Lucienne Pereira Del Grossi Neusquen

**Avaliação da expressão da proteína EZH2 na resposta do
carcinoma de mama localmente avançado à quimioterapia
neoadjuvante**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Dr. José Roberto Morales Piato

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Neusquen, Lucienne Pereira Del Grossi

Avaliação da expressão da proteína EZH2 na resposta do carcinoma de mama
localmente avançado à quimioterapia neoadjuvante / Lucienne Pereira Del Grossi
Neusquen. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: José Roberto Morales Piato.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Terapia neoadjuvante 3.EZH2
4.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-271/12

Sumário

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 Epigenética e câncer de mama.....	8
2. Objetivos.....	16
3. Material e Métodos.....	18
3.1 Material.....	19
3.2 Pacientes.....	19
3.3 Avaliação de resposta à quimioterapia neoadjuvante.....	21
3.4 Métodos.....	22
4. Resultados.....	34
5. Discussão.....	48
6. Conclusões.....	56
7. Anexos.....	58
8. Referências.....	68

RESUMO

Neusquen LPDG. Avaliação da expressão da proteína EZH2 na resposta do carcinoma de mama localmente avançado à quimioterapia neoadjuvante [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: O tratamento de escolha do carcinoma de mama localmente avançado é a quimioterapia neoadjuvante, porém, em virtude da heterogeneidade tumoral, sabe-se que nem todos os tumores responderão a esse tratamento. Neste contexto, avaliamos a proteína EZH2 (*Enhancer of Zest Homolog 2*), uma histona-metiltransferase catalisadora da trimetilação da lisina 27 da histona H3, com objetivos de avaliar sua expressão na predição da resposta do carcinoma de mama localmente avançado à quimioterapia neoadjuvante e de correlacionar sua expressão com a análise imunoistoquímica dos marcadores prognósticos usuais (proteínas HER2, Ki-67, receptores hormonais de estrogênio e progesterona) e do p53. **MÉTODOS:** Foram obtidos fragmentos de tumor de 37 pacientes com carcinoma invasivo de mama nos estádios IIb e IIIa, submetidas à quimioterapia neoadjuvante com agentes antracíclicos. As pacientes pertenciam a 2 grupos. O Grupo 1 era composto de 19 pacientes que apresentaram resposta objetiva ao tratamento quimioterápico. No Grupo 2, as 18 pacientes não apresentaram essa resposta. Através da construção de arranjo em matriz de amostras teciduais, realizamos análise imunoistoquímica das expressões das proteínas HER2, Ki-67, p53, dos receptores de estrogênio e progesterona e da EZH2. **RESULTADOS:** O grupo de pacientes que não responde à quimioterapia tem, em média, idade significativamente superior (56,5 anos) ao das pacientes com resposta à quimioterapia (46,5 anos), porém os grupos não diferiram em relação ao número de ciclos de quimioterapia e em relação aos valores dos receptores hormonais e de HER2, Ki-67 e EZH2. A comparação entre a faixa etária, o número de ciclos de quimioterapia e os marcadores biológicos tumorais não demonstrou diferença significativa entre os grupos. A relação linear dos valores da proteína EZH2 com a idade, o número de ciclos de quimioterapia e os valores dos receptores hormonais foi negativa; e com as proteínas HER2 e Ki-67 a relação foi positiva. Para o grupo de pacientes que respondem ou não à quimioterapia neoadjuvante, não houve associação com as taxas de proteína EZH2. **CONCLUSÕES:** A proteína EZH2 correlaciona-se negativamente com os receptores hormonais de estrogênio e de progesterona e, positivamente com as proteínas HER2 e Ki-67. A expressão dessa proteína não se correlacionou com a resposta clínica do carcinoma de mama localmente avançado à quimioterapia neoadjuvante à base de antracíclicos.

Descritores: Neoplasias da Mama; Terapia Neoadjuvante; EZH2; Imunoistoquímica.

SUMMARY

Neusquen LPDG. EZH2 protein expression on the response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

INTRODUCTION: Neoadjuvant chemotherapy is the treatment of choice for patients with locally advanced breast cancer, however, because of tumor heterogeneity, not all tumors will respond to this treatment. In this context, we evaluated the EZH2 protein (Enhancer of Zest Homolog 2), a histone methyltransferase. EZH2 catalyses the trimethylation of lysine 27 of histone H3. The purposes of this study were to evaluate the expression of EZH2 for predicting tumor response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer and its relation to usual prognostic markers (HER2, Ki-67, hormonal receptors of estrogen and progesterone - ER and PR) and p53.

METHODS: Thirty-seven paraffin-embedded tumor blocks from different patients with stages IIb and IIIa invasive breast cancer. All of them have received neoadjuvant anthracycline-containing chemotherapy. The patients belonged to two different groups. Group 1 comprised 19 patients with objective response to chemotherapy, and Group 2, comprised 18 patients with no response to treatment. A TMA-based (tissue microarray) immunohistochemical analysis of HER2, Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors and EZH2 was performed. **RESULTS:** The group of patients who did not achieve a response had higher age (56.5 years) than the patients with response to chemotherapy (46.5 years), but the groups did not differ from the number of cycles of chemotherapy, and from the values of hormone receptors and HER2, Ki-67 and EZH2. The analysis of age, number of cycles of chemotherapy and biological tumor markers did not show a significant difference between the two groups. There was a negative linear relationship between EZH2 values and age, number of cycles of chemotherapy and hormone receptors. There was a positive linear relationship between EZH2 and HER2 and Ki-67. There was no association between EZH2 expression and response to chemotherapy. **CONCLUSIONS:** EZH2 protein is negatively correlated with hormonal receptors (ER and PR), and positively correlated with HER2 and Ki-67. There was no correlation between EZH2 expression and response to neoadjuvant anthracycline-containing chemotherapy.

Descriptors: Breast Neoplasms; Neoadjuvant Therapy; EZH2; Immunohistochemistry

1. Introdução

O câncer de maior incidência, excetuando-se o de pele não melanoma, e a principal causa de morte por câncer no mundo entre as mulheres é o de mama. Em 2008, representava 23% dos casos e 14% das mortes, o que corresponde a 1.380.000 mulheres com câncer de mama e 458.4000 mortes pela doença. Cerca de 50% desses casos e 60% dessas mortes são estimados que ocorreram em países economicamente em desenvolvimento (Jemal *et al.*, 2011).

No Brasil, o câncer de mama ocupa o segundo lugar em incidência de câncer feminino. Em 2012, há uma estimativa de 52.680 novos casos diagnosticados de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (Inca).

Nas primeiras décadas do século passado, o manejo do câncer de mama era baseado em cirurgias extensas e radioterapia. Entre 1950 e 1960, iniciou-se o uso de hormonioterapia em tumores avançados. Nos anos 1970, a quimioterapia começou a ser utilizada em esquema adjuvante em estádios iniciais (Fisher *et al.*, 1997).

A quimioterapia neoadjuvante, também chamada de *quimioterapia primária* ou *de indução*, refere-se à administração de agentes quimioterápicos antes do tratamento locorregional com cirurgia e/ou irradiação. Atualmente, constitui o tratamento de escolha em pacientes com câncer de mama localmente avançado (Schwartz *et al.*, 2004; Charfare *et al.*, 2005; Mathew *et al.*, 2007; Specht *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

Em 1988, o National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) iniciou um ensaio clínico randomizado (NSABP B-18) com o objetivo principal de avaliar se a quimioterapia neoadjuvante resultaria em maiores índices de sobrevida global e de sobrevida livre de doença do que o uso de quimioterapia adjuvante. Os objetivos secundários foram avaliar a resposta do tumor e dos linfonodos axilares à quimioterapia neoadjuvante, determinar se a mesma propiciaria maiores taxas de cirurgia conservadora da mama e verificar se diminuiria a taxa de recidiva local.

Fisher *et al.* (1997), ao avaliarem os dados referentes à resposta tumoral ao uso de quimioterapia neoadjuvante, identificaram resposta clínica em 80% das pacientes, com diminuição do volume tumoral, destas, 36% apresentaram resposta clínica completa e, entre essas, 26% tiveram resposta patológica completa. Quanto aos linfonodos axilares clinicamente comprometidos, 89% responderam ao tratamento neoadjuvante. A frequência da realização de nodulectomia foi maior no grupo que recebeu tratamento pré-operatório, particularmente nas pacientes com tumores acima de 5 cm, que previamente seriam candidatas à mastectomia (Fisher *et al.*, 1997).

Os resultados, após 5 anos de seguimento das pacientes do estudo NSABP B-18, não evidenciaram diferenças significantes na sobrevida livre de doença e na sobrevida global entre os dois grupos (Fisher *et al.*, 1998). Após 9 anos de seguimento, esses dados se mantiveram inalterados (Wolmark *et al.*, 2001), assim como na análise mais recente feita por Rastogi *et al.* (2008), contemplando 16 anos de seguimento.

Com relação à recidiva local, parece ser mais frequente com o uso de quimioterapia neoadjuvante, mas sem significância estatística nos seguimentos de 9 e 16 anos. As pacientes que após a quimioterapia neoadjuvante tiveram resposta patológica completa do tumor apresentaram maiores sobrevida global e sobrevida livre de doença, quando comparadas com as que não obtiveram essa resposta nas avaliações após 5, 9 e 16 anos (Fisher *et al.*, 1998; Wolmark *et al.*, 2001; Rastogi *et al.*, 2008).

Outro ensaio clínico importante sobre o uso da quimioterapia neoadjuvante foi realizado por European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) e Breast Cancer Cooperative Group (BCCG), em 1991 (EORTC-10902). O estudo teve como objetivo principal a comparação entre a sobrevida global e a sobrevida livre de doença em mulheres com câncer de mama randomizadas para receberem o mesmo esquema quimioterápico em tratamento neoadjuvante ou adjuvante. Os objetivos secundários foram avaliar a possibilidade de cirurgia conservadora após a quimioterapia pré-operatória e determinar se a mesma resultava em melhor controle local, principalmente após cirurgias conservadoras. Em 4 anos de seguimento, não houve diferença significativa em relação a sobrevida global, sobrevida livre de doença e recidiva local. No grupo de mulheres que receberam quimioterapia neoadjuvante, a frequência de cirurgia conservadora foi maior (Van der Hage *et al.*, 2001).

Corroborando os dados apresentados por Van der Hage *et al.* (2001), o estudo de Van Nes *et al.* (2009), com seguimento de 10 anos dessas

mesmas pacientes, não evidenciou diferença significativa na sobrevida global, na sobrevida livre de doença e na recidiva local.

O termo *câncer de mama localmente avançado* refere-se a tumores de mama não metastáticos em estádios avançados. Sua definição diverge entre os diversos autores; em geral engloba os estádios IIIb e IIIc, enquanto para outros incluiria também os estádios IIb e IIIa.

Sabe-se que uma resposta clínica favorável pode transformar tumores inoperáveis em passíveis de ressecção cirúrgica, e tumores operáveis grandes em relação ao volume mamário em passíveis de cirurgias conservadoras após sua redução (Liu *et al.*, 2010). Porém, em virtude da heterogeneidade tumoral, nem todos os tumores responderão ao tratamento neoadjuvante. Uma pequena proporção de pacientes (7%) pode apresentar progressão da doença, tornando impossíveis tanto a cirurgia conservadora quanto a ressecção tumoral completa (Fernández-Sánchez *et al.*, 2006).

