- [21] Topoisomerase II-a amplification as potential predictive marker of complete response to anthracycline-based chemotherapy in locally advanced/metastatic breast cancer. In: F. Cardoso, V. Durbecq, C. Bernard-Marty, G. Rouas, J.-Y. Leroy, M. Mano, R. Giuliani, D. Larsimont, K. Jacobson, M.J. Piccart and A. Di Leo, Editors, *San Antonio Breast Cancer Conference* (2002) [abstract 218] .
- [22] A.M. Afify, B.A. Werness, H.F. Mark *et al.*, HER-2 /neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary serous carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* **66** (1999), pp. 163–169.
- [23] S.R. Young, L. Wei-Hua, B. Jo-Ann and S. Smith, ERB2 and chromosome 17 centromere studies of ovarian cancer by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **16** (1996), pp. 130–137.
- [24] A. Fajac, J. Bernard, C. Lhomme *et al.*, c-erb2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* **64** (1995), pp. 146–151.

- [25] M. Bookman, K. Darcy, D. Clarke-Pearson *et al.*, Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **21** (2003), pp. 283–290.
- [26] V. Durbecq, A. Di Leo, F. Cardoso *et al.*, Comparison of topoisomerase-IIa gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Breast Cancer Res. Treat.* **77** 3 (2003), pp. 199–204.
- [27] D. Gancberg, A. Di Leo, F. Cardoso *et al.*, Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann. Oncol.* **13** (2002), pp. 1036–1043.
- [28] M. Tanner, P. Järvinen, J. Isola *et al.*, Amplification of HER-2/neu and topoisomerase II-a in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* **61** (2001), pp. 5345–5348.
- [29] D.J. Slamon, W. Godephin, L.A. Jones *et al.*, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244** (1989), pp. 707–712.
- [30] X. Zhuag, E. Silva, D. Gershenson *et al.*, Amplification and re-arrangements of c-erb protooncogenes in cancer of human female genital tract. *Oncogene* **4** (1989), pp. 985–989.
- [31] F.D. Kury, C. Schneeberger, G. Sliutz *et al.*, Determination of HER2/neu amplification and expression in tumour tissue and cultured cells using a single phenol free method for nucleic acid isolation. *Oncogene* **5** (1990), pp. 1403–1408.
- [32] J. Zheng, W.R. Robinson, T. Ehlen *et al.*, Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas as the basis of losses of heterozygosity in

chromosomes 3, 6 and 11 and HER2/neu gene amplification. *Cancer Res.* **51** (1991), pp. 4045–4051.

[33] Y. Fukushi, S. Sato, Y. Yokoyhama *et al.*, Detection of numerical aberration in chromosome 17 and c-erbB2 gene amplification in epithelial ovarian cancer using recently established dual color FISH. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **22** (2001), pp. 23–25.

[34] J.S. Ross, F. Yang, B.V.S. Kallakury *et al.*, HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *Am. J. Clin. Pathol.* **11** (1999), pp. 311–316.

[35] A. Seki, M. Yoshinouchi, N. Seki *et al.*, Detection of c-erbB-2 and FGF-3(INT-2) gene amplification in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* **17** (2000), pp. 103–106.

[36] H. Yang, G. Zhang, K. Xu *et al.*, C-erbB-2 gene amplification in human primary epithelial ovarian cancer and its clinical significance. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* **20** (1998), pp. 367ci–370ci.

[37] H. Meden and W. Kuhn, Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER-2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **71** (1997), pp. 173–179.

[38] I. Hellstrom, G. Goodman, J. Pullman *et al.*, Overexpression of HER-2 in ovarian carcinomas. *Cancer Res.* **61** (2001), pp. 2420–2423.

[39] J. Leng, J. Lang, K. Shen and L. Guo, Overexpression of p53, EGFR, c-erbB2 and c-erbB3 in endometrioid carcinoma of the ovary. *Chin. Med. Sci. J.* **12** (1997), pp. 67–70.

- [40] M.B. Anreder, S.M. Freeman, A. Merogi *et al.*, P53, c-erbB2, and PCNA status in benign, proliferative and malignant ovarian surface epithelial neoplasms: a study of 75 cases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **123** (1999), pp. 310–316.
- [41] R. Halperin, S. Zehavis, E. Hadas *et al.*, Immunohistochemical comparison of primary peritoneal and primary ovarian serous papillary carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **20** (2001), pp. 341–345.
- [42] I. Skirnisdottir, B. Sorbe and T. Seidal, The growth factor receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I–II) epithelial ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* **11** (2001), pp. 119–129.
- [43] G. Giaccone, A.F. Gazdar, H. Beck *et al.*, Multidrug sensitivity phenotype of human lung cancer cell associated with topoisomerase II expression. *Cancer Res.* **52** (1992), pp. 1666–1674.
- [44] H. Walter, W. Gotlieb, I. Goldberg *et al.*, Topoisomerase II immunostaining as a prognostic marker for survival in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **82** (2001), pp. 99–104.
- [45] M.J. Costa, C.L. Hansel, J.A. Holden and D. Guinee, Jr., Topoisomerase II alpha: prognostic predictor and cell cycle marker in surface epithelial neoplasms of the ovary and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **19** (2000), pp. 248–257.

Corresponding author. Institut Jules Bordet, Boulevard de Waterloo 125, 1000 ,  
Brussels, , Belgium. Fax: +3225413477.

Table 1. Patients' characteristics

<i>Histology</i>	%
Serous (n=53).....	72,6
Mucinous (n=4).....	5,5
Mixed (n=1).....	1,4
Endometrioid (n=6).....	8,2
Clear cell (n=3).....	4,1
Indiferenciado (n=6).....	8,2
Total (n=73) .....	100,0
 <i>FIGO stage</i>	
I (n=13) .....	17,8
II (n=1) .....	1,4
III (n=44) .....	60,3
IV (n=13) .....	17,8
Unknown (n=2) .....	2,7
Total (n=73) .....	100,0



Fig. 1. HER-2 gene amplification and protein overexpression (by FISH and IHC, respectively).

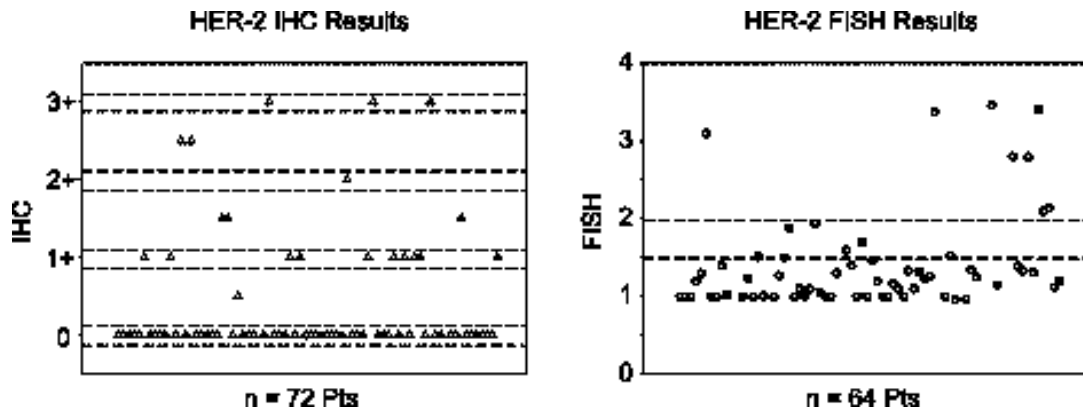


Fig. 2. HER-2 and T2a amplification by FISH (without correction for CEP17).

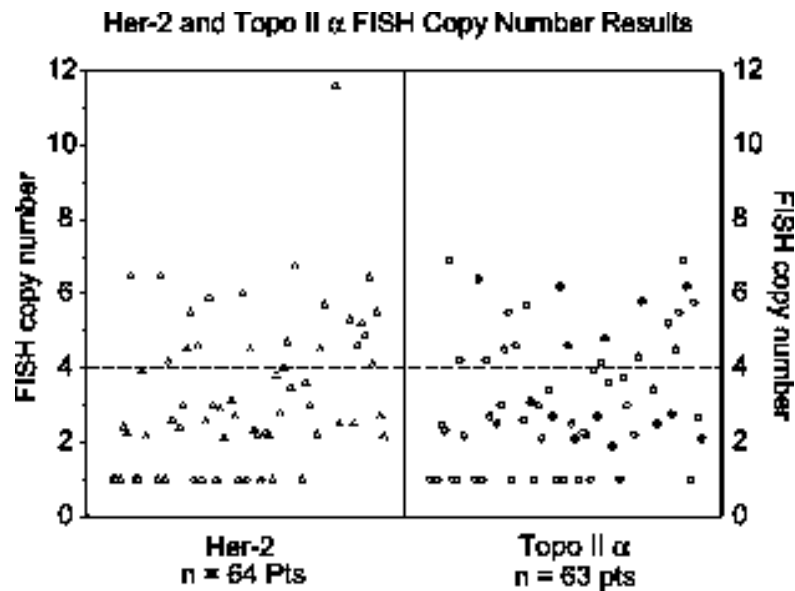


Fig. 3. No correlation between HER-2 amplification (FISH) and overexpression (IHC) (assessment as continuous variables); Spearman's COEFFICIENT = 0.14 (statistically not  $\neq 0$ ;  $P = 0.27$ ;  $n = 62$ ).

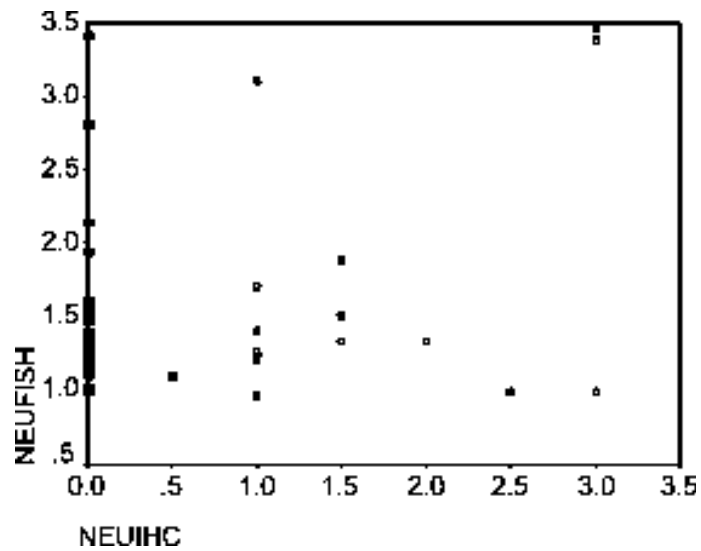


Fig. 4. HER-2 and T2a amplification by FISH (with correction for CEP17).

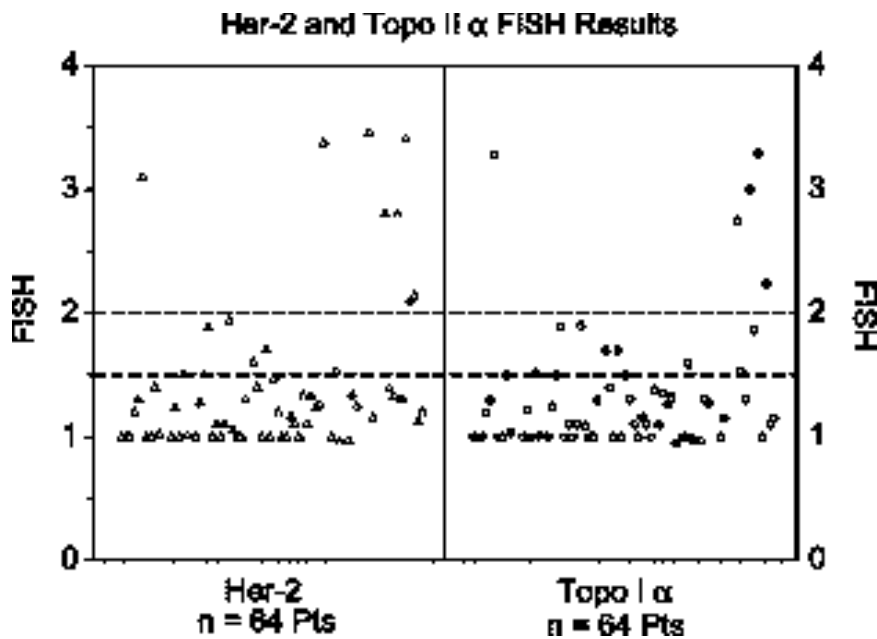


Fig. 5. Modest correlation between T2a amplification (FISH) and overexpression (IHC) (assessment as continuous variables). Spearman's COEFFICIENT = 0.31 (statistically  $\neq 0$ ;  $P = 0.01$ ;  $n = 63$ ).

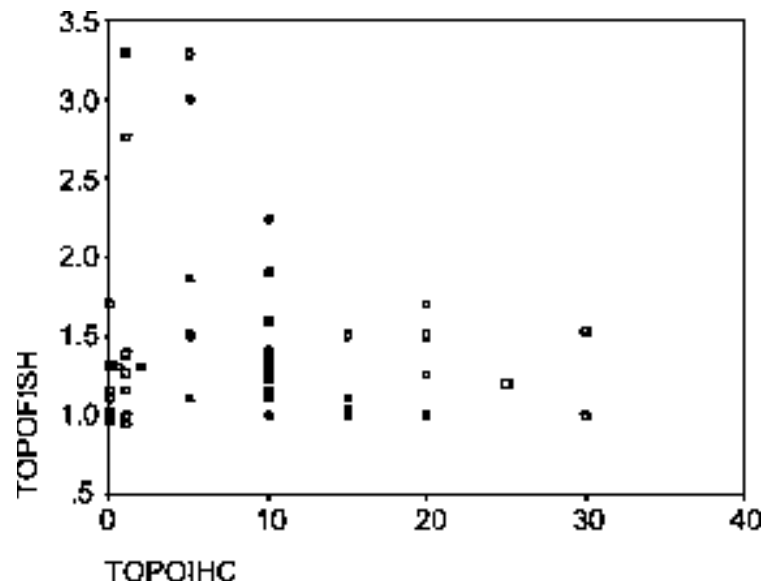


Fig. 6. Excellent correlation between HER-2 and T2a (by FISH), with (on the left) and without (on the right) correction for CEP17. Spearman's COEFFICIENT = 0.83 (statistically  $\neq 0$ ;  $P < 0.001$ ;  $n = 63$ ) and 0.93 (statistically  $\neq 0$ ;  $P < 0.001$ ;  $n = 62$ ), respectively.

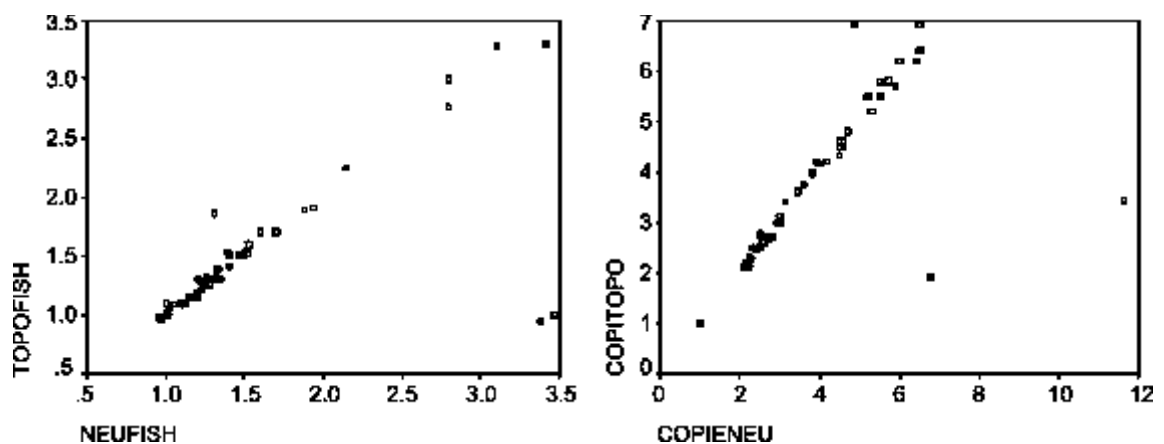
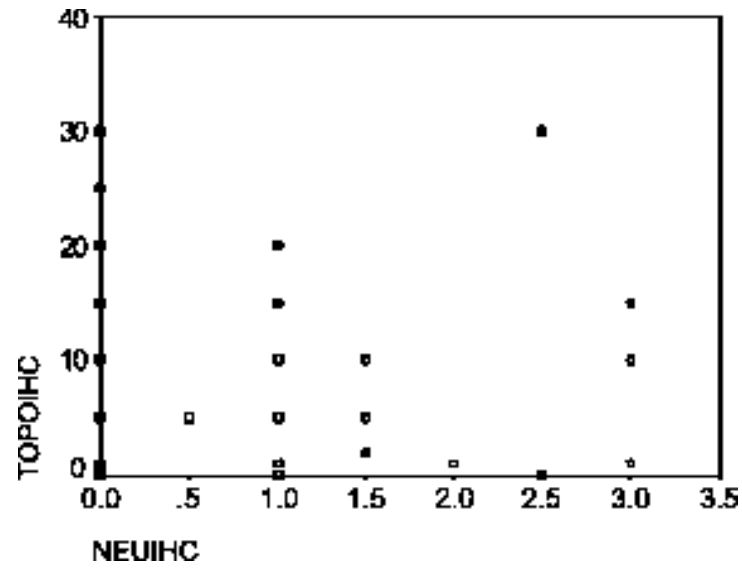


Fig. 7. No correlation between HER-2 and T2a overexpression (as assessed by IHC); Spearman's coefficient 0.09 (statistically not  $\neq 0$ ,  $P = 0.48$ ;  $n = 70$ ).



### **6.3 Artigo 3 em inglês**

Int J Oncol 2004 Nov;25(5): 1473-9

IF 2002: 2.536

**INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 25:1473-1479, 2004**

**CORRELATION BETWEEN TOPOISOMERASE-II $\alpha$  GENE AMPLIFICATION AND  
PROTEIN EXPRESSION IN HER-2 AMPLIFIED BREAST CANCER**

V. Durbecq<sup>1</sup>, C. Desmedt<sup>1</sup>, M. Paesmans<sup>3</sup>, F. Cardoso<sup>1</sup>, A. Di Leo<sup>1</sup>, M. Mano<sup>1</sup>, G.  
Rouas<sup>1</sup>, J.-Y. Leroy<sup>1</sup>, C. Sotiriou<sup>1</sup>, M. Piccart<sup>1</sup>, and D. Larsimont<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Translational Research Unit, Jules Bordet Institute, Brussels, Belgium

<sup>2</sup> Department of Pathology, Jules Bordet Institute, Brussels, Belgium

<sup>3</sup> Jules Bordet Institute Data Center, Brussels, Belgium

Received April 27, 2004; Accepted July 7, 2004

Correspondence to: Christine Desmedt

Department of Chemotherapy

Jules Bordet Institute

Boulevard de Waterloo, 125

1000 Brussels

Belgium

e-mail: [christine.desmedt@bordet.be](mailto:christine.desmedt@bordet.be)

## Abstract

Topoisomerase-II $\alpha$  (topo-II) is a molecular target for topo-II inhibitors, which makes it a potential predictive marker of responsiveness to these agents. We aim to correlate topo-II gene and protein status on 103 *HER-2* amplified breast cancer samples. Paraffin-embedded blocks were screened by FISH for *topo-II* gene amplification (*topo-II*: CEP17 ratio  $\geq 1.5$ ; triple probe by Vysis inc.) and analyzed by IHC for topo-II protein expression (continuous variable; clone KiS1) and Ki-67 (positive if  $> 25\%$  of stained cells; clone MIB-1). *Topo-II* gene amplification was observed in 36.9% (38/103) of the *HER-2* amplified study population. *HER-2* amplification level (e.g. copy number) was not shown to be predictive for *topo-II* amplification. The median percentage of topo-II positively stained cells by IHC for *topo-II* non-amplified and amplified cases were 5% and 10%, respectively. A weak but significant correlation was observed between *topo-II* gene amplification level and percentage of positively stained cells (Spearman's ranks correlation coefficient of 0.23,  $p=0.02$ ), the observed correlation being higher in patients with positive staining for Ki-67. Contrary to *HER-2*, where gene amplification is almost always correlated with protein overexpression in breast cancer, *topo-II* gene amplification apparently does not always lead to protein overexpression, at least when the latter is evaluated by IHC. Other factors, specifically the tumor proliferation status, may interfere with the topo-II protein status. Although the great majority of *topo-II* gene aberrations occur in *HER-2* positive tumors, the level of *HER-2* amplification does not predict for *topo-II* amplification.



**Key Words:** breast cancer, topoisomerase-II $\alpha$ , amplification, overexpression.

## Introduction

Breast cancer is a heterogeneous disease with high individual variability as far as response to treatment is concerned. The evaluation of the molecular target(s) of a specific drug in a tumor sample can be an important tool for selecting the optimal chemotherapy regimen for the individual patient. A better selection of patients can, in turn, lead to an increase of drugs' efficacy while avoiding side effects in patients who are not anticipated to have a treatment benefit.

Topoisomerase-II- $\alpha$  (topo-II) is a key enzyme in DNA metabolism, with an important role in DNA replication, cell cycle progression, recombination and chromosome segregation [1]. It is the target enzyme for anthracyclines, one of the most effective but also toxic anti-cancer drugs in the treatment of breast cancer.

In vitro studies have shown that *topo-II* gene amplification leads to overexpression of the topo-II protein and that sensitivity to topo-II inhibitors is dependent on the expression level of topo-II protein in target cancer cells [2-9]. However, the regulation of topo-II expression in solid tumors is still not completely understood and some preliminary data suggest that the correlation between *topo-II* gene amplification and protein overexpression evaluated by IHC is seen in only about 60% of cases [10,11].

To assess the correlation between gene amplification and protein overexpression in the present study, topo-II gene and protein status were evaluated

by fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC), respectively. Since *topo-II* gene aberrations are rarely found in *Her-2* (*Neu/c-erbB2*) negative tumors [2,12,13], a series of 103 *Her-2* amplified breast cancer samples was selected as the study samples. Topo-II protein is known to be a good marker of proliferation in both normal and neoplastic tissues and cells [14]. Therefore, its expression was also correlated with the expression of the proliferation marker Ki-67, analyzed by IHC.

## **Material and methods**

### **Patient selection**

Archival tumor samples of 103 patients with *Her-2* amplified breast carcinomas were collected at the Jules Bordet Institute and biological markers evaluated. *Her-2* and *topo-II* genes were analyzed by FISH, whereas topo-II protein and Ki-67 were analyzed by IHC.

### **Fluorescence in situ hybridization (FISH).**

FISH assays were done with the Vysis Multi-color *Topo-II* Spectrum orange, *Her-2* Spectrum green and CEP17 Spectrum aqua probe as previously described [15]. The probe was provided free of charge by Vysis, Chicago, IL, USA. Briefly, the sections were deparaffined and incubated in pre-treatment buffer at 80°C for 30 min. Enzymatic digestion was carried out with pepsin (10-20 min at 37°C) and the slides were dehydrated in graded dilutions of ethanol. The probe (10µl) was applied to the slides under coverslips. The slides were co-denatured on a hot plate (73°C for 5 min), followed by overnight hybridization at 37°C. After stringency washed (2XSSC/0.3% Nonidet P-40 at 73°C for 2 min), the slides were counterstained with 10µl of 0.2µM 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in antifade solution (Vectashield, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). FISH was evaluated using an Olympus BX51

epifluorescence microscope equipped as previously described [16]. The invasive part of the tumor was circled on the slides with a diamond by superposition with haematoxylin-stained sections previously analyzed by a pathologist (D.L.). Signals from at least 60 non-overlapping nuclei with intact morphology were evaluated to determine the mean number of signals/cell (ratio between mean number of *topo-II* or *Her-2* signals and the mean number of chromosome 17 centromere signals). Amplification of *Her-2* gene was defined as a relative copy number ratio  $\geq 2$  [16]. Amplification of *topo-II* gene was defined as a relative copy number ratio  $\geq 1.5$ , according to previously reported studies [12,17].

### **Immunohistochemistry (IHC)**

Topo-II protein expression was evaluated by IHC as described previously [18]. Briefly, the sections were dewaxed, rehydrated and incubated for 30 min in 0.5% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in methanol. After pre-treatment (0.1% trypsin in 0.1%  $CaCl_2$  pH 7.8 for 10 min at 37°C), non specific staining was blocked by incubating in 10% normal serum for 1h at 4°C and performing all steps in buffer PBS/0.1%BSA/1%Tween 20. After incubation with the primary antibody ( $1\mu g\ ml^{-1}$  overnight at 4°C, clone KiS1, Boehringer-Manheim), sections were incubated at room temperature with a secondary biotinylated anti-mouse antibody for 30 min and Streptavidin-HRP (Zymed) (1/20) for 10 min. 3'-3 diaminobenzidine was used as a chromogen. Sections were counterstained with Mayer's haematoxylin. Negative controls comprised serial sections incubated with buffer alone instead of primary

antibody. Tonsil samples were used as positive control. As no cut-off for positivity has been validated yet to define topo-II overexpression, we analysed this variable as a continuous one. Analyses were carried out in a blinded fashion (topo-II protein evaluation was unaware of the *topo-II* gene status and vice-versa).

Ki-67 evaluation was carried out routinely by IHC using the monoclonal mouse antibody MIB-1 (1/50, DAKO, Carpinteria, CA). In brief, the sections were dewaxed and rehydrated. Then a microwave (two times ten minutes at 650W) antigen retrieval method in citrate buffer pH6 was implemented before using the Ventana Nexes automated immunostainer with standard Nexes reagents (Ventana Medical Systems, Tucson, Az). An index > 25% corresponded to a proliferating tumor. This cut-off was calculated as the median of the percentage of cells with positive staining (each individual percentage based on the percentage of positive cells in each evaluated sample).

### **Statistical evaluation**

The available data consisted in the observations of four variables assimilated to continuous variables although the measurement is discrete but with many categories for the evaluations done by IHC. For three of these variables (*Her-2* and *topo-II* gene amplification, Ki-67 protein status), there exists a threshold in the literature for considering amplification or positivity. These variables were then treated using a continuous representation or a binary one according to the published thresholds. For

topo-II protein status, assessed by IHC, there is no standard cut-off for positivity. This variable was then only analyzed as a continuous one.

As the continuous observations could not be considered as sampled from a normal distribution (confirmed by Kolmogorov-Smirnov tests), we used then non-parametric methods to analyze the results. Spearman's ranks correlation coefficients were calculated to analyze two continuous variables, Mann-Whitney tests were used to compare the distributions of a continuous variable according to a binary one and Fisher exact tests allowed to test the association between two binary variables. All reported p values are two-tailed and the significance level was set to 5%.

## Results

### Characteristics of the *Her-2* amplified population

*Topo-II* FISH analyses were performed in 103 paraffin-embedded blocks of *Her-2* amplified breast carcinomas. The median gene/centromere-17 ratios were 6.7 [range: 2.04-14.6] for *Her-2* and 1.08 [range: 0.35- 9.1] for *topo-II* (table 1).

*Topo-II* and Ki-67 protein evaluation were carried out by IHC. Analyses were not contributive in 5 samples and 7 samples, respectively. The median percentage of positively stained cells was of 10% [range: 0-50] for *topo-II* and 15% [range: 0-69] for Ki-67. One third of the *Her-2* amplified breast carcinomas population was highly proliferative and presented >25% of cells with positive staining for Ki-67 (table 1).

### Correlation between *Her-2* and *topo-II* gene status

Thirty-eight (36.9%) *topo-II* amplified samples were identified by FISH in this *Her-2* amplified study population with a median amplification ratio of 3.7 [range 1.67-9.10] (table 1 and Fig. 1). The exact ratio was unknown for one sample, otherwise identified as an amplified one. The median *Her-2* amplification ratio was of 6.17 [range: 2.04-9.80] in the *topo-II* amplified subgroup and of 7.11 [range: 2.74-14.60] in the *topo-II* non-amplified subgroup (Table 1). *HER-2* amplification ratio (e.g. gene copy number) appears then lower in patients with co-amplification of *topo-II* gene. The observed differences are statistically significant (Mann-Whitney test,  $p=0.002$ ).



