



**Universidade do Algarve**  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

## **Farmacogenómica do cancro da mama**

Dissertação para obtenção do grau de mestre em  
Ciências Farmacêuticas

**Beatriz Rosário Santos Sousa**

Trabalho efetuado sob a orientação do Prof. Doutor João Varela

**Faro, Setembro de 2016**



**Universidade do Algarve**  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

# **Farmacogenómica do cancro da mama**

Dissertação para obtenção do grau de mestre em  
Ciências Farmacêuticas

**Beatriz Rosário Santos Sousa**

Trabalho efetuado sob a orientação do Prof. Doutor João Varela

**Faro, Setembro de 2016**

# Farmacogenómica do cancro da mama

## Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

(Beatriz Rosário Santos Sousa)

Copyright© 2016 Beatriz Rosário Santos Sousa

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao Prof. Dr. João Varela, pela disponibilidade demonstrada desde o início e pela atenção, aconselhamento e enorme ajuda prestada ao longo deste último ano, pois sem ele a escrita da presente monografia teria sido ainda mais árdua e trabalhosa. Não podia ter escolhido um melhor orientador de tese de mestrado, obrigada!

Quero também agradecer à minha família, aos meus pais e às minhas irmãs, que aconteça o que acontecer estão sempre lá para me apoiar e para me guiar. Sei que têm muito orgulho em mim e na pessoa que me tornei, mas eu também tenho ainda mais orgulho na família que tenho.

Aos meus amigos, mais antigos e mais recentes, e a todas as pessoas que tive o prazer de conhecer ao longo de todo o meu percurso académico, uma das melhores fases da minha vida. Vão fazer parte da minha vida para sempre, mesmo que os nossos caminhos já não se cruzem tão frequentemente. Ajudaram a construir a pessoa que sou hoje, e por isso agradeço.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à Ana Catarina Felismino por ter entrado na minha vida. É uma amizade como existem poucas no mundo, e que tenho a certeza que vai durar muitos e muitos mais anos. Obrigada por estares sempre aqui para mim, nunca me desiludiste!

## RESUMO

O cancro é atualmente a doença mais letal a nível mundial, com 14,1 milhões de novos casos, dos quais resultaram 8,2 milhões de mortes em todo o mundo no ano de 2012. Só em Portugal verificou-se uma taxa de incidência de cancro da mama (bruta), no sexo feminino, de 110,12 por cada 100 mil habitantes. Contudo, tem-se verificado uma tendência positiva no que diz respeito às taxas de sobrevivência, graças à rápida evolução de novos métodos de diagnóstico e terapêutica inovadoras que vão surgindo.

A carcinogénese do cancro da mama envolve, entre outros fatores, modificações genéticas que levam a alterações na função dos genes e que podem, inclusive, ser passadas às gerações seguintes. Este é um tipo de cancro com uma forte componente genética, pelo que atualmente são já conhecidas várias associações entre determinados genes com alelos mutantes, como o gene *BRCA1* e o *BRCA2*, e o risco de desenvolvimento de cancro da mama.

Nos últimos anos tem-se verificado um enorme progresso no tratamento desta doença com o desenvolvimento de fármacos mais seletivos, onde se incluem as terapias hormonais, como tamoxifeno ou os inibidores da aromatase (por exemplo, exemestano), e as terapias biológicas, onde o trastuzumab se inclui.

A Farmacogenómica consiste no estudo dos fatores genéticos que afetam a função ou expressão de produtos génicos envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos. Uma vez que existe uma variação muito significativa na resposta aos fármacos e, conseqüentemente, na taxa de sucesso da terapêutica em indivíduos submetidos a regimes equivalentes, o conceito de “medicina personalizada” tem vindo a ganhar cada vez mais interesse. Esta abordagem terapêutica tem sido implementada através da determinação das variantes genéticas de cada doente a partir de testes genómicos como o MammaPrint® ou o Oncotipo DX®, cujos resultados podem ser usados na seleção do tratamento mais seguro e eficaz de pacientes com cancro da mama.

**Palavras-chave:** Cancro da mama; BRCA; Farmacogenómica; MammaPrint®; Oncotipo DX®; Medicina personalizada

## ABSTRACT

Cancer is nowadays the most lethal disease worldwide. About 14.1 million new cases were reported in 2012, which resulted in 8.2 million deaths. Only in Portugal, the incidence gross rate of breast cancer in females was 110,12 for each 100 thousand habitants. However, there has been a positive trend in the survival rates, thanks to the rapid development of novel diagnostic methods and innovative therapies.

Carcinogenesis of breast cancer involves, among other factors, genetic modifications leading to changes in gene function, some of which can even be transferred to the next generations. As this type of cancer has a strong genetic component, the association between specific genes with mutant alleles of *BRCA1* and *BRCA2* genes with the risk of breast cancer development is already known.

Over the last few years, there has been a huge progress in the treatment of this disease with the development of more selective drugs, where the hormonal therapies are included, such as tamoxifen, or aromatase inhibitors (e.g., exemestane), and the biological therapies, where trastuzumab is included.