A identificação de parâmetros tumorais que permitam prever com acurácia a resposta ao tratamento neoadjuvante seria muito importante na otimização do seu uso e, nos tumores não respondedores, permitiria o emprego de terapias alternativas mais efetivas.

Define-se como marcador preditivo um indicador de sensibilidade ou de resistência a um tratamento específico. São importantes, pois tumores diferentes variam em sua resposta a uma terapia em particular. No tratamento oncológico seria desejável saber a probabilidade da resposta tumoral diante de um agente proposto. Algumas vezes, marcadores preditivos confundem-se com marcadores prognósticos. Ambos são

utilizados para informar a probabilidade do comportamento tumoral futuro, porém, enquanto os marcadores preditivos são utilizados para avaliar a resistência ou a resposta a terapias específicas, os marcadores prognósticos fornecem informação do resultado, independente da terapia sistêmica adjuvante (Duffy, 2005). Assim, os marcadores preditivos direcionam a escolha do tipo de tratamento.

Com o objetivo de identificar esses fatores, em estudo utilizando quimioterapia neoadjuvante baseada em antracíclicos, com resposta clínica em 52% das pacientes, Fernández-Sánchez *et al.* (2006) concluíram que as com tumores de maior diâmetro, linfonodos axilares comprometidos, baixo índice de proliferação celular, imunorreatividade à proteína p53 e tumores bem diferenciados apresentavam menor resposta à quimioterapia neoadjuvante.

Em publicação mais recente, Darb-Esfahani *et al.* (2009) demonstraram que a subclassificação baseada nos receptores hormonais de estrogênio e progesterona e na expressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) poderia prever a resposta à quimioterapia neoadjuvante baseada em antracíclicos e taxanos. Tumores HER2 positivos e com receptor de estrogênio (RE) e de progesterona (RP) positivos apresentaram alta taxa de resposta ao tratamento neoadjuvante e prognóstico favorável. Os tumores RE/RP positivos e HER2 negativo, apesar da baixa taxa de resposta patológica completa, mostraram prognóstico favorável, com maior sobrevida livre de doença do que os outros subgrupos. Nos tumores HER2 positivo e RE/RP negativos, tanto a taxa de resposta

patológica completa à quimioterapia neoadjuvante quanto o tempo de sobrevida livre de doença foram menores. Os tumores ditos triplo negativos (HER2 negativo, RE e RP negativos) apresentaram as maiores taxas de resposta patológica completa (24,2%), porém, nas pacientes que não apresentaram essa resposta, a recidiva tumoral foi precoce.

A avaliação de 2.064 pacientes com carcinoma de mama (estádios avançado e inicial), submetidas à quimioterapia neoadjuvante com a intenção de identificar preditores de resposta patológica completa, concluiu que idade jovem, grau histológico 3, tipo histológico não lobular e negatividade para receptores hormonais eram preditores independentes de resposta patológica completa. Além disso, não houve diferenças de resposta em relação ao estadiamento tumoral (Costa *et al.*, 2010).

Colleoni *et al.* (2010), em estudo com 783 pacientes com carcinoma ductal invasivo, submetidas a quimioterapia neoadjuvante, elaboraram um nomograma para prever a probabilidade de resposta patológica completa, baseado nas características biológicas dos tumores. Os fatores preditivos de resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante foram expressão de RE e de RP, expressão da proteína Ki-67 e números de ciclos quimioterápicos pré-operatórios. Quanto menor a expressão de RE e RP, maior a expressão da Ki-67 e maior o número de ciclos quimioterápicos, maior a probabilidade de resposta patológica completa.

Caudle *et al.* (2010) avaliaram preditores de progressão da doença à quimioterapia neoadjuvante. Os fatores pré-tratamento identificados incluem raça afro-americana e características que expressam agressividade tumoral,

como maior diâmetro do tumor, RE e RP negativos, proteína Ki-67 com alto índice e alto grau nuclear. Muitas dessas características também estão associadas à resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante (alto grau tumoral, RE/RP negativos e Ki-67 elevada), sugerindo que, apesar de morfologicamente similares, tumores altamente proliferativos podem ser divididos em duas subpopulações: os altamente sensíveis e os altamente resistentes aos quimioterápicos. Permanece então a necessidade da descoberta de novos marcadores moleculares para diferenciar as subpopulações de tumores altamente proliferativos.

1.1 Epigenética e câncer de mama

O termo *epigenética* refere-se a alterações herdáveis na expressão gênica que não envolvem mudança na sequência do DNA (ácido desoxirribonucléico). Modificações químicas no DNA e nas histonas têm impacto na expressão gênica e são copiadas fielmente para as células-filhas através de mitoses. Os eventos epigenéticos mais relacionados ao desenvolvimento e à progressão do câncer são a metilação gênica e as modificações nas histonas. Os genes só podem ser transcritos na presença de três critérios: fatores de transcrição disponíveis; histonas acetiladas e não metiladas e ilhas CpG (regiões do DNA em que há repetição da sequência de nucleotídeos citosina e guanina), presentes principalmente nas regiões promotoras dos genes, não metiladas (Esteller, 2003).

1.1.1 A proteína EZH2

A proteína EZH2 (sigla do inglês de *Enhancer of Zest Homolog 2*), é uma histona-metiltransferase. A modificação epigenética das histonas tem sido implicada na oncogênese.

Uma das formas de controle da expressão gênica se faz por meio da organização da cromatina. Esta, em parte, é controlada pela conformação das histonas. A estrutura básica da cromatina é o nucleossomo, composto de aproximadamente 150 pares de bases do DNA, envoltas em um centro protéico formado por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. Cada uma das proteínas histonas apresenta uma sequência N-terminal flexível composta de 11 a 47 resíduos que se projetam para fora da estrutura fixa do nucleossomo, chamada de *cauda da histona*. Essas caudas aminoterminais estão sujeitas a uma variedade de modificações, como metilação, ubiquitinação, acetilação e fosforilação, que regulam suas funções (Figuras 1 e 2). As combinações resultantes dessas modificações constituem um código epigenético conhecido como o código das histonas, que age como uma rica rede de efeitos moleculares envoltos em inúmeros processos no DNA. Essa configuração impacta na capacidade de cofatores e iniciadores de se ligarem às sequências específicas do DNA, determinando a repressão e a ativação da transcrição gênica (Young *et al.*, 2010).

Figura 1 - Representação esquemática da disposição das histonas e do código das histonas (modificado de Sparmann e van Lohuizen, 2006)

Figura 2 - Modificações pós-translacionais das caudas das histonas (modificado de Zhang e Reinberg, 2001). Aminoácidos: A- alanina; C- cisteína; D- ácido aspártico; G- glicina; H- histidina; I- isoleucina; K- Lisina; L- leucina; N- Asparagina; R- arginina; P- prolina; Q- glutamina; S- serina; T- treonina; V- valina

Nas células saudáveis, existe uma regulação dos “marcadores de ativação” e “repressão” das histonas. Nas células tumorais, esse padrão é alterado pela perda dos marcadores de ativação nas regiões transcritionalmente ativas, como as promotoras de genes supressores tumorais, e também da perda dos marcadores de repressão nas regiões transcritionalmente inativas (Tsai *et al.*, 2011).

Figura 3 – Estrutura molecular da lisina e suas formas mono, di e trimetilada (modificado de Zhang e Reinberg, 2001). HMT: histonametiltransferase. CH₃: radical metil

A metilação de resíduos de lisina (K) consiste na adição de um grupo metil promovida pelas histonas metiltransferases (Figura 3). Está relacionada à repressão da transcrição gênica, silenciando diferentes genes nos organismos. É realizada por uma família de metiltransferases (Família EZH □ *Enhancer of zeste homolog*), codificadas por dois genes (*EZH1* e *EZH2*). O gene *EZH2* está localizado no cromossomo 7 e codifica uma proteína

homônima membro da família Polycomb-group (PcG) (Xiao *et al.*, 2011). A proteína EZH2 catalisa a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) e requer a presença de duas outras proteínas, EED (*Embryonic ectoderm development*) e SUZ12 (*Supressor of zeste 12*). As proteínas EZH2, SUZ12 e EED, juntamente com as proteínas RBBP4 e RBBP7 (*Retinoblastoma binding proteins*) constituem os componentes principais do PRC2 (*Polycomb- Repressive Complex 2*). Este, por sua vez, recruta outras enzimas gerando repressão adicional da transcrição por compactação da cromatina (Chase; Cross, 2011).

O exato mecanismo de ação da EZH2 ainda não é conhecido. Em 2004, Tang *et al.* identificaram que a ativação do *Tp53* inibe a região promotora do *EZH2*. Estudos recentes demonstram que a EZH2 pode recrutar DNA metiltransferases para silenciar genes específicos, sugerindo associação entre esses dois eventos epigenéticos (Viré *et al.*, 2006), ao passo que Lu *et al.* (2010) verificaram ser a proteína EZH2 reguladora da angiogênese em tumores de ovário. Em 2008, Cao *et al.* evidenciaram o papel da diminuição da expressão da E-caderina na invasão celular mediada por EZH2, através de sua ligação à região promotora do gene da E-caderina (com consequente repressão da transcrição) em tumores agressivos de mama. Além disso, Li *et al.* (2009) demonstraram associação entre a superexpressão da proteína EZH2 e a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina no desenvolvimento da hiperplasia ductal mamária. Por fim, o estudo de Derfoul *et al.* (2011) sugeriu haver possível relação entre MicroRNAs, que são pequenos RNAs (ácido ribonucléicos) não codificantes

que regulam a expressão gênica, e a expressão aumentada da proteína EZH2.

Postula-se que a presença de células-tronco (identificadas pela presença das proteínas de superfície CD44 e CD24 baixo ou ausente) seja responsável pela iniciação tumoral, progressão e resistência aos fármacos. Estas células já podem ser identificadas em vários tipos de tumores. Comparativamente às células diferenciadas, as células progenitoras permitem a progressão para a malignidade através do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que desregulam as vias de auto-renovação. Chang *et al.*, em 2011, notaram que o bloqueio do reparo do DNA mediado pela EZH2 acumularia fatores oncogênicos e favoreceria a promoção de células iniciadoras de tumores de mama pela ativação da via de sinalização intracelular RAF1-ERK- β -catenina. O mesmo estudo identificou drogas capazes de inibir essa via de ativação e destruir as células- tronco do câncer de mama, impedindo a progressão tumoral.

Fujii *et al.* (2011) analisaram a região promotora do gene *EZH2* e identificaram a via de sinalização MEK-ERK como sendo a responsável pela superexpressão da EZH2 que associa-se a subtipos agressivos de câncer de mama.

A primeira evidência de que o bloqueio da ação da proteína EZH2 diminui a razão de crescimento celular do câncer de mama e aumenta a sobrevida em ratos foi descrita por Gonzalez *et al.* (2009). Nos tumores com receptores hormonais negativos, o seu bloqueio interrompeu o ciclo celular

na transição G2/M, com consequente menor número de células tumorais em mitose.