### **Correlation between Topo-II gene and protein status**

Topo-II IHC analyses were performed in *topo-II* amplified and non-amplified samples (Fig. 2). Analyses were not contributive for 1 (2.6%) of the 38 *topo-II* amplified samples and 4 (6.2%) of the 65 *topo-II* non-amplified samples. The median percentage of topo-II positively stained cells by IHC for evaluable *topo-II* amplified and non-amplified cases was 10% [range: 0-40] and 5% [range 0-50], respectively (table 1 and Fig. 2). The percentage of topo-II positively stained cells is statistically higher when *topo-II* gene is amplified (Mann-Whitney test,  $p=0.006$ ). When considering both the percentage of topo-II positively stained cells and the level of *topo-II* gene amplification (e.g. gene copy number) as continuous variables, topo-II protein content was significantly, although weakly, correlated to *topo-II* gene amplification ratio (Spearman's ranks correlation coefficient of 0.23,  $p=0.02$ ).

### **Correlation between Topo-II and Ki-67 status:**

As a measure of the cell proliferation index, which is known to influence the amount of topo-II protein, the proliferation marker Ki-67 was analyzed by IHC. As previously reported, 1 (2.6%) of the 38 *topo-II* amplified samples and 6 (9.2%) of the 65 *topo-II* non-amplified samples were not evaluable for Ki-67 by IHC (table 1).

Ten of the 38 (27%) *topo-II* amplified cases and 18 of the 65 (30.5%) *topo-II* non-amplified cases were positive for Ki-67. The median percentages of Ki-67 positively stained cells for the *topo-II* amplified and non-amplified cases were 20%

[range: 0-69] and 15% [range: 0-55] respectively (Table 1). Ki-67 expression level is not statistically different between the two populations ( $p=0.47$ ). Consistently, no significant correlation was observed between Ki-67 and *topo-II* gene amplification (correlation coefficient of  $-0.02$ ;  $p=0.88$ ).

The median percentage of topo-II positively stained cells was of 10% in both groups of Ki-67 positive and negative cases. There was no statistically significant difference in the distribution of the percentage of topo-II positively stained cells ( $p=0.14$ ). Nevertheless, when considering both marker's expression as continuous variables, a significant correlation was reached between topo-II protein expression and Ki-67 (correlation coefficient of  $0.34$ ,  $p=0.001$ ) (Fig. 3).

Considering Ki-67 positive cases, the *topo-II* amplified subgroup presents a significantly higher median percentage of topo-II positive cells than the *topo-II* non-amplified subgroup (25% versus 10% with a p-value of 0.005 for the Mann-Whitney test). This conclusion did not remain valid for Ki-67 negative cases with no detectable difference in the distributions of topo-II protein level according to *topo-II* gene amplification ( $p=0.30$ ) (Fig. 4).

## Discussion

Studies have shown that *topo-II* gene amplification mainly occurs with concurrent *Her-2* amplification [2,12], and that the predictive value of *Her-2* regarding anthracycline-based chemotherapy may be possibly explained by the concomitant amplification of the *topo-II* gene [10,11,19]. Despite the close link between the *Her-2* and *topo-II* genes (closely located on the long arm of chromosome 17), the level of *Her-2* gene amplification (e.g. gene copy number) was not shown to be predictive of *topo-II* amplification in this study. Moreover, the *HER-2* amplification ratio appears lower in patients with co-amplification of the *topo-II* gene. This has already been reported by Smith *et al.* [3] and may be related to the fact that early amplification events involve large areas of a chromosome, and later events result in deletion of large domains between genes, providing selective advantage. Thus, the most highly amplified cases may have undergone many more events, eliminating 'passenger' genes, and the less amplified cases may then be more likely to show co-amplification [20,21].

Unlike the *Her-2* gene, where amplification is almost always associated with overexpression of the protein in breast cancer (almost 100%) [22], *topo-II* gene amplification apparently does not always lead to overexpression of the protein, at least when the latter is evaluated by IHC. In the present study, the percentage of *topo-II* positively stained cells was weakly correlated with the amplification level of the *topo-II* gene. Some discordance between *topo-II* amplification and overexpression

has recently been reported in another study, where four of the six samples with *topo-II* gene amplification did not show protein overexpression [10]. In ovarian carcinoma, a weak correlation was observed between *topo-II* gene amplification and protein expression [23,24]. Additionally, in ovarian cancer many cases of *Her-2* gene amplification do not result in protein expression contrary to what is seen in breast cancer [24,25]. MYC is another example for which no significant link was observed between gene amplification and over 'transcription' as assessed by RT-PCR in breast cancer [26]. MYC over 'transcription' is not generally due to an increased MYC gene copy number but, as we observed for *topo-II*, seems to be linked to Ki-67 activity [27]. The key message to retain is the fact that the correlation between gene amplification and protein overexpression is greatly variable among different biological markers and, even for the same marker among different tissue localization.

In breast cancer, where HER-2 protein levels seem to depend almost exclusively on the corresponding gene status [28], *topo-II* protein expression is regulated at multiple stages (transcription, post-transcription, post-translation) by several signaling factors. Transcriptional regulation has been demonstrated under several circumstances, including heat shock syndrome [29], physiological stress conditions such as glucose starvation and hypoxia [30], expression of some oncogenes including *ras* [31], *myb* [32] and *p53* [32,33], and cellular confluence [34]. Sequences within the *topo-II* promoter influencing confluence-induced down-regulation have been identified [35]. The impact of cell proliferation rate on transcription seems indeed to be important, as a detectable difference in the distributions of *topo-II* protein level according to *topo-II* gene amplification was

observed in our study, only in the high proliferative subgroup (defined as Ki-67 >25%). Nevertheless the proliferation index is unlikely to be the only determinant factor since highly positively stained samples for topo-II (up to 40% in *topo-II* amplified and non amplified cases) were observed in Ki-67 negatives tumors, which stresses the notion that topo-II protein expression regulation is quite complex.

One of the most interesting potential down regulatory transcription factors for the *topo-II* promoter is the p53 protein. A major function of this tumor suppressor protein is to induce cell cycle arrest at the G1 and /or G2 checkpoints in response to DNA damage [36,37]. p53 is also an initiator of the apoptotic cell death pathway [38]. Overproduction of topo-II in proliferating cells can result in inappropriate DNA recombination. In p53 normal cells, this molecule will lead to cell cycle arrest and may induce cell death via initiation of the apoptotic pathway. Furthermore, p53 can also lead to down-regulation of topo-II protein expression by directly repressing the promoter [33]. Transcription from the *topo-II* promoter was shown to be decreased (15-fold) by wild-type p53 in a concentration-dependent manner [39]. The loss or inactivation of wild type p53 may reduce normal regulatory suppression of topo-II and contribute to abortive cell cycle checkpoints, accelerated cell proliferation, and alterations in genomic stability (chromosomal rearrangement and /or gene amplification) [39].

Additionally, topo-II protein exists in cells in a phosphorylated form and *in vitro* studies have demonstrated a correlation between phosphorylation and topo-II

catalytic activity [40,41]. This post-translational regulation may further complicate the assessment of topo-II expression.

Finally, a potential and possibly important factor that could explain the sub-optimal correlation between gene amplification and protein expression is linked to the technical limitations of IHC. This problem has been recognized in previous studies comparing FISH with IHC for HER-2 and has been attributed to protein degradation in the paraffin-embedded material [42]. On the other hand, FISH defined as the ratio between mean number of *topo-II* and CEP17 copy may miss some cases with high number of *topo-II* gene copy due to chromosome 17 polysomy. These cases were defined as non-amplified whereas they present a high number of *topo-II* gene copy potentially responsible for topo-II protein overexpression.

Preclinical studies have shown that *topo-II* gene amplification leads to overexpression of the topo-II protein, which in turn renders the cells more sensitive to topo-II inhibitors [2-9]. Our results suggest that, in breast tumors, the process is more complex and that it might involve other cellular pathways including apoptosis and proliferation.

Four distinct patterns with regard to topo-II were identified: a) topo-II gene amplified/ protein overexpressed; b) topo-II gene non-amplified/ protein downregulated; c) topo-II gene amplified/ protein downregulated; d) topo-II gene non-amplified/ protein overexpressed. While pre-clinical and early clinical data suggest that the first two patterns might be useful to predict the response to anthracyclines,

the correlation between anthracyclines efficacy and the last two topo-II patterns is still largely unexplored.

Biologically, the topo-II protein status is crucial since it is the protein that is the target of anthracyclines, a fact that strength its potential value as predictive marker, if accurately evaluated. However since it largely mirrors tumor proliferation status it may lack specificity and act only as a “general predictive marker” for response to chemotherapy. Conversely, *topo-II* gene status has the potential to be a more specific marker, concerning anthracyclines, since it is not influenced by other factors. This could imply that the FISH assay may be technically more robust for evaluating the topo-II status of tumors. Nevertheless, the predictive value of topo-II amplification when it does not translate into protein remains to be determined. It seems reasonable to hypothesize that both topo-II gene and protein might be useful tools to define the tumor profile with regard to sensitivity to anthracyclines. Topo-II protein status might be particularly interesting in *topo-II* non-amplified tumors (i.e. almost 95% of breast cancer cases). Indeed, in such a large cohort it seems reasonable to hypothesize that topo-II protein evaluation might lead to the identification of those cases still sensitive to anthracyclines, even in absence of gene amplification.

Two large clinical studies coordinated by our Institute and addressing the value of topo-II gene and protein status in predicting the efficacy of anthracyclines in breast cancer patients, are ongoing. The first of the two clinical studies is a meta-analysis of four trials, with a total of 4600 patients, which compared CMF to an anthracycline-based therapy in the adjuvant treatment of breast cancer patients; a meta-analysis of

the clinical data from the four trials and the collection, centralization of all tumors samples and reassessment of *Her-2* gene status are ongoing. Topo-II gene and protein status will be determined for all *Her-2* positive and some *Her-2* negative patients participating in these trials. The second study, known as the TOP trial (i.e. trial of principle) attempts to prospectively evaluate the predictive value of topo-II gene and protein in approximately four hundred patients with operable breast cancer. These patients receive four cycles of single-agent epirubicin as neo-adjuvant chemotherapy followed by breast cancer surgery. The study hypothesis is that the pathological complete remission rate after the four cycles of neoadjuvant epirubicin will be closely related to the topo-II gene and protein status (pCR= 35-40% versus 10%). Moreover, this study will attempt to clarify the complex interaction existing between topo-II and p53, since *p53* gene status will also be evaluated and correlated with the topo-II status and response to anthracyclines.

In summary, the present study raises the following hypotheses: a) topo-II protein evaluated by IHC is not necessarily overexpressed in the presence of gene amplification; b) other factors, specifically the tumor proliferation status, may interfere with the topo-II protein status; c) although the great majority of *topo-II* gene aberrations occurs in *Her-2* positive tumors, the level (e.g. copy number) of *Her-2* gene amplification is not predictive for *topo-II* gene amplification. Two ongoing projects will hopefully help to better define the role of both HER-2 (the meta-analyses) and topo-II (both studies) as predictive markers of response to anthracyclines.



**Acknowledgements:** The authors wish to thank “Les Amis de l’Institut Jules Bordet” for the support provided to the study.

## References

- [1] Sperry AO, Blasquez VC, Garrard WT: Dysfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association regions and topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5497-5501, 1989
- [2] Jarvinen TAH, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J: Amplification and deletion of topoisomerase II $\alpha$  associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 156: 839-847, 2000
- [3] Smith K, Houlbrook S, Greenall M, Carmichael J, Harris AL: Topoisomerase II $\alpha$  co-amplification with erbB2 in human primary breast cancer and breast cancer cell lines: relationship to m-AMSA and mitoxantrone sensitivity. *Oncogene* 8: 933-938, 1993
- [4] Harris LN, Yang L, Liotcheva V, Pauli S, Iglehart JD, Colvin OM, Hsieh TS: Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7: 1497-1504, 2001
- [5] Vassetzky YS, Alghisi GCR, Roberts E, Gasser SM: Ectopic expression of inactive forms of yeast DNA topoisomerase II confers resistance to the anti-tumor drug-etoposide. *Br J Cancer* 73: 1201-1209, 1996
- [6] Asano T, An T, Zwelling LA, Takano H, Fojo AT, Kleinerman ES: Transfection of a human topoisomerase II alpha gene into etoposide-resistant human breast tumor cells sensitizes the cells to etoposide. *Oncol Res* 8: 101-110, 1996

- [7] Withoff S, de Vries EG, Keith WN, Nienhuis EF, van der Graaf WT, Uges DR, Mulder NH: Differential expression of DNA topoisomerase II $\alpha$  and  $\beta$  in P-gn and MRP-negative VM26, mAMSA and mitoxantrone-resistant sublines of the human SCLC cell line GLC. *Br J Cancer* 74: 1869-1876, 1996
- [8] Withoff S, Keith WN, Knol AJ, Coutts JC, Hoare SF, Mulder NH, de Vries EG: Selection of a subpopulation with fewer DNA topoisomerase II $\alpha$  gene copies in a doxorubicin-resistant cell line panel. *Br J Cancer* 74: 502-507, 1996
- [9] Mo YY, Ameiss KA, Beck WT: Overexpression of human DNA topoisomerase II $\alpha$  by fusion to enhanced green fluorescent protein. *Biotechniques* 25: 1052-1057, 1998
- [10] Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta V, Fronda G, Preisler HD: Amplification and overexpression of topoisomerase II $\alpha$  predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 8: 1061-1067, 2002
- [11] Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, Paesmans M, Leroy JY, Rouas G, Sotiriou C, Renard N, Richard V, Piccart MJ, Di Leo A: Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II- $\alpha$  gene amplification and protein overexpression in locally advanced /metastatic breast cancer. *Int J Oncol* 24: 201-209, 2004
- [12] Jarvinen TA, Tanner M, Barlund M, Borg A, Isola J: Characterization of topoisomerase II $\alpha$  gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 142-150, 1999

- [13] Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, Balslev E, Knoop A, Ejlersen B, Nielsen KV, Schonau A, Overgaard J; Danish Breast Cancer Cooperative Group: Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol* 43: 35-42, 2004
- [14] Lynch BJ, Guinee DG, Holden JA: Human DNA topoisomerase II- $\alpha$ : a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 28: 1180-1188, 1997
- [15] Durbecq V, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Leroy JY, Piccart M, Larsimont D: Comparison of Topoisomerase-II $\alpha$  gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Breast Cancer Res Treat* 2477: 199-204, 2003
- [16] Gancberg D, Di leo A, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M, Verhest A, Bernard-Marty C, Piccart MJ, Larsimont D: Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 13: 1036-1043, 2002
- [17] Tanner M, Järvinen P, Isola J: Amplification of HER-2/neu and topoisomerase II $\alpha$  in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 61: 5345-5348, 2001
- [18] Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Jarvinen T, Beauduin M, Vindevoghel A, Michel J, Focan CH, Ries F, Gobert PH, Closon-Dejardin MT, Dolci S, Rouas G, Paesmans M, Lobelle JP, Isola J, Piccart MJ: HER-2 and topoisomerase II $\alpha$  as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol* 12: 1081-1089, 2001

- [19] Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, Tanner M, Jarvinen T, Rouas G, Dolci S, Leroy JY, Paesmans M, Isola J, Piccart MJ: HER-2 amplification and topoisomerase II $\alpha$  gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 8: 1107-16, 2002
- [20] Smith KA, Gorman PA, Stark MB, Groves RP, Stark GR: Distinctive chromosomal structures are formed very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Cell* 63: 1219-1227, 1990
- [21] Windle B, Draper BW, Yin Y, O’Gorman S, Wahl GM: A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplicon integration. *Genes Dev* 5: 160-174, 1991
- [22] Farabegoli F, Ceccarelli C, Santini D, Baldini N, Taffurelli M, Marrano D, Trere D, Derenzini M: c-erbB-2 over-expression in amplified and non-amplified breast carcinoma samples. *Int J Cancer* 84: 273-277, 1999
- [23] Van der Zee AG, de Vries EG, Hollema H, Kaye SB, Brown R, Keith WN: Molecular analysis of the topoisomerase II alpha gene and its expression in human ovarian cancer. *Ann Oncol* 5: 75-81, 1994
- [24] Mano M, Awada A, Di Leo A, Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F, Larsimont D, Piccart M: Rates of topoisomerase II- $\alpha$  and Her-2 genes amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 92: 887-895, 2004

- [25] Fajac A, Bernard J, Lhomme C, Rey A, Duvillard P, Rochard F, Bernaudin JF, Riou G: *c-erb2* gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis. *Int J Cancer* 64: 146-51, 1995
- [26] Bièche I, Laurendeau I, Tozlu S, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M: Quantification of Myc gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription PCR assay. *Cancer Res* 59: 2759-2765, 1999
- [27] Pavelic ZP, Pavelic L, Lower EE, Gapany M, Gapany S, Barker EA, Preisler HD: *c-myc*, *c-erbB2* and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and non invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 52: 2597-2602, 1992
- [28] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancers. *Science* 244: 707-12, 1989
- [29] Furukawa M, Uchiumi T, Nomoto M, Takano H, Morimoto RI, Naito S, Kuwano M, Kohno K: The role of an inverted CCAAT element in transcriptional activation of the human DNA topoisomerase II alpha gene by heat shock. *J Biol Chem* 273: 10550-10555, 1998
- [30] Tomida A, Tsuruo T: Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors. *Anticancer Drug Des* 14: 169-177, 1999
- [31] Chen G, Templeton D, Suttle DP, Stacey DW: Ras stimulates DNA topoisomerase II alpha through MEK: A link between oncogenic signaling and a therapeutic target. *Oncogene* 18: 149-160, 1999

- [32] Brandt TL, Fraser DJ, Leal S, Halandras PM, Kroll AR, Kroll DJ: C-Myb trans-activates the human DNA topoisomerase II $\alpha$  gene promoter. *J Biol Chem* 272: 6278-6284, 1997
- [33] Sandri MI, Isaacs RJ, Ongkeko WM, Harris AL, Hickson ID, Brogginini M, Vikhanskaya F: p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase II $\alpha$  gene. *Nucleic Acids Res* 24: 4464-4470, 1996
- [34] Isaacs RJ, Harris AL, Hickson ID: Regulation of the human topoisomerase II $\alpha$  gene promoter in confluence-arrested cells. *J Biol Chem* 271: 16741-16747, 1996
- [35] Tolner B, Hartley JA, Hochhauser D: Transcriptional regulation of topoisomerase II $\alpha$  at confluence and pharmacological modulation of expression by bis-benzimidazole drugs. *Mol Pharmacol* 59: 699-706, 2001
- [36] Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311, 1991
- [37] Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71: 587-597, 1992
- [38] Lu X, Lane DP: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 75: 765-778, 1993
- [39] Wang Q, Zambetti GP, Suttle DP: Inhibition of DNA Topoisomerase II $\alpha$  gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17: 389-397, 1997

- [40] Heck MMS, Hittleman WN, Earnshaw WC: In vivo phosphorylation of the 170kDa form of eukaryotic DNA topoisomerase II. J Biol Chem 264: 15161-15164, 1989
- [41] Wells NJ, Fry AM, Guano F, Norbury C, Hickson ID: Cell cycle phase-specific phosphorylation of human topoisomerase II alpha. Evidence of a role for protein kinase C. J Biol Chem 270: 28357-28363, 1995
- [42] Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ: 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

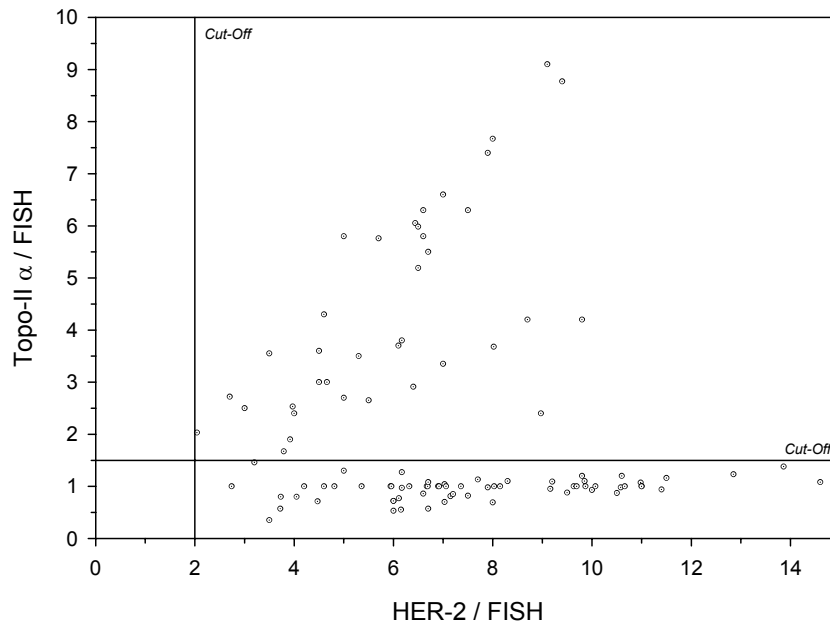


**Table 1:** Biological markers evaluation

	<b>Topo-II Ampl.</b> (Ratio $\geq 1.5$ )	<b>Topo-II Non-Ampl.</b> (Ratio $< 1.5$ )	<b>Total Population</b>
	38 Pts. (36.9 %)	65 Pts. (63.1 %)	103 (100.0 %)
<b>Her-2 FISH</b>			
Median Ratio [Range]	37 Pts. (97.4 %) 6.17 [2.04 – 9.80]	64 Pts. (98.5 %) 7.11 [2.74 – 14.60]	101 Pts. (98.1 %) 6.70 [2.04 – 14.60]
Mean Ratio	5.98	7.69	7.06
Ratio UK	1 Pt. (2.6 %)	1 Pt. (1.5 %)	2 Pts. (1.9 %)
<b>Topo-II IHC</b>			
Median % [Range]	37 Pts. (97.4 %) 10 [0 – 40]	61 Pts. (93.8 %) 5 [0 – 50]	98 Pts. (95.1 %) 10 [0 – 50]
Mean %	15.16	9.67	11.74
No. % UK	1 Pt. (2.6 %)	4 Pts. (6.2 %)	5 Pts. (4.9 %)
<b>Topo-II FISH</b>			
Median Ratio [Range]	37 Pts. (97.4 %) 3.70 [1.67 – 9.10]	65 Pts. (100.0 %) 1.00 [0.35 – 1.46]	102 Pts. (99.0 %) 1.08 [0.35 – 9.10]
Mean Ratio	4.39	0.96	2.20
No. Ratio UK	1 Pt. (2.6 %)	0 Pt. (0.0 %)	1 Pt. (1.0 %)
<b>KI 67</b>			
Median % [Range]	37 Pts. (97.4) 20.0 [0 – 69]	59 Pts. (90.8 %) 15.0 [0 – 55]	96 Pts. (93.2 %) 15.0 [0 – 69]
Mean %	20.59	17.95	18.97
$\leq 25$ %	27 Pts. (73.0 %)	41 Pts. (69.5 %)	68 Pts. (70.8 %)
Median % [Range]	10.0 [0 – 25]	10.0 [0 – 25]	10.0 [0 – 25]
Mean %	12.04	9.71	10.63
$> 25$ %	10 Pts. (27.0 %)	18 Pts. (30.5 %)	28 Pts. (29.2 %)
Median % [Range]	42.5 [30 – 69]	30.0 [26 – 55]	40.0 [26 – 69]
Mean %	43.70	36.72	39.21
No. % UK	1 Pt. (2.6 %)	6 Pts. (9.2 %)	7 Pts. (6.8 %)

Figure 1.

Correlation between HER-2 and Topo-II  $\alpha$  genes amplification



**Note:** certain points can correspond to several patients, those presenting identical results (or approximative) for the presented markers.

Figure 2.

Correlation between levels of Topo-II  $\alpha$  gene amplification and protein overexpression

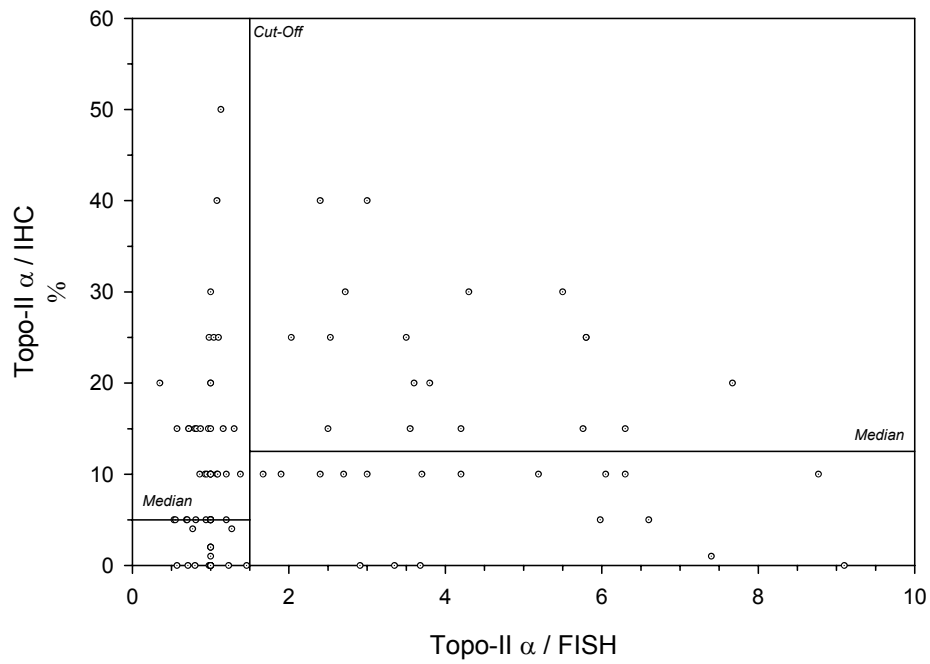
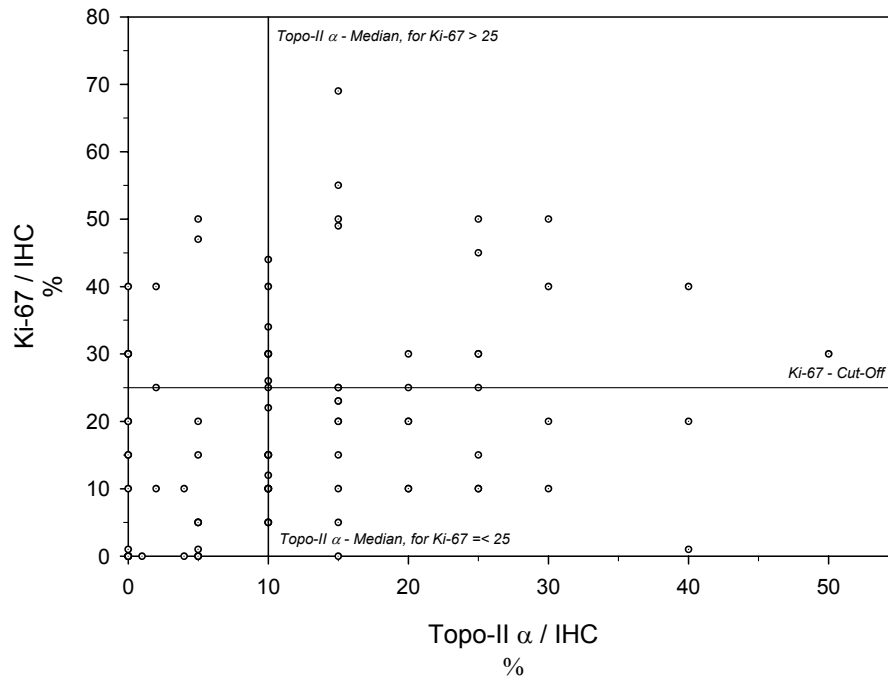


Figure 3.