Pharmacogenomics consists in the study of genetic factors affecting the function or expression of gene products involved in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. Since there is a significant variation in drug response and, as a result, in the therapeutic success rate in patients submitted to equivalent schemes, the concept of “personalized medicine” is gaining increasing interest. More specifically, this type of therapeutic approach has been achieved through the determination of genetic background of each patient using genomic tests, such as MammaPrint® or Oncotipo DX®, whose results can be used to select the safest and effective treatment to a given breast cancer patient.

**Key-words:** Breast cancer; BRCA; Pharmacogenomics; MammaPrint®; Oncotipo DX®; personalized medicine

## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	v
Índice de figuras .....	viii
Índice de quadros.....	ix
Lista de anexos .....	x
Lista de siglas .....	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos .....	3
3. Metodologia .....	3
4. O cancro .....	3
4.1. Conceitos.....	3
4.2. Marcas características do cancro.....	5
4.3. Epidemiologia do cancro.....	7
5. Cancro da mama.....	8
5.1. Epidemiologia do cancro da mama .....	9
5.2. Etiologia .....	9
5.3. Estádios da doença .....	12
5.4. Grau.....	14
5.5. Patologia do cancro da mama.....	14
5.5.1. Classificação histológica.....	15
5.5.2. Classificação molecular e imunohistoquímica .....	24
6. Predisposição genética para o cancro da mama .....	29
6.1. Genes e polimorfismos.....	31

6.1.1.	<i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .....	32
6.1.2.	<i>TP53</i> .....	36
6.1.3.	<i>PTEN</i> .....	37
6.1.4.	<i>CHECK2</i> .....	38
6.1.5.	<i>ATM</i> .....	39
6.1.6.	<i>PALB2</i> e <i>BRIP1</i> .....	40
6.1.7.	<i>RAD51C</i> .....	41
7.	Rastreio e diagnóstico do cancro da mama .....	43
7.1.	Mamografia .....	44
7.2.	Ressonância magnética e ultrassons.....	45
7.3.	Biópsia.....	46
7.4.	Imunohistoquímica.....	48
7.5.	Marcadores tumorais .....	48
7.6.	Testes genómicos .....	50
7.6.1.	MammaPrint® .....	51
7.6.2.	Oncotipo DX®.....	53
8.	Farmacogenómica do cancro da mama .....	54
8.1.	Cancro ER <sup>+</sup> (e PR <sup>+</sup> ).....	57
8.1.1.	Moduladores seletivos dos recetores de estrogénio.....	59
8.1.2.	Inibidores da aromatase .....	64
8.2.	Cancro HER2 <sup>+</sup> .....	67
8.2.1.	Trastuzumab.....	68
8.2.2.	Pertuzumab .....	69
8.2.3.	Bevacizumab.....	70
8.2.4.	Lapatinib .....	71
8.2.5.	Trastuzumab-emtansina .....	71
8.2.6.	Everolimus .....	72

8.3.	Cancro triplo-negativo.....	74
8.3.1.	Quimioterapia citotóxica.....	75
8.3.2.	Terapia seletiva: novos alvos .....	80
8.4.	Cirurgia e Radioterapia .....	81
8.5.	Conclusão .....	84
9.	Bibliografia.....	85
	Anexos .....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 4.1.1</b> – Processo de transformação de células normais em células cancerígenas.	4
<b>Figura 4.2.1</b> – Exemplos de classes farmacológicas que atuam seletivamente em cada uma das marcas características adquiridas pelo cancro.	6
<b>Figura 4.3.1</b> – Previsão da evolução da incidência de cancro em Portugal (2010 a 2030).	7
<b>Figura 5.5.1.1</b> – Esquema representativo das estruturas normais da mama.	17
<b>Figura 5.5.2.1</b> – Heterogeneidade do cancro da mama: classificação imunohistoquímica, classificação molecular e classificação histológica.	25
<b>Figura 6.1</b> – Suscetibilidade genética no cancro da mama hereditário.	30
<b>Figura 6.1.1.1</b> – Representação esquemática dos domínios funcionais dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> , com respetivos ligandos proteicos.	33
<b>Figura 7.2.1</b> – Comparação de imagens por ressonância magnética.	46
<b>Figura 7.6.1.1</b> – Padrões dos resultados dicotómicos do MammaPrint® obtidos por <i>microarrays</i> .	52
<b>Figura 8.1</b> – Opções de terapia adjuvante sistémica de acordo com o tipo imunohistoquímico de cancro da mama.	57
<b>Figura 8.1.1.1</b> – Metabolismo do tamoxifeno via CYP450. Os metabolitos hidroxilados sofrem posterior conjugação pela <i>SULT</i> e <i>UGT</i> .	61
<b>Figura 8.1.1.2</b> – Comparação do número de anos sem recidivas que os diferentes tipos de metabolizadores para o CYP2D6 apresentam, após serem submetidos ao tratamento do cancro da mama com tamoxifeno.	63
<b>Figura 8.2</b> – Representação esquemática das classes terapêuticas usadas no cancro ER <sup>+</sup> e HER2 <sup>+</sup> , com seus respetivos alvos de ação.	73

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 6.1.1</b> – Quadro resumo das síndromes associadas ao cancro da mama hereditário.....	43
<b>Quadro 7.6.1</b> – Critérios chave, aplicados ao próprio doente e/ou a parentes próximos de si, para a execução de testes de suscetibilidade genética para o cancro da mama.....	51
<b>Quadro 8.3.1.1</b> – Regimes de quimioterapia com maior eficácia demonstrada na luta contra o cancro da mama, reportada por vários estudos clínicos.....	80