Raaphorst *et al.* (2003) identificaram maior expressão do gene *EZH2* em carcinomas de mama pouco diferenciados em comparação ao tecido mamário normal, ao com hiperplasia ductal e ao com carcinoma bem diferenciado. Na análise de 172 casos de tumores invasivos de mama, a diferente expressão da proteína EZH2 não apresentou valor prognóstico.

A comparação entre a expressão da proteína EZH2 no tecido mamário normal, no com hiperplasia atípica e nos carcinomas *in situ*, realizada por Ding *et al.* (2006), demonstrou maior expressão da proteína EZH2 nas pacientes com carcinoma *in situ* de mama. Essa maior expressão protéica nas células epiteliais também foi identificada nas mulheres de alto risco para câncer de mama (mulheres com mutação para o gene *BRCA1*), demonstrando que a proteína EZH2 pode ser um marcador precoce na detecção pré-neoplásica em tecidos mamários histologicamente normais.

Bachmann *et al.* (2006) avaliaram a expressão de *EZH2* em 696 casos de tumores de próstata, melanoma, carcinomas de endométrio e de mama. Identificaram maior expressão nos tumores com maiores índices de proliferação celular. Além disso, a intensa expressão de *EZH2* correlacionou-se com um subgrupo de tumores mais agressivos. Nos casos de tumores de próstata e endométrio e no melanoma, associou-se a menor sobrevida em seguimento de 5 e 10 anos, podendo ser considerado como um marcador de agressividade em todos esses tipos tumorais.

A superexpressão da EZH2 em células epiteliais de mama induz a proliferação e aumenta a capacidade de invasão celular *in vitro*, conforme demonstrado por Kleer *et al.* em 2003. Nesse estudo, os autores reportaram maior expressão do RNAm (RNA mensageiro) da EZH2 em pacientes que tiveram metástase nos 5 anos após o diagnóstico primário, seria, então um preditor independente de metástase. A maior expressão da EZH2 associou-se com tumores pouco diferenciados e agressivos, além de se correlacionar com menor sobrevida livre de doença, independentemente dos receptores hormonais.

Na análise da expressão da EZH2 em 88 casos de carcinoma de mama inflamatório residual após a administração de quimioterapia neoadjuvante, Gong *et al.* (2011) identificaram que essa proteína achava-se frequentemente expressa e, além disso, correlacionava-se com fatores prognósticos desfavoráveis, como tumores de alto grau histológico e com receptores hormonais negativos.

Como se depreende dos dados da literatura, não há estudos que correlacionem a expressão da proteína EZH2 com a resposta do carcinoma de mama à quimioterapia neoadjuvante. Tal fato motivou-nos a realizar a presente pesquisa.

2. Objetivos

2.1 Avaliar a expressão da proteína EZH2, por imunoistoquímica, na predição da resposta do carcinoma de mama localmente avançado à quimioterapia neoadjuvante.

2.2 Correlacionar a expressão da proteína EZH2 com as proteínas HER2, Ki-67, p53 e com os receptores hormonais de estrogênio e progesterona.

3. Material e Métodos

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq/FMUSP) aprovou a realização do presente estudo (Anexos A e B).

3.1 Material

No presente estudo foi selecionado material parafinado contendo amostras de carcinoma mamário, correspondentes a 37 pacientes, atendidas no Serviço de Oncoginecologia e Mastologia do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, de São Paulo, com diagnóstico prévio de carcinoma invasivo, estádios clínicos IIb e IIIa (TNM), submetidas à quimioterapia neoadjuvante com agentes antracíclicos. Foram selecionadas amostras tumorais das áreas mais representativas da neoplasia - uma amostra para cada paciente - para a construção de microarranjos de tecidos (TMA, *tissue microarray*) e realizamos as pesquisas imunoistoquímicas para marcadores prognósticos usuais (RE, RP, HER-2 e Ki-67) e ainda p53 e EZH2.

3.2 Pacientes

Todas as pacientes foram assistidas no Serviço de Oncoginecologia e Mastologia do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, de São Paulo, no período de junho de 1995 a novembro de 2006. As amostras tumorais

foram obtidas segundo protocolos institucionais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho (Registro CEP 120/06 – Anexo C). Foram excluídas do estudo as pacientes com idade inferior a 30 anos e superior a 70 anos; as que se apresentavam grávidas; aquelas com carcinoma de mama bilateral sincrônico ou metacrônico e as que apresentaram qualquer outro tumor de natureza maligna.

Para a definição de carcinoma de mama localmente avançado, utilizamos os critérios do MD Anderson Cancer Center, definidos como tumores acima de 5 cm de diâmetro (T3), que acometam pele ou parede torácica (T4), presença de conglomerado de linfonodos axilares fixos (N2) ou acometimento linfonodal ipsilateral supraclavicular, infraclavicular ou na mama interna (Giordano, 2003). Desse modo, todos os tumores no estágio III e os tumores T3N0 do estágio IIB são considerados localmente avançados (AJCC, 2009).

As pacientes pertenciam a dois grupos de acordo com a resposta clínica do tumor primário ao tratamento quimioterápico neoadjuvante: o Grupo 1 era composto de 19 pacientes cujos tumores apresentaram resposta objetiva à quimioterapia neoadjuvante (definida como redução do tamanho tumoral igual ou maior a 50%) e o Grupo 2, com 18 pacientes nas quais não houve essa resposta.

O esquema quimioterápico adotado foi baseado no uso de antracíclicos, administrados em três ou quatro ciclos com intervalos de 21 a

28 dias. Nos Anexos D e E, estão representadas as associações empregadas e o número de ciclos aplicados em ambos os grupos.

3.3 Avaliação de resposta à quimioterapia neoadjuvante

A avaliação clínica da resposta tumoral foi realizada, como preconizado, antes e após o uso dos quimioterápicos em todas as pacientes. Com o emprego de um paquímetro, mediu-se o maior e o menor diâmetro tumoral, considerando-se sempre aquele de maior valor (Anexos F e G).

Os critérios de resposta utilizados foram os estabelecidos pela Union for International Cancer Control (UICC). Assim, considerou-se resposta clínica completa (RcC) à quimioterapia neoadjuvante aquela em que houve redução em 100% do diâmetro inicial da neoplasia; resposta clínica parcial (RcP) aquela na qual houve redução do tumor acima de 50% do seu tamanho inicial e progressão de doença (PD) quando houve aumento superior a 25% do tamanho tumoral inicial. Os casos de doença estável (DE) corresponderam aos que não apresentaram resposta parcial nem progressão de doença (Hayward *et al.*, 1977).

Para a análise dos dados, as pacientes que apresentaram RcC e RcP foram consideradas como grupo de resposta à quimioterapia neoadjuvante (Grupo 1), e, as pacientes com DE e PD, consideradas grupo de não resposta à quimioterapia neoadjuvante (Grupo 2).

3.4 Métodos

3.4.1 Arranjo em matriz de amostra tecidual

O arranjo em matriz de amostra tecidual, ou *tissue microarray* (TMA), é uma técnica descrita por Kononen *et al.*, em 1998, com aceitação mundial na literatura médica. Consiste na construção de um bloco único de parafina (bloco receptor) a partir de amostras tumorais obtidas como cilindros dos chamados blocos doadores (blocos contendo amostras originais) (Figura 4).

Todas as lâminas coradas pela técnica da Hematoxilina-eosina correspondentes aos 37 casos foram revisadas ao microscópio óptico por um patologista especialista em patologia mamária. Os casos foram avaliados quanto ao tipo histológico e grau de diferenciação tumoral, segundo critérios de Nottingham. A área de interesse foi demarcada com o uso de caneta permanente e a mesma marcação foi realizada na área correspondente ao bloco de parafina, que direcionou a obtenção dos cilindros (diâmetro de 2mm) utilizados na construção dos TMAs. Os cilindros foram dispostos em linhas e colunas, com um fragmento de tecido hepático na primeira linha e na primeira coluna do bloco, funcionando como fragmento orientador.

Os cortes do bloco receptor foram realizados utilizando-se micrótomo manual, na espessura de 5 µm, colhidos em fita adesiva especial para a técnica do TMA e aplicados em lâminas de vidro. A fita adesiva foi retirada pela exposição à luz ultravioleta.

A validade técnica do TMA em câncer de mama foi comprovada por Torhorst *et al.* (2001) e Sapino *et al.* (2006).

Figura 4 - Fotomicrografia de cilindro de TMA. Coloração HE. Aumento 50x

3.4.2 Análise imunoistoquímica

Realizamos análise das expressões das proteínas RE, RP, HER2, Ki-67, p53 e EZH2. Para cada marcador, a Tabela 1 descreve o clone, o fabricante, a diluição utilizada e o método de recuperação antigênica.

Tabela 1- Descrição do fabricante, clone, diluição e recuperação antigênica para os antígenos utilizados

Antígeno	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação antigênica
Ki-67	Dako	MIB1	1:4800	Panela de pressão, por 9 minutos com ácido cítrico ph 6.0
EZH2	Novocastra	NCL-L-EZH2	1:200	Panela de pressão, 60 minutos com ácido cítrico ph 6.0
RP	Dako	PgR 636	1:1600	Panela de pressão, por 9 minutos com ácido cítrico ph 6.0
RE	Neomarkers	SP1	1:1200	Panela de pressão, por 9 minutos com ácido cítrico ph 6.0
HER2	Spring	C-erbB-2	1:400	Panela de pressão, 40 minutos com ácido cítrico ph 6.0
p53	Dako	DO-7	1:3200	Panela de pressão, por 9 minutos com ácido cítrico ph 6.0

3.4.2.1 Análise da expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona

As lâminas contendo os fragmentos de tumores foram visualizadas em microscopia de luz em aumento de 100 a 630 vezes. Foram utilizados

controles positivos e negativos nas reações, e considerado resultado positivo a marcação nuclear exclusiva. Atribuiu-se para cada caso a graduação da positividade pelo escore de Allred, no qual se atribuem valores numéricos para intensidade da positividade (de 0 a 3) e porcentagem de células com positividade nuclear (de 0 a 5), como descrito na Tabela 2. O escore final varia de 0 a 8. (Harvey *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Escore de Allred: somatória das pontuações de intensidade e porcentagem de células coradas no estudo imunoistoquímico

Intensidade da coloração	Pontuação	Porcentagem de células coradas
Nenhuma	0	0
Fraca	1	Menos de 1%
Moderada	2	Entre 1 e 10%
Intensa	3	Entre 11 e 33%
	4	Entre 34 e 66%
	5	Acima de 67%

As Figuras 5 e 6 exemplificam casos de carcinoma ductal invasivo da mama com expressão positiva e negativa para os receptores hormonais de estrogênio e de progesterona, respectivamente.

Figura 5 – Fotomicrografias de carcinoma ductal invasivo de mama. Aumento de 200x. (A)RE positivo (B)RE negativo

Figura 6 – (A) Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama, evidenciando RP positivo no aumento de 200x; (B) Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama, evidenciando RP negativo no aumento de 400x

3.4.2.2 Análise da expressão da proteína HER2

A proteína HER2 foi considerada positiva na presença de coloração uniforme e intensa da membrana em mais de 30% das células tumorais invasivas (+3). Resultados 0 e +1 foram considerados negativos para a superexpressão da proteína HER2, e o resultado +2 foi considerado

indeterminado (Tabela 3). Foram realizados controles positivos e negativos (Wolff *et al.*, 2007).