Correlation between Topo-II  $\alpha$  and Ki-67 proteins expression



**Note:** certain points can correspond to several patients, those presenting identical results (or approximative) for the presented markers



## **7.1 Artigo 1 em português**

***Amplicon 17q12-q21: Her-2, topoisomerase-II $\alpha$  e a importância destes dois marcadores na biologia de tumores sólidos***

***Amplicon 17q12-q21: Her-2 e topoisomerase-II $\alpha$***

Max S. Mano<sup>1,2</sup>, Daniela D. Rosa<sup>1</sup>, Evandro De Azambuja<sup>1,2</sup>, Gustavo F.V. Ismael<sup>1</sup>,  
Virginie Durbecq<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Unidade de Oncologia Médica, Instituto Jules Bordet

<sup>2</sup> Aluno do PPG em Medicina : Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> Unidade de Pesquisa Translacional, Instituto Jules Bordet

Correspondência :

Dr Max S. Mano

Medical Oncology Unit, Jules Bordet Institut

Bd de Waterloo, 125

1000 Brussels, Belgium

Tel : 0032(0)2 541 3111

Fax : 0032(0)2 541 3090

Email: [max.mano@gmail.com](mailto:max.mano@gmail.com)

***Amplicon 17q12-q21: Her-2, topoisomerase-II $\alpha$  e a importância destes dois marcadores na biologia de tumores sólidos***

***Amplicon 17q12-q21: Her-2 e topoisomerase-II $\alpha$***



## Resumo

A amplificação dos genes Her-2 e topoisomerase-II $\alpha$  (T2A) são eventos independentes, embora o último seja mais frequentemente visto em tumores com amplificação do Her-2 (34-90%) do que em tumores sem amplificação do Her-2 (5-10%). Existe uma melhor correlação entre amplificação e expressão do Her-2 no câncer de mama (CM) do que em outros tipos de tumores. O Her-2 é também considerado um importante marcador prognóstico no CM, e dados similares têm sido relatados em outros tumores sólidos, como de bexiga, ovário, endométrio, estômago, esôfago e pulmão não de pequenas células (NSCLC). A amplificação e/ou superexpressão do Her-2 são preditivas de resposta a certos compostos anti HER-2, como o trastuzumab e o lapatinib, mas os dados têm sido inconsistentes no que diz respeito à predição de resposta a agentes citotóxicos. Estudos têm sugerido que tumores Her-2 positivos sejam relativamente resistentes ao tratamento com anti-estrogênios (tamoxifeno), mas não à deprivação estrogênica (por exemplo, com um inibidor da aromatase). Aberrações da T2A são eventos infrequentes em tumores sólidos, com uma prevalência de aproximadamente 10%. A amplificação do gene T2A tem mostrado uma relação inconsistente com a expressão da proteína em estudos clínicos e pré-clínicos, principalmente porque eventos não-genéticos, como índice de proliferação, também podem influenciar a expressão da proteína. A expressão da proteína T2A não parece ser um fator preditivo confiável de resposta aos inibidores da T2A, apesar do fato de que a enzima é o alvo molecular destes compostos. No CM, a amplificação da T2A parece ser preditiva de resposta às

antraciclina, mas estes dados ainda estão em processo de validação. O significado biológico da deleção da T2A ainda não é bem conhecido, mas, contrariamente ao que se pensava, tais eventos podem também ser preditivos de resposta aos inibidores da T2A. Existem, atualmente, poucos dados sobre o valor prognóstico das aberrações da T2A.

**Palavras-chave:** topoisomerase-II $\alpha$ , Her-2, amplificação, superexpressão, tumores sólidos

## Introdução

A cirurgia tem sido considerada o único tratamento potencialmente curativo para a maioria dos pacientes com tumores sólidos, diagnosticados em estágio precoce. No entanto, a quimioterapia tem sido cada vez mais utilizada, como tratamento complementar à cirurgia. Nos estágios iniciais, o benefício obtido com a adição da quimioterapia tende a ser modesto, embora efeitos tóxicos e custo sejam, por vezes, significativos. Para pacientes com doença mais avançada, a quimioterapia é considerada o pilar do tratamento, mas o benefício potencial precisa ser avaliado em função do risco de efeitos adversos, custo e questões ligadas à qualidade de vida.

Uma das explicações mais plausíveis para o impacto não mais que modesto da quimioterapia pode ser a ausência de alvos moleculares relevantes. O resultado disto seria um benefício robusto para uma minoria, mas nenhum benefício significativo para um grande número de pacientes, resultando numa certa 'diluição' do efeito global do tratamento. Sendo relativamente pouco específicos, os agentes citotóxicos podem afetar não somente as células tumorais, mas também células e tecidos normais, resultando em efeitos tóxicos indesejáveis. Este quadro poderia ser melhorado pela identificação de alvos moleculares relevantes para as drogas anti-neoplásicas, o que ajudaria a identificar pacientes com maior probabilidade de beneficiar-se de um certo tratamento. Existem alguns exemplos, na oncologia, nos quais esta abordagem se mostrou eficaz: 1) o tratamento hormonal do câncer de mama (CM), eficaz somente em pacientes nos quais os tumores expressam receptores hormonais [1]; 2) novas terapias biológicas, como o tratuzumab [2,3] e o

lapatinib [4], especificamente para pacientes com CM Her-2 positivo; 3) o rituximab, para pacientes com linfoma não-Hodgkin CD-20+ [5]; 4) o imatinib, especificamente para pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) cromossomo *Philadelphia*-positivo [6], e para pacientes com tumores estromais gastro-intestinais (GIST) contendo uma mutação do KIT ou PDGFRA [7]; 5) os inibidores da tirosino-quinase, direcionados para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) – como o erlotinib e gefitinib – que têm mostrado uma maior atividade em subgrupos de pacientes com cancer de pulmão não de pequenas células (NSCLC), apresentando seja uma mutação, amplificação ou superexpressão do EGFR, e uma ausência de mutação do K-RAS [8-11]. Embora a maioria dos novos agentes biológicos não venha sendo associada a efeitos adversos importantes, o custo destas drogas pode restringir a sua aplicação clínica, de forma que a identificação de alvos terapêuticos relevantes se tornou uma etapa crucial no desenvolvimento clínico destes agentes.

Existe também um grande interesse na investigação de marcadores preditivos de resposta à quimioterapia, um tratamento potencialmente mais tóxico em comparação às terapias hormonais e biológicas. Os resultados mais promissores têm sido vistos com a técnica de avaliação do padrão de expressão de genes, através da qual ‘cartas genéticas’ preditivas de resposta ao docetaxel [12], paclitaxel [13], doxorubicina [14] e gemcitabina/epirubicina/docetaxel [15] têm sido descritas. No entanto, este método é relativamente complexo (em geral, necessitando estocagem de material biológico congelado) e oneroso, o que pode dificultar a sua utilização na prática clínica diária, principalmente fora de centros de referência [16].

Além disso, a maioria destas 'cartas genéticas' está ainda em processo de validação, em estudos prospectivos.

Outros alvos terapêuticos potencialmente mais simples e menos onerosos, que têm sido largamente investigados como marcadores preditivos potenciais de resposta às antraciclinas, são os genes Her-2 e topoisomerase-II $\alpha$  (T2A) e as respectivas proteínas, sintetizadas por estes genes. Embora, atualmente, o Her-2 seja universalmente aceito como um fator prognóstico no CM e, possivelmente, também em outros tumores sólidos, o seu papel como fator preditivo de resposta à quimioterapia citotóxica não está bem estabelecido. A explicação para isto pode vir de um melhor entendimento da biologia do *amplicon* Her-2, que é sede de uma série de genes importantes como o da T2A, frequentemente co-amplificado ou deletado em tumores Her-2 amplificados, e que pode ser o verdadeiro marcador preditivo de resposta às antraciclinas. Neste artigo, nós revisamos as evidências levando às conclusões acima, e discutimos em mais detalhe a função complexa e o potencial oncogênico destes dois genes, particularmente importantes na biologia de vários tumores sólidos.

### **Amplificação e superexpressão do Her-2**

O gene Her-2 está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q12-q21). O teste mais popular para análise da amplificação do Her-2 é a hibridização *in situ* fluorescente [FISH] [17]. No entanto, outras técnicas podem ser também empregadas, como a hibridização *in situ* cromogênica [CISH] e a reação em cadeia

por polimerase [PCR] que, em alguns estudos, se mostraram mais custo-efetivas e menos laboriosas [18-20]. Na prática diária, a abordagem mais comum tem sido a de rastrear pacientes para superexpressão da proteína por IHC e confirmar a amplificação do gene somente para casos com escores de 2+ [21,22,23]. Entretanto, a identificação da proteína (geralmente por IHC) pode estar sujeita a uma certa variabilidade. O risco de erro é minimizado quando os testes são feitos por laboratórios com ampla experiência na realização da técnica da IHC [24]. Embora o FISH seja considerado de mais fácil reprodutibilidade do que a IHC, a subjetividade do ponto de corte (número relativo de cópias  $\geq 2$ ), descrita no estudo pioneiro analisando a técnica de FISH neste contexto [25], é um fato que deve ser levado em conta.

O potencial oncogênico das células pode incluir mutações pontuais, truncamento de proteínas, e amplificação de proto-oncogenes não-mutados. No CM, o principal mecanismo parece ser a amplificação de genes [26]. A amplificação do Her-2 causa um aumento significativo no risco de formação de heterodímeros com outros membros da família EGFR, na superfície celular. A formação de heterodímeros parece ser, ao menos em parte, responsável pela ativação desta via de sinalização celular [26]. No entanto, a amplificação do Her-2 também aumenta a formação de homodímeros do Her-2, presumidamente oncogênicos e que, segundo alguns estudos, poderiam mesmo representar o principal mecanismo oncogênico [27,28]. Amplificação do Her-2 pode ser encontrada em aproximadamente 15-30% dos casos de CM e, na maioria dos estudos, tem sido associada a características histológicas desfavoráveis e comportamento clínico agressivo [17,18,29-37], embora

estes achados não tenham sido confirmados por outros autores [22]. Dados similares têm sido descritos em outros tipos de tumores, como o câncer de endométrio, no qual a amplificação e/ou superexpressão do Her-2 parece se correlacionar com o grau histológico e o estágio da doença [38].

No CM, vários estudos têm demonstrado uma excelente correlação entre amplificação do gene Her-2 e superexpressão da sua proteína [39]. Ambos os métodos são capazes de identificar pacientes com maior probabilidade de beneficiar-se de um tratamento com o anticorpo monoclonal anti Her-2 trastuzumab [40]. É importante destacar-se que estudos clínicos demonstraram uma equivalência entre os quatro métodos mais comumente empregados – FISH, CISH e PCR (para amplificação do gene) e IHC (para superexpressão da proteína) – na predição de resposta a um tratamento com antraciclinas [18,41,42] ou trastuzumab [43], em pacientes com CM. Em outros tumores sólidos, a correlação entre amplificação do gene e expressão da proteína tem sido menos clara. O nosso grupo, assim como outros autores, encontrou uma fraca correlação no carcinoma de ovário [44-47], e dados similares foram relatados em outros tumores, como de endométrio [38]. Apesar disto, uma boa correlação tem sido ocasionalmente descrita em carcinomas de estômago [48] e esôfago [49], por exemplo. Além disto, verdadeiros casos de superexpressão do HER-2 (3+, Herceptest®) foram infreqüentes em tumores de ovário [44,50,51], embora escores mais baixos (1+ ou 2+) sejam mais comumente descritos. Dados similares foram relatados em NSCLC, com pouquíssimos casos de verdadeira amplificação ou superexpressão do Her-2 descritos e sem nenhum padrão óbvio de correlação entre amplificação do gene e expressão da proteína [52-

**55]**. Em outras palavras, a amplificação do Her-2, como definida no CM, parece ser um evento relativamente infrequente em outros tumores, como de ovário, estômago, endométrio e NSCLC, o que levou alguns autores a sugerir a utilização de critérios menos rigorosos para definição de superexpressão e/ou amplificação nestes tipos de neoplasias **[44,52,53]**. Estes dados, somados ao valor prognóstico incerto do Her-2 (discutido abaixo) e aos resultados decepcionantes dos estudos com o trastuzumab em vários tumores, sugerem que este marcador tenha somente um papel secundário na carcinogênese e no crescimento de tumores de origem extra-mamária, levantando dúvidas sobre a sua relevância como alvo terapêutico potencial de novos compostos. na maioria dos tumores sólidos. Deve-se, no entanto, citar três possíveis exceções – nas quais parece haver uma maior prevalência de amplificação e/ou superexpressão do Her-2 e nas quais o papel do trastuzumab está atualmente em investigação – que são os carcinomas de esôfago, estômago (particularmente do tipo intestinal) e endométrio (especialmente do tipo papilar seroso e tumores de alto grau histológico em geral).

### **Her-2 como um marcador prognóstico em tumores sólidos**

A família EGFR exerce um papel importante na carcinogênese e no desenvolvimento tumoral em uma série de tumores sólidos. O valor prognóstico do Her-2 nas neoplasias malignas de mama e ginecológicas foi descrito num trabalho memorável, publicado há quase duas décadas **[56]**. Desde então, numerosos outros estudos foram realizados, de forma que, atualmente, existe pouco questionamento ao fato de



que pacientes com CM com amplificação e/ou superexpressão do Her-2 têm um pior prognóstico [57]. Talvez a evidência mais convincente sejam os próprios resultados dos estudos do trastuzumab no contexto adjuvante, nos quais um grande número de pacientes (prospectivamente seguidas) com tumores Her-2 positivos, não tratadas com trastuzumab (braço controle), tiveram um risco elevado de recidiva precoce e óbito [43,58-60]. Em todos estes estudos, o efeito negativo da amplificação e/ou superexpressão do Her-2 no prognóstico pareceu ser revertido pela administração do trastuzumab, embora um seguimento mais longo seja essencial para uma plena compreensão do comportamento biológico, a longo prazo, dos tumores Her-2 positivos, precocemente expostos ao trastuzumab. Embora a relação entre Her-2 e prognóstico venha sendo um ponto de controvérsia em outros tipos de tumores, tal associação foi descrita no câncer de estômago e junção gastro-esofágica [61], esôfago [49,62], endométrio [38] (particularmente no caso de histologia papilar serosa [38,63,64]), ovário [51], NSCLC [65,66] e bexiga [67], mas o nível de evidência é certamente mais baixo do que para o CM [57].

### **Her-2 como um marcador preditivo**

A crescente compreensão da importância da família EGFR no câncer abriu uma janela de oportunidades para a investigação de novos compostos, direcionados para alvos em um ou vários pontos desta via de sinalização. O trastuzumab, um anticorpo monoclonal 95% humanizado direcionado para o domínio extracelular do receptor HER2, foi o primeiro agente a mostrar atividade clínica convincente. Em estudos de

fase II, realizados em pacientes com CM previamente tratado, o trastuzumab resultou em taxas de resposta (TR) de 15% [2], contra 25-35%, quando utilizado como tratamento de primeira linha [3,68]. Embora isto não tenha sido antecipado, somente pacientes com níveis mais altos de superexpressão da proteína HER-2 (3+ por IHC; Herceptest®) e/ou amplificação do gene beneficiam-se do tratamento de forma significativa [2,3]. Combinado à quimioterapia, o tratamento com trastuzumab resultou em melhores TR, tempo de progressão (TTP) e sobrevida global (OS) [69,70]. Mais importante, no contexto adjuvante, a administração do trastuzumab resultou numa dramática redução do risco de recidiva (de ordem de 50%) e óbito [43,58-60,71], quando usado de forma concomitante [43,58,60] ou sequencial à quimioterapia [59] em pacientes com CM Her-2 amplificado e/ou superexpresso. Como previamente assinalado, a atividade do trastuzumab tem sido decepcionante em outros tipos de tumores, como de ovário [50], endométrio [72] e pulmão [53-55,73], embora existam relatos de respostas em tumores de endométrio [74] e estômago [75]. A fraca atividade do trastuzumab em outros tumores sólidos pode ser em parte explicada pela raridade de casos de verdadeira amplificação e/ou superexpressão do Her-2, ou simplesmente pela irrelevância desta via de sinalização na biologia destes tumores. No entanto, é possível que a atividade do trastuzumab tenha sido subestimada em alguns destes estudos, devido à inclusão de pacientes não-eligíveis (isto é, não verdadeiramente Her-2 positivos). A ‘terapia molecular focada’ é uma forma de medicina ‘personalizada’, de maneira que baixas prevalências não devem ser um impedimento à utilização de tratamentos potencialmente eficazes, em pacientes bem selecionados. É interessante assinalar

que, em um estudo retrospectivo em pacientes com NSCLC, a amplificação do Her-2 se mostrou preditiva de resposta ao inibidor da tirosino-quinase gefitinib [76].

Em paralelo ao desenvolvimento dos anticorpos monoclonais, novos tipos de tratamento anti HER-2 têm sido investigados, como as vacinas e pequenas moléculas anti HER-2, anticorpos ligados a radionuclídeos e vacinas com citocinas [77]. Alguns destes agentes já estão em fase avançada de desenvolvimento clínico e podem estar comercialmente disponíveis num futuro próximo. O lapatinib, por exemplo, um duplo inibidor dos receptores HER-1/HER-2, desenvolvido principalmente para uso em CM Her-2 positivo, tem mostrado atividade promissora em estudos de fase II (mesmo em tumores resistentes ao trastuzumab) [78,79] e de fase III (combinado à capecitabina, em pacientes com doença progressiva após antraciclina, taxanos e trastuzumab) [4]. Este composto oral está agora sendo investigado nos contextos adjuvante e neoadjuvante, em dois grandes estudos internacionais coordenados pelo *Breast International Group* e *NCCTG*, assim como em outros tumores, como de cabeça e pescoço e endométrio. É importante salientar que, provavelmente devido ao pequeno tamanho da molécula, o lapatinib tem mostrado evidência de atividade em metástases cerebrais [80].

No final dos anos 90, começou a haver um grande interesse na investigação da amplificação e/ou superexpressão do Her-2, como marcadores de responsividade a certos tipos de quimioterapia citotóxica e hormonoterapia. Alguns estudos retrospectivos sugeriram que a amplificação e/ou superexpressão do Her-2 pudessem ser preditivas de resposta às antraciclina e de resistência ao regime ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracil (CMF) e ao tamoxifeno (tabela 1). No

entanto, outros autores relataram dados conflitantes (tabela 1). Alguns estudos têm sugerido que o Her-2 possa ser principalmente um marcador de resposta à quimioterapia com antraciclinas, administrada em dose densa [93] ou dose intensa [41,81], mas esta hipótese ainda precisa ser validada. O estudo 'TOP', atualmente recrutando pacientes na Bélgica, Luxemburgo, França e Brasil, é um ensaio clínico prospectivo especificamente desenhado para investigar a relação entre T2A, Her-2 (e outros marcadores biológicos) e responsividade às antraciclinas. Finalmente, apesar de dados pré-clínicos relativamente contraditórios [120], estudos recentes têm sugerido que a amplificação e/ou superexpressão do Her-2 possam ser marcadores preditivos de resposta aos taxanos (tabela 1).

### **O amplicon 17q12-q21**

O locus cromossômico humano 17q12-q21 contém, além do Her-2, vários outros genes importantes (tabela 2). Entre estes, a T2A parece ser particularmente importante no câncer. Este gene é responsável pela síntese da enzima T2A, uma proteína vital para o ciclo celular, em razão do seu papel na resolução de problemas topológicos do metabolismo do DNA (transcrição, recombinação, replicação, segregação cromossômica), durante a divisão celular. Esta enzima também é o alvo molecular de uma série de agentes citotóxicos conhecidos por inibidores da T2A (antraciclinas, etoposide, teniposide) [26].

Alguns experimentos têm mostrado que, quando ambos os genes Her-2 e T2A estão amplificados, eles estão, na verdade, localizados em *amplicons* diferentes

[126]. Isto significa que o chamado 'amplicon Her-2' é, na verdade, composto de, pelo menos, dois *amplicons* diferentes, e que a amplificação do Her-2 e da T2A são eventos independentes (quer dizer, não explicados pela simples amplificação de um segmento cromossômico extenso, como previamente suposto). Em outros estudos, o número de cópias dos genes Her-2 e T2A não foram idênticos, o que também reforçaria a conclusão acima [34,39]. Dados similares têm sido relatados em tumores gástricos e pulmonares [127,128].

Um outro gene de interesse potencial neste sítio cromossômico é o HSD17B1, responsável pela síntese de uma enzima envolvida no processo de formação de andrógenos e estrógenos (catalização E1 → E2). A amplificação deste gene é uma explicação hipotética para a resistência ao tamoxifeno, frequentemente observada em neoplasias de mama com amplificação do Her-2 [129].

Embora a amplificação do Her-2 continue sendo considerada o evento central no locus cromossômico 17q21, outros eventos genéticos podem ocorrer mais frequentemente do que se supunha, mesmo na ausência de amplificação do Her-2. No CM, a prevalência de aberrações da T2A em tumores Her-2 não-amplificados é de ordem de 5-10% e tem sido relatada em neoplasias de estômago, pulmão e bexiga (tabela 3).

**Gene e proteína (enzima) T2A como marcadores preditivos de resposta à quimioterapia citotóxica**

O gene T2A e a proteína por ele sintetizada são conhecidos há mais de duas décadas, mas a sua importância como marcadores potenciais de resposta a certos agentes citotóxicos tem sido mais intensamente investigada somente a partir da última década. Embora a pesquisa tenha sido mais ampla no CM, alguns estudos têm sido também realizados em outros tipos de tumores.

A enzima T2A ocorre em 2 isoformas: T2 $\alpha$  170kd e T2 $\beta$  18kd, que são sintetizadas por genes diferentes, localizados no 17q21 e 3p, respectivamente [138]. A T2 $\beta$  não é ciclo celular-dependente, e sua função é atualmente desconhecida. Já a T2A é ciclo celular-dependente; ela atinge o seu pico durante G2/M, e diminui no final da mitose. A expressão da T2A só é vista em células em proliferação [139-141], o que é consistente com dados mostrando que certos eventos não genéticos (alto índice proliferativo [avaliado por MIB-1 ou Ki-67], comportamento clínico agressivo, estágio clínico avançado) também podem induzir à expressão de T2A [142,143]. Isto pode, em parte, explicar os resultados inconsistentes de estudos avaliando a utilidade da enzima T2A como marcador preditivo de resposta aos inibidores da T2A [85,144,145], assim como a correlação inconsistente entre amplificação do gene e expressão da proteína T2A [44,139,144,146]. Também tem sido sugerido que a amplificação do Her-2 possa diretamente ativar a enzima T2A [89,147]. Contudo, é importante destacar que a proteína T2A é, provavelmente, o alvo molecular primário dos inibidores da T2A, como as antraciclinas; acredita-se que esta ligação impeça a quebra da dupla-cadeia de DNA, levando à apoptose.

Em alguns estudos pré-clínicos, a expressão da proteína T2A correlacionou-se com a resposta aos inibidores da T2A [132,148-154]. Outros autores sugeriram

que a amplificação da T2A correlacionava-se com a expressão da proteína T2A [132,136] e com uma maior responsividade aos inibidores da T2A [129,155], enquanto a deleção da T2A correlacionava-se com níveis mais baixos de expressão da proteína e resistência aos inibidores da T2A [132,150]. No contexto clínico, a correlação entre expressão da proteína T2A e responsividade aos inibidores da T2A parece ser uma questão mais complicada [139], principalmente devido ao fato de que a enzima é altamente dependente do ciclo celular e tem sido considerada um marcador de proliferação celular [146]. É importante destacar que, no CM, a própria proliferação celular tem sido considerada um marcador de resposta à quimioterapia em geral [156-159]. Entretanto, diferenças técnicas podem explicar parcialmente estas discrepâncias: estudos nos quais a proteína foi analisada por IHC mostraram uma melhor correlação com a proliferação celular [146] do que com a amplificação do gene [139], enquanto estudos nos quais a proteína foi avaliada por *western blot* mostraram uma clara correlação entre expressão da proteína e do gene [132]. Além disso, um estudo utilizando o método de citometria de fluxo encontrou mais de 50% das células T2A-positivas na fase G0/G1 [160].

Relatos iniciais sugeriram que aberrações do gene T2A (isto é, amplificação ou deleção do gene) seriam vistas em até 90% dos casos de carcinoma de mama com amplificação do Her-2 [126,132]. Estudos mais recentes têm relatado taxas de 32-57% (tabela 3). Globalmente, a amplificação da T2A deve ser vista como um evento infrequente no CM, com uma prevalência de aproximadamente 5-10%, nos estudos mais importantes [22,89,135]. Aberrações da T2A são mais frequentemente avaliadas por FISH (com a possibilidade de realizar-se o Her-2 e T2A em um único

teste, com o uso de uma sonda tripla), embora um estudo recente tenha sugerido uma concordância de 100% entre FISH e PCR [19]. O CISH também tem sido empregado com sucesso em outros estudos [161]. É preciso, no entanto, assinalar que o problema de subjetividade do ponto de corte pode ser ainda mais importante no caso da T2A; embora um número relativo de cópias de  $\geq 1.5$  tenha sido proposto como definição de amplificação no CM, este ponto de corte ainda não foi completamente validado. Mais particularmente, a precisão analítica do método FISH na detecção de deleções da T2A, em tecido fixado por formalina, ainda não foi detalhadamente estudada, o que pode explicar, em parte, os resultados variáveis dos estudos até então realizados.

Diversos estudos têm tentado avaliar o papel da amplificação da T2A como marcador preditivo de resposta às antraciclinas no CM. A maior parte destes estudos são de natureza retrospectiva (tabela 4) e, em geral, têm confirmado a hipótese de que a amplificação da T2A é o verdadeiro evento preditivo de resposta às antraciclinas em tumores com amplificação do Her-2, tanto no CM precoce (tabela 4), como no avançado [134,144,155,162]. No estudo adjuvante BCRIG 006, no qual a correlação entre resposta às antraciclinas e aberrações da T2A foi planejada de forma prospectiva, somente pacientes com tumores apresentando amplificação da T2A pareceram beneficiar-se da adição de antraciclinas. No entanto, estes resultados são ainda preliminares, necessitando um seguimento mais longo e validação, antes de poderem ser utilizados na prática clínica diária [130]. O desenho e os resultados deste estudo importante estão resumidos na figura 1. O estudo TOP (previamente citado), no qual aproximadamente 400 pacientes com CM não-



metastático e receptores hormonais negativos são tratadas com epirubicina 100 mg/m<sup>2</sup> pré-operatória (a cada 3 semanas por 4 ciclos no caso de tumores >2cm, ou a cada 2 semanas com suporte de fator de crescimento por 6 ciclos no caso de tumores >5cm ou CM inflamatório), foi especificamente desenhado para responder a esta questão.

A deleção da T2A é um dos eventos genéticos mais intrigantes do *amplicon* 17q12-q21. Embora estudos prévios tenham associado a deleção da T2A a um maior risco de resistência aos inibidores da T2A [132,150], estudos recentes têm sugerido o inverso [22,155]. A prevalência de deleções da T2A no CM varia de 2-11% em diferentes estudos (estas variações podem ser parcialmente explicadas pela heterogeneidade da população estudada e pelo uso de diferentes sondas).

O valor prognóstico das aberrações da T2A em tumores sólidos é atualmente desconhecido. Estudos realizados no CM não mostraram nenhuma correlação significativa, embora o número de pacientes disponíveis para estas análises fosse muito pequeno [18,135]. No entanto, alterações do gene T2A se correlacionaram com características histológicas desfavoráveis em outros estudos, como alto grau histológico [34,135] e ausência de receptores hormonais [34]. Um estudo recente, realizado em pacientes com tumores de bexiga com invasão muscular, sugeriu que a amplificação e/ou superexpressão da T2A pode estar associada a um pior prognóstico [67].