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO I:</b> Classificação do cancro da mama segundo o sistema de categorias TNM.....	100
<b>ANEXO II:</b> Subtipos moleculares de cancro da mama.....	101
<b>ANEXO III:</b> Comparação entre o teste MammaPrint® e outros testes de suscetibilidade genética para o cancro da mama.....	102
<b>ANEXO IV:</b> Sumário dos vários tipos de terapia endócrina do cancro da mama.....	103

## LISTA DE SIGLAS

<b>5-FU</b>	5-FluoroUracilo
<b>AI</b>	Inibidores da aromatase, de <i>Aromatase Inhibitor</i>
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>AKT1</b>	<i>v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
<b>ALDH1A1</b>	Aldeído desidrogenase 1A1, de <i>ALdehyde DeHydrogenase 1 family, member A1</i>
<b>APC</b>	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
<b>AR</b>	Recetor de androgénios, de <i>Androgen Receptor</i>
<b>ARID1A/B/2</b>	<i>AT-Rich Interaction Domain 1A/B/2</i>
<b>ASXL1</b>	<i>Additional SeX combs Like 1, transcriptional regulator</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated gene</i>
<b>BAP1</b>	<i>BRCA1 Associated Protein 1</i>
<b>BARD1</b>	<i>BRCA1 Associated RING Domain protein 1</i>
<b>BASC</b>	Complexo de vigilância do genoma associado ao <i>BRCA1</i> , de <i>BRCA1-Associated genome Surveillance Complex</i>
<b>BIC</b>	<i>Breast Cancer Information Core</i>
<b>BRCA1</b>	<i>BReast CAncer 1</i>
<b>BRCA2</b>	<i>BReast CAncer 2</i>
<b>BRCT</b>	<i>BRCA1 C-Terminus</i>
<b>BRIP1</b>	<i>BRCA1-Interacting Protein 1</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, de <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
<b>CA 15-3</b>	Antigénio “carboidrato” 15-3, de <i>Cancer Antigen 15-3</i>
<b>CA 27.29</b>	Antigénio “carboidrato” 27.29, de <i>Cancer Antigen 27.29</i>
<b>CASP8</b>	<i>CASPase 8</i>
<b>CDH1</b>	<i>CadDHerin 1</i>
<b>CDIS</b>	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
<b>CDK</b>	Cinases dependentes de ciclinas, de <i>Cyclin-Dependent Kinases</i>
<b>CEA</b>	Antigénio carcinoembrionário, de <i>CarcinoEmbryonic Antigen</i>
<b>CEC</b>	Célula Endotelial Circulante

<b>CEP</b>	Célula Endotelial Precursora
<b>CHEK2</b>	<i>CHEckpoint Kinase 2</i>
<b>CYP450</b>	Citocromo da família P450, de <i>CYtochromes P450</i>
<b>CLIS</b>	Carcinoma Lobular <i>in situ</i>
<b>CTLA4</b>	Células T citotóxicas associadas à proteína 4, de <i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4</i>
<b>E3</b>	Ubiquitina ligase
<b>EGFR</b>	Recetor do fator de crescimento epidérmico, de <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>ER</b>	Recetor de estrogénios, de <i>Estrogen Receptor</i>
<b>ESR1</b>	<i>EStrogen Receptor 1</i>
<b>ESR2</b>	<i>EStrogen Receptor 2</i>
<b>FFPE</b>	Embebidos em parafina, fixados por meio de formaldeído, de <i>Formalin-Fixed, Parrafin-Embedded</i>
<b>FGFR2</b>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i>
<b>GATA3</b>	<i>GATA binding protein 3</i>
<b>GWAS</b>	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
<b>HBOC</b>	Cancro da mama e do ovário hereditário, de <i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer</i>
<b>HER2</b>	Recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2, de <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
<b>HER3</b>	<i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3</i>
<b>HER4</b>	<i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4</i>
<b>HGF</b>	Fator de crescimento dos hepatócitos, de <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<b>HLA</b>	Hiperplasia Lobular Atípica
<b>HR</b>	Recombinação homóloga, de <i>Homologous Recombination</i>
<b>IGF-1R</b>	<i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i>
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina G1
<b>IRM</b>	Imagem por Ressonância Magnética
<b>ISRS</b>	Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
<b>KMT2D/C</b>	<i>Lysine methyltransferase 2D/C</i>
<b>KRAS</b>	<i>Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog</i>