Tabela 3 – Resultado pela imunoistoquímica da expressão da proteína HER2 e sua respectiva definição

Resultado	Definição
0	Ausência de coloração na membrana celular das células tumorais invasivas.
+1	Coloração parcial e de fraca intensidade da membrana celular em qualquer porcentagem de células tumorais invasivas.
+2	Coloração completa da membrana celular, mas não uniforme ou de intensidade fraca, em pelo menos 10% das células tumorais invasivas.
+3	Coloração uniforme e intensa da membrana em menos de 30% das células tumorais invasivas.

As Figuras 7 e 8 exemplificam casos de carcinoma ductal invasivo da mama com expressão negativa, indeterminada e positiva para HER2.

Figura 7 - Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama evidenciando (A) HER2 negativo. Aumento de 200x; (B) HER2 positivo. Aumento 400x

Figura 8 – Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama evidenciando HER2 indeterminado no aumento 400x (A) e de 630x (B)

3.4.2.3 Análise da expressão da proteína p53

A positividade para a proteína p53 foi definida por marcação nuclear em pelo menos 10% das células tumorais invasivas (Jung *et al.*, 2011). Foram realizados controles positivos e negativos.

A Figura 9 exemplifica casos de carcinoma ductal invasivo da mama com expressão positiva e negativa para a proteína p53.

Figura 9 - Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama evidenciando p53 negativo (A) e positivo (B) no aumento de 400x

3.4.2.4 Análise da expressão da proteína Ki-67

Nessa análise, foram realizados controles positivos e negativos. A expressão da proteína Ki-67 foi avaliada em função da quantidade em porcentagem de células com núcleos corados e descrita dessa maneira. Não há consenso na literatura sobre o ponto de corte acima do qual se deva considerar a expressão elevada dessa proteína. Dados recentes sugerem que valores acima de 10-14% definem tumores com alto índice de proliferação celular (Yerushalmi *et al.*, 2010). No presente estudo, utilizaremos o ponto de corte de 14% (Cheang *et al.*, 2009).

As Figuras 10 e 11 exemplificam casos de carcinoma ductal invasivo da mama com alta e baixa expressão do antígeno Ki-67.

Figura 10 - Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama evidenciando Ki-67 elevada nos aumentos de 200x (A) 400x (B)

Figura 11- Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama evidenciando Ki-67 baixo no aumento de 200x

3.4.2.5 Análise da expressão da proteína EZH2

A proteína EZH2 não apresenta critérios definidos de positividade na literatura. Optamos por avaliar a expressão imunoistoquímica de forma semelhante aos critérios de Allred estabelecidos para a avaliação dos receptores hormonais. Dessa maneira, observamos a intensidade da coloração celular e a graduamos em fraca, moderada ou intensa, e a porcentagem de células coradas, separadas em menos de 1%, entre 1 e 10%, entre 11 e 33%, entre 34% e 66% e acima de 67% de células coradas (Tabela 4). Somamos as pontuações resultando entre 0 e 8 e possibilitando a comparação com os outros marcadores biológicos.

Tabela 4 - Escore utilizado na detecção da proteína EZH2

Intensidade da coloração	Pontuação	Porcentagem de células coradas
Nenhuma	0	0
Fraca	1	Menos de 1%
Moderada	2	Entre 1 e 10%
Intensa	3	Entre 11 e 33%
	4	Entre 34 e 66%
	5	Acima de 67%

As Figuras 12 e 13 exemplificam casos de carcinoma ductal invasivo da mama com expressão positiva para EZH2.

Figura 12 - Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama evidenciando EZH2 positivo elevada. Aumento de 200x (A) e 400x (B)

Figura 13 – (A) Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama evidenciando EZH2 positivo em tumor bem diferenciado no aumento de 200x; (B) Fotomicrografia de carcinoma ductal invasivo de mama evidenciando EZH2 positivo, aumento de 630x

3.4.3 Método estatístico

Avaliou-se a relação entre resposta clínica à quimioterapia neoadjuvante (não resposta à quimioterapia x resposta à quimioterapia), características clínicas das pacientes (idade, estado menopausal, número de ciclos de quimioterapia), e marcadores biológicos do tumor (grau histológico tumoral e expressão imunoistoquímica dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona e das proteínas p53, Ki-67, HER2 e EZH2).

A análise de associação das variáveis dos fatores biológicos categorizadas como positivo e negativo, com resposta ou não resposta à quimioterapia neoadjuvante, foi descrita através de tabelas de contingências, o teste estatístico utilizado foi o teste exato de Fisher.

A distribuição de normalidade para as variáveis quantitativas foi verificada através do teste de Shapiro Wilks, e a igualdade de variabilidade pelo teste de Levene's.

A igualdade entre dois grupos em relação às médias ou distribuições das variáveis quantitativas foi realizada através do teste t-Student ou Teste não paramétrico de Mann–Whitney quando conveniente. Para três ou mais grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Teste de sub-hipóteses entre três ou mais grupos foram aplicados quando necessários.

A análise de correlação linear foi realizada através da correlação não paramétrica de Spearman.

A análise de sobrevida foi realizada através do teste de Kaplan Meyer e o teste log Rank; a análise de regressão de Cox utilizando covariáveis também foi utilizada.

4. Resultados

As características clínicas das pacientes incluídas no estudo podem ser visualizadas nos Anexos H e I. As características anatomopatológicas podem ser visualizadas nas Tabelas 5 e 6.

Em ambos os grupos, a idade das pacientes mostrou distribuição normal e não houve diferença em relação à variabilidade da idade das pacientes.

Em razão da falta de material suficiente para estudo imunoistoquímico de todos os marcadores em todos os blocos de parafina, a análise não foi realizada completamente em todos os casos, havendo perda das proteínas Ki-67 em 6 amostras; EZH2 em 5 amostras; HER2 em 1 amostra; receptor de estrogênio em 2 amostras e receptor de progesterona em 1 amostra (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Características anatomopatológicas dos tumores das pacientes pertencentes ao grupo de resposta à quimioterapia neoadjuvante

Caso	Tipo histológico	GH	RE	RP	HER2	p53	Ki67 (%)	EZH2
1	CDI	2	7	7	0	0	40	8
2	CDI	3	0	0	0	0	90	8
3	CDI	2	8	8	0	0	10	6
4	CDI	3	0	0	0	1	50	7
5	CDI	2	6	8	3	0	60	8
6	CDI	2	8	8	1	0	50	7
7	CDI	1	5	7	0	0	5	5
8	CDI	2	7	5	0	1	30	7
9	CDI	2	7	4	0	0	60	7
10	CDI	3	0	0	0	0	90	8
11	CDI	3	0	0	0	1	90	8
12	CDI	3	0	0	0	1	80	8
13	CLI	1	6	7	0	0	30	7
14	CDI	1	6	7	1	0	-	8
15	CDI	2	0	0	0	0	40	8
16	CDI	2	6	8	3	0	35	7
17	CDI	1	7	5	0	0	25	7
18	CDI	3	6	3	0	0	-	-
19	CDI	2	4	6	2	1	-	-

CDI: carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; GH: grau histológico (1, 2 ou 3); RE: receptor de estrogênio (escore de Allred); RP: receptor de progesterona (escore de Allred); HER2: proteína HER2 (0 e 1 negativo, 2 indeterminado, 3 positivo); P53: proteína p53 - 0 negativo; 1 positivo; Ki67: proteína Ki-67 (em porcentagem); EZH2: proteína EZH2 (escore)

Tabela 6 - Características anatomopatológicas dos tumores das pacientes pertencentes ao grupo de não resposta à quimioterapia neoadjuvante

Caso	Tipo histológico	GH	RE	RP	HER2	p53	Ki67 (%)	EZH2
20	CDI	3	0	0	0	1	10	8
21	CDI	2	5	8	0	0	75	8
22	CDI	3	-	-	3	0	39	8
23	CDI	3	0	0	2	1	74	8
24	CDI	3	0	0	3	1	-	-
25	CDI	2	8	7	0	0	8.5	7
26	CDI	2	3	5	0	0	11	8
27	CDI	3	0	0	0	1	70	8
28	CDI	2	7	7	0	0	60	8
29	CDI	3	0	0	3	1	80	8
30	CDI	2	6	5	3	0	80	8
31	CDI	2	6	0	0	0	30	7
32	CDI	2	5	3	0	0	12	6
33	CDI	1	-	0	-	0	-	-
34	CDI	1	8	7	0	0	5	7
35	CDI	1	6	6	0	0	30	8
36	CDI	3	0	0	0	0	95	8
37	CDI	2	8	8	0	0	-	-

CDI: carcinoma ductal invasivo; GH: grau histológico (1, 2 ou 3); RE: receptor de estrogênio (escore de Allred); RP: receptor de progesterona (escore de Allred); HER2: proteína HER2 (0 e 1 negativo, 2 indeterminado, 3 positivo); P53: proteína p53 - 0 negativo, 1 positivo; Ki67: proteína Ki-67 (em porcentagem); EZH2: proteína EZH2 (escore)

O grupo de pacientes que não responde à quimioterapia tem, em média, idade significativamente ($p=0,008$) superior (56,5 anos) ao das pacientes com resposta à quimioterapia (46,5 anos), conforme pode ser visualizado na Tabela 7, porém, segundo os dados observados, os dois grupos não diferem em relação ao número de ciclos de quimioterapia, e em relação aos valores dos receptores hormonais e valores de HER2, Ki-67 e EZH2 (Tabela 7).

Em relação ao estado menopausal, todas as pacientes acima de 48 anos estavam na pós-menopausa; as abaixo dessa idade estavam na pré-menopausa (Tabela 8).