## **Conclusão**

A amplificação dos genes Her-2 e T2A são eventos independentes, embora o último ocorra mais frequentemente em células tumorais Her-2 amplificadas (32-90%), do que em Her-2 não-amplificadas (5-10%). A amplificação do Her-2 correlaciona-se com a superexpressão da proteína no CM, mas, frequentemente, não em outros tipos de tumores. A amplificação e/ou superexpressão do Her-2 são marcadores prognósticos bem estabelecidos no CM, e dados similares têm emergido em outras neoplasias como de bexiga, ovário, endométrio, gastro-esofágicas, e NSCLC. A amplificação e/ou superexpressão do Her-2 são altamente preditivas de resposta a certos agentes biológicos anti HER-2, como o trastuzumab e o lapatinib, mas têm sido marcadores preditivos inconsistentes de resposta à quimioterapia citotóxica. Existe crescente evidência (por vezes conflitante) de que tumores com amplificação e/ou superexpressão do Her-2 sejam relativamente resistentes aos anti-estrógenos (tamoxifeno), mas não à deprivação estrogênica (por ex., com um inibidor da aromatase).

Aberrações da T2A são eventos genéticos infrequentes no CM, com uma prevalência de aproximadamente 10%. A amplificação da T2A tem mostrado uma correlação inconsistente com a expressão da proteína em estudos clínicos e pré-clínicos, principalmente porque eventos não genéticos, como índice de proliferação, podem também afetar a expressão da proteína. Nesta mesma linha, a expressão da proteína T2A não se tem mostrado um marcador preditivo confiável de resposta aos inibidores da T2A, apesar do fato de que a enzima T2A é o alvo molecular destes compostos. A amplificação da T2A parece ser preditiva de resposta aos inibidores da T2A, particularmente às antraciclinas. Presentemente, estes dados só estão

disponíveis para o CM, e ainda deverão ser validados por estudos prospectivos. O significado da deleção da T2A não é bem conhecido, mas, contrariamente ao que se pensava, estes eventos podem ser preditivos de resposta aos inibidores da T2A. O valor prognóstico de uma aberração da T2A é atualmente desconhecido.

## 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 May 14-20;365(9472):1687-717.
- [2] 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 Sep;17(9):2639-48.
- [3] 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 Feb 1;20(3):719-26.
- [4] Geyer CE, Cameron D, Lindquist D, et al. A phase III randomized, open-label, international study comparing lapatinib and capecitabine vs capecitabine in women with refractory advanced or metastatic breast cancer (EGF100151). ASCO 2006 (late breaking abstract).
- [5] Ghilmini M, Schmitz SF, Cogliatti SB, et al. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4416-23.

- [6] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
- [7] Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347:472-480, 2002.
- [8] Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):133-44.
- [9] Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005 May 4;97(9):643-55.
- [10] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.
- [11] Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):5900-9.
- [12] Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*. 2003 Aug 2;362(9381):362-9.
- [13] Ayers M, Symmans WF, Stec J, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and

cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 15;22(12):2284-93.

**[14]** Folgueira MA, Carraro DM, Brentani H, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 15;11(20):7434-43.

**[15]** Thuerigen O, Schneeweiss A, Toedt G, et al. Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 20;24(12):1839-45.

**[16]** Mano M. The burden of scientific progress: growing inequalities in the delivery of cancer care. *Acta Oncol*. 2006;45(1):84-6.

**[17]** Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996 Jul 4;13(1):63-72.

**[18]** Scandinavian Breast Group Trial 9401; Tanner M, Isola J, Wiklund T, et al. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 1;24(16):2428-36.

**[19]** Murthy SK, Magliocco AM, Demetrick DJ. Copy number analysis of c-erb-B2 (HER-2/neu) and topoisomerase IIalpha genes in breast carcinoma by quantitative real-time polymerase chain reaction using hybridization probes and fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med*. 2005 Jan;129(1):39-46.

- [20]** Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G. Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Pathology*. 2006 Apr;38(2):120-4.
- [21]** 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 Jul-Aug;22(4):2485-90.
- [22]** Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, et al; Danish Breast Cancer Cooperative Group. retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7483-90. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):1015.
- [23]** Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Apr;3(4):379-98. Epub 2004 Feb 3. Review.
- [24]** Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19):3032-8.
- [25]** Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by

fluorescence in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 15;89(12):5321-5.

**[26]** Jarvinen TA, Liu ET. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2003 Apr;78(3):299-311. Review.

**[27]** Worthylake, R., Opresko, L. K. and Wiley, H. S. (1999). ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both erbB-2 and epidermal growth factor receptors. J. Biol. Chem. 274, 8865-8874.

**[28]** Baeckstrom, D., Alford, D. and Taylor, P. J. (2000). Morphogenetic and proliferative responses to heregulin of mammary epithelial cells in vitro are dependent on HER2 and HER3 and differ from the responses to HER2 homodimerisation or hepatocyte growth factor. Int. J. Oncol. 16, 1081-1090.

**[29]** Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. J Clin Oncol 1992;10:1049-56.

**[30]** Paik S, Bryant J, Park C, et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst. 1998 Sep 16;90(18):1361-70.

**[31]** Berger MS, Locher GW, Saurer S, et al. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. Cancer Res. 1988 Mar 1;48(5):1238-43.

**[32]** Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, et al. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. J Clin Pathol. 2005 Jun;58(6):611-6.



- [33]** Press MF, Bernstein L, Thomas PA, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*. 1997 Aug;15(8):2894-904.
- [34]** Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, et al. The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Hum Pathol*. 2005 Apr;36(4):348-56.
- [35]** Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1120-1128.
- [36]** Paik S, Hazan R, Fisher ER, et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8: 103-112.
- [37]** Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1044-1048.
- [38]** Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol*. 2006 May 20;24(15):2376-85.
- [39]** Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, et al; Danish Breast Cancer Cooperative Group. Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol*. 2004;43(1):35-42.
- [40]** Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical

trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Sep;93(1):3-11.

**[41]** Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, et al; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006 May 18;354(20):2103-11.

**[42]** Dressler LG, Berry DA, Broadwater G, et al. Comparison of HER2 status by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry to predict benefit from dose escalation of adjuvant doxorubicin-based therapy in node-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2005 Jul 1;23(19):4287-97.

**[43]** Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006 Feb 23;354(8):809-20.

**[44]** Mano MS, Awada A, Di Leo A, et al. Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004 Mar;92(3):887-95

**[45]** Lee CH, Huntsman DG, Cheang MC, et al. Assessment of Her-1, Her-2, And Her-3 expression and Her-2 amplification in advanced stage ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2005 Apr;24(2):147-52.

**[46]** Wu Y, Soslow RA, Marshall DS, Leitao M, Chen B. Her-2/neu expression and amplification in early stage ovarian surface epithelial neoplasms. *Gynecol Oncol.* 2004 Dec;95(3):570-5.

**[47]** Fajac A., Bernard J., Lhomme C. et al., c-erb2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic

significance by multivariate analysis. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 64 (1995), pp. 146–151.

**[48]** Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2006 Jan;15(1):65-71.

**[49]** Mimura K, Kono K, Hanawa M, et al. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2005 Apr 11;92(7):1253-60.

**[50]** Bookman M., Darcy K., Clarke-Pearson D. et al. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 21 (2003), pp. 283–290.

**[51]** Serrano-Olvera A, Duenas-Gonzalez A, Gallardo-Rincon D, Candelaria M, De la Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Rev.* 2006 May;32(3):180-90. Epub 2006 Feb 17. Review.

**[52]** Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer.* 2002 May 6;86(9):1449-56.

**[53]** Langer CJ, Stephenson P, Thor A, et al. Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group study 2598. *J Clin Oncol.* 2004 Apr 1;22(7):1180-7.

- [54]** Gatzemeier U, Groth G, Butts C, et al. Randomized phase II trial of gemcitabine-cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2004 Jan;15(1):19-27.
- [55]** Zinner RG, Glisson BS, Fossella FV, et al. Trastuzumab in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with Her2-overexpressing, untreated, advanced non-small cell lung cancer: report of a phase II trial and findings regarding optimal identification of patients with Her2-overexpressing disease. *Lung Cancer.* 2004 Apr;44(1):99-110.
- [56]** Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
- [57]** Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003;8(4):307-25. Review.
- [58]** Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20;353(16):1673-84.
- [59]** Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20;353(16):1659-72.
- [60]** 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. San Antonio Breast Cancer Symposium [abstract 1].

**[61]** Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol.* 2005 Feb;16(2):273-8.

**[62]** Brien TP, Odze RD, Sheehan CE, McKenna BJ, Ross JS. HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2000 Jan;31(1):35-9. Erratum in: *Hum Pathol* 2000 Apr;31(4):524.

**[63]** Slomovitz BM, Broaddus RR, Burke TW, et al. Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. *J Clin Oncol.* 2004 Aug 1;22(15):3126-32.

**[64]** Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, et al. Amplification of c-erbB2 oncogene: a major prognostic indicator in uterine serous papillary carcinoma. *Cancer.* 2005 Oct 1;104(7):1391-7.

**[65]** Meert AP, Martin B, Paesmans M, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer.* 2003 Sep 15;89(6):959-65. Review.

**[66]** Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Association of HER-2 overexpression with prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: a metaanalysis. *Cancer.* 2005 May 1;103(9):1865-73.

- [67]** Simon R, Atefy R, Wagner U, et al. HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer*. 2003 Dec 10;107(5):764-72.
- [68]** Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V, Morales S, Barton C, Ghahramani P. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2162-71.
- [69]** Marty M, Cognetti F, Maraninchi D et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 1;23(19):4265-74.
- [70]** 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 Mar 15;344(11):783-92.
- [71]** The HERA Study Team. Trastuzumab (H: Herceptin®) following adjuvant chemotherapy (CT) significantly improves disease-free survival (DFS) in early breast cancer (BC) with HER2 overexpression: the HERA Trial. San Antonio Breast Cancer Symposium 2005 [abstract 11].
- [72]** Fleming G. F., Sill M. A., Thigpen J. T., et al. Phase II evaluation of trastuzumab in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: A report on GOG 181B. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 2003 (abstr 1821).
- [73]** Krug LM, Miller VA, Patel J, et al. Randomized phase II study of weekly docetaxel plus trastuzumab versus weekly paclitaxel plus trastuzumab in patients

with previously untreated advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2005 Nov 15;104(10):2149-55.

**[74]** Jewell E, Secord AA, Brotherton T, Berchuck A. Use of trastuzumab in the treatment of metastatic endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 May-Jun;16(3):1370-3

**[75]** Rebischung C, Barnoud R, Stefani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer*. 2005;8(4):249-52.

**[76]** Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, et al. Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5007-18.

**[77]** Järvinen TAH, Liu ET: Novel cancer therapies targeted at the product of the HER-2/neu gene. *Appl genom Proteom* 1:3-14, 2002.

**[78]** Gomez HL, Chavez MA, Doval DC. A phase II, randomized trial using the small molecule tyrosine kinase inhibitor lapatinib as a first-line treatment in patients with FISH positive advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23 (16S): 203s.

**[79]** Spector NL, Blackwell K, Hurley, J et al. EGF103009, a phase II trial of lapatinib monotherapy in patients with relapsed/refractory inflammatory breast cancer (IBC) clinical activity and biological predictors of response. *J Clin Oncol* 2006; 18S: 3s

- [80]** Lin N. U., Carey L. A., Liu M. C., et al. Phase II trial of lapatinib for brain metastases in patients with HER2+ breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 503
- [81]** Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 16;90(18):1346-60.
- [82]** Petit T, Wilt M, Velten M, et al. Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2004 Jan;40(2):205-11.
- [83]** Bitran JD, Samuels B, Trujillo Y, Klein L, Schroeder L, Martinec J. Her2/neu overexpression is associated with treatment failure in women with high-risk stage II and stage IIIA breast cancer (>10 involved lymph nodes) treated with high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell support following standard-dose adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 1996 Sep;2(9):1509-13.
- [84]** Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, et al. Amplification and overexpression of topoisomerase IIalpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Apr;8(4):1061-7.
- [85]** Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, et al. HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol*. 2001 Aug;12(8):1081-9.



- [86]** Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Dec 20;92(24):1991-8.
- [87]** 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 (ER) and/or progesterone (PgR) receptor-positive breast cancer: mature outcomes and new biologic correlates on phase III intergroup trial 0100 (SWOG-8814). *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2004* [abstract 37].
- [88]** Colozza M, Sidoni A, Mosconi AM, et al; Italian Oncology Group for Clinical Research. HER2 overexpression as a predictive marker in a randomized trial comparing adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil with epirubicin in patients with stage I/II breast cancer: long-term results. *Clin Breast Cancer.* 2005 Aug;6(3):253-9.
- [89]** Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, et al. HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1107-16.
- [90]** Moliterni A, Menard S, Valagussa P, et al. HER2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Feb 1;21(3):458-62.

- [91]** De Laurentiis M., Caputo F., Massarelli E. HER2 Expression and Anthracycline Effect: Results from the Naples GUN3 Randomized Trial. Proc Am Soc Clin Oncol 20: 2001 (abstr 133).
- [92]** Arnould L, Fargeot P, Bonneterre J, et al. Epirubicin dose-response effect in node-positive breast cancer patients is independent of HER2 overexpression: 10-year retrospective analysis of French Adjuvant Study Group 05 trial. Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2003 [abstract 538]
- [93]** Del Mastro L, Bruzzi P, Nicolo G, et al. HER2 expression and efficacy of dose-dense anthracycline-containing adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Br J Cancer. 2005 Jul 11;93(1):7-14.
- [94]** Gregory RK, Powles TJ, Salter J, Chang JC, Ashley S, Dowsett M. Prognostic relevance of cerbB2 expression following neoadjuvant chemotherapy in patients in a randomised trial of neoadjuvant versus adjuvant chemoendocrine therapy. Breast Cancer Res Treat. 2000 Jan;59(2):171-5.
- [95]** Tetu B, Brisson J, Plante V, Bernard P. p53 and c-erbB-2 as markers of resistance to adjuvant chemotherapy in breast cancer. Mod Pathol. 1998 Sep;11(9):823-30.
- [96]** Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. J Clin Oncol. 1998 Feb;16(2):470-9.
- [97]** Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B, et al. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. Int J Cancer. 1998 Feb 20;79(1):27-33.

- [98] Fritz P, Cabrera CM, Dippon J, Gerteis A, Simon W, Aulitzky WE, van der Kuip H. c-erbB2 and topoisomerase IIalpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):R374-84.
- [99] Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, Hietanen P, Wasenius VM. Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(7):917-22.
- [100] Sjostrom J, Krajewski S, Franssila K, et al. A multivariate analysis of tumour biological factors predicting response to cytotoxic treatment in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1998 Sep;78(6):812-5.
- [101] Jarvinen TA, Holli K, Kuukasjarvi T, Isola JJ. Predictive value of topoisomerase IIalpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1998 Jun;77(12):2267-73.
- [102] Menard S, Valagussa P, Pilotti S, et al. Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):329-35
- [103] Miles DW, Harris WH, Gillett CE, Smith P, Barnes DM. Effect of c-erbB(2) and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer.* 1999 Aug 20;84(4):354-9

- [104]** Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol.* 1992 Apr;10(4):599-605.
- [105]** De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 1;11(13):4741-8.
- [106]** Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol.* 1996 Oct;14(10):2702-8.
- [107]** Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol.* 1998 Feb;16(2):462-9.
- [108]** Ferrero-Pous M, Hacene K, Bouchet C, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Spyrtatos F. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec;6(12):4745-54.
- [109]** Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER+) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol.* 2001 Apr;12(4):525-33.
- [110]** De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, et al. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Mar;9(3):1039-46.
- [111]** Ellis MJ, Coop A, Singh B, et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen

receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol*. 2001 Sep 15;19(18):3808-16.

**[112]** Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, et al; IMPACT Trialists Group. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5108-16.

**[113]** Berry DA, Muss HB, Thor AD, et al. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2000 Oct 15;18(20):3471-9

**[114]** Elledge RM, Green S, Ciocca D, et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res*. 1998 Jan;4(1):7-12.

**[115]** Learn PA, Yeh IT, McNutt M, et al. HER-2/neu expression as a predictor of response to neoadjuvant docetaxel in patients with operable breast carcinoma. *Cancer*. 2005 Jun 1;103(11):2252-60.

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

**[117]** Gonzalez-Angulo AM, Krishnamurthy S, Yamamura Y, et al. Lack of association between amplification of her-2 and response to preoperative taxanes in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2004 Jul 15;101(2):258-63.

- [118] Konecny GE, Thomssen C, Luck HJ, et al. Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Aug 4;96(15):1141-51.
- [119] Van Poznak C, Tan L, Panageas KS, et al. Assessment of molecular markers of clinical sensitivity to single-agent taxane therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002 May 1;20(9):2319-26.
- [120] Yu D, Jing T, Liu B, et al. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* 1998;2(5):581-91.
- [121] Luoh SW. Amplification and expression of genes from the 17q11 approximately q12 amplicon in breast cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002 Jul 1;136(1):43-7.
- [122] Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, et al. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6240-5.
- [123] Clark J, Edwards S, John M, et al. Identification of amplified and expressed genes in breast cancer by comparative hybridization onto microarrays of randomly selected cDNA clones. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 May;34(1):104-14.
- [124] Kauraniemi P, Kuukasjarvi T, Sauter G, Kallioniemi A. Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *Am J Pathol.* 2003 Nov;163(5):1979-84.
- [125] Jacobson KK, Morrison LE, Henderson BT, et al. Gene copy mapping of the ERBB2/TOP2A region in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 May;40(1):19-31.

- [126] Jarvinen TA, Tanner M, Barlund M, Borg A, Isola J. Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Oct;26(2):142-50.
- [127] Varis A, Wolf M, Monni O, et al. Targets of gene amplification and overexpression at 17q in gastric cancer. *Cancer Res*. 2002 May 1;62(9):2625-9.
- [128] Wikman H, Kettunen E, Seppanen JK, et al. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene*. 2002 Aug 22;21(37):5804-13.
- [129] Gunnarsson C, Ahnstrom M, Kirschner K, et al. Amplification of HSD17B1 and ERBB2 in primary breast cancer. *Oncogene*. 2003 Jan 9;22(1):34-40.
- [130] Press MF, Bernstein L, Sauter G, et al. Topoisomerase II-alpha gene amplification as a predictor of responsiveness to anthracycline-containing chemotherapy in the Cancer International Research Group 006 clinical trial of trastuzumab (herceptin) in the adjuvant setting. *Proc San Antonio Breast Cancer Symposium 2005* [abstract 1045].
- [131] Bofin AM, Ytterhus B, Hagmar BM. TOP2A and HER-2 gene amplification in fine needle aspirates from breast carcinomas. *Cytopathology*. 2003 Dec;14(6):314-9.
- [132] Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J. Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):839-47.

- [133] Durbecq V, Di Leo A, Cardoso F, et al. Comparison of topoisomerase-IIalpha gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Feb;77(3):199-204.
- [134] Villman K, Sjostrom J, Heikkila R, et al. TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol.* 2006;45(5):590-6.
- [135] Park K, Han S, Gwak GH, Kim HJ, Kim J, Kim KM. Topoisomerase II-alpha gene deletion is not frequent as its amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Feb 24.
- [136] Bhargava R, Lal P, Chen B. HER-2/neu and topoisomerase IIa gene amplification and protein expression in invasive breast carcinomas: chromogenic in situ hybridization and immunohistochemical analyses. *Am J Clin Pathol.* 2005 Jun;123(6):889-95.
- [137] Varis A, Zaika A, Puolakkainen P, et al. Coamplified and overexpressed genes at ERBB2 locus in gastric cancer. *Int J Cancer.* 2004 Apr 20;109(4):548-53.
- [138] Wang JC: DNA Topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65:635-592,1996.
- [139] Durbecq V, Desmed C, Paesmans M, et al. Correlation between topoisomerase-IIalpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. *Int J Oncol.* 2004 Nov;25(5):1473-9.
- [140] Sandri MI, Hochhauser D, Ayton P, et al. Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta genes in human breast cancers. *Br J Cancer.* 1996 Jun;73(12):1518-24.



- [141] Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *J Pathol.* 1999 Jan;187(2):207-16.
- [142] Isaacs RJ, Davies SL, Sandri MI, Redwood C, Wells NJ, Hickson ID. Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Oct 1;1400(1-3):121-37. Review.
- [143] Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol.* 2000 May;13(5):542-7.
- [144] Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, et al. Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol.* 2004 Jan;24(1):201-9.
- [145] Tinari N, Lattanzio R, Natoli C, et al. Changes of topoisomerase IIalpha expression in breast tumors after neoadjuvant chemotherapy predicts relapse-free survival. *Clin Cancer Res.* 2006 Mar 1;12(5):1501-6.
- [146] Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 Apr;39(4):288-97.
- [147] Harris LN, Yang L, Liotcheva V, et al. Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1497-504.

**[148]** Asano T, Zwelling LA, An T, et al. Effect of transfection of a *Drosophila* topoisomerase II gene into a human brain tumour cell line intrinsically resistant to etoposide. *Br J Cancer*. 1996 Jun;73(11):1373-80.

**[149]** Asano T, An T, Mayes J, Zwelling LA, Kleinerman ES. Transfection of human topoisomerase II alpha into etoposide-resistant cells: transient increase in sensitivity followed by down-regulation of the endogenous gene. *Biochem J*. 1996 Oct 1;319 (Pt 1):307-13.

**[150]** Withoff S, Keith WN, Knol AJ, et al. Selection of a subpopulation with fewer DNA topoisomerase II alpha gene copies in a doxorubicin-resistant cell line panel. *Br J Cancer*. 1996 Aug;74(4):502-7.

**[151]** Withoff S, de Vries EG, Keith WN, et al. Differential expression of DNA topoisomerase II alpha and -beta in P-gp and MRP-negative VM26, mAMSA and mitoxantrone-resistant sublines of the human SCLC cell line GLC4. *Br J Cancer*. 1996 Dec;74(12):1869-76.

**[152]** Zhou Z, Zwelling LA, Kawakami Y, et al. Adenovirus-mediated human topoisomerase IIalpha gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1999 Sep 15;59(18):4618-24.

**[153]** Asano T, Kleinerman ES, Zwelling LA, Zhou Z, Fukunaga Y. Adenovirus-mediated human topoisomerase IIalpha gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human and mouse breast cancer cells. *Acta Oncol*. 2005;44(3):240-7.

- [154] Gudkov AV, Zelnick CR, Kazarov AR et al. Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II Cdna. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3231-3235, 1993.
- [155] Tanner M, Järvinen TAH, Kauraniemi P, Holli K, Joensuu H: Topoisomerase II $\alpha$  amplification and deletion predict response to chemotherapy in breast cancer. *Proc Am Soc Cancer Res* 41:803, abstract, 2000.
- [156] Wilt M, Millon R, Velten M, et al. Comparative value of SBR grade, hormonal receptors, KI 67, HER-2 and topo-isomerase II alpha (topo II alpha) status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracyclin-based chemotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 32a (Abstr 123).
- [157] Penault-Llorca FM, Amat S, De Latour M, et al. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: from predictive to prognostic significance in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy (CT). *Br Cancer Res Treat* 2002; 76: (Suppl 1) (Abstr 153).
- [158] Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, et al. Evaluation of Ki67 proliferation index before and during neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Br Cancer Res Treat* 2002; 76: (Suppl 1) (Abstr 229).
- [159] Billgren A, Rutqvist L, Tani E, et al. Proliferating fraction during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer in relation to objective local response and relapse-free survival. *Acta Oncol* 1999; 38: 597–601.
- [160] Villman K, Stahl E, Liljegren G, Tidefelt U, Karlsson MG. Topoisomerase II-alpha expression in different cell cycle phases in fresh human breast carcinomas. *Mod Pathol*. 2002 May;15(5):486-91.

**[161]** Park K, Kim J, Lim S, Han S. Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2003 Mar;39(5):631-4

**[162]** Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Kornmeier A, Rack B, Rjosk D, Gerber B, Braun S, Sommer H, Friese K. Isolated tumor cells in the bone marrow (ITC-BM) of breast cancer patients before and after anthracyclin based therapy: influenced by the HER2- and Topoisomerase IIalpha-status of the primary tumor? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 Aug;131(8):539-46.

Tabela 1. Amplificação e/ou superexpressão do Her-2 como marcadores preditivos de resposta à quimioterapia citotóxica e hormonoterapia no câncer de mama.

	<b>Autor</b>	<b>n</b>	<b>Desenho e método</b>	<b>Resultado</b>
Antraciclinas (contexto adjuvante e neoadjuvante)	Paik et al 1998[30]	638	Retrospectivo (IHC) LN+ e ER-	Preditivo de resposta (somente DFS)
	Thor et al 1998[81]	397 (grupo A) + 595 (grupo B)	Retrospectivo (IHC e PCR)	Preditivo de resposta à QT 'dose densa'
	Petit et al 2004[82]	119	Retrospectivo (IHC e PCR) Neoadjuvante	Não foi preditivo de resposta à QT
	Bitran et al 1996[83]	25	Retrospectivo (IHC)	Não foi preditivo de resposta à QT em 'altas doses'
	Coon et al 2002[84]	35	Retrospectivo (IHC e FISH) Neoadjuvante	Amplificação, mas não superexpressão, foi preditiva de resposta à QT
	Di Leo et al 2001[85]	481	Retrospectivo (IHC) LN+	Valor preditivo limítrofe
	Knoop et al 2005[22]	805	Retrospectivo (IHC e FISH se IHC++)	Não foi preditivo de resposta à QT
	Paik et al 2000[86]	2034	Retrospectivo (IHC)	Valor preditivo limítrofe
	Albain et al 2004[87]	782	Retrospectivo (IHC) LN+,ER e/ou PgR+	Preditivo de resposta à QT
	Tanner et al 2006[18]	391	Retrospectivo (CISH) LN massivamente invadidos	Preditivo de resposta à QT 'dose intensa' (em relação a um braço 'doses usuais')
	Colozza et al 2005[88]	266	Retrospectivo (IHC)	Valor preditivo limítrofe
	Pritchard et al 2006[41]	639	Retrospectivo (FISH, IHC e PCR) Pré-menopáusicas, LN+	Preditivo de resposta à QT 'dose intensa'
	Di Leo et al 2002[89]	454	Retrospectivo (FISH)	Valor preditivo limítrofe
	Moliterni et al 2003[90]	506	Retrospectivo (IHC)	Valor preditivo limítrofe
	De Laurentiis et al 2001[91]	123	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resposta à QT
	Dressler et al 2005[42]	524	Retrospectivo (IHC,FISH e PCR)	Preditivo de resposta à escalada de doses de doxorubicina
	Arnould et al 2003[92]	332	Retrospectivo (IHC)	Superioridade da QT 'dose intensa' foi independente do Her2
	Del Mastro et al 2005[93]	731	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resposta à QT 'dose densa' (em relação à um braço 'doses usuais')
	Gregory et al 2000[94]	268	Retrospectivo (IHC) Neoadjuvante	Preditivo de resistência à quimio- hormonoterapia

Tabela 1 (cont.)

Antraciclina (contexto adjuvante e neoadjuvante)	Tetu et al 1998[95]	458	Retrospectivo (IHC)	Ausência de superexpressão do HER-2 foi preditiva de resposta à QT de mais longa duração
	Clahsen et al 1998[96]	441	Retrospectivo (IHC) Pré-menopáusicas, LN-	Não foi preditivo de resposta a 1 ciclo de QT peri-operatória
	Rozan et al 1998[97]	167	Retrospectivo (IHC) Neoadjuvante	Não foi preditivo de resposta à QT
	Fritz et al 2005[98]	225	Retrospectivo (IHC)	Não foi preditivo de resposta à QT
Antraciclina (contexto metastático)	Niskanen et al 1997[99]	127	Retrospectivo	Não foi preditivo de resposta à QT
	Sjöstrom et al 1998[100]	103	Retrospectivo	Não foi preditivo de resposta à QT
	Jarvinen et al 1998[101]	55	Retrospectivo	Preditivo de uma menor responsividade às antraciclina
CMF	Gusterson et al 1992[29]	262	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao CMF
	Menard et al 2001[102]	324	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao CMF
	Miles et al 1999[103]	274	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao CMF
	Allred et al 1992[104]	613	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao CMF
Tamoxifeno	Laurentiis et al 2005[105]	1059	Meta-análise (vários métodos) MBC	Tumores Her-2 positivos são mais resistentes à hormonoterapia
	Carlomagno et al 1996[106]	145	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao tamoxifeno
	Sjogren et al 1998[107]	315	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao tamoxifeno
	Ferrero-Pous et al 2000[108]	488	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao tamoxifeno
	Pinto et al 2001[109]	306	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao tamoxifeno
	De Placido et al 2003[110]	433	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resistência ao tamoxifeno
	Ellis et al 2001[111]	36 (disponíveis para esta análise de subgrupo)	Retrospectivo (IHC) Neoadjuvante	HER-1/HER-2 preditivos de resistência ao tamoxifeno mas não ao letrozol
	Smith et al 2005[112]	34 (disponíveis para esta análise de subgrupo)	Retrospectivo (IHC; FISH em casos selecionados) Neoadjuvante	HER-2 Preditivo de resistência ao tamoxifeno mas não ao anastrozol
	Berry et al 2000[113]	651	Retrospectivo (IHC, PCR e FISH)	Não foi preditivo de resistência ao tamoxifeno
	Elledge et al 1998[114]	205	Retrospectivo (IHC)	Não foi preditivo de resistência ao tamoxifeno
Taxanos	Learn et al 2005[115]	121	Retrospectivo (IHC)	Preditivo de resposta ao tratamento pré-operatório com docetaxel

Tabela 1 (cont.).