<b>LHRH</b>	Análogos da hormona de libertação da hormona luteinizante, de <i>Luteinizing Hormone–Releasing Hormone</i>
<b>MAP2K4</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4</i>
<b>MAP3K13</b>	<i>Mitogen-activated protein Kinase Kinase Kinase 13</i>
<b>MET</b>	Transição epitélio-mesênquima, de <i>Mesenchymal–Epithelial Transition</i>
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>mTOR</b>	Rapamicina em mamíferos, de <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
<b>NCOR1</b>	<i>Nuclear receptor CORepressor 1</i>
<b>NF1</b>	<i>NeuroFibromin 1</i>
<b>NL</b>	Neoplasia Lobular
<b>NLS</b>	Sequência de localização nuclear, de <i>Nuclear Localization Sequence</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PALB2</b>	<i>Partner And Localizer of BRCA2</i>
<b>PARP</b>	Poli (ADP-Ribose) Polimerase
<b>PIK3CA</b>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit alfa</i>
<b>PR</b>	Recetor da progesterone, de <i>Progesterone Receptor</i>
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and TENSin homolog</i>
<b>RAD51C</b>	<i>RAD51 paralog C</i>
<b>RB1</b>	<i>RetinoBlastoma 1</i>
<b>RING</b>	<i>Really Interesting New Gene</i>
<b>SERD</b>	Redutor (“ <i>downregulator</i> ”) seletivo dos níveis do recetor dos estrogénios, de <i>Selective Estrogen Receptor Down-regulator</i>
<b>SERM</b>	Modulador seletivo do recetor dos estrogénios, de <i>Selective Estrogen Receptor Modulators</i>
<b>SETD2</b>	<i>SET Domain containing 2</i>
<b>SF3B1</b>	<i>Splicing Factor 3b subunit 1</i>
<b>SMAD4</b>	<i>SMAD family member 4</i>
<b>SMARCD1</b>	<i>SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily d, member 1</i>
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>SOE</b>	Carcinoma ductal invasivo Sem Outra Especificação

<b>STE</b>	Carcinoma invasivo Sem Tipo Especifico
<b>STK11</b>	<i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
<b>SULT</b>	SULfoTransferase
<b>TK</b>	Tirosina cinase, de <i>Tyrosine Kinase</i>
<b>TNBC</b>	Cancro da mama triplo-negativo, de <i>Triple Negative Breast Cancer</i>
<b>TOX3</b>	<i>TOX High Mobility Group Box Family Member 3</i>
<b>TP53</b>	<i>Tumor Protein p53</i>
<b>TR</b>	Região terminal, de <i>Terminal Region</i>
<b>TRH</b>	Terapia de Reposição Hormonal
<b>UDLT</b>	Unidade Ducto-Lobular Terminal
<b>UGT</b>	Uridina 5'-difosfo-GlucuronosilTransferase
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular, de <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro é descrito como um crescimento descontrolado de células, com a sua consequente disseminação, que pode afetar quase todo o corpo. Este crescimento pode invadir os tecidos adjacentes e metastizar para locais distantes. Muitos dos cancros podem ser prevenidos, evitando a exposição a fatores de risco comuns, tais como o fumo de tabaco. O tratamento da patologia oncológica envolve muitas vezes estratégias como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, especialmente quando existe uma deteção precoce <sup>1</sup>.

Com o crescimento da população mundial, o aumento da esperança média de vida e a adoção de comportamentos e estilos de vida conhecidos por aumentarem o risco de desenvolver cancro - tais como o tabagismo, o sedentarismo e uma alimentação desequilibrada - estima-se que a taxa de incidência desta doença terá tendência para aumentar, tanto em Portugal como no resto do mundo <sup>2</sup>. De entre os vários tipos de cancro que existem, o cancro da mama é o mais diagnosticado em mulheres e uma das suas principais causas de morte <sup>2</sup>.

O cancro da mama é uma doença complexa que pode ser caracterizada de acordo com as suas características morfológicas, clínicas e moleculares, sendo tradicionalmente classificada segundo critérios histopatológicos como o tamanho do tumor, o envolvimento ou não dos nódulos linfáticos e o seu estágio. Este último parâmetro é, por sua vez, determinado pela existência de metástases noutros tecidos diferentes do tecido mamário <sup>3, 4</sup>. Mais recentemente, avanços da tecnologia ao nível da biologia molecular têm permitido uma melhor compreensão das características das células tumorais, nomeadamente no que diz respeito à identificação de anomalias genéticas - como por exemplo o *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), variável número de cópias de genes, metilações ou translocações - e de biomarcadores, como o recetor dos estrogénios (ER, de *Estrogen Receptor*), o recetor da progesterona (PR, de *Progesterone Receptor*) e o recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2, de *Human Epidermal growth factor Receptor 2*). Em conjunto, os critérios clínicos e moleculares podem contribuir para um diagnóstico, prognóstico e definição da terapêutica mais personalizados, bem como para um aumento da eficácia, por exemplo, através da sinalização das anomalias genéticas responsáveis pelo comportamento do tumor e diminuição da toxicidade inerente aos fármacos utilizados, muitas vezes consequência das diferentes características genéticas dos doentes <sup>3</sup>.

Muitos dos cancros em estádios iniciais podem ser curados com sucesso através da cirurgia, complementada com terapia hormonal, quimioterapia, e/ou radioterapia, no caso de existirem fatores de risco para uma possível reincidência da doença. Os últimos avanços no campo da imunoterapia vieram, no entanto, dar alguma esperança a doentes em fase terminal <sup>5</sup>. Existem cada vez mais evidências científicas de que no cancro da mama existe uma forte componente inflamatória envolvida no seu desenvolvimento, pelo que a imunoterapia tem vindo a ganhar cada vez mais destaque como terapia adjuvante <sup>6</sup>. Contudo, sendo esta uma abordagem muito seletiva e específica, não é indicada para todos os tipos de cancro <sup>5</sup>.