Tabela 7 - Comparação dos grupos de resposta à quimioterapia em relação a idade média, distribuição do número de ciclos de quimioterapia e marcadores biológicos

	Resposta à quimioterapia	n	Média	dp	Mediana	p
Idade (anos)	Responde	19	46,53	10,74	44	0,008 ¹
	Não responde	18	56,50	10,82	55	
N Ciclos	Responde	19	3,21	0,42	3	0,730 ²
	Não responde	18	3,28	0,46	3	
RE	Responde	19	4,37	3,18	6	0,683 ²
	Não responde	16	3,88	3,34	5	
RP	Responde	19	4,37	3,34	5	0,363 ²
	Não responde	17	3,29	3,41	3	
HER2	Responde	19	0,53	1,02	0	0,731 ²
	Não responde	17	0,82	1,33	0	
Ki67 (%)	Responde	16	49,06	27,52	45	0,682 ²
	Não responde	15	45,3	32,1	39	
EZH2	Responde	17	7,29	0,85	7	0,216 ²
	Não responde	15	7,67	0,62	8	

¹ Teste t-Student com variâncias iguais; ² Teste de Mann-Whitney
n: número de casos; dp: desvio padrão; p: nível de significância; RE: receptor de estrogênio (escore de Allred); RP: receptor de progesterona (escore de Allred); HER2: proteína HER2 (0 e 1 negativo, 2 indeterminado, 3 positivo); Ki67: proteína Ki-67 (em porcentagem); EZH2: proteína EZH2 (escore)

Tabela 8 - Valores descritivos da idade por estado da menopausa

	Menopausa	n	Média	DP	Mín	1º Q	Mediana	3º Q	Máx
Idade (anos)	Pré-menopausa	16	40,19	5,56	30	36,3	40	44	48
	Pós-menopausa	21	59,9	7,03	49	54	60	67	70
	TOTAL	37	51,38	11,77	30	42	50	61,5	70

n: número de casos; DP: desvio padrão; Mín: idade mínima; 1º Q: primeiro quartil; 3º Q: terceiro quartil; Máx: idade máxima

A análise entre a faixa etária (assim como o estado menopausal), o número de ciclos de quimioterapia e os marcadores biológicos tumorais não demonstra diferença significativa entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação das faixas etárias em relação à distribuição do número de ciclos de quimioterapia e dos marcadores biológicos

	Idade (anos)	n	Média	DP	Mediana	p ^a
Número de ciclos	≤ 48 anos	16	3,25	0,45	3	0,964
	> 48 anos	21	3,24	0,44	3	
RE	≤ 48 anos	16	4	2,88	5,5	0,422
	> 48 anos	19	4,26	3,56	6	
RP	≤ 48 anos	16	4,06	3,47	5,5	0,741
	> 48 anos	20	3,7	3,36	4,5	
HER 2	≤ 48 anos	16	0,5	1,1	0	0,459
	> 48 anos	20	0,8	1,24	0	
Ki67 (%)	≤ 48 anos	14	50	27,03	40	0,681
	> 48 anos	17	44,97	31,82	50	
EZH2	≤ 48 anos	14	7,5	0,85	8	0,694
	> 48 anos	18	7,44	0,7	8	

^a Teste de Mann-Whitney

n: número de casos; DP: desvio padrão; p: nível de significância

RE: receptor de estrogênio (escore de Allred); RP: receptor de progesterona (escore de Allred); HER2: proteína HER2 (0 e 1 negativo, 2 indeterminado, 3 positivo); Ki67: proteína Ki-67 (em porcentagem); EZH2: proteína EZH2 (escore)

A graduação histológica diferiu significativamente para a distribuição dos receptores hormonais e das proteínas Ki-67 e EZH2. A comparação entre a graduação histológica pelo teste de sub-hipóteses de Kruskal Wallis identificou que, para $p=0,05$, a distribuição dos marcadores biológicos diferiu significativamente entre os graus histológicos 1 e 3 e também entre os graus histológicos 2 e 3 (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparação do grau histológico em relação à distribuição dos indicadores biológicos

	Grau histológico	n	Média	dp	Mediana	p ^a	Sub-hipóteses ^b	
							Grau 2	Grau 3
RE	1	6	6,33	1,03	6,0	< 0,001	ns	s
	2	17	5,94	2,11	6,0		-	s
	3	12	0,50	1,73	0,0		-	-
RP	1	7	5,57	2,57	7,0	< 0,001	ns	s
	2	17	5,71	2,66	7,0		-	s
	3	12	0,25	0,87	0,0		-	-
HER2	1	6	0,17	0,41	0,0	0,678	-	-
	2	17	0,71	1,21	0,0		-	-
	3	13	0,85	1,34	0,0		-	-
Ki-67(%)	1	5	19,00	12,94	25,0	0,002	ns	s
	2	15	40,10	23,71	40,0		-	s
	3	11	69,82	26,46	80,0		-	-
EZH2	1	6	7,00	1,10	7,0	0,028	ns	s
	2	15	7,33	0,72	7,0		-	s
	3	11	7,91	0,30	8,0		-	-

^a Teste de Kruskal-Wallis; ^b teste de sub-hipóteses de Kruskal Wallis;

ns: não significativo; s: significativo;

RE: receptor de estrogênio (escore de Allred); RP: receptor de progesterona (escore de Allred); HER2: proteína HER2 (0 e 1 negativo, 2 indeterminado, 3 positivo); Ki67: proteína Ki-67 (em porcentagem); EZH2: proteína EZH2 (escore)

A relação linear dos valores da proteína EZH2 com a idade, o número de ciclos de quimioterapia e os valores dos receptores hormonais foi negativa, ou seja, conforme esses aumentam, os valores da proteína EZH2 tendem a diminuir. Essa relação é significativa apenas para os valores de receptor de estrogênio ($p=0,002$) e limítrofe para os valores de receptor de progesterona ($p=0,055$). Além disso, a relação entre os valores da proteína EZH2 com as proteínas HER2 e Ki-67 é positiva, ou seja, com o aumento dos valores de HER2 e Ki-67, o valor da proteína EZH2 tende a aumentar. Essa relação foi significativa apenas para a proteína Ki-67 ($p < 0,001$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Análise de correlação entre idade, número de ciclos de quimioterapia, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, HER2, Ki-67 e EZH2

	Idade (anos)		N. Ciclos		RE		RP		HER 2		Ki67 (%)		EZH2	
	R ¹	p	R ¹	p	R ¹	p	R ¹	p	R ¹	p	R ¹	p	R ¹	p
Idade	1	-	-0,080	0,639	0,179	0,304	-0,074	0,670	0,065	0,708	-0,173	0,352	-0,137	0,456
N.Ciclos	-0,080	0,639	1	-	0,283	0,099	0,173	0,313	-0,196	0,251	-0,238	0,198	-0,253	0,162
RE	0,179	0,304	0,283	0,099	1	-	0,784	0,000	-0,088	0,617	-0,540	0,002	-0,530	0,002
RP	-0,074	0,670	0,173	0,313	0,784	0,000	1	-	0,129	0,460	-0,435	0,016	-0,348	0,055
HER 2	0,065	0,708	-0,196	0,251	-0,088	0,617	0,129	0,460	1	-	0,236	0,200	0,216	0,235
Ki67 (%)	-0,173	0,352	-0,238	0,198	-0,540	0,002	-0,435	0,016	0,236	0,200	1	-	0,642	<0,001
EZH2	-0,137	0,456	-0,253	0,162	-0,530	0,002	-0,348	0,055	0,216	0,235	0,642	0,000	1	-

RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: proteína HER2; Ki67: proteína Ki-67; EZH2: proteína EZH2; N: ciclos: número de ciclos de quimioterápicos; p: nível de significância

Considerando-se como positividade para o receptor de estrogênio o valor do escore de Allred maior que 2, e negativo, caso contrário; positividade para o receptor de progesterona quando o valor do escore de Allred for maior que 2, e negativo, caso contrário; positividade para a proteína HER2 no valor de 3, negatividade para HER2 se igual a 0 ou 1, e indeterminado se HER2 for igual a 2; positividade para proteína p53 quando acima de 10% das células encontrarem-se coradas, e negativo, caso contrário; positividade para a proteína Ki-67 quando a porcentagem de células coradas encontra-se acima de 14%, e negativo, caso contrário, pode-se realizar uma análise de associação desses marcadores biológicos em relação à resposta ou não à quimioterapia.

Dos casos avaliados, 65,7% apresentaram positividade para o receptor de estrogênio, 61,1% foram positivos para receptor de progesterona, 16,7% foram positivos para a proteína HER2, 27% positivos para a proteína p53 e 77,4% positivos para a proteína Ki-67. Conforme os dados expressos na Tabela 12, a positividade desses marcadores biológicos não se associou com a resposta à quimioterapia.

Tabela 12 - Análise de associação dos fatores biológicos classificados como positivo/negativo e resposta à quimioterapia

Como positivo, negativo e resposta a quimioterapia								
		Resposta				TOTAL		p ^a
		Responde		Não responde				
		n	%	n	%	n	%	
RE								0,736
	Negativo	6	31,6	6	37,5	12	34,3	
	Positivo	13	68,4	10	62,5	23	65,7	
	TOTAL	19	100,0	16	100,0	35	100,0	
RP								0,495
	Negativo	6	31,6	8	47,1	14	38,9	
	Positivo	13	68,4	9	52,9	22	61,1	
	TOTAL	19	100,0	17	100,0	36	100,0	
Her 2								0,686
	Negativo	16	84,2	12	70,6	28	77,8	
	Positivo	2	10,5	4	23,5	6	16,7	
	Indeterminado	1	5,3	1	5,9	2	5,6	
	TOTAL	19	100,0	17	100,0	36	100,0	
p53								1,000
	Negativo	14	73,7	13	72,2	27	73,0	
	Positivo	5	26,3	5	27,8	10	27,0	
	TOTAL	19	100,0	18	100,0	37	100,0	
Ki67 (%)								0,226
	Negativo	2	12,5	5	33,3	7	22,6	
	Positivo	14	87,5	10	66,7	24	77,4	
	TOTAL	16	100,0	15	100,0	31	100,0	

^a Teste Exato de Fisher

n: número de casos; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: proteína HER2; Ki67: proteína Ki-67; p53: proteína p53

No presente estudo, o valor mínimo da proteína EZH2, em porcentagem de células coradas, foi de 11%, e 96,9% delas tinham o valor mínimo igual a 34% (Tabela 13).

Tabela 13 - Número de casos de acordo com a porcentagem de EZH2

EZH2%	n	%
11 a 33%	1	3,1
34 a 66%	11	34,4
>= 67%	20	62,5
TOTAL	32	100,0

n: número de casos; EZH2: proteína EZH2 em porcentagem de células coradas

Comparando-se as faixas de porcentagem de positividade celular para a proteína EZH2 com relação à idade das pacientes, ao número de ciclos de quimioterápicos recebidos e aos marcadores biológicos avaliados, houve uma diferença significativa para a distribuição dos receptores hormonais e da proteína Ki-67, a porcentagem da proteína EZH2 será maior quanto menores forem os valores dos receptores hormonais e maior for a porcentagem da proteína Ki-67 (Tabela 14).

Tabela 14- Comparação das faixas do EZH2 (em porcentagem) em relação à distribuição da idade, do número de ciclos de quimioterapia e dos indicadores biológicos

	EZH2%	n	Média	DP	Mediana	p
Idade (anos)	34 a 66%	11	54,273	13,192	56,0	0,244
	>= 67%	20	49,350	11,142	48,5	
N. Ciclos	34 a 66%	11	3,455	0,522	3,0	0,113
	>= 67%	20	3,100	0,308	3,0	
RE	34 a 66%	11	6,364	2,335	7,0	0,001
	>= 67%	19	2,737	3,070	0,0	
RP	34 a 66%	11	5,636	2,541	7,0	0,042
	>= 67%	19	2,789	3,441	0,0	
HER 2	34 a 66%	11	0,364	0,924	0,0	0,555
	>= 67%	20	0,750	1,251	0,0	
Ki67 (%)	34 a 66%	11	28,682	18,821	30,0	0,002
	>= 67%	19	60,211	27,474	70,0	

^a Teste de Mann-Whitney

n: número de casos; N ciclos: número de ciclos de quimioterapia; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: proteína HER2; Ki67: proteína Ki-67; HER2: proteína HER2; p: nível de significância

Para o grupo de pacientes que respondem (51,6%; 16/31) ou não (48,4%; 15/31) à quimioterapia neoadjuvante, segundo os dados observados, não houve associação com as taxas de proteína EZH2 ($p = 0,135$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise de associação da porcentagem da proteína EZH2 e resposta à quimioterapia para o grupo com porcentagem acima de 11%

	Resposta				Total		p^2
	Responde		Não responde		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
EZH2 (%)							
34 a 66%	8	50,0	3	20,0	11	34,4	0,135
>= 67%	8	50,0	12	80,0	20	62,5	
TOTAL	16	100,0	15	100,0	31	100,0	

² Teste Exato de Fisher

n: número de casos; EZH2: proteína EZH2 em porcentagem de células coradas

Na avaliação de recidiva local com o tempo de seguimento de 24 meses, houve diferença significativa ($p=0,038$) entre os grupos de pacientes que responderam e não responderam à quimioterapia. Segundo os dados observados, o grupo que respondeu à quimioterapia teve uma sobrevida livre de recidiva maior do que o grupo das que não responderam (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Análise de sobrevivência para a recidiva até 24 meses de acompanhamento por resposta à quimioterapia

O Gráfico 2, que analisa a recidiva local em tempo de seguimento de 24 meses corrigido pela proteína EZH2, segundo os dados observados, mostra que não houve diferença significativa ($p=0,071$) entre os grupos de pacientes que responderam e não responderam à quimioterapia, porém, vale salientar que, pelo coeficiente estimado (-0,538), a medida que o valor de EZH2 cresce, aumenta a chance das pacientes apresentarem recidiva (em ambos os grupos).