Taxanos	Di Leo et al 2004[116]	176	Retrospectivo (IHC e FISH) MBC	Tumores Her-2 positivos foram mais responsivos ao docetaxel do que à doxorubicina
	Gonzales-Angulo et al 2004 [117]	71	Retrospectivo (FISH)	Não foi preditivo de resposta ao tratamento pré-operatório com taxanos
	Konecny et al 2004[118]	297	Retrospectivo (FISH) MBC	Possivelmente preditivo de resposta à QT contendo taxanos
	Van Poznak et al 2002[119]	144	Retrospectivo (IHC) MBC	Não foi preditivo de resposta aos taxanos

DFS= sobrevida livre de doença; IHC= imuno-histoquímica; FISH= hibridização in situ fluorescente; CISH= hibridização in situ cromogênica; PCR= reação de polimerase em cadeia; MBC= câncer de mama metastático; ER= receptor de estrogênio; LN+= linfonodo positivo; LN-= linfonodo negativo; QT= quimioterapia; CMF= ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracil

Table 2. Genes importantes encontrados no amplicon 17q12-q21

Luoh et al 2002[121] Hyman, Wolf 2002[122] Clark, Edwards 2002[123] Kauraniemi, Sauter 2003[124] Jacobson, Morrison 2004[125]	HER-2	<i>Human epidermal receptor 2</i>
	T2A	<i>Topoisomerase-II<math>\alpha</math></i>
	THRA1	<i>Thyroid hormone receptor <math>\alpha</math></i>
	RARA	<i>Retinoid acid receptor <math>\alpha</math></i>
	MLNs 50,51,62 and MLN 64/CAB1	<i>Steroidogenic acute regulatory protein-related protein</i>
	PBP/PARBPT/TRAP-220	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein</i>
	TRAP-100	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein complex component 100</i>
	GASTRIN	
	GRB7	<i>Growth factor receptor-bound protein 7</i>
	DARPP-32	<i>Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein</i>
	HOXB2 and HOXB7	<i>Homeobox genes 2 and 7</i>
	JUP	<i>Junction plakoglobin</i>
	CrkRS	<i>CDC2-related protein kinase-7</i>
	TCP	<i>titin cap protein</i>
	PNMT	<i>Phenylethanolamine N-methyltransferase</i>
MGC9753 and MGC14832	<i>Two hypothetical proteins</i>	
Aiolos and HSD17B1	<i>17<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase type 1</i>	



Table 3. Prevalência de aberrações da T2A no câncer de mama Her-2 amplificado e não-amplificado.

Autor	Taxas de aberrações da T2A	Tipo de neoplasia
<b>Her2-amplificado</b>		
Press et al 2005[130]	~40% (35% ampliações, 4% deleções)	2120 pacientes com câncer de mama não-metastático, todos com tumores Her-2 amplificados
Bofin et al 2003[131]	80% (aspirados)	Mama
Jarvinen et al 2000[132]	80-90%	
Jarvinen et al 1999[126]		
Durbecq et al 2003[133]	38%	
Di Leo et al 2002[89]	51%	
Olsen et al 2004[39]	53%	
Knoop et al 2006[22]	57% (dos casos Her-2+, alguns avaliados somente por IHC)	
Villman et al 2006[134]	32%	
Park et al 2006[135]	33%	
Tanner et al 2006[18]	37%	
Hicks et al 2005[34]	50%	
Bhargava et al 2005[136]	50%	
Murthy et al 2005[19]	42%	
Simon et al 2003[67]	56%	
Varis et al 2004[137]	100%	Estômago
Tanner et al 2005[61]	63%	Estômago
	68%	Junção gastro-esofágica
<b>Her2 não-amplificados</b>		
Simon et al 2003[67]	17%	Bexiga
Varis et al 2004[137]	0	Estômago
Bofin et al 2003[131]	10% (aspirados)	Mama
Bhargava et al 2005[136]	5%	
Hicks et al 2005[34]	5%	
Knoop et al 2005[22]	7,6%	
Jacobson et al 2004[125]	24%	
Park et al 2006[135]	7,7%	
Coon et al 2002[84]	0	
Olsen et al 2004[39]	13%	
Durbecq et al 2003[133]	0	
Villman et al 2006[134]	4%	
Jarvinen et al 2000[132]	0	
Jarvinen et al[126]		

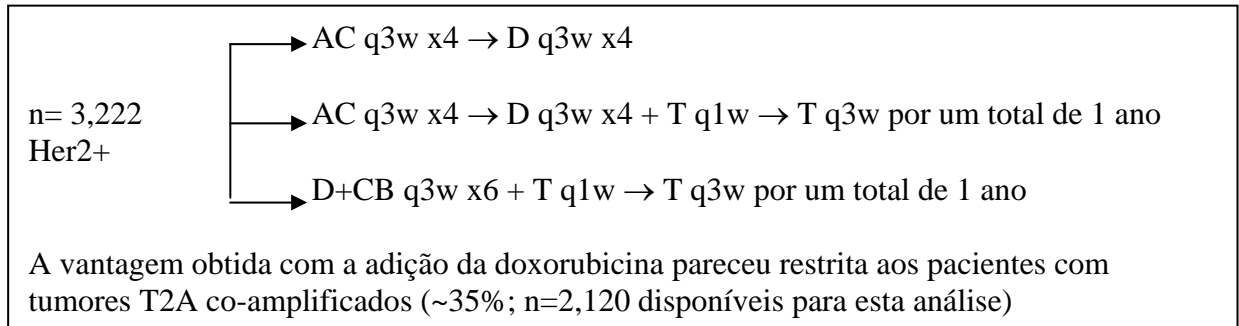
T2A= topoisomerase-II $\alpha$ ; (+)=positive; IHC= imuno-histoquímica

Tabela 4. Estudos correlacionando aberrações da T2A e responsividade às antraciclina

	<b>Autor</b>	<b>n</b>	<b>Desenho, método e população</b>	<b>Resultado</b>
T2A e responsividade às antraciclina (contexto adjuvante e neoadjuvante)	Coon et al 2002[84]	35	Retrospectivo (IHC e FISH) Neoadjuvante	Amplificação da T2A foi preditiva de resposta à QT baseada em antraciclina
	Di Leo et al 2002[89]	354	Retrospectivo (FISH) Adjuvante	Superioridade das antraciclina sobre o CMF em pacientes com tumores Her-2 amplificados pode ser restrita ao subgrupo T2A co-amplificado
	Park et al 2003[161]	67	Retrospectivo (CISH) Neoadjuvante	Amplificação da T2A foi preditiva de resposta à QT baseada em antraciclina
	Knoop et al 2005[22]	773	Retrospectivo (IHC, e FISH se IHC++) Adjuvante	Amplificação (e possivelmente deleção) da T2A foram preditivos de resposta à QT baseada em antraciclina
	Press et al 2005[130]	2120	Análise prospectivamente planejada (FISH) Adjuvante, LN+ ou LN- alto risco	Benefício obtido com a utilização das antraciclina em pacientes com tumores Her-2 positivos pareceu restrito aos tumores T2A co-amplificados
	Tanner et al 2006[18]	391	Retrospectivo (CISH) Adjuvante, LN+ (massivamente invadidos)	Amplificação da T2A foi preditiva de resposta à QT dose intensa baseada em antraciclina (em relação a um braço 'doses usuais')
	Petit et al 2004[82]	119	Retrospectivo (IHC e PCR) Neoadjuvante	Amplificação ou superexpressão da T2A não foram preditivas de resposta à QT baseada em antraciclina

T2A= topoisomerase-II $\alpha$ ; IHC= imuno-histoquímica; FISH= hibridização in situ fluorescente; CISH= hibridização in situ cromogênica; LN+= linfonodo-positivo; LN-= linfonodo-negativo; QT= quimioterapia; CMF= ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracil

Figura 1. Desenho do estudo BCRIG 006 [60,130].



n= número de pacientes; A= doxorubicina; C= ciclofosfamida; D= docetaxel; CB= carboplatina; q3w= cada 3 semanas; q1w= uma vez por semana; T= trastuzumab; (+)= positivo; BCRIG= Breast Cancer Research International Group

## **7.2 Artigo 2 em português**

**Taxas de amplificação e expressão do HER-2 e *topoisomerase II-alpha* no  
carcinoma de ovário**

M. S. Mano <sup>a</sup>, A. Awada <sup>a</sup>, A. Di Leo <sup>a</sup>, V. Durbecq <sup>b</sup>, M. Paesmans <sup>c</sup>, F. Cardoso <sup>a</sup>, D.  
Larsimont <sup>b</sup> and M. Piccart <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unidade de Quimioterapia, Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica

<sup>b</sup> Serviço de Anatomopatologia, Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica

<sup>c</sup> Centro de Dados, Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica

Recebido no dia 16/07/2003. Disponível *online* a partir do dia 24/01/2004.

## Resumo

*Objetivos:* A topoisomerase II- $\alpha$  (T2a) tem sido ativamente investigada como um potencial marcador prognóstico de resposta às antraciclinas no câncer de mama (CM). Muito embora o papel dos inibidores T2a no tratamento do carcinoma de ovário (CO) continue indefinido, nós hipotetizamos que um sub-grupo de pacientes poderia obter um benefício seletivo destes agentes. Neste estudo, investigamos as taxas de amplificação e superexpressão da T2a e HER-2, por hibridização in situ fluorescente (FISH) e imuno-histoquímica (IHC), respectivamente.

*Métodos:* Setenta e três amostras de pacientes com CO, não previamente tratadas com quimioterapia, foram selecionadas de nossos arquivos. Estágio FIGO e tipo histológico estavam disponíveis para a maioria das pacientes.

*Resultados:* Com base nos pontos de corte arbitrários de  $\geq 1.5$  e  $\geq 2$  (relação cópias/centromero17), as taxas de amplificação do HER-2 foram 15/64 (23.4%) e 8/64 (12.5 %), versus 16/64 (25 %) e 5/64 (7.8 %) para T2a. Encontramos somente 3/72 (4.2 %) casos de superexpressão para o HER-2 (3+), contra 15/70 (21.4%) para a T2a (marcagem em >10% das células). Houve uma modesta correlação entre amplificação e superexpressão da T2a ( $P= 0.01$ ) e uma forte correlação entre a amplificação da T2a e do HER-2, quando estes marcadores foram analisados como variáveis contínuas ( $P<0.001$ ). A amplificação da T2a correlacionou-se significativamente com estágio FIGO avançado ( $P= 0.02$ ).

*Conclusão:* A determinação da amplificação e superexpressão de HER-2 e T2a por FISH e IHC, respectivamente, é possível no CO. No futuro, estes testes poderão ser

usados para uma avaliação em larga escala do valor preditivo e prognóstico destes marcadores. Estudos adicionais, com um foco especial na T2a, são necessários para uma melhor avaliação dos pontos de corte.

2004 *Elsevier Inc* Todos os direitos preservados

**Palavras-chave:** Câncer de ovário (*Ovarian cancer*), Topoisomerase II–alpha; HER2; Quimioterapia (*Chemotherapy*)

## Sumário

- Introdução
- Pacientes e métodos
- Seleção dos pacientes
- Imuno-histoquímica
- Hibridização In Situ Fluorescente
- Limitações potenciais ligadas à idade das amostras
- Métodos estatísticos
- Resultados
- HER-2 por imunohistoquímica
- HER-2 por FISH (relação cópias/CEP17)
- HER-2 por FISH (sem correção para o CEP17)
- Associação entre amplificação do gene HER-2 e superexpressão da proteína (avaliadas por FISH e IHC, respectivamente)
- T2a por FISH (relação cópias/CEP17)
- T2a por FISH (> 4 cópias)
- Associação entre amplificação do gene T2a e superexpressão da proteína (avaliadas por FISH e IHC, respectivamente)
- Associação entre amplificação dos genes HER-2 e T2a
- Associação entre as variáveis e estágio FIGO
- Discussão



- Reconhecimentos
- Referências

## Introdução

O câncer de ovário (CO) é uma das principais causas de morte em mulheres [1]. Infelizmente, a doença é diagnosticada em estágios avançados em 70–80% dos casos. A maior parte das pacientes recebem um sal de platina combinado a um taxano como tratamento de primeira linha [2,3] mas, apesar disso, a sobrevida média permanece tão baixa quanto 24 meses, com a maioria das pacientes eventualmente necessitando quimioterapia para tratamento de doença recorrente. Na doença resistente ou refratária aos sais de platina, vários agentes têm mostrado atividade clínica comparável (taxas de resposta oscilando entre 15 a 30%). Neste cenário, a modesta atividade dos inibidores T2a, tais como as antraciclinas e o etoposide, também está bem documentada [4-6]. No tratamento de primeira linha, estudos randomizados têm falhado em estabelecer um papel claro para as antraciclinas [7-9]. No entanto, a possibilidade que um sub-grupo de pacientes tais como aqueles com amplificação e/ou superexpressão da T2a pudesse derivar um benefício seletivo a partir destes agentes, ainda não foi investigada.

T2a é um gene localizado no locus q21 do cromossomo 17, responsável pela síntese de uma enzima nuclear que exerce um papel crucial no ciclo celular, e que é também o alvo de vários agentes quimioterápicos, tais como etoposide, teniposide, novobiocina e antraciclinas [10]. No câncer de mama (CM), a amplificação da T2a está estreitamente associada à amplificação do HER-2. Esta descoberta levou pesquisadores hipotetizar que a T2a poderia ser o verdadeiro fator preditivo de resposta às antraciclinas, ao invés do HER-2 [11]. De fato, a correlação entre

amplificação da T2a e resposta às antraciclinas já foi relatada no contexto clínico por *Isole et al* [11] e *Di Leo et al* [12,13]. Se a amplificação do gene ou a superexpressão da proteína (ou qualquer combinação de ambos) seria o melhor marcador prognóstico de resposta a inibidores da T2a, permanece uma fonte de debate [14].

Até aqui, há somente dados limitados sobre as taxas de amplificação da T2a no CO, e nenhum estudo utilizou hibridização *in situ* fluorescente (FISH), um teste confiável, reproduzível e amplamente disponível para avaliação do DNA (permitindo a realização do teste em amostras de tecido embebidas em parafina) [15,16]. Em contraste, a proteína T2a parece estar superexpressa em 30-70 % dos casos de CO [16-19], dependendo do método utilizado. Dados pré-clínicos têm sustentado a superexpressão da proteína T2a como um potencial fator preditivo de resposta a inibidores da T2a no CO [17,20] mas, no nosso conhecimento, o valor preditivo da amplificação da T2a nunca foi investigado. Assim como no CM, um estudo encontrou nenhuma correlação entre amplificação e expressão da T2a, mas até aqui a relação entre a amplificação do HER-2 e T2a não foi explorada [16,21].

A amplificação do HER-2 tem sido relatada em cerca de 15% das neoplasias de mama e, nesta doença, parece haver uma boa correlação entre amplificação do gene e superexpressão da proteína. A amplificação do HER-2 também tem sido descrita no CO, mas alguns destes estudos usaram métodos outros que não FISH [22-24]. Em contraste, e em contrário a relatos iniciais, as taxas de superexpressão da proteína parecem ser muito baixas em tumores de ovário, quando avaliadas por imuno-histoquímica (IHC) [25].

Neste estudo, primeiramente investigamos as verdadeiras taxas de amplificação dos genes T2a e HER-2 e de superexpressão das respectivas proteínas (por FISH e IHC, respectivamente), e se a amplificação do gene seria o principal determinante da superexpressão das proteínas T2a e HER-2, no CO. Também avaliamos a relação entre amplificação dos genes T2a e HER-2 e exploramos o potencial valor prognóstico destes marcadores, através de correlação com o estágio clínico (FIGO).

## **Pacientes e métodos**

### **Seleção das pacientes**

Setenta e três amostras de CO embebidas em parafina foram selecionadas, com base nas listas de cirurgias ginecológicas realizadas no Instituto Jules Bordet entre 1987 e 2002. Somente uma paciente havia sido previamente tratada com quimioterapia (esta informação tornou-se disponível somente depois da análise). Informação sobre tipo histológico e estágio FIGO estava disponível para 73 e 71 pacientes, respectivamente. As características clínicas e patológicas são mostradas no Quadro 1.

### **Imuno-histoquímica**

A expressão da proteína T2a foi avaliada por IHC, conforme previamente descrito [12]. Resumidamente, os espécimes foram desparafinados, rehidratados e incubados por trinta minutos em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 0.5 % em metanol. Depois do pré-tratamento (0.1 % tripsina em 0.1 %CaCl<sub>2</sub> pH 7.8 por 10 minutos, a 37°), a coloração não específica foi bloqueada pela incubação em soro normal a 10% por 1h a 4°C; todos os passos foram desenvolvidos em solução tampão PBS/0.1% BSA/1%Tween 20. Após incubação com o anticorpo primário (1 µg ml<sup>-1</sup> durante a noite a 4°C, clone kiS1, Boehringer-Manheim), as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente com um anticorpo secundário anti-murino biotilado por 30 minutos, e estreptavidina-HRP (Zimed) (1/20) por 10 minutos. 3'-3 diaminobenzidina

foi usado como cromogênio. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Como controles negativos, foram utilizados cortes em série incubados somente com solução-tampão, ao invés do anticorpo primário. Como nenhum sistema de cálculo foi até aqui definido para T2a, a análise foi baseada somente na porcentagem de células positivamente coradas, conforme avaliado pelo patologista. As análises foram executadas de forma cega (avaliação da proteína ignorando-se o estado do gene e vice-versa). Em caso de importante heterogeneidade, as zonas de mais intensa coloração foram consideradas. No CM, um ponto de corte de >10% de células marcadas (IHC) foi proposto, muito embora isto permaneça controverso. O ponto de corte apropriado não é conhecido no CO. Por esta razão, nós analisamos a proteína T2a primariamente como uma variável contínua, muito embora também tenhamos executado análises exploratórias, baseadas nos dois pontos de corte arbitrários de  $\geq 10\%$  e  $>10\%$  de células marcadas.

HER-2 foi avaliado por IHC com o anticorpo monoclonal murino CB-11, diluição 1/40 (Novocastra, Newcastle, UK), de acordo com os seguintes procedimentos: espécimes de blocos de tumores embebidos em parafina, habitualmente fixados em formalina tamponada neutra, foram cortados em lâminas de poli-L-lisina. As lâminas foram desparafinadas e rehidratadas. O tecido foi pré-tratado num banho de água a 94° C por 30 min em 10 mmol/l de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), pH8. As lâminas foram, então, coloridas com o *Ventana Nexes System*, usando reagentes Nexes padrão e bloqueadores endógenos da biotina (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). As lâminas foram incubadas por trinta minutos a 37°C com o anticorpo primário e 10 min a 37°C com o

anticorpo biotilado secundário, antes de incubação com complexo avidina-peroxidase pela mesma duração de tempo. O cromogênio foi o 3'-3 diaminobenzidina. Todos os produtos necessários para estes procedimentos estavam incluídos no kit de detecção DAB fornecido pelo fabricante. As lâminas foram, então, contra-coradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas. Coloração da membrana celular foi definida como positividade. O sistema de escore utilizado foi o do Herceptest (DAKO, Carpinteria, CA). A avaliação foi baseada na porcentagem de células positivamente coradas e na intensidade da coloração. As análises foram feitas de uma forma cega (avaliação da proteína ignorando-se o estado do gene e vice-versa). Nós analisamos o HER-2 como uma variável contínua, embora também tenhamos realizado duas análises exploratórias usando os pontos de corte de 2+/3+ e 3+, de acordo com estudos prévios realizados em CM e CO.

### **Hibridização in situ fluorescente (FISH)**

As análises de FISH foram executadas usando o *Vysis Multi-color T2a Spectrum Orange, HER-2 Spectrum Green* e CEP17 Spectrum aqua probe (Vysis, Chicago, IL, USA), conforme previamente descrito [26]. Resumindo, os espécimes foram desparafinados e incubados em pré-tratamento com solução-tampão a 80°C por 30 min. A digestão enzimática foi executada com pepsina (10-20 min a 37°C) e as lâminas foram desidratadas em diluições graduadas de etanol. A sonda (10 µl) foi aplicada nas lâminas sob proteção. As lâminas foram desnaturadas em conjunto num prato quente (73°C por 5 min), seguido de hibridização durante a noite a 37°C. Depois de serem rigorosamente lavadas (2xssc/0.3% Nonidet P-40 a 73°C por 2

min), as lâminas foram contra-coradas com 10 µl de 0.2 µM de 4,6 diamino-2-fenil-indol (DAPI) em solução com *antifade* (Vectashield, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA). O FISH foi avaliado com uso de um microscópio de epifluorescência Olympus BX51, equipado como previamente descrito [27]. As partes invasivas do tumor foram circuladas nas lâminas com um diamante, sobrepostas pelos cortes hematoxilina-corados, previamente analisados por um patologista (DL). Sinais de, no mínimo, 60 núcleos não sobrepostos com morfologia intacta foram avaliados para determinar o número médio de sinais/células (proporção entre o número médio de sinais de T2a ou HER-2 e o número médio de sinais de centrômero do cromossomo 17 [cópias/CEP17]). No CM, amplificação do gene HER-2 tem sido definida como uma relação cópias/CEP17  $\geq 2$  [28]. No CO, dois pequenos estudos usaram um ponto de corte de  $\geq 1.5$ . Em contraste, a amplificação da T2a não foi previamente avaliada por FISH no CO, embora no CM, um ponto de corte de  $\geq 1.5$  tenha sido proposto [28]. Uma vez que ainda existe pouca experiência com o teste FISH no CO, nós analisamos estes marcadores primariamente como variáveis contínuas. Além disso, executamos análises exploratórias da amplificação do HER-2 e T2a, usando um ponto de corte de  $\geq 1.5$  ou  $\geq 2.0$ , para ilustrar o impacto potencial desta avaliação nos resultados finais.

### **Limitações potenciais relacionadas com a idade das amostras**

Nós avaliamos previamente a influência potencial da idade das amostras nos resultados, durante nossos estudos retrospectivos anteriores. Os coeficientes de correlação não paramétricos entre a distribuição dos marcadores biológicos e a



idade dos blocos não mostraram qualquer influência significativa da última, tanto por IHC quanto por FISH (coeficientes de Spearman entre 0 e 0.18, não significativo). Portanto, é pouco provável que a idade das amostras possa ter influenciado nossos resultados.

### **Métodos estatísticos**

O propósito desta análise é essencialmente descritivo. A distribuição univariável das variáveis contínuas foi descrita por posição (média e mediana) e parâmetros de dispersão (desvio padrão e amplitude). Variáveis binárias foram descritas pelas taxas observadas de expressão de proteína e/ou amplificação do gene. A associação entre duas variáveis contínuas foi estabelecida calculando-se os coeficientes de correlação de postos de Spearman (com teste de significância na igualdade a zero desses coeficientes). Taxas de positividade de variáveis binárias foram feitas aos pares usando-se testes de McNemar.

## **Resultados**

### **HER-2 por IHC**

Setenta e dois casos foram disponibilizados para esta análise (um foi excluído devido a problemas técnicos com a conservação do tecido). O escore que mais se repetiu foi 0 (n=52,72%); a distribuição das contagens é mostrada na Fig 1. Considerando como positivos aqueles casos com escores  $\geq 2+$ , 6/72 (8.3 %), tumores foram definidos como HER superexpressos. Tomando somente casos 3+ (conforme definido em CM), a taxa de positividade do HER-2 foi 4,2 % (3/72 casos).

### **HER-2 por FISH (cópias/CEP17)**

Sessenta e três casos foram disponibilizados para esta análise (nove foram excluídos devido a problemas com a conservação do tecido, e um caso foi definido como amplificado, mas sem nenhuma medida precisa da relação cópias/CEP17 e, portanto, não levado em conta no cálculo dos parâmetros de distribuição do HER-2). Os valores medianos e médios do FISH foram 1.20 e 1.40, respectivamente (com um desvio padrão de 0.63, esta variável oscilou de 0.96 a 3.46). A distribuição é mostrada na Fig 1. Na análise da distribuição contínua desta variável, um caso amplificado não foi levado em conta, porque a amplificação não pôde ser quantificada (n=63). Considerando como positivos aqueles casos com uma relação cópias /CEP17  $\geq 1.5$ , 15/64 (23,4%) dos tumores foram considerados amplificados. Com um ponto de corte de  $\geq 2$ , a taxa de amplificação caiu a 12.5% (8/64 casos).

### **HER-2 por FISH(sem correção para CEP17)**

Sessenta e quatro casos foram disponibilizados para esta análise (nove excluídos devido a problemas com conservação do tecido). Quando o número de cópias do CEP17 não foi levado em conta, os escores medianos e médios do FISH foram 2.70 e 3.26, respectivamente (com um desvio padrão de 2.04, esta variável oscilou entre 1 e 11.60). A distribuição é mostrada na Fig 2. Conforme acima, ao calcular os parâmetros da distribuição do HER-2, um caso amplificado não pôde ser levado em conta, porque a amplificação não pôde ser quantificada (n=63). Considerando como positivos aqueles casos com >4 cópias do gene (conforme sugerido no CM), 21/64 (32.8 %) tumores foram definidos como HER-2 amplificados).

### **Associação entre amplificação do gene HER-2 e superexpressão da proteína (conforme avaliado por FISH e IHC, respectivamente)**

Sessenta e dois pares foram disponibilizados para esta análise (nove testes FISH e um IHC foram excluídos devido a problemas com a conservação do tecido, e um caso amplificado foi excluído porque a amplificação não pôde ser quantificada). O coeficiente de correlação de postos de Spearman teve um valor de 0.14 e não foi estatisticamente diferente de 0 (P=0.27)(Fig 3). Isto quer dizer que, quando analisado como uma variável contínua, não houve correlação significativa entre estas duas variáveis. Numa análise exploratória, estas avaliações foram também dicotomizadas e comparadas como variáveis binárias (HER-2 IHC  $\geq 2+$ , HER-2 IHC  $\geq 3+$ , HER-2 FISH  $\geq 1.5$ , HER-2 FISH  $\geq 2$ ). A proporção de positividade foi comparada

usando testes McNemar (63 pares disponíveis: nove testes FISH e um IHC excluídos devido a problemas com conservação do tecido). Concluindo, as taxas de amplificação e superexpressão foram baixas e não houve correlação clara entre os diferentes métodos de avaliação.

### **T2a por IHC**

Setenta casos foram disponibilizados para esta análise (três casos foram excluídos devido a problemas com a conservação de tecido). Os escores foram expressos como porcentagem das células marcadas. A contagem mais frequente foi 0 (n=21, 30%), e os valores medianos e médios foram de 5% e 7.50%, respectivamente. Considerando como positivos aqueles casos com >10% de células marcadas, 15/70 (21,4%) dos tumores mostraram uma superexpressão da T2a.

### **T2a por FISH (cópias/ CEP17)**

Sessenta e quatro casos foram disponibilizados para esta análise (nove casos foram excluídos devido a problemas com a conservação do tecido). Os escores medianos e médios de FISH foram 1.15 e 1.34, respectivamente (com um desvio padrão de 0.53, a variação foi de 0.95 a 3.29), com sua distribuição mostrada na Fig 4. Os casos foram considerados positivos quando a relação cópias/CEP17 foi  $\geq 1.5$ , com 16/64 (25%) dos tumores assim considerados amplificados. Com um ponto de corte mais alto de  $\geq 2$ , a taxa de amplificação caiu para 7.8% (5/64 casos).