Tendo o cancro da mama uma forte componente genética, pode também ser considerada como uma doença hereditária. Muitas destas situações são provocadas por mutações em genes como o *BRCA1* e *BRCA2* (*BReast CAncer* tipo 1 e 2), os quais aparentemente estão envolvidos em processos de reparação de ácido desoxirribonucleico (DNA, de *DeoxyriboNucleic Acid*). Atualmente, há indicações que alelos mutantes destes genes estejam associados a cerca de 5% do total de casos de cancro da mama. Os portadores de mutações nestes genes têm também um risco acrescido para o desenvolvimento de cancro do ovário, das trompas de Falópio, do cólon, da próstata, do pâncreas e da pele (melanoma) <sup>7</sup>.

Apesar das características do cancro variarem consideravelmente mesmo entre doentes portadores de mutações genéticas semelhantes, é possível fazer algumas associações entre os subtipos de cancro da mama e os alelos de suscetibilidade. Verifica-se, por exemplo, que a maioria dos portadores de mutações no *BRCA1* desenvolvem cancro da mama ER negativo (ER<sup>-</sup>), isto é, têm uma expressão reduzida ou ausente de ER. Por outro lado, os portadores de *BRCA2* mutantes desenvolvem principalmente cancro da mama ER positivo (ER<sup>+</sup>) <sup>8</sup>. Testes genómicos de prognóstico, como o MammaPrint® e o Oncotype DX™, que analisam a atividade de vários genes que contribuem para um aumento do risco de cancro, têm-se vindo a revelar ferramentas bastante úteis, nomeadamente na decisão de submeter ou não à quimioterapia certos doentes — por exemplo, que estejam em fases mais iniciais do cancro ou que apresentem poucos fatores de risco clínicos <sup>9</sup>.

Fazendo então recurso não só dos dados clínicos, mas também das características moleculares e genómicas durante os processos de diagnóstico e prognóstico do cancro da mama, é possível simplificar o processo de delineamento de

terapêuticas mais eficazes e seguras, aumentando assim a taxa de cura e sucesso dos tratamentos e, conseqüentemente, reduzindo significativamente os custos associados<sup>9, 10</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

Tendo em conta o tema da “Farmacogenómica do cancro da mama”, esta dissertação tem como principal objetivo sistematizar não só os protocolos de terapêutica oncológica atualmente seguidos, mas principalmente os fatores genéticos associados ao desenvolvimento do cancro da mama e a sua importância no delineamento do tratamento mais seguro e eficaz a aplicar a cada situação, fazendo uma comparação dos resultados, vantagens e desvantagens em ambas as situações.

## **3. METODOLOGIA**

A presente monografia tem por base uma revisão bibliográfica com vista a sistematizar os mais recentes conhecimentos na área da medicina oncológica, nomeadamente sobre os fatores genéticos associados ao desenvolvimento do cancro da mama a partir dos quais se podem aplicar protocolos de terapêutica personalizados a cada doente. Para além disso, foram consultados organismos governamentais com vista a completar a informação com dados relevantes. A pesquisa de dados foi executada entre outubro de 2015 e setembro de 2016.

A investigação documental consistiu na análise de artigos revistos por pares e trabalhos disponibilizados não só em livros da área, como também em bases de dados online, como a PubMed e a Web of Science, entre outras. Os principais termos de pesquisa utilizados foram: “pharmacogenomics of breast cancer”, “breast cancer”, “hereditary breast cancer”, “personalized therapy” e “endocrine therapy”.

## **4. O CANCRO**

### **4.1. CONCEITOS**

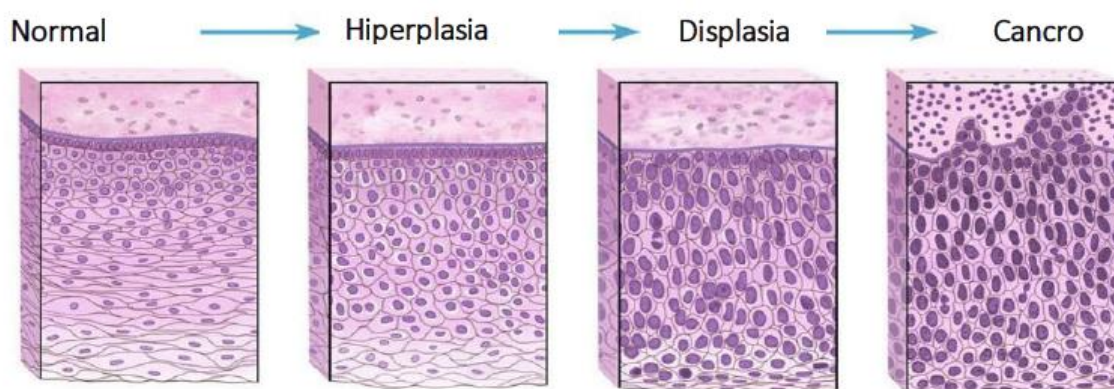
O cancro é atualmente considerado um fenómeno complexo e heterogéneo, composto por um conjunto de doenças com causas diversas, sendo as genéticas apenas um tipo entre muitas outras — como as ambientais, ocupacionais, nutricionais ou virais

—, caracterizadas por um crescimento celular anormal e descontrolado <sup>11</sup>. Por sua vez, o termo tumor (ou neoplasma) diz respeito a uma massa de tecido anormal que resulta da divisão acelerada de células ou da inibição da apoptose. Os tumores podem ser benignos ou malignos, sendo os últimos, por metastizarem, considerados cancros.