Gráfico 2 - Por resposta à quimioterapia, análise de sobrevivência para a recidiva até 24 meses de acompanhamento corrigida pelo EZH2

5. Discussão

A heterogeneidade do câncer de mama na sua evolução e na resposta ao tratamento padrão nos impulsiona a identificar marcadores que permitam individualizar a terapia a ser proposta às pacientes. O curso clínico e o tratamento das pacientes com câncer de mama são direcionados pelas características biológicas de seus tumores; é de suma importância uma classificação acurada das mesmas. A expressão dos receptores hormonais e do HER2, identificados através da avaliação imunoistoquímica, tem guiado a classificação tumoral e hoje é utilizada na padronização das bases do tratamento. Tumores que apresentam receptores hormonais positivos (75-80% dos tumores) e aqueles que possuem a proteína para o HER2 superexpressa (15-20% dos tumores) já tem parte de sua terapêutica definida (terapia hormonal e Trastuzumab).

O uso do tratamento neoadjuvante, considerado um modelo *in vivo* para testar a resposta tumoral aos medicamentos empregados, é vantajoso na avaliação das características biológicas dos tumores malignos, na tentativa de computarmos os fatores preditivos de resistência ou de resposta às drogas citotóxicas. Os estudos do projeto NSABP-B18 (Fisher *et al.*, 1997; Fisher *et al.*, 1998; Wolmark *et al.*, 2001; Rastogi *et al.*, 2008), que avaliaram a sobrevida de mulheres com câncer de mama que foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante, demonstraram que a resposta patológica completa ao tratamento correlacionou-se a maior sobrevida e, sua atualização com 16 anos de seguimento, mostrou que o benefício na sobrevida é maior com o passar do tempo, desafiando-nos a pesquisar

fatores preditivos de resposta que possam identificar as pacientes que mais se beneficiariam do tratamento neoadjuvante à base de antracíclicos.

Não encontramos na literatura trabalhos que correlacionaram a proteína EZH2 com a resposta à quimioterapia neoadjuvante. O estudo de Gong *et al.* (2011), que identificou a proteína EZH2 em tumores residuais de carcinoma inflamatório, nos impulsionou a avaliar sua associação com a resposta à quimioterapia neoadjuvante.

Em nosso estudo, a classificação entre as características clínicas, patológicas e biológicas dos tumores de dois grupos de pacientes (grupo que respondeu à quimioterapia neoadjuvante e grupo que não respondeu a essa quimioterapia) foi avaliada. Todos os tumores analisados apresentaram positividade para a expressão da proteína EZH2 em pelo menos 11% das células tumorais invasivas, concordando com o estudo de Bachmann *et al.* (2006), que evidenciou a expressão de EZH2 em tumores de mama localmente avançados.

A falta de padronização da imunoistoquímica na avaliação da expressão da proteína EZH2 permitiu-nos classificar sua presença em função da porcentagem de células coradas e da intensidade dessa coloração, graduando-a em um escore que variou de 0 a 8, e possibilitou sua interpretação por meio de outros parâmetros, já avaliados em função de seus escores e suas porcentagens. Desse modo, concluímos que quanto maior o grau histológico do tumor, menor os escores dos receptores hormonais e maior a porcentagem da expressão das proteínas Ki-67 e EZH2, dados consistentes com os descritos na literatura (Kleer *et al.*, 2003;

Bachmann *et al.*, 2006; Collett *et al.*, 2006; Athanassiadou *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2011; Reijm *et al.*, 2011; Alford *et al.*, 2012).

No presente estudo, a análise de correlação entre os valores da proteína EZH2 com a idade das pacientes, o número de ciclos de quimioterápicos prescritos e os valores dos receptores hormonais foi negativa. Apesar de essa relação ser significativa apenas para os valores de receptor de estrogênio e limítrofe para os valores de receptor de progesterona, podemos encontrar na literatura estudos de expressão gênica que também correlacionam a expressão dessa proteína com idade jovem para o diagnóstico (Reijm *et al.*, 2011). Esses mesmos autores também demonstraram a relação inversa entre os níveis da expressão do RNAm do EZH2 e do RNAm do receptor de estrogênio. De igual modo, Kleer *et al.* (2003) identificaram que níveis maiores de expressão do gene *EZH2* associaram-se com menor idade à época do diagnóstico do câncer de mama e com tumores que apresentaram negatividade para os receptores hormonais (RE e RP).

Nosso estudo também analisou a relação entre os valores da proteína EZH2 e das proteínas HER2 e Ki-67, mostrando haver uma correlação positiva, apesar de ser significativa apenas para os valores de Ki-67. Essa correlação é concordante com publicações de outros autores que identificaram essa mesma relação (Bachmann *et al.*, 2006; Collett *et al.*, 2006, Athanassiadou *et al.*, 2011), mas é controversa com relação a HER2, pois, apesar dos resultados de Collett *et al.* (2006) serem semelhantes aos nossos achados, demonstrando haver uma correlação positiva entre a

expressão de EZH2 e HER2, os estudos de Kleer *et al.* (2003) não comprovaram essa associação.

Na análise dos nossos dados de resposta ou não resposta à quimioterapia neoadjuvante, os receptores hormonais, as proteínas HER2, p53 e Ki-67 não apresentaram associação com o tipo de resposta tumoral aos antracíclicos.

A revisão da literatura demonstra dados conflitantes a respeito da capacidade da predição de resposta aos quimioterápicos dos marcadores tumorais.

Quanto aos receptores hormonais, alguns estudos evidenciaram que tumores que não expressam esses receptores apresentam maior quimiossensibilidade aos antracíclicos (Colleoni *et al.*, 2004, Guarneri *et al.*, 2006; Colleoni *et al.*, 2008, Colleoni *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Huober *et al.*, 2010; Precht *et al.*, 2010), enquanto outros reportaram não haver associação entre os receptores hormonais e a resposta à quimioterapia neoadjuvante com antracíclicos (Burcombe *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003; Bozzetti *et al.*, 2006; Tiezzi *et al.*, 2007).

A disparidade desses dados pode ser explicada pela diferença no limiar da detecção de positividade dos receptores hormonais à imunoistoquímica, que variou nos últimos anos. Estudos sobre a expressão gênica dos receptores hormonais (Carey *et al.*, 2007) identificaram a ausência de expressão desses receptores como preditiva de resposta à quimioterapia neoadjuvante baseada em antracíclicos.

A maior parte dos estudos avaliando a proteína HER2 e a sensibilidade aos antracíclicos foi realizada na terapia adjuvante. Dados sobre a sensibilidade neoadjuvante são conflitantes. Assim como em nosso estudo, a relação entre a superexpressão da proteína HER2 e a resposta à quimioterapia neoadjuvante não foi identificada nos trabalhos de Zhang *et al.* (2003), Burcombe *et al.* (2005), Bozzetti *et al.* (2006), Tiezzi *et al.* (2007), Colleoni *et al.* (2008), Huober *et al.* (2010) e Precht *et al.* (2010).

Por outro lado, Petit *et al.* (2001) identificaram maior resposta à quimioterapia neoadjuvante nos tumores que superexpressavam HER2 e foram submetidos a altas doses de antracíclicos. Esses dados sugerem que o HER2 não é um preditor consistente de resposta objetiva do carcinoma de mama à quimioterapia neoadjuvante apenas com antracíclicos. A introdução da terapia específica com Trastuzumab para pacientes com superexpressão da proteína HER2 modificou a resposta desses tumores à quimioterapia neoadjuvante, que passaram a apresentar altos índices de resposta completa a esse agente (60%) (Buzdar *et al.*, 2007).

A análise da expressão da proteína Ki67 na resposta aos antracíclicos neoadjuvantes também apresenta resultados controversos. Assim como em nosso estudo, essa relação não foi identificada por Burcombe *et al.* (2005) e Bonnefoi *et al.* (2003), ao passo que Colleoni *et al.* (2004), Bozzetti *et al.* (2006) e Petit *et al.* (2004) a correlacionaram com maior resposta a esses agentes quando sua expressão era superior a 25%, 20% e 20%, respectivamente.

O valor preditivo de resposta à quimioterapia neoadjuvante em relação à expressão da proteína p53 foi vastamente investigada, porém, uma associação consistente não foi identificada. Concordante com nossos achados, Bonnefoi *et al.* (2003), Tiezzi *et al.* (2007), Keam *et al.* (2007) e Bidard *et al.* (2008) não demonstraram associação, apesar de outros estudos evidenciarem que sua expressão seria um fator preditivo de resposta a esses agentes (Bertheau *et al.*, 2007).

Com relação à proteína EZH2, não evidenciamos associação significativa entre sua expressão e a resposta clínica do carcinoma de mama localmente avançado aos quimioterápicos ministrados de forma neoadjuvante. Conforme exposto anteriormente, não existem dados na literatura sobre a proteína EZH2 e a resposta à quimioterapia neoadjuvante, o que nos impossibilita de realizar comparações.

Avaliamos a sobrevida livre de doença entre os dois grupos de pacientes (responde à quimioterapia x não responde à quimioterapia) e identificamos que as pacientes que respondem à quimioterapia neoadjuvante apresentam maior sobrevida livre de doença no seguimento de 24 meses. Esses dados são concordantes com os da literatura relativos a resposta à quimioterapia neoadjuvante. (Fisher *et al.*, 1997; Precht *et al.*, 2010).

A análise de sobrevida livre de doença corrigida pela expressão da EZH2 não demonstrou diferença significativa entre os grupos em 2 anos de seguimento, porém na análise de 5 anos, Kleer *et al.* (2003) a identificaram como fator independente para desenvolvimento de metástases. Essa

diferença talvez possa ser explicada pela nossa pequena casuística, pois, embora não significativa, a análise de regressão de Cox demonstra que o coeficiente estimado evidencia uma tendência a ocorrer maior recidiva quanto maior for a expressão de EZH2.