### **T2a por FISH (>4 cópias)**

Sessenta e três casos foram disponibilizados para esta análise (10 FISH excluídos devido a problemas com a conservação do tecido). Quando a proporção com o número de cópias CEP 17 não foi levado em conta, a média de contagem e a contagem intermediária FISH foram 2.70 e 3.12016, respectivamente (com um desvio padrão de 1.75, a variável ficou entre 1.00 a 6.90). Sua distribuição é mostrada na Fig. 2. Considerando como positivos aqueles casos com >4 cópias do gene, 20/63 (31,7 %) dos tumores foram T2a-amplificados.

### **Associação entre a amplificação do gene T2a e expressão da proteína (avaliados por FISH e IHC, respectivamente)**

Sessenta e três pares foram disponibilizados para esta análise (nove testes FISH e um IHC foram excluídos devido a problemas com a conservação do tecido). O coeficiente de correlação de postos de Spearman teve um valor de 0.31 e este foi estatisticamente diferente de 0 ( $P=0.01$ ) (Fig 5), o que quer dizer que houve uma modesta associação entre estas duas variáveis quando analisadas de forma contínua. Numa análise exploratória, estas avaliações foram também dicotomizadas e comparadas como variáveis binárias (T2a IHC >10%, T2a IHC  $\geq$ 10%, T2aFish  $\geq$ 1.5, T2a FISH  $\geq$ 2). A proporção de positividade foi comparada usando testes McNemar (63 pares disponíveis, com nove testes FISH e um IHC excluídos devido a problemas com a conservação do tecido). Concluindo, de maneira similar aos

resultados obtidos para o HER-2, não houve correlação entre os diferentes métodos de avaliação.

### **Associação entre a amplificação dos genes HER-2 e T2a**

Quando analisadas como variáveis contínuas, houve uma excelente correlação entre a amplificação dos genes HER-2 e T2a (FISH) (com ou sem correção para o CEP 17; coeficientes de correlação de Spearman de 0.83[P<0.001; n=63] e 0.93 [P<0.001; n=62], respectivamente (para o HER-2, 9 testes FISH foram excluídos devido a problemas técnicos problemas com a conservação do tecido e um teste que não pôde ser quantificado; para T2a, 10 testes FISH foram excluídos devido a problemas com a conservação do tecido e um teste que não pôde ser quantificado) Fig 6. De modo inverso, a associação entre a expressão de proteína HER-2 e T2a (IHC) foi pobre (coeficiente de correlação= 0.09, P=0.48; n=70) Fig.7.

### **Associação das variáveis com estágio FIGO**

A superexpressão do HER-2 (2+/3+) foi associada com estágios FIGO I e II (P=0.01, teste exato Fisher). De modo inverso, a amplificação da T2a (FISH) correlacionou-se com estágio FIGO avançado (III e IV). Todos os casos de amplificação (independentemente da definição utilizada, isto é, cópias/CEP17  $\geq 1.5$ , cópias/CEP17  $\geq 2.0$  ou cópias >4) foram vistos em tumores FIGO III/IV. Esta associação alcançou significância estatística somente na ausência de correção para CEP17 (P=0.02). Não houve outras associações detectáveis.

## Discussão

A amplificação do gene HER-2 é vista em cerca de 15% dos casos de CM e o método FISH, que permite a realização do teste em tecido parafinado, tem sido largamente utilizado na prática clínica. No CM, um ponto de corte de  $\geq 2$  cópias/CEP17 ou  $>4$  cópias (sem correção para CEP17) tem sido usado para definir amplificação do gene. No CO, as taxas de amplificação do gene HER-2 variaram de 20% a 30% [29-32] com métodos outros que não o FISH, embora Van der Zee et al [16] tenham encontrado somente um caso de amplificação entre 86 casos. Por FISH, as taxas de amplificação variaram de 32% a 71% (um ponto de corte de  $\geq 1.5$  cópias/CEP17 foi usado na maior parte destes estudos) [23,33-36]. No nosso estudo, encontramos valores medianos e médios de FISH de 1.20 e 1.40, respectivamente. Com um ponto de corte de  $\geq 2$ , a taxa de amplificação foi de 12.5% [8/64] (versus 23.4% [15/64] com um ponto de corte de  $\geq 1.5$ ). As avaliações foram freqüentemente complicadas por heterogeneidade e altas taxas de polissomia do cromossomo 17. Na realidade, 13/64 (20.3%) ou 8/64 (12.5%) dos tumores (ponto de corte  $\geq 2$  e  $\geq 1.5$ , respectivamente) foram considerados não amplificados apesar da presença de  $>4$  cópias do gene. Usando o número de cópias do gene ( $>4$ ) sem correção para CEP17 para definir amplificação, 32.8% (21/64) dos casos foram considerados como HER-2 amplificados. A importância deste achado é que o número não corrigido de cópias do gene parece ser mais representativo da anormalidade genética nas células de CO. No entanto, é preciso assinalar que

alguns estudiosos continuam a questionar a utilidade do número de cópias CEP17 na prática clínica.

A proteína HER-2 está superexpressa em 15-20% dos casos de CM, e a IHC tem sido o teste mais largamente usado para a sua avaliação. No CO e nas neoplasias epiteliais primárias do peritônio (TPP), a superexpressão do HER-2 tem sido relatada em 25-30% dos casos, embora os números variem de 9% a 65% em diferentes séries [37-41]. Alguns [22,35,36,39], mas não todos [34,35,42] estudos também sugeriram que a superexpressão do HER-2 pudesse ser um indicador de pior prognóstico em CM e TPP. No entanto, as verdadeiras taxas de superexpressão parecem ser muito mais baixas. No maior estudo (n=837), o grupo GOG encontrou somente 11.4 % e 4% de casos de superexpressão 2+/3+ e 3+, respectivamente [25], que estão muito perto dos nossos resultados(2+/3+=8.3 % [6/72] e 3+=4.2 % [3/72]). Interessantemente, nós encontramos nenhuma correlação entre amplificação do gene HER-2 e níveis de proteína, sugerindo que muitos casos de amplificação do gene não resultam na expressão da proteína, contrário ao conhecimento corrente no CM. Descobertas similares foram também reportadas por *Fajac et al* [24]. É possível que, conforme visto com a T2a, fatores outros além da amplificação do gene possam também influenciar a expressão da proteína HER-2, como parte de um complexo processo de regulação. De interesse, no estudo GOG, tumores HER-2-superexpressos mostraram baixas taxas de resposta ao anticorpo monoclonal anti-HER-2 trastuzumab. Resumindo, a evidência atual sugere que a via de sinalização HER-2 não exerce um papel importante na sobrevivência das células do CO sendo, portanto, improvável tornar-se um alvo terapêutico interessante nesta patologia.



Quando avaliado por FISH, o gene T2a está amplificado em cerca de 5-10 % dos casos de CM, geralmente em tumores HER-2 co-amplificados. Também já foi sugerido que a amplificação da T2a possa ser o verdadeiro marcador preditivo de resposta às antraciclinas no CM, ao invés do HER-2 [11]. De fato, dados pré-clínicos e clínicos têm sustentado a hipótese que T2a exerça um papel central na determinação da sensibilidade de células tumorais a agentes inibidores da T2a [43,12,13]. Um ponto de corte de  $\geq 1.5$  cópias/CEP17 foi definido CM [12,13].

Até aqui, a amplificação do gene T2a não foi investigada no CO [16,17]. Muitos estudos têm avaliado os níveis m-RNA ou a proteína T2a diretamente. A desvantagem potencial é que os níveis de proteína podem ser dependentes de outros fatores, tais como o grau de proliferação [42]. Por outro lado, outros poderiam argüir que a proteína é o alvo direto dos inibidores da T2a [26]. No nosso estudo, a amplificação da T2a foi avaliada por FISH. Usando um ponto de corte de  $\geq 1.5$  cópias/CEP17 (conforme definido no CM), 25% (16/64) dos casos foram considerados como amplificados. Com um ponto de corte levemente mais alto de  $\geq 2$ , a taxa de amplificação foi tão baixa como 7.8 % (5/64). A realização dos testes foi complicada pela heterogeneidade. As taxas de polissomia do cromossomo 17 (CEP17) também foram elevadas, tanto que em 11.1% (7/63) e 23.8% (15/63) dos casos, a relação cópias/CEP17 de T2a foi  $< 1.5$  e  $< 2$  (não aumentadas), respectivamente, apesar da presença de  $> 4$  cópias do gene. Usando o número não corrigido de cópias do gene para definir amplificação, 31.7 % (20/63) dos casos seriam considerados amplificados. Estas descobertas poderiam refletir a diversidade genética, histológica e biológica típica do CO. Como para HER-2, poder-se-ia

especular que o número não corrigido de cópias do gene melhor reflete a anormalidade genética da célula. Estudos adicionais são necessários antes que um ponto de corte confiável possa ser proposto. Como no CM, encontramos uma excelente correlação entre amplificação dos genes T2a e HER-2 (tanto corrigido ou não corrigido para cópias CEP17), quando analisados como variáveis contínuas (Fig 6).

A superexpressão da proteína T2a tem sido reportada em 30% a 70% dos casos de CO. Um número de métodos diferentes tem sido usado, por exemplo, transcrição reversa por PCR [20], *western blot* [17] e IHC [18,24,44]. Níveis mais elevados de T2a também têm sido reportados em tumores ovarianos de células embionárias, uma das neoplasias mais sensíveis ao inibidor da T2a etoposide [45]. No presente estudo, usando um ponto de corte >10% das células marcadas (como previamente proposto no CM), encontramos 15/70 (21,4 %) casos de superexpressão da T2a. Salientamos que as avaliações foram frequentemente dificultadas pela heterogeneidade da imunomarcagem. De nota, trabalhos anteriores não encontraram qualquer correlação entre amplificação e superexpressão da T2a no CO [16,17] e CM (BC) [15]. Uma explicação possível é que fatores outros que não a amplificação do gene T2a possam também interferir no complexo processo de regulação da expressão da proteína T2a. Em contraste, nossos resultados sugerem uma modesta correlação entre a amplificação do gene e a expressão da proteína T2a, que deve ser interpretada com cautela, devido ao pequeno tamanho da amostra neste estudo (Fig 5).

Usando os pontos de corte  $\geq 2$  para o gene HER-2,  $\geq 1.5$  para o gene T2a e  $>10\%$  para a proteína T2a, 62.5% (5/8) dos tumores HER-2 amplificados apresentavam uma co-amplificação do gene T2a, mas 68,75% (11/16) de tumores T2a amplificados não apresentaram co-amplificação do gene HER-2. Somente 12.5% (1/8) dos tumores HER-2 amplificados apresentaram uma superexpressão da T2a. Com um ponto de corte de  $\geq 1.5$  para definição de amplificação do HER-2, 80% (12/15) dos tumores foram T2a co-amplificados, enquanto somente 20% destes apresentaram uma superexpressão da proteína T2a. Estes dados sugerem que, neste aspecto, o CO não pode ser comparado ao CM, no qual somente 4% dos casos de amplificação do gene T2a foram observados em tumores HER-2 não-amplificados. Novamente, nós destacamos os limites de comparações baseadas em pontos de corte arbitrários. Conforme exposto anteriormente, quando analisados como variáveis contínuas, a correlação entre amplificação dos genes HER-2 e T2a foi excelente. De interesse, não encontramos casos de deleção da T2a no nosso estudo, quando a mesma definição utilizada no CM foi aplicada (relação  $<0.67$ ).

Com referência ao significado biológico da amplificação do gene sem co-expressão da proteína, poderia ser argüido que o primeiro representa um defeito genético adquirido da célula, enquanto que o último somente reflete seu conteúdo de proteína num tempo preciso. Portanto, a alteração do gene, ainda que sem expressão de proteína, pode ainda ser um marcador de uma biologia alterada, que poderia ainda ser associado com prognóstico e/ou resposta à terapia. A regulação da proteína T2a, por exemplo, é um processo complexo e altamente relacionado ao estágio proliferativo do tumor, tanto que um tumor com nenhuma expressão de

proteína, não obstante a amplificação do gene, poderia potencialmente expressar a proteína se o seu estágio proliferativo mudasse. No CM, já demonstramos anteriormente que a amplificação do gene T2a correlaciona-se com a expressão da proteína somente em tumores proliferativos (definida como imunomarcagem positiva para ki-67).

No nosso estudo, nós observamos uma correlação entre amplificação do gene T2a e estágio avançado (FIGO III/IV), alcançando significância estatística ( $P=0.02$ , teste exato Fisher) somente quando não controlado para CEP17. Nenhum caso de amplificação da T2a foi visto entre os tumores em estágio inicial (FIGO I/II). As implicações potenciais deste achado são (1) é possível que a superexpressão da T2a tenha um significado prognóstico ou que ela seja uma ocorrência tardia e (2) a doença avançada poderia responder melhor a certos tipos de quimioterapia, se T2a de fato tivesse um valor preditivo. De modo inverso, a expressão HER-2 pareceu correlacionar-se com estágio FIGO precoce ( $P=0.01$ , teste exato de Fisher). Estes dados devem ser interpretados com cautela devido ao pequeno número de casos (somente 14 pacientes FIGO I/ II disponíveis para esta análise). Não obstante, no que diz respeito à possibilidade da superexpressão do HER-2 ser um evento de ocorrência precoce no CO, destacamos as altas taxas de superexpressão do HER-2 em tumores intra-ductais de mama, um precursor potencial da doença invasiva.

Concluindo, a avaliação das taxas de amplificação e expressão do HER-2 e T2a, por FISH e IHC, respectivamente, é praticável em amostras parafinadas de CO. O nosso trabalho confirmou a associação entre amplificação dos genes HER-2 e T2a no CO, como também descrito no CM. Contrariamente a relatos anteriores,

observamos uma modesta correlação entre amplificação e superexpressão da T2a no CO, mas nenhuma correlação entre amplificação e superexpressão do HER-2. A polissomia do cromossomo 17 é um achado frequente no CO, de forma que taxas de amplificação significativamente maiores são vistas se o número de cópias do gene não for corrigido para o número de cópias do CEP17. Finalmente, embora a amplificação da T2a pareça correlacionar-se com estágio clínico avançado, mais estudos são necessários para explorar o significado prognóstico da amplificação do gene T2a no CO. O nosso grupo está também planejando um estudo clínico para avaliar de maneira prospectiva o papel da T2a como marcador preditivo de resposta às antraciclina no CO.

## **Agradecimentos**

Agradecemos à Schering-Plough pelo suporte financeiro parcial à pesquisa, Straehle C pela revisão e Leroy J-Y por alguns dos gráficos.

## Referências

- [1] C. Boring *et al.*. *CA-A Cancer J. Clin.* **44** 1 (1994), pp. 7–26.
- [2] W.P. McGuire, W.J. Hoskins, M.F. Brady *et al.*, Cyclophosphamide and cisplatin versus paclitaxel and cisplatin: a phase III randomized trial in patients with suboptimal stage III/IV ovarian cancer (from the Gynecologic Oncology Group). *Semin. Oncol.* **5** (1996), pp. 40–47.
- [3] M.J. Piccart, K. Bertelsen and K. James, Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J. Natl. Cancer Inst.* **92** (2000), pp. 699–708.
- [4] J.B. Vermorken, A. Kobińska, B. Chevallerier *et al.*, A phase II study of high-dose epirubicin in ovarian cancer patients previously treated with cisplatin. EORTC Gynecological Cancer Cooperative Group. *Ann. Oncol.* **11** (2000), pp. 1035–1040.
- [5] P.G. Rose, J.A. Blessing, A.R. Mayer and H.D. Homesley, Prolonged oral etoposide as second-line therapy for platinum-resistant and platinum-sensitive ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* **16** (1998), pp. 405–410.
- [6] A.N. Gordon, J.T. Fleagle, D. Guthrie *et al.*, Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J. Clin. Oncol.* **19** (2001), pp. 3312–3322.

- [7] The Ovarian Cancer Meta-Analysis Project. Cyclophosphamide plus cisplatin versus cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy of ovarian carcinoma: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 9 1668–1674.
- [8] A. du Bois, B. Weber, J. Pfisterer *et al.*, Epirubicin/paclitaxel/carboplatin (TEC) vs. paclitaxel/carboplatin (TC) in first-line treatment of ovarian cancer FIGO stages IIb-IV. Interim results of an AGO-GINECO-intergroup phase III trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20** (2001), p. 202a [abstract 805].
- [9] G. Kristensen, I. Vergote, G. Stuart *et al.*, First line treatment of ovarian cancer FIGO stages IIb-IV with paclitaxel/epirubicin/carboplatin (TEC) vs. paclitaxel/carboplatin (TC). Interim results of an NSGO-EORTC-NCIC CTG Gynecological Cancer Intergroup phase III trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21** (2002), p. 202a [abstract 805].
- [10] U. Kellner, M. Sehested, P. Jensen *et al.*, Culprit and victim—DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol.* **3** (2002), pp. 235–243.
- [11] J.J. Isola *et al.*, Amplification of topoisomerase II alpha is strong predictor of response to epirubicin-based chemotherapy in HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. In: *Proc. San Antonio Breast Cancer Meeting* **64** (2000 (December)), p. 31 (abstr. 21).
- [12] A. Di Leo, D. Larsimont, D. Gancberg *et al.*, HER-2 and topoisomerase IIa as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann. Oncol.* **12** (2001), pp. 1081–1089.

- [13] A. Di Leo, D. Gancberg and D. Larsimont, HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* **8** (2002), pp. 1107–1116.
- [14] V. Durbecq, A. Di Leo, G. Rouas *et al.*, Correlation between topoisomerase II-alpha (TOPO-II) gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. *Proc. Am. Soc. Cancer Res.* **44** (2003), p. 937.
- [15] M. Cornarotti, G. Capranico, S. Bohm *et al.*, Gene expression of DNA topoisomerases I, II alpha and II beta and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* **67** (1996), pp. 479–484.
- [16] A.G.J. Van der Zee, E.G.E. de Vries, H. Hollema *et al.*, Molecular analysis of the topoisomerase II alpha gene and its expression in human ovarian cancer. *Ann. Oncol.* **5** (1994), pp. 75–81.
- [17] M. Koshiyama, H. Fujii, M. Kinezaki *et al.*, Correlation between Topo II alpha expression and chemosensitivity testing for Topo II-targeting drugs in gynaecological carcinomas. *Anticancer Res.* **21** (2001), pp. 905–910.
- [18] W. Gotlieb, I. Goldberg, B. Weisz *et al.*, Topoisomerase II immunostaining as a prognostic marker for survival in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **82** (2001), pp. 99–104.



- [19] S. Withoff, A.G.J. van der Zee, de S. Jong *et al.*, DNA topoisomerae II alpha and beta expression in human ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **79** (1999), pp. 748–753.
- [20] M. Koshiyama, H. Fujii, M. Kinezaki *et al.*, Immunohistochemical expression of topoisomerase II alpha (Topo IIalpha) and multidrug resistance-associated protein (MPR), plus chemosensitivity testing, as chemotherapeutic indices of ovarian and endometrial carcinomas. *Anticancer Res.* **21** (2001), pp. 2925–2932.
- [21] Topoisomerase II-a amplification as potential predictive marker of complete response to anthracycline-based chemotherapy in locally advanced/metastatic breast cancer. In: F. Cardoso, V. Durbecq, C. Bernard-Marty, G. Rouas, J.-Y. Leroy, M. Mano, R. Giuliani, D. Larsimont, K. Jacobson, M.J. Piccart and A. Di Leo, Editors, *San Antonio Breast Cancer Conference* (2002) [abstract 218] .
- [22] A.M. Afify, B.A. Werness, H.F. Mark *et al.*, HER-2 /neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary serous carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* **66** (1999), pp. 163–169.
- [23] S.R. Young, L. Wei-Hua, B. Jo-Ann and S. Smith, ERB2 and chromosome 17 centromere studies of ovarian cancer by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **16** (1996), pp. 130–137.
- [24] A. Fajac, J. Bernard, C. Lhomme *et al.*, c-erb2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* **64** (1995), pp. 146–151.

- [25] M. Bookman, K. Darcy, D. Clarke-Pearson *et al.*, Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **21** (2003), pp. 283–290.
- [26] V. Durbecq, A. Di Leo, F. Cardoso *et al.*, Comparison of topoisomerase-IIa gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Breast Cancer Res. Treat.* **77** 3 (2003), pp. 199–204.
- [27] D. Gancberg, A. Di Leo, F. Cardoso *et al.*, Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann. Oncol.* **13** (2002), pp. 1036–1043.
- [28] M. Tanner, P. Järvinen, J. Isola *et al.*, Amplification of HER-2/neu and topoisomerase II-a in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* **61** (2001), pp. 5345–5348.
- [29] D.J. Slamon, W. Godephin, L.A. Jones *et al.*, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244** (1989), pp. 707–712.
- [30] X. Zhuag, E. Silva, D. Gershenson *et al.*, Amplification and re-arrangements of c-erb protooncogenes in cancer of human female genital tract. *Oncogene* **4** (1989), pp. 985–989.
- [31] F.D. Kury, C. Schneeberger, G. Sliutz *et al.*, Determination of HER2/neu amplification and expression in tumour tissue and cultured cells using a single phenol free method for nucleic acid isolation. *Oncogene* **5** (1990), pp. 1403–1408.
- [32] J. Zheng, W.R. Robinson, T. Ehlen *et al.*, Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas as the basis of losses of heterozygosity in

chromosomes 3, 6 and 11 and HER2/neu gene amplification. *Cancer Res.* **51** (1991), pp. 4045–4051.

[33] Y. Fukushi, S. Sato, Y. Yokoyhama *et al.*, Detection of numerical aberration in chromosome 17 and c-erbB2 gene amplification in epithelial ovarian cancer using recently established dual color FISH. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **22** (2001), pp. 23–25.

[34] J.S. Ross, F. Yang, B.V.S. Kallakury *et al.*, HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *Am. J. Clin. Pathol.* **11** (1999), pp. 311–316.

[35] A. Seki, M. Yoshinouchi, N. Seki *et al.*, Detection of c-erbB-2 and FGF-3(INT-2) gene amplification in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* **17** (2000), pp. 103–106.

[36] H. Yang, G. Zhang, K. Xu *et al.*, C-erbB-2 gene amplification in human primary epithelial ovarian cancer and its clinical significance. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* **20** (1998), pp. 367ci–370ci.

[37] H. Meden and W. Kuhn, Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER-2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **71** (1997), pp. 173–179.

[38] I. Hellstrom, G. Goodman, J. Pullman *et al.*, Overexpression of HER-2 in ovarian carcinomas. *Cancer Res.* **61** (2001), pp. 2420–2423.

[39] J. Leng, J. Lang, K. Shen and L. Guo, Overexpression of p53, EGFR, c-erbB2 and c-erbB3 in endometrioid carcinoma of the ovary. *Chin. Med. Sci. J.* **12** (1997), pp. 67–70.

- [40] M.B. Anreder, S.M. Freeman, A. Merogi *et al.*, P53, c-erbB2, and PCNA status in benign, proliferative and malignant ovarian surface epithelial neoplasms: a study of 75 cases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **123** (1999), pp. 310–316.
- [41] R. Halperin, S. Zehavis, E. Hadas *et al.*, Immunohistochemical comparison of primary peritoneal and primary ovarian serous papillary carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **20** (2001), pp. 341–345.
- [42] I. Skirnisdottir, B. Sorbe and T. Seidal, The growth factor receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I–II) epithelial ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* **11** (2001), pp. 119–129.
- [43] G. Giaccone, A.F. Gazdar, H. Beck *et al.*, Multidrug sensitivity phenotype of human lung cancer cell associated with topoisomerase II expression. *Cancer Res.* **52** (1992), pp. 1666–1674.
- [44] H. Walter, W. Gotlieb, I. Goldberg *et al.*, Topoisomerase II immunostaining as a prognostic marker for survival in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **82** (2001), pp. 99–104.
- [45] M.J. Costa, C.L. Hansel, J.A. Holden and D. Guinee, Jr., Topoisomerase II alpha: prognostic predictor and cell cycle marker in surface epithelial neoplasms of the ovary and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **19** (2000), pp. 248–257.

Corresponding author. Institut Jules Bordet, Boulevard de Waterloo 125, 1000 ,  
Brussels, , Belgium. Fax: +3225413477.

Quadro 1. Características das pacientes

<i>Tipo histológico</i>	<i>%</i>
Seroso (n=53).....	72,6
Mucinoso (n=4).....	5,5
Mixto (n=1).....	1,4
Endometrióide (n=6).....	8,2
Células claras (n=3).....	4,1
Indiferenciado (n=6).....	8,2
Total (n=73) .....	100,0

*Estágio FIGO*

I (n=13) .....	17,8
II (n=1) .....	1,4
III (n=44) .....	60,3
IV (n=13) .....	17,8
Desconhecido (n=2) .....	2,7
Total (n=73) .....	100,0

Fig. 1. Amplificação do gene e superexpressão da proteína HER-2 (por FISH e IHC, respectivamente).

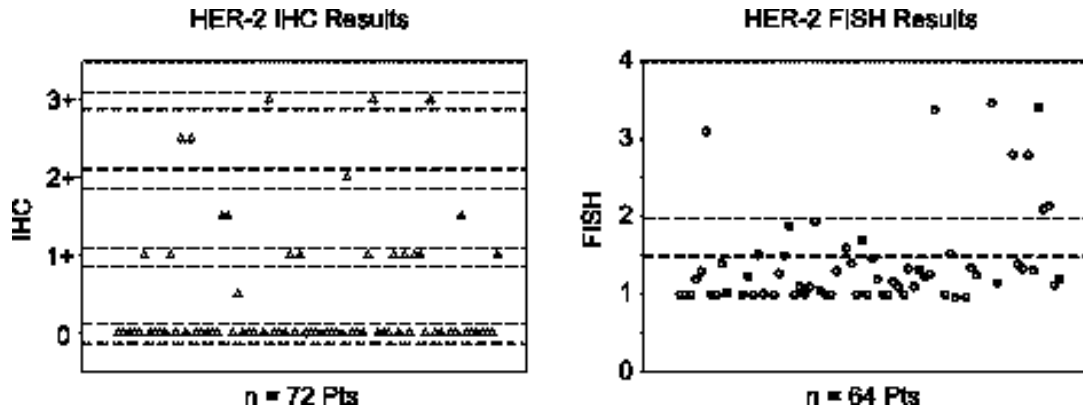


Fig. 2. Amplificação dos genes HER-2 e T2a por FISH (sem correção para o CEP17).

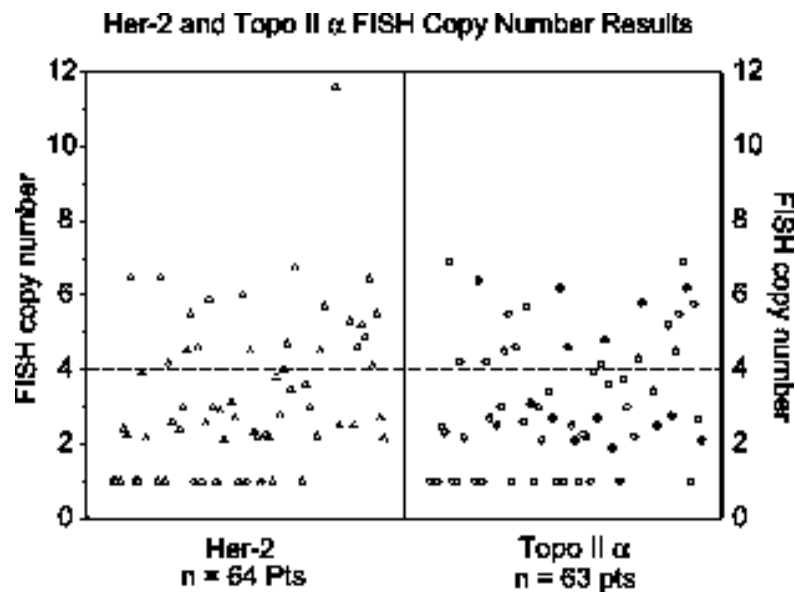


Fig. 3. Ausência de correlação entre amplificação (FISH) e superexpressão (IHC) do HER-2 (analisados como variáveis contínuas); Coeficiente de correlação de Spearman= 0.14 (estatisticamente não diferente de 0;  $P = 0.27$ ;  $n = 62$ ).