A carcinogénese consiste no processo através do qual células normais são transformadas em células cancerígenas. De acordo com o exemplificado na Figura 4.1.1, antes de se tornarem malignas, as células normais começam por sofrer um processo de hiperplasia, isto é, verifica-se um aumento anormal do número de células de um dado tecido ou órgão. Estas podem depois sofrer alterações estruturais (metaplasia), dando origem a células anormais, quando observadas ao microscópio ótico, não malignas (displasia). As hiperplasias e as displasias podem, ou não, vir dar origem a um cancro <sup>12</sup>.

Dependendo do tipo de tecido de origem, o cancro pode ser designado de carcinoma, se tiver origem em células epiteliais ou de tecidos que revestem os órgãos internos <sup>12</sup>, ou de sarcoma, isto é, um cancro que começa no osso ou em tecidos moles, incluindo cartilagem, tecido adiposo, músculo, vasos sanguíneos, tecidos fibrosos, conectivos ou de suporte. Os diferentes tipos de sarcomas são designados de acordo com a sua origem. Por exemplo, o osteossarcoma tem origem no osso <sup>12</sup>.

O processo de metastização é caracterizado pela migração das células cancerígenas para outros tecidos. Ao tumor secundário formado a partir destas células migratórias é dado o nome de metástase ou tumor metastático <sup>12</sup>.



**Figura 4.1.1** – Processo de transformação de células normais em células cancerígenas [Adaptado de National Cancer Institute <sup>12</sup>].

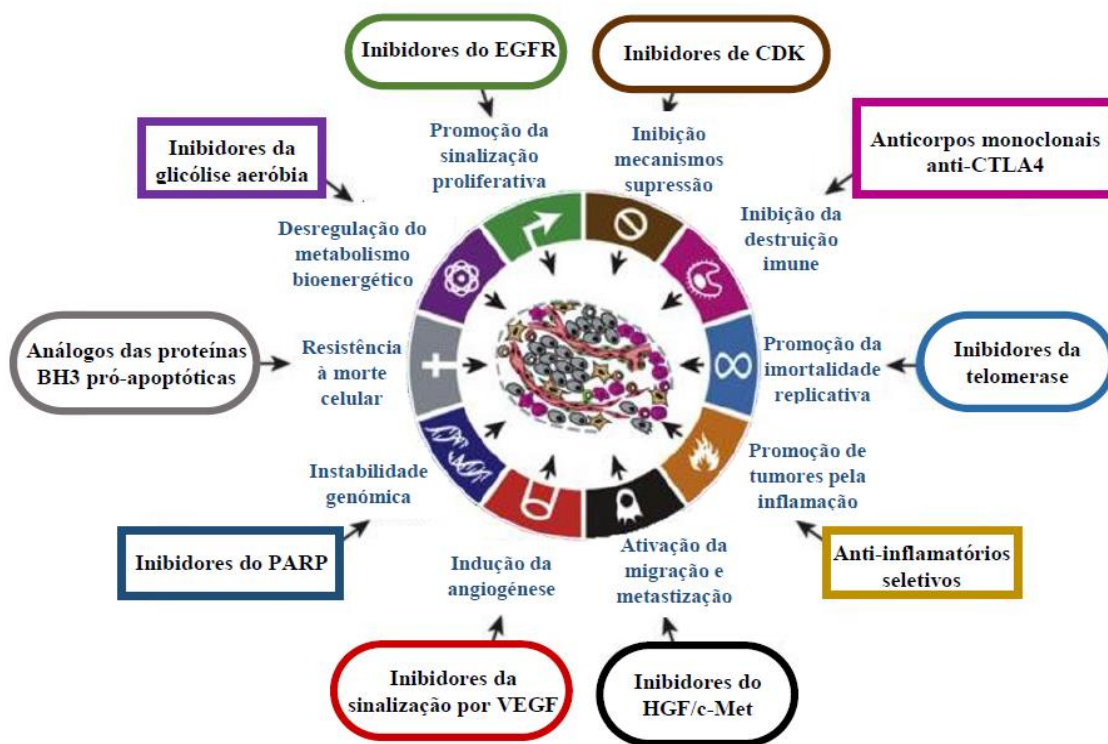
#### 4.2. MARCAS CARACTERÍSTICAS DO CANCRO

Apesar de existirem mais de 200 tipos de cancros descritos que podem afetar os diferentes tecidos que compõem o corpo humano, existem características comuns a todos eles <sup>13</sup>. De acordo com Hanahan e Weinberg <sup>11</sup>, existem oito alterações fundamentais na fisiologia celular que coletivamente ditam o desenvolvimento e proliferação das células malignas.

A enumeração destas marcas características, comuns a todos os cancros, constitui uma forma organizada de racionalizar os mecanismos complexos subjacentes à doença neoplásica, pelo que englobam um conjunto de características que levam à proliferação e disseminação das células tumorais. São estes: promoção da sinalização proliferativa, inibição dos mecanismos de supressão proliferativa, evasão da “destruição” imune, promoção da imortalidade replicativa, ativação da migração e metastização, indução da angiogénese, resistência à morte celular e desregulação do metabolismo bioenergético <sup>11</sup>. Para além disso, encontram-se também descritas duas propriedades subjacentes que facilitam a aquisição destas capacidades: a instabilidade genómica e a inflamação <sup>11, 13</sup>.