A resposta tumoral é um parâmetro válido para avaliarmos a eficácia da quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama. Nos últimos anos, a categorização tumoral em nível molecular desenvolveu-se muito, permitindo o que chamamos de *classificação molecular do câncer de mama*, levando-nos à busca das chamadas *terapias-alvo*. Por outro lado, as ferramentas clínicas necessárias para determinar quais tipos de tumores se beneficiam de uma terapia específica ainda está em fase de desenvolvimento.

Nossos resultados demonstram que a expressão do EZH2 é frequente em tumores localmente avançados e que não parece haver associação com a resposta ao tratamento neoadjuvante com antracíclicos. A possibilidade de utilizá-la como alvo terapêutico pode ser promissora na tentativa de melhorarmos a resposta clínica das pacientes com tumores de mama localmente avançados ao tratamento neoadjuvante. Novas pesquisas devem ser delineadas para melhor esclarecer esses aspectos.

6. Conclusões

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- A expressão da proteína EZH2 não se correlacionou com a resposta clínica do carcinoma de mama localmente avançado à quimioterapia neoadjuvante à base de antracíclicos.

- A proteína EZH2 correlacionou-se negativamente com os receptores hormonais (RE e RP) e positivamente com as proteínas HER2 e Ki-67.

7. Anexos

Anexo A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 02/09/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0827/09**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA DO CARCINOMA DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE POR METODOLOGIA DE AMPLIFICAÇÃO MULTIPLEX POR SONDAS DE LIGAÇÃO DEPENDENTE SENSÍVEIS À METILAÇÃO DE PROMOTORES GÊNICOS (MS-MLPA)**," apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Jose Roberto Morales Piato**

Pesquisador (a) Executante: **Lucienne Pereira Del Grossi**

CAPPesq, 03 de Setembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo B

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0827/09

Título: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA DO CARCINOMA DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE POR METODOLOGIA DE AMPLIFICAÇÃO MULTIPLEX POR SONDAS DE LIGAÇÃO DEPENDENTE SENSÍVEIS À METILAÇÃO DE PROMOTORES GÊNICOS (MS- MLPA).

Pesquisador Responsável: Jose Roberto Morales Piato

Pesquisador Executante: Lucienne Pereira Del Grossi

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 25/04/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 23/01/12 - Relatório de andamento e Mudança de título para: "Avaliação da metilação gênica na resposta clínica do carcinoma de mama localmente avançado a quimioterapia neoadjuvante".
- Carta datada de 10/02/12 - Emenda e relatório do estudo.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 25 de Abril de 2012

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo C

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do ICAVC

Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho
Fundado em 19/02/1920 – CGC 60.945.854/0001-72
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – CEP
APROVADO PELA CONEP/MS EM 25/08/97 CARTA Nº1555/97

São Paulo, 06 de setembro de 2006.

Ilmo. Sr.
Dr. Carlos Elias Fristachi
Pesquisador Responsável
Departamento de Onco-Ginecologia e Mastologia

Registro CEP:120/06

O Comitê de Ética em Pesquisa(CEP) do Instituto do Câncer Dr. Arnaldo, reunido no dia **23/08/2006** e no cumprimento de suas atribuições,de acordo com Resolução CNS 196/96, após revisão do seu protocolo de pesquisa **“Respostas clínicas de tumores primários de carcinoma ductal invasivo de mama estádios clínicos IIB e IIIA à quimioterapia neoadjuvante , consoante a imunoexpressão da proteína Maspín”** emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

- ☐ Aprovado;
- ☐ com pendência modificações ou informação relevante, a serem atendidas em 60 dias;
- ☐ retirado, por não ser reapresentado no prazo determinado;
- ☐ Não aprovado
- ☒ Aprovado Protocolo e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Enviar todo trimestre relatório - MS, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias.

Marilisa Cicerelli
CRM 4.793
O.M.S.

Dra. Marilisa Cicerelli
Coordenadora Substituta do CEP do
Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho

Anexo D

Esquemas de quimioterapia neoadjuvante com os respectivos números de ciclos aplicados nas pacientes que responderam ao tratamento quimioterápico

CASO	Esquema quimioterápico	Número de ciclos
1	FAC	3
2	FAC	3
3	FAC	3
4	FAC	4
5	FAC	3
6	AC	3
7	FAC	3
8	FAC	3
9	FAC	3
10	FAC	3
11	FAC	3
12	FAC	3
13	EC	3
14	FAC	3
15	FAC	3
16	FEC	4
17	FAC	4
18	FAC	4
19	FAC	3

AC (adriablastina, ciclofosfamida); EC (epirrubicina, ciclofosfamida); FAC (5-fluoro-uracil, adriablastina, ciclofosfamida); FEC (5-fluoro-uracil, epirrubicina, ciclofosfamida)

Anexo E

Esquemas de quimioterapia neoadjuvante com os respectivos números de ciclos aplicados nas pacientes que não responderam ao tratamento quimioterápico

CASO	Esquema quimioterápico	Número de ciclos
20	FAC	3
21	FAC	3
22	FAC	3
23	FAC	3
24	FAC	3
25	FAC	4
26	FAC	3
27	AC	3
28	EC	3
29	FAC	3
30	FAC	3
31	FAC	3
32	FAC	3
33	FAC	3
34	FAC	4
35	FAC	4
36	FAC	4
37	FAC	4

AC (adriablastina, ciclofosfamida); EC (epirrubicina, ciclofosfamida); FAC (5-fluoro-uracil, adriablastina, ciclofosfamida)

Anexo F

Tamanho tumoral medido com auxílio de paquímetro antes e após a administração de quimioterapia neoadjuvante nas pacientes que responderam ao tratamento quimioterápico (em centímetros)

CASO	Tumor pré- quimioterapia	Tumor pós - quimioterapia	Patologista
1	7,0	2,0	1,0
2	6.1	3.0	3.2
3	4.2	0.5	0.0
4	5.1	2.1	2.8
5	6.0	3.0	2.8
6	9.0	2.5	2.5
7	4.5	0.0	0.0
8	7.1	3.5	3,0
9	5.2	2,0	3,0
10	6.8	0,0	1,0
11	5.3	2,0	3,0
12	6.3	2,0	1.8
13	4.6	1.0	1.0
14	5.0	2.5	0,0
15	7,0	3,0	3.5
16	5.1	2.5	2.6
17	5.2	1,0	1.8
18	5.6	2.0	2.5
19	5.5	0,0	1.8

Anexo G

Tamanho tumoral medido com auxílio de paquímetro antes (T pré QT) e após (T pós QT) a administração de quimioterapia neoadjuvante nas pacientes que não responderam ao tratamento quimioterápico (em centímetros)

CASO	Tumor pré- quimioterapia	Tumor pós- quimioterapia	Patologista
20	5.0	6.0	7.0
21	6.0	5.5	4.5
22	8.0	6.0	2.0
23	5.7	6.0	4.5
24	5.3	4.8	2.8
25	5.0	3.5	3.5
26	6.2	4.0	2.8
27	10.0	10.0	10.0
28	5.0	4.0	3.8
29	5.5	6.0	6.0
30	7.5	5.0	3.5
31	10.0	10.0	10.0
32	6.0	5.0	4.2
33	5.5	3.5	3.0
34	4.0	3.5	3.5
35	10.0	9.0	8.5
36	9.5	9.0	8.0
37	5.0	4.5	3.0

Anexo H

Características clínicas das pacientes pertencentes ao grupo de resposta à quimioterapia neoadjuvante

CASO	IDADE	RAÇA	MENOPAUSA	EC	Número Ciclos
1	41	2	0	IIIA	3
2	37	2	0	IIB	3
3	63	2	1	IIIA	3
4	55	2	1	IIIA	4
5	56	2	1	IIIA	3
6	35	2	0	IIB	3
7	43	3	0	IIIA	3
8	67	2	1	IIIA	3
9	60	3	1	IIIA	3
10	60	2	1	IIIA	3
11	39	2	0	IIIA	3
12	44	2	0	IIIA	3
13	44	2	0	IIIA	3
14	50	3	1	IIB	3
15	39	2	0	IIIA	3
16	30	2	0	IIIA	4
17	36	2	0	IIIA	4
18	47	1	0	IIIA	4
19	38	3	0	IIIA	3

EC: estadiamento clínico; Número ciclos: número de ciclos de quimioterapia neoadjuvante;
Raça: 1- amarela, 2- branca, 3- negra; Menopausa: 0 - pré-menopausa, 1- pós- menopausa

Anexo I

Características clínicas das pacientes pertencentes ao grupo de não resposta à quimioterapia neoadjuvante

CASO	IDADE	RAÇA	MENOPAUSA	EC	Número Ciclos
20	54	2	1	IIB	3
21	48	2	0	IIIA	3
22	67	2	1	IIIA	3
23	56	2	1	IIIA	3
24	65	2	1	IIIA	3
25	67	2	1	IIIA	4
26	69	1	1	IIIA	3
27	43	2	0	IIIA	3
28	54	2	1	IIB	3
29	69	2	1	IIIA	3
30	54	2	1	IIIA	3
31	48	2	0	IIIA	3
32	49	2	1	IIIA	3
33	66	2	1	IIB	3
34	70	1	1	IIIA	4
35	31	2	0	IIIA	4
36	49	2	1	IIIA	4
37	58	1	1	IIIA	4

EC: estadiamento clínico; Número ciclos: número de ciclos de quimioterapia neoadjuvante;
Raça: 1- amarela, 2- branca, 3- negra; Menopausa: 0 - pré-menopausa; 1- pós- menopausa

8. Referências Bibliográficas

AJCC. Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer; 2009.

Alford SH, Toy K, Merajver SD, Kleer CG. Increased risk for distant metastasis in patients with familial early-stage breast cancer and high EZH2 expression. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(2):429-37.

Athanassiadou AM, Tsipis A, Patsouris E, Gonidi M, Nicolopoulou-Stamati P, Chelidonis G, Athanassiadou P. Enhancer of zeste homologue 2 expression in breast carcinoma smears in relationship with p53, Ki-67 and other prognostic parameters. *Acta Cytol*. 2011;55(2):180-6.

Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*. 2006;24(2):268-73.

Bertheau P, Turpin E, Rickman DS, Espié M, de Reyniès A, Feugeas JP, Plassa LF, Soliman H, Varna M, de Roquancourt A, Lehmann-Che J, Beuzard Y, Marty M, Misset JL, Janin A, de Thé H. Exquisite sensitivity of TP53 mutant and basal breast cancers to a dose-dense epirubicin-cyclophosphamide regimen. *PLoS Med*. 2007;4(3):e90.

Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Therasse P, Hamilton A, van de Vijver M, MacGrogan G, Shepherd L, Amaral N, Duval C, Drijkoningen R, Larsimont D, Piccart M. Locally advanced/inflammatory breast cancers treated with intensive epirubicin-based neoadjuvant chemotherapy: are there molecular markers in the primary tumour that predict for 5-year clinical outcome? *Ann Oncol*. 2003;14(3):406-13.

Bozzetti C, Musolino A, Camisa R, Bisagni G, Flora M, Bassano C, Martella E, Lagrasta C, Nizzoli R, Personeni N, Leonardi F, Cocconi G, Ardizzoni A. Evaluation of HER-2/neu amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy in primary breast cancer: the role of anthracycline dose intensity. *Am J Clin Oncol*. 2006;29(2):171-7.