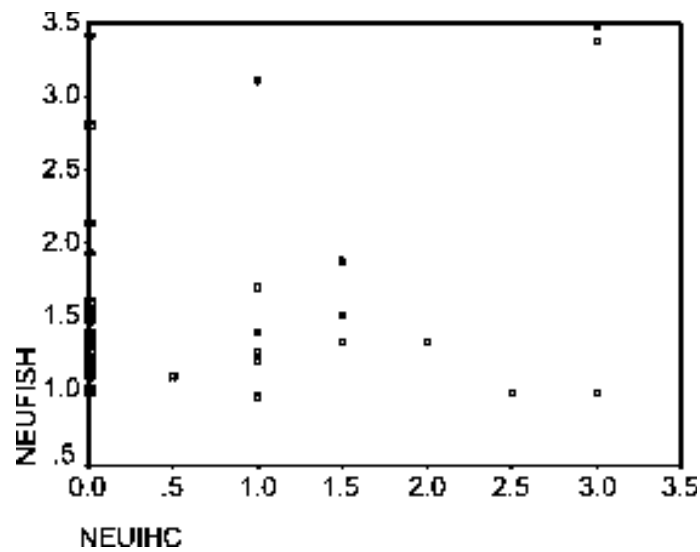


Fig. 4. Amplificação dos genes HER-2 e T2a por FISH (com correção para o CEP17).

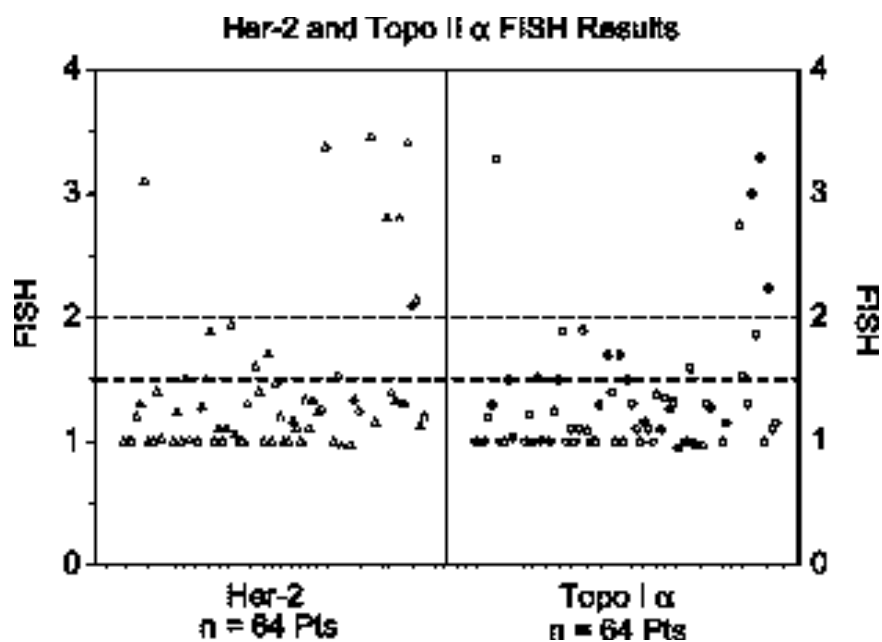


Fig. 5. Modesta correlação entre a amplificação (FISH) e a superexpressão (IHC) da T2a (analisados como variáveis contínuas); Coeficiente de correlação de Spearman= 0.31(estatisticamente diferente de 0; P= 0.01; n=63)

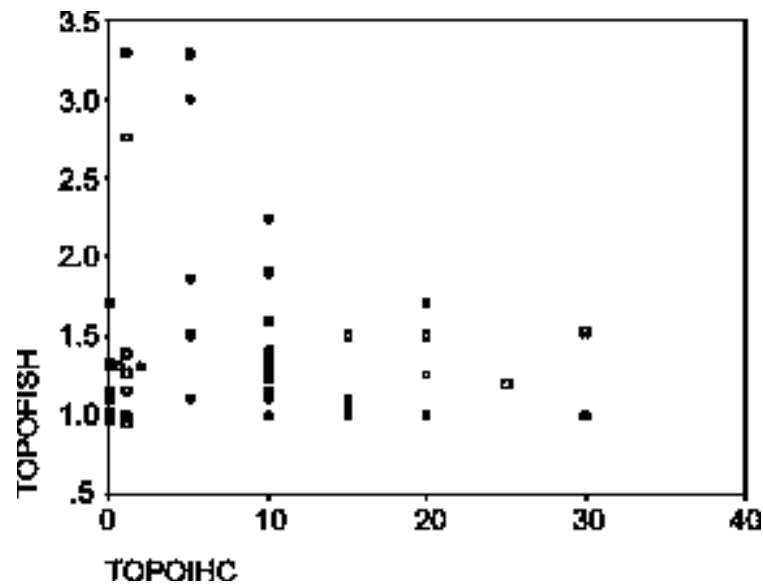


Fig 6. Excelente correlação entre a amplificação dos genes HER-2 e T2a (por FISH), com (à esquerda) e sem (à direita) correção para o CEP17. Coeficiente de Spearman= 0.83 (estatisticamente diferente de 0; P<0.001; n=63 e 0.93 (estatisticamente diferente de 0; P<0.001; n=62), respectivamente.

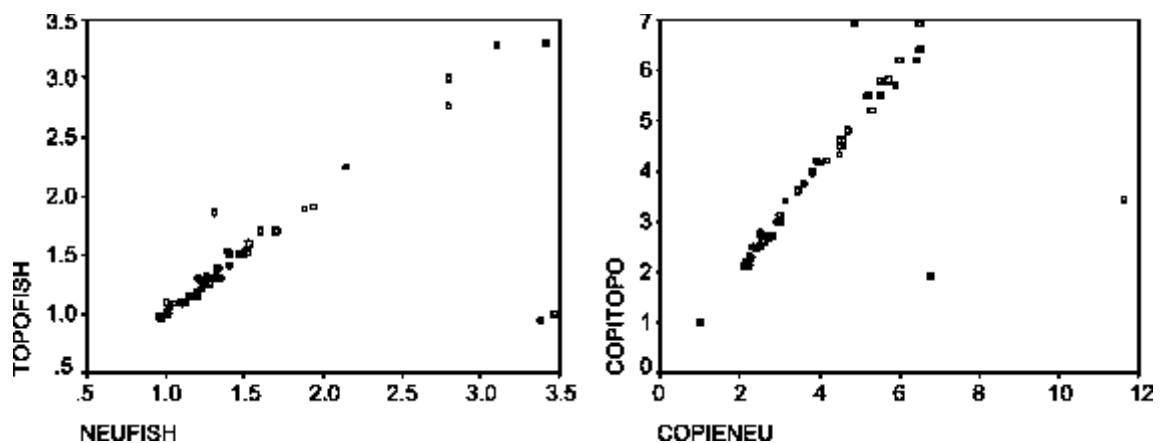
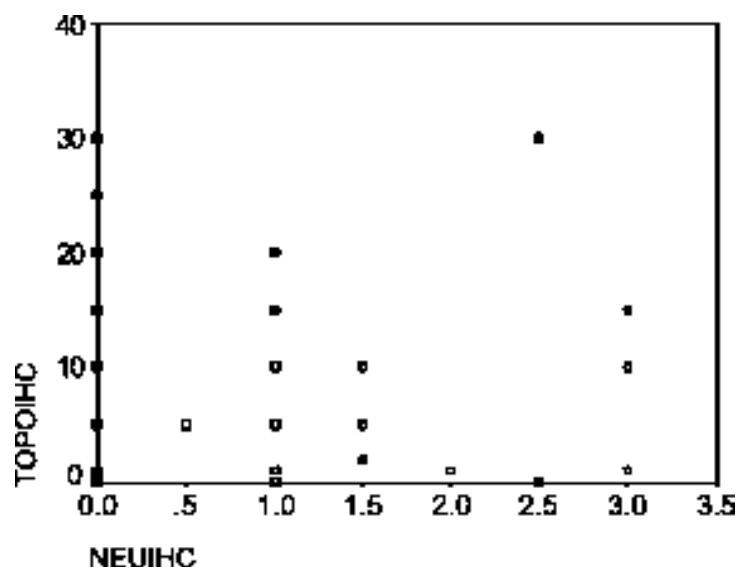




Fig 7. Ausência de correlação entre a superexpressão do HER-2 e da T2a (por IHC); coeficiente de Spearman 0.09 (estatisticamente não diferente de 0, P=0.48; n=70).



### **7.3 Artigo 3 em português**

**Correlação entre amplificação do gene e expressão da proteína topoisomerase-II $\alpha$  em carcinomas de mama HER-2-amplificados**

V. Durbecq<sup>1</sup>, C. Desmedt<sup>1</sup>, M. Paesmans<sup>3</sup>, F. Cardoso<sup>1</sup>, A. Di Leo<sup>1</sup>, M. Mano<sup>1</sup>, G. Rouas<sup>1</sup>, J.-Y. Leroy<sup>1</sup>, C. Sotiriou<sup>1</sup>, M. Piccart<sup>1</sup>, e D. Larsimont<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unidade de Pesquisa Translacional, Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica

<sup>2</sup> Departamento de Patologia, Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica

<sup>3</sup> Centro de Dados do Instituto Jules Bordet, Bruxelas, Bélgica

Recebido no dia 27 de abril de 2004; Aceito no dia 7 de julho de 2004

Correspondência: Christine Desmedt

Departamento de Quimioterapia

Instituto Jules Bordet

Boulevard de Waterloo, 125

1000 Brussels

Belgium

e-mail: [christine.desmedt@bordet.be](mailto:christine.desmedt@bordet.be)

## Resumo

A topoisomerase-II $\alpha$  (topo-II) é um dos alvos moleculares dos inibidores da topo-II, e tem sido considerada um possível marcador preditivo de resposta a estes agentes. O objetivo do presente trabalho é de investigar a correlação entre a amplificação do gene e a expressão da proteína topo-II em 103 amostras de câncer de mama HER-2 amplificados. Os tumores foram avaliados por FISH para amplificação do gene *topo-II* (relação topo-II : CEP17  $\geq 1.5$ ; sonda tripla da Vysis inc.) e, por IHC, para expressão da proteína topo-II (variável contínua; clone KiS1) e Ki-67 (considerado positivo no caso de marcagem em  $>25\%$  das células; clone MIB-1). Uma amplificação do gene topo-II foi observada em 36.9% (38/103) dos casos. Os níveis de amplificação do HER-2 (número de cópias) não mostraram nenhuma correlação com a amplificação da topo-II. A porcentagem média de células positivas para a topo-II por IHC foi de 5% e 10%, para casos topo-II não-amplificados e amplificados, respectivamente. Uma correlação fraca, mas ainda significativa, foi observada entre os níveis de amplificação do gene topo-II e a porcentagem de células positivas por IHC (coeficiente de correlação de Spearman 0.23,  $p=0.02$ ); a correlação entre estas duas variáveis foi mais evidente em tumores Ki-67-positivos. Contrariamente ao HER-2, no qual, no câncer de mama, a amplificação quase sempre se correlaciona com a superexpressão da proteína, a amplificação do gene topo-II não parece necessariamente levar a uma superexpressão da proteína, ao menos quando esta última é avaliada por IHC. Outros fatores, como o índice de proliferação celular,

podem interferir na síntese da proteína topo-II. Embora a grande maioria dos casos de aberrações do gene topo-II ocorram em tumores HER-2 positivos, os níveis de amplificação do HER-2 não predizem uma maior probabilidade de amplificação da topo-II.

**Palavras-chave:** câncer de mama, topoisomerase-II $\alpha$ , amplificação, superexpressão.

## Introdução

O câncer de mama (CM) é uma doença heterogênea, particularmente no que diz respeito à resposta ao tratamento. A avaliação de alvos moleculares das drogas anti-neoplásicas em amostras de tumores pode ser de grande auxílio na seleção do tratamento mais adequado ao paciente. Uma melhor 'individualização' do tratamento pode, por sua vez, aumentar a eficácia deste último e, ao mesmo tempo, reduzir o risco de efeitos adversos, baseada na idéia que indivíduos com baixa probabilidade de resposta não devem ser expostos ao tratamento.

A topoisomerase-II $\alpha$  (topo-II) é uma enzima envolvida no processo de metabolismo do DNA, desempenhando um papel importante na duplicação do DNA, progressão do ciclo celular, recombinação e segregação cromossomial [1]. A topo-II é o alvo biológico das antraciclinas, um dos agentes quimioterápicos mais eficazes no tratamento do CM, mas ,ao mesmo tempo, um dos mais tóxicos.

Estudos in vitro mostraram que a amplificação do gene topo-II leva à superexpressão da proteína topo-II e que a sensibilidade aos inibidores da topo-II é dependente dos níveis de expressão da proteína topo-II nas células tumorais [2-9]. No entanto, o processo de regulação da expressão da topo-II nos tumores sólidos ainda é parcialmente desconhecido, e existem dados preliminares sugerindo que uma correlação entre a amplificação do gene e a superexpressão da proteína topo-II (avaliada por imuno-histoquímica [IHC]) seria observada em somente 60% dos casos [10,11].

No presente estudo, de forma a poder-se estabelecer a correlação entre a amplificação do gene e a superexpressão da proteína topo-II, estes dois parâmetros foram avaliados por hibridização in situ fluorescente (FISH) e IHC, respectivamente. Visto que aberrações do gene topo-II são raramente vistas em tumores Her-2(*Neu/c-erbB2*) negativos [2,12,13], uma série de 103 amostras de CM Her-2 amplificado foi selecionada dos nossos arquivos. A proteína topo-II tem sido descrita como um marcador de proliferação celular em tecidos normais e neoplásicos [14]. Por esta razão, a expressão da topo-II também foi correlacionada com a expressão do marcador de proliferação Ki-67, também analisado por IHC.



## **Materiais e métodos**

### **Seleção das pacientes**

Cento e três amostras de CM Her-2 amplificado foram selecionadas dos arquivos do serviço de anátomo-patologia do Instituto Jules Bordet, para análise de marcadores biológicos. Os genes Her-2 and topo-II foram analisados por FISH, enquanto as proteínas topo-II e Ki-67 foram analisadas por IHC.

### **Hibridização in situ fluorescente (FISH)**

As análises de FISH foram executadas usando a sonda *Vysis Multi-color T2a Spectrum Orange, HER-2 Spectrum Green e CEP 17 Spectrum Aqua* (Vysis, Chicago Il, USA), conforme previamente descrito [15]. A sonda foi fornecida gratuitamente pela empresa 'Vysis'. Resumindo, os espécimes foram desparafinados e incubados em pré-tratamento com solução-tampão a 80°C por 30 min, a 80°C, por 30 min. A digestão enzimática foi realizada com pepsina (10-20 min a 37°C), e as lâminas foram desidratadas em diluições graduadas de etanol. A sonda (10µl) foi aplicada nas lâminas sob proteção. As lâminas foram desnaturadas em conjunto em um prato quente (73°C por 5 min), seguido de hibridização durante a noite, a 37°C. Depois de serem rigorosamente lavadas (2xssc/0.3% Nonidet P-40 a 73°C por 2 min), as lâminas foram contra-coradas com 10 µl de 0.2 µM de 4,6 diamino-2-fenil-indol (DAPI) em solução com *antifade* (Vectashield, Vector Laboratories, Inc,

Burlingame, CA). O FISH foi avaliado com uso de um microscópio de epifluorescência Olympus BX51, equipado como previamente descrito [16]. As partes invasivas do tumor foram circuladas nas lâminas com um diamante, sobrepostas pelos cortes hematoxilina-corados, previamente analisados por um patologista (DL). Sinais de, no mínimo, 60 núcleos não sobrepostos com morfologia intacta foram avaliados para determinar o número médio de sinais/células (proporção entre o número médio de sinais de T2a ou HER-2 e o número médio de sinais de centrômero do cromossomo 17 [cópias/CEP17]). Amplificação do gene Her-2 foi definida como um número relativo de cópias  $\geq 2$  [16]. Amplificação do gene topo-II foi definida como um número relativo de cópias  $\geq 1.5$ , conforme estudos previamente publicados [12,17].

### **Imuno-histoquímica (IHC)**

A expressão da proteína topo-II foi avaliada por IHC, como previamente descrito [18]. Brevemente, os espécimes foram desparafinados, rehidratados e incubados por trinta minutos em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 0.5 % em metanol. Depois do pré-tratamento (0.1 % tripsina em 0.1 %CaCl<sub>2</sub> pH 7.8 por 10 minutos, a 37°), a coloração não específica foi bloqueada pela incubação em soro normal a 10% por 1h a 4°C; todos os passos foram desenvolvidos em solução tampão PBS/0.1% BSA/1%Tween 20. Após incubação com o anticorpo primário (1 $\mu$ g ml<sup>-1</sup> durante a noite a 4°C, clone kiS1, Boehringer-Manheim), as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente com um anticorpo anti-murino biotinilado por 30 minutos, e

estreptavidina-HRP (Zimed) (1/20) por 10 minutos. 3'-3 diaminobenzidina foi usado como cromogênio. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Como controles negativos, foram utilizados cortes em série incubados somente com solução-tampão, ao invés do anticorpo primário. Amostras de amígdala foram usadas como controle positivo. Como nenhum ponto de corte foi até então validado para definir 'positividade' da superexpressão da topo-II, nós analisamos esta variável de forma contínua. As análises foram realizadas de maneira cega (o resultado da avaliação da proteína topo-II era desconhecida à pessoa que analisava a amplificação do gene, e vice-versa).

A avaliação do Ki-67 foi feita por IHC, utilizando-se o anticorpo monoclonal murino MIB-1 (1/50, DAKO, Carpinteria, CA). Resumidamente, os espécimes foram desparafinados e rehidratados. Em seguida, um método de recuperação antigênica por micro-ondas (duas vezes 10 min a 650W) em citrato tampão pH6 foi aplicado, antes do uso do imuno-marcador automatizado 'Ventana Nexes', com reagentes 'Nexes' padrão, recomendados pelo fabricante (Ventana Medical Systems, Tucson, Az). Um índice de >25% foi usado para definição de 'tumor proliferativo'. Este ponto de corte foi calculado como a média da porcentagem de células marcadas (cada porcentagem individual baseada na porcentagem de células positivas em cada amostra analisada).

## **Análise estatística**

O estudo consiste na observação de quatro variáveis similares a variáveis contínuas, embora a medida seja discreta, mas com muitas categorias para as avaliações feitas por IHC. Para três destas variáveis (amplificação dos genes Her-2 e topo-II, expressão da proteína Ki-67), existe um ponto de corte descrito na literatura para definição de amplificação ou positividade. Estas variáveis foram tratadas por meio de uma representação contínua ou binária, de acordo com os pontos de corte. Para a proteína topo-II, analisada por IHC, não existe um ponto de corte estabelecido para definição de positividade. Portanto, esta variável foi somente analisada de forma contínua.

Visto que as observações contínuas não puderam ser consideradas como oriundas de uma distribuição normal (confirmadas por testes de Kolmogorov-Smirnov), usamos métodos não paramétricos para analisar os resultados. Os coeficientes de correlação de postos de Spearman foram calculados para analisar 2 variáveis contínuas; testes de Mann-Whitney foram usados para comparar as distribuições de uma variável contínua de maneira binária, e testes exatos de Fisher permitiram a avaliação da associação entre duas variáveis binárias. Todos os valores de 'p' foram bilaterais e o nível de significância foi estabelecido a 5%.

## **Resultados**

### **Características da população Her-2 amplificada**

Análises do gene topo-II foram realizadas, por FISH, em 103 amostras parafinadas de carcinomas de mama Her-2 amplificados. Os valores médios da relação cópias do gene / CEP17 foram de 6.7 [intervalos de confiança (IC): 2.04-14.6] para o Her-2 e 1.08 [IC: 0.35- 9.1] para a topo-II (tabela 1).

A avaliação das proteínas topo-II e Ki-67 foi realizada por IHC. As análises foram não-contributivas em 5 e 7 amostras, respectivamente. A porcentagem média de células marcadas (positivas) foi de 10% [IC: 0-50] para a topo-II e 15% [IC: 0-69] para o Ki-67. Um terço dos tumores foram considerados altamente proliferativos, com >25% das células positivas para o Ki-67 (tabela 1).

### **Correlação entre os genes Her-2 e topo-II**

Entre os 103 casos de carcinomas de mama Her-2 amplificados, 38 (36.9%) foram considerados topo-II amplificados por FISH. O valor médio de amplificação foi de 3.7 [IC: 1.67-9.10] (tabela 1 e Fig. 1). O valor de amplificação exato foi desconhecido no caso de uma amostra, que foi, no entanto, identificada como amplificada. O valor médio de amplificação do Her-2 foi de 6.17 [IC: 2.04-9.80] no grupo topo-II amplificado e de 7.11 [IC: 2.74-14.60] no grupo topo-II não-amplificado (Tabela 1). Portanto, os valores de amplificação do HER-2 (isto é, a relação número de cópias

do gene / CEP17) pareceram menores em amostras apresentando uma co-amplificação do gene topo-II. As diferenças observadas foram estatisticamente significativas (teste de Mann-Whitney,  $p=0.002$ ).

### **Correlação entre o gene e a proteína topo-II**

Análises imuno-histoquímicas da topo-II foram realizadas em amostras topo-II amplificadas e não-amplificadas (Fig. 2). As análises foram não contributivas em 1 (2.6%) das 38 amostras topo-II amplificadas e 4 (6.2%) das 65 amostras topo-II não-amplificadas. A porcentagem média de células positivas para a topo-II por IHC (casos avaliáveis), nas amostras topo-II amplificadas e não-amplificadas, foi de 10% [IC: 0-40] e 5% [IC: 0-50], respectivamente (tabela 1 e Fig. 2). A porcentagem de células positivas para a topo-II foi estatisticamente maior na presença de uma amplificação do gene topo-II (teste de Mann-Whitney,  $p=0.006$ ). Considerando-se a porcentagem de células topo-II positivas e os níveis de amplificação do gene topo-II (isto é, a relação número de cópias do gene / CEP17) como variáveis contínuas, a expressão da proteína topo-II correlacionou-se de maneira fraca, mas ainda significativa, com a amplificação do gene topo-II (coeficiente de correlação de Spearman 0.23,  $p=0.02$ ).

### **Correlação entre a topo-II e Ki-67**

O marcador de proliferação celular Ki-67, que pode também influenciar a síntese da proteína topo-II, foi analisado por IHC. Como citado acima, 1 (2.6%) das 38 amostras topo-II amplificadas e 6 (9.2%) das 65 amostras topo-II não-amplificadas não puderam ser avaliadas para expressão do Ki-67 (tabela 1).

Dez (27%) das 38 amostras topo-II amplificadas e 18 (30.5%) das 65 amostras topo-II não-amplificadas foram positivas para o Ki-67. A percentagem média de células positivas para o Ki-67 nas amostras topo-II amplificadas e não-amplificadas foi de 20% [IC: 0-69] e 15% [IC: 0-55], respectivamente (Tabela 1). Os níveis de expressão do Ki-67 não foram estatisticamente diferentes entre estas duas populações ( $p=0.47$ ). Não foi observada nenhuma correlação significativa entre a expressão do Ki-67 e a amplificação do gene topo-II (coeficiente de correlação de  $-0.02$ ;  $p=0.88$ ).

A percentagem média de células positivas para a topo-II foi de 10%, para ambos os grupos de tumores Ki-67 positivos e negativos. Não foi observada qualquer diferença significativa na distribuição da percentagem de células topo-II positivas ( $p=0.14$ ). No entanto, quando estes dois marcadores foram analisados como variáveis contínuas, uma correlação significativa foi observada entre a expressão da topo-II e do Ki-67 (coeficiente de correlação  $0.34$ ,  $p=0.001$ ) (Fig. 3).

Considerando-se somente os casos Ki-67-positivos, o grupo topo-II amplificado apresentou uma maior percentagem média de células topo-II positivas, em relação ao grupo topo-II não-amplificado (25% contra 10%;  $p=0.005$  pelo teste de Mann-Whitney). Esta conclusão não permaneceu válida para os casos Ki-67

negativos, nos quais não houve diferença significativa na distribuição dos níveis de proteína topo-II, de acordo com a amplificação do gene topo-II ( $p=0.30$ ) (Fig. 4).



## Discussão

Alguns estudos têm sugerido que a amplificação do gene topo-II ocorre principalmente em tumores Her-2 amplificados [2,12], e que o valor preditivo do Her-2 em relação à resposta à quimioterapia com antraciclinas pode ser explicado pela co-amplificação do gene topo-II [10,11,19]. Apesar da relação íntima entre os genes Her-2 e topo-II (de localização próxima no braço longo do cromossomo 17), os valores (níveis) de amplificação do Her-2 (relação número de cópias do gene/CEP17) não se mostraram preditivos da amplificação do gene topo-II, neste estudo. Além disso, os valores de amplificação do Her-2 parecem menores em pacientes com co-amplificação do gene topo-II. Este fato já havia sido constatado por Smith *et al* [3], e pode ser devido ao fato que eventos iniciais no processo de amplificação envolvam áreas relativamente extensas de um cromossomo, enquanto eventos tardios resultem na deleção de áreas extensas localizadas entre os genes, resultando num processo de vantagem seletiva. Portanto, os casos com valores de amplificação mais elevados podem ter sofrido um número maior de eventos, eliminando genes 'passageiros'; desta forma, os casos com valores de amplificação menores teriam uma maior probabilidade de co-amplificação [20,21].

Contrariamente ao gene Her-2, no qual a amplificação é quase sempre associada à superexpressão da proteína (próximo de 100% dos casos, no CM) [22], a amplificação do gene topo-II não leva necessariamente à superexpressão da proteína, ao menos quando esta última é avaliada por IHC. No presente estudo, a

porcentagem de células topo-II positivas mostrou uma fraca correlação com os valores de amplificação do gene topo-II. Recentemente, um outro estudo também mostrou uma certa discordância entre amplificação e expressão da topo-II, visto que quatro de seis amostras topo-II amplificadas não mostraram supressão da proteína [10]. Em amostras de carcinoma de ovário, uma fraca correlação foi observada entre amplificação e expressão da topo-II [23,24]. Além disso, no câncer de ovário, vários casos de amplificação do Her-2 não resultaram em superexpressão da proteína, contrariamente ao que tem sido descrito no CM [24,25]. MYC é um outro exemplo no qual nenhuma relação significativa foi observada entre amplificação do gene e transcrição (avaliadas por RT-PCR, em amostras de CM) [26]. A super-transcrição do MYC não parece ser consequência de um maior número de cópias do gene mas, de maneira similar às nossas próprias observações em relação à topo-II, parece ser mais ligada à atividade do Ki-67 [27]. Em resumo, a correlação entre amplificação do gene e superexpressão da proteína é complexa e variável entre os diferentes marcadores biológicos, podendo, inclusive, para um mesmo marcador, variar em função do tecido de origem da neoplasia.

No CM, no qual os níveis de expressão da proteína HER-2 dependem quase que exclusivamente do número de cópias do gene Her-2 [28], a expressão da proteína topo-II é regulada em múltiplas etapas (transcrição, pós-transcrição, pós-translação), por diversos tipos de sinais. A regulação, a nível transcricional, tem sido demonstrada em diversas circunstâncias, incluindo a síndrome do choque térmico [29], condições de estresse fisiológico como abstinência de glucose e hipóxia [30], expressão de certos oncogenes como *ras* [31], *myb* [32] e *p53* [32,33], e confluência

celular [34]. Sequências internas do promotor da topo-II que influenciam a regulação decrescente confluência-induzida também têm sido identificadas [35]. O impacto da proliferação celular na transcrição parece ser importante, visto as diferenças significativas detectadas, no nosso estudo, nos níveis de expressão da proteína topo-II, em função da amplificação do gene topo-II (correlação significativa somente no grupo de amostras altamente proliferativas, definido como Ki-67 >25%). No entanto, o índice proliferativo não deve ser o único fator determinante, visto que amostras altamente positivas para a topo-II (até 40% dos casos, em tumores topo-II amplificados e não-amplificados) foram também observadas em tumores Ki-67-negativos, reforçando a noção de que a expressão da proteína topo-II é um processo relativamente complexo.