A instabilidade genómica pode ser definida como a tendência para adquirir mutações genómicas, quando os processos de que regulam a replicação celular são disfuncionais e/ou quando existe exposição a agentes carcinogénicos. O estudo do cancro como uma doença genética tem evoluído exponencialmente nas últimas décadas <sup>14</sup>, sendo por isso cada vez mais evidente que as variações fenotípicas resultam de interações entre fatores ambientais e genéticos que ocorrem ao longo do tempo. Os fatores ambientais podem ser tão diversos como dieta, tabagismo, consumo de álcool, comportamentos reprodutivos e sexuais, exposições ocupacionais a carcinogénios, poluição ambiental, medicação farmacológica, fatores geofísicos e agentes infecciosos <sup>15</sup>.

O rápido crescimento do arsenal terapêutico dos últimos anos pode ser categorizado de acordo com os seus efeitos numa ou mais características do cancro, pelo que têm sido desenvolvidos fármacos cada vez mais seletivos para um determinado alvo. Na Figura 4.2.1 encontram-se ilustrados alguns exemplos <sup>11</sup>.



**Figura 4.2.1** - Exemplos de classes farmacológicas que atuam seletivamente em cada uma das marcas características adquiridas pelo cancro: Inibidores do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), responsável pelo controlo das vias de sinalização que promovem o crescimento, a proliferação e a migração celular; inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDK), que regulam a progressão do ciclo celular; anticorpos monoclonais anti-CTLA4 (células T citotóxicas associadas à proteína 4, de *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), ou seja, anticorpos seletivos para os recetores expressos na superfície dos linfócitos T auxiliares, que quando ativados emitem sinais inibitórios aos linfócitos T. Estes fármacos têm, portanto, o objetivo de estimular a ação do sistema imunitário contra o tumor; inibidores da telomerase, cuja atividade se encontra aumentada em células tumorais que, conseqüentemente, poderá levar à sua imortalização; anti-inflamatórios seletivos, uma vez que se verifica uma forte componente inflamatória que estimula o crescimento do tumor; inibidores do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF, de *Hepatocyte Growth Factor*) /c-Met (recetor do HGF), que se encontram envolvidos no processo de crescimento e metastização; inibidores da sinalização pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), uma proteína que ativa o processo de formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese); inibidores da poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP), envolvida na reparação celular e apoptose; análogos das proteínas BH3 pró-apoptóticas; inibidores da glicólise aeróbia, aumentada em células cancerígenas [Adaptado de Hanahan & Weinberg <sup>11</sup>].

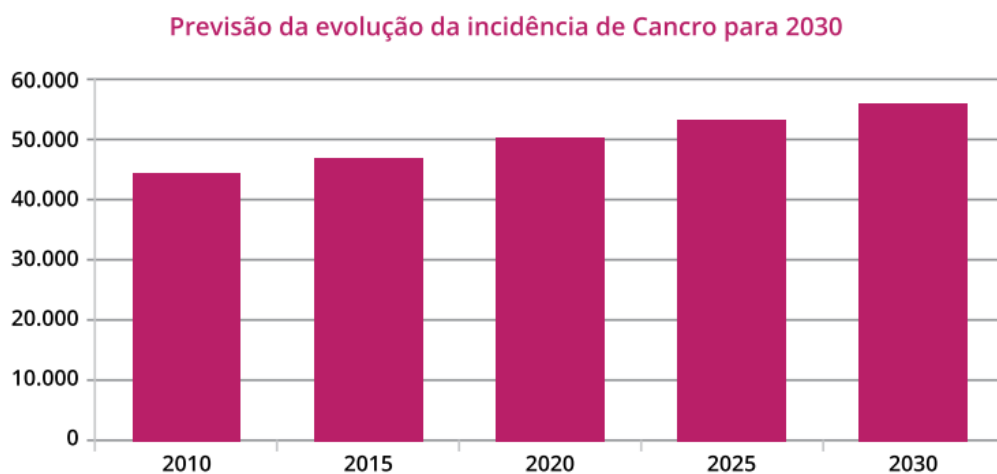
A grande maioria dos fármacos utilizados na área da oncologia apresenta um perfil de efeitos secundários bastante nefastos para os doentes, dependendo do seu mecanismo de ação e alvo terapêutico. Quanto menos específico for o fármaco, mais tóxico será o seu efeito. O uso desde agentes vai depender, portanto, de uma cuidadosa seleção tanto da dose como do regime a aplicar, uma vez que a seletividade do fármaco

é um conceito relativo, isto é, não existem moléculas totalmente seletivas para um dado alvo <sup>16</sup>.

### 4.3.EPIDEMIOLOGIA DO CANCRO

Em 2012, estima-se que tenham sido diagnosticados 14,1 milhões de novos casos de cancro, a nível mundial, com 8,2 milhões de mortes como consequência, sendo que o cancro da mama e o cancro do pulmão terão sido os mais diagnosticados e as principais causas de morte por doença neoplásica entre mulheres e homens, respetivamente <sup>2</sup>. Entre 1990 e 2013, evoluiu da terceira para a segunda principal causa de morte, logo atrás das doenças cardiovasculares <sup>17</sup>. Só em Portugal, registou-se, em 2009, uma taxa de incidência de tumores malignos de 426,5 por cada 100 mil habitantes.