Bidard FC, Matthieu MC, Chollet P, Raoefils I, Abrial C, Dômont J, Spielmann M, Delaloge S, André F, Penault-Llorca F. p53 status and efficacy of primary anthracyclines/alkylating agent-based regimen according to breast cancer molecular classes. *Ann Oncol*. 2008;19(7):1261-5.

Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, Daley FM, Noble S, Pittam M, Wright D, Allen SA, Dove J, Wilson GD. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;92(1):147-55.

Buzdar AU, Valero V, Ibrahim NK, Francis D, Broglio KR, Theriault RL, Puztai L, Green MC, Singletary SE, Hunt KK, Sahin AA, Esteva F, Symmans WF, Ewer MS, Buchholz TA, Hortobagyi GN. Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. *Clin Cancer Res.* 2007;13(1):228-33.

Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani RS, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Cao X, Yu J, Kleer CG, Varambally S, Chinnaiyan AM. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene.* 2008;27(58):7274-84.

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2329-34.

Caudle AS, Gonzalez-Angulo AM, Hunt KK, Liu P, Puztai L, Symmans WF, Kuerer HM, Mittendorf EA, Hortobagyi GN, Meric-Bernstam F. Predictors of tumor progression during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(11):1821-8.

Chang CJ, Yang JY, Xia W, Chen CT, Xie X, Chao CH, Woodward WA, Hsu JM, Hortobagyi GN, Hung MC. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1- β -catenin signaling. *Cancer Cell.* 2011;19(1):86-100.

Charfare H, Limongelli S, Purushotham AD. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Br J Surg.* 2005; 92(1):14-23.

Chase A, Cross NC. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(9):2613-8.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50.

Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, Gelber RD, Curigliano G, Torrisi R, Luini A, Intra M, Galimberti V, Renne G, Nolè F, Peruzzotti G, Goldhirsch A. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6622-8.

Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Bottiglieri L, Gelber RD, Veronesi P, Balduzzi A, Torrissi R, Luini A, Intra M, Dellapasqua S, Cardillo A, Ghisini R, Peruzzotti G, Goldhirsch A. Expression of ER, PgR, HER1, HER2, and response: a study of preoperative chemotherapy. *Ann Oncol.* 2008;19(3):465-72.

Colleoni M, Bargnardi V, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua M, Veronesi P, Cardillo A, Torrissi R, Luini A, Goldhirsch A. A nomogram based on the expression of Ki-67, steroid hormone receptors status and number of chemotherapy courses to predict pathological complete remission after preoperative chemotherapy for breast cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46(12):2216-24.

Collett K, Eide GE, Arnes J, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Aas T, Otte AP, Akslen LA. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(4):1168-74.

Costa SD, Loibl S, Kaufmann M, Zahm DM, Hilfrich J, Huober J, Eidtmann H, du Bois A, Blohmer JU, Ataseven B, Weiss E, Tesch H, Gerber B, Baumann KH, Thomssen C, Breitbach GP, Ibishi S, Jackisch C, Mehta K, von Minckwitz G. Neoadjuvant chemotherapy shows similar response in patients with inflammatory or locally advanced breast cancer when compared with operable breast cancer: a secondary analysis of the GeparTrio trial data. *J Clin Oncol.* 2010; 28(1):83-91.

Darb-Esfahani S, Loibl S, Müller BM, Roller M, Denkert C, Komor M, Schlüns K, Blohmer JU, Budczies J, Gerber B, Noske A, du Bois A, Weichert W, Jackisch C, Dietel M, Richter K, Kaufmann M, von Minckwitz G. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2009;11(5):R69.

Derfoul A, Juan AH, Difilippantonio MJ, Palanisamy N, Ried T, Sartorelli V. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase. *Carcinogenesis.* 2011;32(11):1607-14.

Ding L, Erdmann C, Chinnaiyan AM, Merajver SD, Kleer CG. Identification of EZH2 as a molecular marker for a precancerous state in morphologically normal breast tissues. *Cancer Res.* 2006;66:4095–99.

Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem.* 2005;51(3):494-503.

Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol.* 2003 Jun;4(6):351-8.

Fernández-Sánchez M, Gamboa-Dominguez A, Uribe N, García-Ulloa AC, Flores-Estrada D, Candelaria M, Arrieta O. Clinical and pathological predictors of the response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Med Oncol*. 2006; 23(2):171-83.

Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Fisher ER, Wickerham DL, Wolmark N, DeCillis A, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol*. 1997;15(7):2483-93.

Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2672-85.

Fujii S, Tokita K, Wada N, Ito K, Yamauchi C, Ito Y, Ochiai A. MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene*. 2011;30(39):4118-28.

Giordano SH. Update on Locally Advanced Breast Cancer. *Oncologist*. 2003; 8(6):521-30.

Gong Y, Huo L, Liu P, Sneige N, Sun X, Ueno NT, Lucci A, Buchholz TA, Valero V, Cristofanilli M. Polycomb group protein EZH2 is frequently expressed in inflammatory breast cancer and is predictive of worse clinical outcome. *Cancer*. 2011;117(24):5476-84.

Gonzalez ME, Li X, Toy K, DuPrie M, Ventura AC, Banerjee M, Ljungman M, Merajver SD, Kleer CG. Downregulation of EZH2 decreases growth of estrogen receptor-negative invasive breast carcinoma and requires BRCA1. *Oncogene*. 2009;28(6):843-53.

Guarneri V, Broglio K, Kau SW, Cristofanilli M, Buzdar AU, Valero V, Buchholz T, Meric F, Middleton L, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J Clin Oncol*. 2006;24(7):1037-44.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2784-95.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474-81.

Hayward JL, Carbone PP, Heusen JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1977;35(3):292-8.

Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, Belau A, Khandan F, Hauschild M, Thomssen C, Högel B, Darb-Esfahani S, Mehta K, Loibl S. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(1):133-40.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil (on line). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward, E and Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011; 61: 69–90.

Jung SY, Jeong J, Shin SH, Kwon Y, Kim EA, Ko KL, Shin KH, Ro J, Lee KS, Park IH, Lee S, Kim SW, Kang HS. Accumulation of p53 determined by immunohistochemistry as a prognostic marker in node negative breast cancer; analysis according to St Gallen consensus and intrinsic subtypes. *J Surg Oncol*. 2011;103(3):207-11.

Keam B, Im SA, Kim HJ, Oh DY, Kim JH, Lee SH, Chie EK, Han W, Kim DW, Moon WK, Kim TY, Park IA, Noh DY, Heo DS, Ha SW, Bang YJ. Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7:203.

Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(20):11606-11.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.

Li X, Gonzalez ME, Toy K, Filzen T, Merajver SD, Kleer CG. Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *Am J Pathol*. 2009;175(3):1246-54.

Liu SV, Melstrom L, Yao K, Russell CA, Sener SF. Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer. *J Surg Oncol*. 2010; 101(4):283-91.

Lu C, Han HD, Mangala LS, Ali-Fehmi R, Newton CS, Ozbun L, Armaiz-Pena GN, Hu W, Stone RL, Munkarah A, Ravoori MK, Shahzad MM, Lee JW, Mora E, Langley RR, Carroll AR, Matsuo K, Spannuth WA, Schmandt R, Jennings NB, Goodman BW, Jaffe RB, Nick AM, Kim HS, Guven EO, Chen YH, Li LY, Hsu MC, Coleman RL, Calin GA, Denkbass EB, Lim JY, Lee JS, Kundra V, Birrer MJ, Hung MC, Lopez-Berestein G, Sood AK. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell*. 2010;18(2):185-97.

Mathew J, Asgeirsson KS, Agrawal A, Mukherjee A, Ellis IO, Cheung KL, Chan SY, Robertson JF. Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced primary breast cancers: the Nottingham experience. *Eur J Surg Oncol*. 2007; 33(8):972-6.

Petit T, Borel C, Ghnassia JP, Rodier JF, Escande A, Mors R, Haegelé P. Chemotherapy response of breast cancer depends on HER-2 status and anthracycline dose intensity in the neoadjuvant setting. *Clin Cancer Res*. 2001;7(6):1577-81.

Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, Mors R, Haegelé P, Eber M, Ghnassia JP. 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;40(2):205-11.

Precht LM, Lowe KA, Atwood M, Beatty JD. Neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: tumor markers as predictors of pathologic response, recurrence, and survival. *Breast J*. 2010;16(4):362-8.

Raaphorst FM, Meijer CJ, Fieret E, Blokzijl T, Mommers E, Buerger H, Packeisen J, Sewalt RA, Otte AP, van Diest PJ. Poorly differentiated breast carcinoma is associated with increased expression of the human polycomb group EZH2 gene. *Neoplasia*. 2003;5(6):481-8.

Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, Margolese RG, Hoehn JL, Vogel VG, Dakhil SR, Tamkus D, King KM, Pajon ER, Wright MJ, Robert J, Paik S, Mamounas EP, Wolmark N. Preoperative Chemotherapy: Updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008;26(5):778-85.

Reijm EA, Jansen MP, Ruigrok-Ritstier K, van Staveren IL, Look MP, van Gelder ME, Sieuwerts AM, Sleijfer S, Foekens JA, Berns EM. Decreased expression of EZH2 is associated with upregulation of ER and favorable outcome to tamoxifen in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(2):387-94.

Sapino A, Marchiò C, Senetta R, Castellano I, Macrì L, Cassoni P, Ghisolfi G, Cerrato M, D'Ambrosio E, Bussolati G. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch*. 2006;449(3):288-96.

Schwartz GF, Hortobagyi GN, Masood S, Palazzo J, Holland R, Page D. Consensus Conference Committee. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26-28, 2003, Philadelphia, PA. *Hum Pathol*. 2004; 35(7):781-4

Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):846-56.

Specht J, Gralow JR. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2009;19(4):222-8.

Tang X, Milyavsky M, Shats I, Erez N, Goldfinger N, Rotter V. Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. *Oncogene*. 2004; 23(34):5759-69.

Tiezzi DG, Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Zola FE, Marana HR, Tiezzi MG. HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer*. 2007 Feb;7:36.

Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2249-56.

Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res*. 2011;21(3):502-17.

van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative Chemotherapy in Primary Operable Breast Cancer: Results From the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902. *J Clin Oncol*. 2001;19(22):4224-37.

van Nes JG, Putter H, Julien JP, Tubiana-Hulin M, van de Vijver M, Bogaerts J, de Vos M, van de Velde CJ; Cooperating Investigators of the EORTC. Preoperative chemotherapy is safe in early breast cancer, even after 10 years of follow-up; clinical and translational results from the EORTC trial 10902. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115(1):101-13.

Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 2006;439(7078):871-4.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):118-45. -+*

Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative Chemotherapy in Patients with Operable Breast Cancer: Nine-Year Results From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;30:96-102.

Xiao Y. Enhancer of zeste homolog 2: A potential target for tumor therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(4):474-7.

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):174-83.

Young NL, Dimaggio PA, Garcia BA. The significance, development and progress of high-throughput combinatorial histone code analysis. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(23):3983-4000.

Zhang F, Yang Y, Smith T, Kau SW, McConathy JM, Esteva FJ, Kuerer HM, Symmans WF, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Pusztai L. Correlation between HER-2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2003;97(7):1758-65.

Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 2001;15(18):2343-60.