Um dos fatores implicados na regulação descendente da transcrição para o promotor da topo-II é a proteína p53. A principal função desta proteína supressora de tumores é induzir a parada do ciclo celular nos pontos de checagem G1 e/ou G2, em resposta a um dano ao DNA [36,37]. A proteína p53 é também um iniciador do processo de morte celular programada conhecido por apoptose [38]. A superprodução de topo-II em células proliferativas pode resultar em recombinação inadequada do DNA. Em células com níveis normais de p53, esta última pode levar à parada do ciclo celular e morte celular através da indução da apoptose. Além disso, a proteína p53 pode também levar a uma regulação descendente da expressão da proteína topo-II, através de uma repressão direta do promotor [33]. A transcrição do promotor da topo-II pode ser reduzida (15 vezes) pela proteína p53 funcional, de uma maneira concentração-dependente [39]. A perda ou inativação da proteína p53

funcional pode reduzir a supressão regulatória normal da topo-II e contribuir com a abolição de pontos de checagem normais, aumento da proliferação celular, e alterações na estabilidade do genôma (re-arranjo cromossômico e/ou amplificação de genes) [39].

Adicionalmente, a proteína topo-II ocorre nas células numa forma fosforilada, e estudos *in vitro* têm mostrado uma correlação entre fosforilação e atividade catalítica da topo-II [40,41]. Esta regulação pós-translacional pode complicar ainda mais a avaliação da expressão da topo-II.

Finalmente, um outro fator que pode também explicar a fraca correlação entre amplificação e superexpressão da topo-II é a limitação técnica do método IHC. Este problema já foi citado em outros estudos comparando os testes FISH e IHC para detecção do Her-2, e foi atribuído à degradação da proteína no material armazenado em blocos de parafina [42]. Por outro lado, o método FISH, definido como a relação entre o número médio de cópias do gene e do CEP17, pode falhar em identificar casos de tumores com número elevado de cópias do gene topo-II, devido a uma polissomia do cromossomo 17. No nosso estudo, estes casos foram definidos como não-amplificados, mesmo se eles apresentavam um número alto de cópias do gene topo-II, que pode ser ao menos parcialmente responsável pela síntese da proteína topo-II.

Estudos pré-clínicos mostraram que a amplificação do gene topo-II leva à superexpressão da proteína, que, por sua vez, tornaria as células mais sensíveis aos inibidores da topo-II [2-9]. Os nossos resultados sugerem que, em carcinomas de

mama, este processo seja mais complexo e deva envolver outras vias celulares, incluindo apoptose e proliferação.

Quatro padrões distintos foram identificados, no que diz respeito ao marcador biológico topo-II: a) gene topo-II amplificado/ proteína superexpressa; b) gene topo-II não-amplificado/ proteína não-superexpressa; c) gene topo-II amplificado/ proteína não-superexpressa; d) gene topo-II não-amplificado/ proteína superexpressa. Embora dados clínicos e pré-clínicos preliminares sugiram que os primeiros dois padrões possam ser úteis como marcadores preditivos de resposta às antraciclinas, a utilidade dos últimos dois padrões é atualmente desconhecida.

Do ponto de vista biológico, a expressão da proteína topo-II é crucial, pois esta é o alvo molecular das antraciclinas. Este fato reforça o interesse na investigação da topo-II como um marcador preditivo potencial. No entanto, visto que a expressão da proteína é principalmente um indicador do índice de proliferação tumoral, é possível que ela deva ser considerada somente como um marcador inespecífico de resposta à quimioterapia. Por outro lado, talvez a amplificação do gene topo-II seja um marcador mais específico de resposta às antraciclinas, por não ser influenciado por outros fatores. Por esta razão, o FISH pode ser considerado um método mais interessante para avaliação da topo-II em tumores. Contudo, o valor preditivo da amplificação da topo-II, na ausência de superexpressão da proteína, ainda não é bem conhecido. É possível, portanto, formular-se a hipótese que ,tanto o gene quanto a proteína topo-II, possam ser fatores preditivos potenciais de resposta às antraciclinas. A proteína topo-II pode ser um marcador biológico interessante

principalmente em tumores topo-II não-amplificados (aproximadamente 95% dos casos de CM).

Dois grandes estudos, coordenados pelo Instituto Jules Bordet, estão atualmente avaliando o valor preditivo do gene e da proteína topo-II, em relação à eficácia das antraciclinas em pacientes com CM. O primeiro é uma meta-análise de quatro estudos, com um total de 4600 pacientes, que compararam o regime CMF a um tratamento baseado em antraciclinas no contexto adjuvante; além da coleta dos dados clínicos, haverá também uma coleta de material biológico, que será analisado de forma centralizada. Análises do gene e da proteína topo-II serão realizadas em todos os tumores Her-2 positivos, e em algumas amostras de tumores Her-2 negativos. O segundo estudo, conhecido como 'TOP' (isto é, *trial of principle*), consiste numa avaliação prospectiva do valor preditivo do gene e da proteína topo-II em aproximadamente 400 pacientes, diagnosticados com CM operável. Estes pacientes recebem 4 ciclos de epirubicina como tratamento neoadjuvante, seguido de cirurgia. A hipótese do estudo é que as taxas de resposta patológica completa, após 4 ciclos de epirubicina, serão maiores em pacientes com tumores topo-II positivos (pCR= 35-40% versus 10%). Além disso, o estudo também deverá avaliar a interação complexa entre os marcadores biológicos topo-II e p53.

Em resumo, o presente estudo formula as seguintes hipóteses: a) a proteína topo-II, avaliada por IHC, não está necessariamente superexpressa na presença de uma amplificação do gene topo-II; b) outros fatores, mais especificamente a proliferação tumoral, podem interferir com a expressão da proteína topo-II; c) embora

a grande maioria dos casos de aberrações do gene topo-II ocorram em tumores Her-2 positivos, os valores de amplificação (número de cópias) do gene Her-2 não parecem ser preditivos da amplificação do gene topo-II. Dois projetos atualmente em andamento na nossa instituição poderão levar a uma melhor compreensão do papel do HER-2 (a meta-análise) e da topo-II (ambos os estudos), como fatores preditivos de resposta às antraciclinas.

**Reconhecimento:** Os autores gostariam de agradecer “*Les Amis de l’Institut Jules Bordet*” pelo suporte ao presente estudo.

## Referências

- [1] Sperry AO, Blasquez VC, Garrard WT: Dysfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association regions and topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5497-5501, 1989
- [2] Jarvinen TAH, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J: Amplification and deletion of topoisomerase II $\alpha$  associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 156: 839-847, 2000
- [3] Smith K, Houlbrook S, Greenall M, Carmichael J, Harris AL: Topoisomerase II $\alpha$  co-amplification with erbB2 in human primary breast cancer and breast cancer cell lines: relationship to m-AMSA and mitoxantrone sensitivity. *Oncogene* 8: 933-938, 1993
- [4] Harris LN, Yang L, Liotcheva V, Pauli S, Iglehart JD, Colvin OM, Hsieh TS : Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7: 1497-1504, 2001
- [5] Vassetzky YS, Alghisi GCR, Roberts E, Gasser SM: Ectopic expression of inactive forms of yeast DNA topoisomerase II confers resistance to the anti-tumor drug-etoposide. *Br J Cancer* 73: 1201-1209, 1996
- [6] Asano T, An T, Zwelling LA, Takano H, Fojo AT, Kleinerman ES: Transfection of a human topoisomerase II alpha gene into etoposide-resistant human breast tumor cells sensitizes the cells to etoposide. *Oncol Res* 8: 101-110, 1996



- [7] Withoff S, de Vries EG, Keith WN, Nienhuis EF, van der Graaf WT, Uges DR, Mulder NH: Differential expression of DNA topoisomerase II $\alpha$  and  $\beta$  in P-gn and MRP-negative VM26, mAMSA and mitoxantrone-resistant sublines of the human SCLC cell line GLC. *Br J Cancer* 74: 1869-1876, 1996
- [8] Withoff S, Keith WN, Knol AJ, Coutts JC, Hoare SF, Mulder NH, de Vries EG: Selection of a subpopulation with fewer DNA topoisomerase II $\alpha$  gene copies in a doxorubicin-resistant cell line panel. *Br J Cancer* 74: 502-507, 1996
- [9] Mo YY, Ameiss KA, Beck WT: Overexpression of human DNA topoisomerase II $\alpha$  by fusion to enhanced green fluorescent protein. *Biotechniques* 25: 1052-1057, 1998
- [10] Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta V, Fronda G, Preisler HD: Amplification and overexpression of topoisomerase II $\alpha$  predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 8: 1061-1067, 2002
- [11] Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, Paesmans M, Leroy JY, Rouas G, Sotiriou C, Renard N, Richard V, Piccart MJ, Di Leo A: Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II- $\alpha$  gene amplification and protein overexpression in locally advanced /metastatic breast cancer. *Int J Oncol* 24: 201-209, 2004
- [12] Jarvinen TA, Tanner M, Barlund M, Borg A, Isola J: Characterization of topoisomerase II $\alpha$  gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 142-150, 1999

- [13] Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, Balslev E, Knoop A, Ejlersen B, Nielsen KV, Schonau A, Overgaard J; Danish Breast Cancer Cooperative Group: Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol* 43: 35-42, 2004
- [14] Lynch BJ, Guinee DG, Holden JA: Human DNA topoisomerase II- $\alpha$ : a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 28: 1180-1188, 1997
- [15] Durbecq V, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Leroy JY, Piccart M, Larsimont D: Comparison of Topoisomerase-II $\alpha$  gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Breast Cancer Res Treat* 2477: 199-204, 2003
- [16] Gancberg D, Di leo A, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M, Verhest A, Bernard-Marty C, Piccart MJ, Larsimont D: Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 13: 1036-1043, 2002
- [17] Tanner M, Järvinen P, Isola J: Amplification of HER-2/neu and topoisomerase II $\alpha$  in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 61: 5345-5348, 2001
- [18] Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Jarvinen T, Beauduin M, Vindevoghel A, Michel J, Focan CH, Ries F, Gobert PH, Closon-Dejardin MT, Dolci S, Rouas G, Paesmans M, Lobelle JP, Isola J, Piccart MJ: HER-2 and topoisomerase II $\alpha$  as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol* 12: 1081-1089, 2001

- [19] Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, Tanner M, Jarvinen T, Rouas G, Dolci S, Leroy JY, Paesmans M, Isola J, Piccart MJ: HER-2 amplification and topoisomerase II $\alpha$  gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 8: 1107-16, 2002
- [20] Smith KA, Gorman PA, Stark MB, Groves RP, Stark GR: Distinctive chromosomal structures are formed very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Cell* 63: 1219-1227, 1990
- [21] Windle B, Draper BW, Yin Y, O’Gorman S, Wahl GM: A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplicon integration. *Genes Dev* 5: 160-174, 1991
- [22] Farabegoli F, Ceccarelli C, Santini D, Baldini N, Taffurelli M, Marrano D, Trere D, Derenzini M: c-erbB-2 over-expression in amplified and non-amplified breast carcinoma samples. *Int J Cancer* 84: 273-277, 1999
- [23] Van der Zee AG, de Vries EG, Hollema H, Kaye SB, Brown R, Keith WN: Molecular analysis of the topoisomerase II alpha gene and its expression in human ovarian cancer. *Ann Oncol* 5: 75-81, 1994
- [24] Mano M, Awada A, Di Leo A, Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F, Larsimont D, Piccart M: Rates of topoisomerase II- $\alpha$  and Her-2 genes amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 92: 887-895, 2004

- [25] Fajac A, Bernard J, Lhomme C, Rey A, Duvillard P, Rochard F, Bernaudin JF, Riou G: *c-erb2* gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis. *Int J Cancer* 64: 146-51, 1995
- [26] Bièche I, Laurendeau I, Tozlu S, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M: Quantification of Myc gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription PCR assay. *Cancer Res* 59: 2759-2765, 1999
- [27] Pavelic ZP, Pavelic L, Lower EE, Gapany M, Gapany S, Barker EA, Preisler HD: *c-myc*, *c-erbB2* and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and non invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 52: 2597-2602, 1992
- [28] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancers. *Science* 244: 707-12, 1989
- [29] Furukawa M, Uchiumi T, Nomoto M, Takano H, Morimoto RI, Naito S, Kuwano M, Kohno K: The role of an inverted CCAAT element in transcriptional activation of the human DNA topoisomerase II alpha gene by heat shock. *J Biol Chem* 273: 10550-10555, 1998
- [30] Tomida A, Tsuruo T: Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors. *Anticancer Drug Des* 14: 169-177, 1999
- [31] Chen G, Templeton D, Suttle DP, Stacey DW: Ras stimulates DNA topoisomerase II alpha through MEK: A link between oncogenic signaling and a therapeutic target. *Oncogene* 18: 149-160, 1999

- [32] Brandt TL, Fraser DJ, Leal S, Halandras PM, Kroll AR, Kroll DJ: C-Myb trans-activates the human DNA topoisomerase II $\alpha$  gene promoter. *J Biol Chem* 272: 6278-6284, 1997
- [33] Sandri MI, Isaacs RJ, Ongkeko WM, Harris AL, Hickson ID, Broggin M, Vikhanskaya F: p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase II $\alpha$  gene. *Nucleic Acids Res* 24: 4464-4470, 1996
- [34] Isaacs RJ, Harris AL, Hickson ID: Regulation of the human topoisomerase II $\alpha$  gene promoter in confluence-arrested cells. *J Biol Chem* 271: 16741-16747, 1996
- [35] Tolner B, Hartley JA, Hochhauser D: Transcriptional regulation of topoisomerase II $\alpha$  at confluence and pharmacological modulation of expression by bis-benzimidazole drugs. *Mol Pharmacol* 59: 699-706, 2001
- [36] Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311, 1991
- [37] Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71: 587-597, 1992
- [38] Lu X, Lane DP: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 75: 765-778, 1993
- [39] Wang Q, Zambetti GP, Suttle DP: Inhibition of DNA Topoisomerase II $\alpha$  gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17: 389-397, 1997

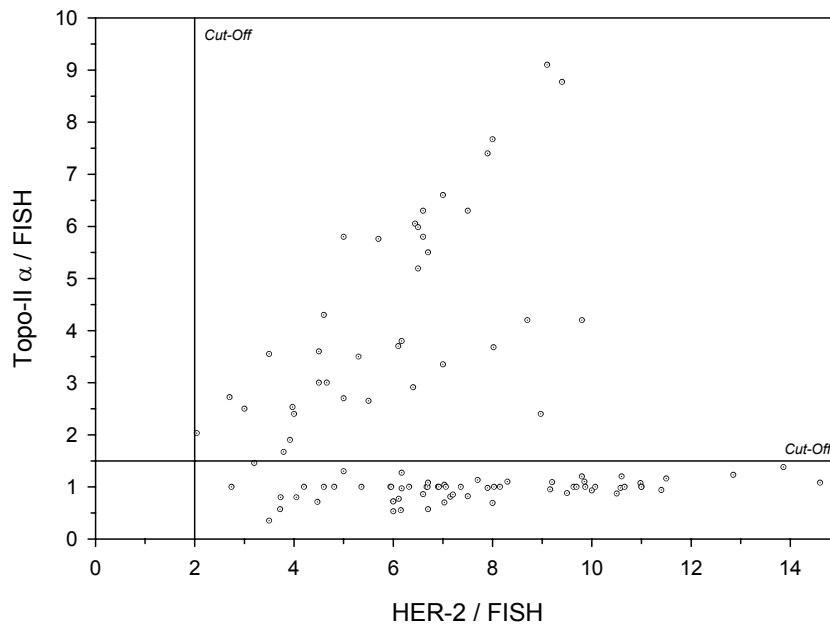
- [40] Heck MMS, Hittleman WN, Earnshaw WC: In vivo phosphorylation of the 170kDa form of eukaryotic DNA topoisomerase II. J Biol Chem 264: 15161-15164, 1989
- [41] Wells NJ, Fry AM, Guano F, Norbury C, Hickson ID: Cell cycle phase-specific phosphorylation of human topoisomerase II alpha. Evidence of a role for protein kinase C. J Biol Chem 270: 28357-28363, 1995
- [42] Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ: 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

Tabela 1. Avaliação dos marcadores biológicos

	<b>Topo-II Ampl.</b> (Relação $\geq 1.5$ )	<b>Topo-II Não-Ampl.</b> (Relação $< 1.5$ )	<b>População Total</b>
	38 Pts. (36.9 %)	65 Pts. (63.1 %)	103 (100.0 %)
<b>Her-2 FISH</b>			
Mediana da Relação [Amplitude]	37 Pts. (97.4 %) 6.17 [2.04 – 9.80]	64 Pts. (98.5 %) 7.11 [2.74 – 14.60]	101 Pts. (98.1 %) 6.70 [2.04 – 14.60]
Média da Relação	5.98	7.69	7.06
Relação UK	1 Pt. (2.6 %)	1 Pt. (1.5 %)	2 Pts. (1.9 %)
<b>Topo-II IHC</b>			
Mediana% [Amplitude]	37 Pts. (97.4 %) 10 [0 – 40]	61 Pts. (93.8 %) 5 [0 – 50]	98 Pts. (95.1 %) 10 [0 – 50]
Média %	15.16	9.67	11.74
No. % UK	1 Pt. (2.6 %)	4 Pts. (6.2 %)	5 Pts. (4.9 %)
<b>Topo-II FISH</b>			
Mediana da Relação [Amplitude]	37 Pts. (97.4 %) 3.70 [1.67 – 9.10]	65 Pts. (100.0 %) 1.00 [0.35 – 1.46]	102 Pts. (99.0 %) 1.08 [0.35 – 9.10]
Média da Relação	4.39	0.96	2.20
No. Relação UK	1 Pt. (2.6 %)	0 Pt. (0.0 %)	1 Pt. (1.0 %)
<b>KI 67</b>			
Mediana% [Amplitude]	37 Pts. (97.4) 20.0 [0 – 69]	59 Pts. (90.8 %) 15.0 [0 – 55]	96 Pts. (93.2 %) 15.0 [0 – 69]
Média %	20.59	17.95	18.97
$\leq 25$ %			
Mediana% [Amplitude]	27 Pts. (73.0 %) 10.0 [0 – 25]	41 Pts. (69.5 %) 10.0 [0 – 25]	68 Pts. (70.8 %) 10.0 [0 – 25]
Média %	12.04	9.71	10.63
$> 25$ %			
Mediana% [Amplitude]	10 Pts. (27.0 %) 42.5 [30 – 69]	18 Pts. (30.5 %) 30.0 [26 – 55]	28 Pts. (29.2 %) 40.0 [26 – 69]
Média %	43.70	36.72	39.21
No. % UK	1 Pt. (2.6 %)	6 Pts. (9.2 %)	7 Pts. (6.8 %)

Figura 1. Correlação entre a amplificação do Her-2 e da T2A

Correlation between HER-2 and Topo-II  $\alpha$  genes amplification



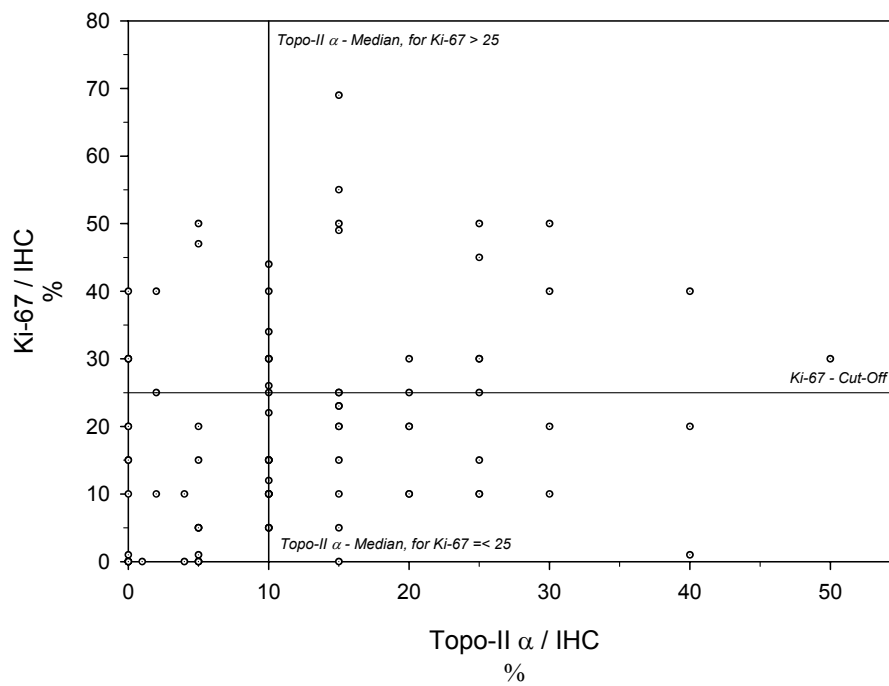
**Note:** certain points can correspond to several patients, those presenting identical results (or approximative) for the presented markers.





Figura 3. Correlação entre a expressão das proteínas topo-II e Ki-67

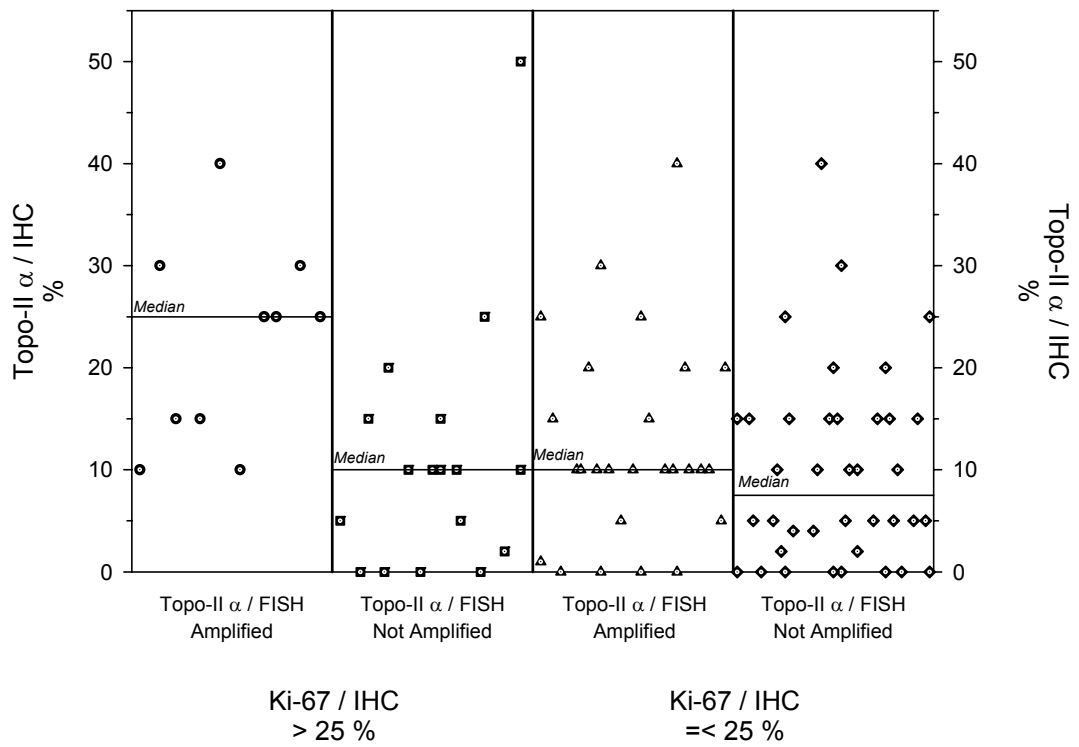
Correlation between Topo-II  $\alpha$  and Ki-67 proteins expression



**Note:** certain points can correspond to several patients, those presenting identical results (or approximative) for the presented markers

Figura 4. Distribuição da expressão da topo-II na população topo-II amplificada e não-amplificada

Topo-II  $\alpha$  percentage distribution in Topo-II  $\alpha$  amplified and not amplified population



## **8. Considerações finais e perspectivas**

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

### Artigo 2 (CO).

A avaliação da amplificação e da superexpressão do Her-2 e da T2A, por FISH e IHC, respectivamente, é realizável em amostras de CO fixadas em parafina. Foi observada uma boa correlação entre a amplificação dos genes Her-2 e T2A, quando analisadas como variáveis contínuas. A correlação entre amplificação dos genes Her-2 e T2A e suas respectivas proteínas foi, em geral, fraca. A amplificação do Her-2 parece ser mais frequente do que a sua superexpressão, mas as taxas de amplificação variam em função do ponto de corte utilizado. As taxas de amplificação dos genes Her-2 e T2A são mais elevadas quando não é realizada correção para o número de cópias do CEP17, devido, provavelmente, a uma alta prevalência de casos de polissomia do CEP17 nesta doença. Além disso, a realização dos testes foi, por vezes, complicada pela heterogeneidade na marcagem. Finalmente, encontramos uma boa correlação entre amplificação da T2A e estágio clínico avançado, sugerindo que a primeira possa ser um marcador prognóstico nesta doença, ou simplesmente um evento de ocorrência tardia na evolução do CO. No entanto, o número de casos analisados neste estudo foi insuficiente para sustentar tais conclusões.

No futuro, a amplificação e/ou superexpressão do Her-2 e da T2A, analisadas por FISH e IHC, respectivamente, poderão ser utilizadas para uma avaliação em mais larga escala do valor preditivo e prognóstico destes marcadores no CO. No entanto, estudos adicionais serão necessários para determinar o melhor ponto de corte para estes marcadores. O nosso grupo pretende realizar outros estudos translacionais, avaliando o valor destes marcadores, particularmente da amplificação da T2A, na predição de resposta à quimioterapia baseada em antraciclinas, como a doxorubicina liposomal peguilada (frequentemente utilizada como tratamento de segunda ou terceira linha no CO), ou a epirubicina, que, em dois estudos randomizados, não mostrou qualquer vantagem sobre o tratamento padrão numa população de pacientes não-selecionadas. Finalmente, tais estudos deverão investigar a hipótese que pacientes com doença mais avançada se beneficiem particularmente de um tratamento contendo antraciclinas, devido a uma maior prevalência de amplificação da T2A nestes tumores. Os nossos dados também sugerem que o valor prognóstico da amplificação da T2A no CO deva ser mais amplamente investigado.

### Artigo 3 (CM).

Uma amplificação da T2A foi observada em 37% das amostras com amplificação do Her-2, o que é compatível com resultados de outros estudos. Contrariamente ao Her-2, no qual, ao menos no CM, a amplificação do gene quase sempre se correlaciona com a superexpressão da proteína, a amplificação do gene T2A não parece necessariamente levar à superexpressão da proteína, ao menos

quando esta última é avaliada por IHC. Outros fatores, como o índice de proliferação celular, podem interferir na síntese da proteína T2A. Embora a grande maioria dos casos de aberrações do gene T2A ocorram em tumores Her-2 positivos, os níveis de amplificação do Her-2 não se correlacionaram com a amplificação do gene T2A.

Os resultados deste estudo sugerem que, visto que a expressão da proteína T2A parece ser mais um reflexo da proliferação celular, a amplificação do gene T2A possa ser um marcador preditivo mais específico de resposta às antraciclinas no CM. O nosso grupo está atualmente realizando dois grandes projetos, com o objetivo de validar estes dados: 1) uma meta-análise de 4 estudos randomizados, originalmente desenhados para avaliar o papel das antraciclinas no CM, com coleta de material para avaliação centralizada dos marcadores biológicos; e 2) um estudo prospectivo, no contexto neoadjuvante, desenhado especificamente para confirmar o valor preditivo da amplificação da T2A.