Analisando os dados estatísticos atuais, prevê-se que a incidência do cancro terá tendência para aumentar, progressiva e gradualmente, até ao ano de 2030, tanto em Portugal (Figura 4.3.1) como no resto no mundo, em consequência do aumento da esperança média de vida e do crescimento da população mundial <sup>2, 18</sup>.



Fonte: IARC

**Figura 4.3.1** - Previsão da evolução da incidência de cancro em Portugal (2010 a 2030) [Adaptado de Miranda *et al* <sup>18</sup>].

Verifica-se uma taxa de incidência significativamente superior de cancro da próstata, cancro colo-retal, cancro da mama e de cancro do pulmão nos países mais desenvolvidos quando comparadas com as taxas dos países em desenvolvimento. Cancros associados a processos infecciosos — como o cancro do fígado, o cancro do estômago e o cancro do colo do útero — são, por outro lado, mais predominantes nos

países subdesenvolvidos. De uma forma geral, o cancro é mais incidente em países desenvolvidos, mas mais mortal nos países em via de desenvolvimento <sup>2</sup>. Esta discrepância deve-se a diversos fatores, tais como o acesso restrito a meios de diagnóstico e tratamento pode ser um fator que justifique a maior incidência de óbitos relacionados com casos de cancro, sobretudo nos países subdesenvolvidos. Contudo, mesmo em países desenvolvidos, o elevado custo associado aos tratamentos e a falta de seguros de saúde podem contribuir muitas vezes para o mau prognóstico associado a esta patologia <sup>2,19</sup>.

### **5. CANCRO DA MAMA**

O cancro da mama é atualmente reconhecido não como uma doença singular, mas sim como um conjunto heterogéneo de diferentes subtipos de neoplasmas <sup>20, 21</sup>. Trata-se, por isso, de um carcinoma com uma grande variabilidade tanto inter- como intra-tumoral <sup>22</sup>, classificado de acordo com as suas características morfológicas, clínicas, moleculares e genéticas <sup>3</sup>.

Desenvolve-se através de uma proliferação anormal e descontrolada das células epiteliais que revestem os ductos ou lóbulos da mama. É considerada uma doença clonal – uma única célula anormal, produto de mutações somáticas ou germinais em genes que normalmente controlam o ciclo celular, é suficiente para o desenvolvimento de um cancro <sup>23</sup>.

Os mais recentes avanços no campo da análise molecular, que permitiram não só o sequenciamento do genoma humano, como também de genomas cancerígenos, revelaram ser possível, num futuro próximo, fazer um diagnóstico e tratamento do cancro individualizados e personalizados para cada doente <sup>24</sup>. A identificação do ER, PR e HER2 como marcadores de diagnóstico e prognóstico do cancro da mama revelou ser uma das conquistas das últimas décadas. A expressão destes marcadores no carcinoma da mama permitiu o desenvolvimento de terapêuticas mais seletivas - como o tamoxifeno, os inibidores da aromatase e o anticorpo monoclonal trastuzumab – e, portanto, com menores efeitos adversos e melhores prognósticos e resultados <sup>25</sup>.

## 5.1.EPIDEMIOLOGIA DO CANCRO DA MAMA

O cancro da mama é o tipo de cancro mais frequentemente diagnosticado e a principal causa de morte entre as mulheres a nível mundial, com cerca de 1,7 milhões de novos casos e 521,900 mortes só em 2012. Representa 25% dos cancros diagnosticados e 15% das mortes por cancro entre as mulheres <sup>2</sup>. Apenas 1% dos casos de cancro da mama ocorrem em homens <sup>26</sup>.

Só em Portugal verificou-se uma taxa de incidência de 57,94 por cada 100,000 habitantes (em 2009) de ambos os sexos. No sexo feminino estima-se uma taxa de incidência de 110,12 por cada 100,000 habitantes, tendo sido registadas 1663 mortes por cancro da mama feminino (em 2012) <sup>18</sup>.

## 5.2.ETIOLOGIA

Apesar de, na maioria dos casos, não ser possível a identificação de fatores que poderão estar envolvidos na etiologia do cancro da mama, existem atualmente inúmeros fatores de risco documentados com uma relevante importância no desenvolvimento desta doença <sup>27</sup>. Características como a idade, história familiar, exposição hormonal ou predisposição genética têm sido associadas a um risco aumentado de desenvolver cancro da mama feminino <sup>28</sup>.

### I. Exposição hormonal e fatores reprodutivos

A variação dos níveis de estrogénios endógenos (ciclo menstrual) a que a mulher é sujeita ao longo da vida tem implicações no desenvolvimento ou proteção contra o cancro da mama <sup>28</sup>, pelo que se estima que o risco aumenta com o número de ciclos menstruais <sup>29</sup>.

Quanto mais cedo ocorrer a primeira menstruação (menarca) e quanto mais tarde for a primeira gravidez, maior é o risco, uma vez que existe uma maior exposição aos efeitos dos estrogénios <sup>30</sup>. A menopausa é também, pelas mesmas razões, um fator importante na etiologia do cancro da mama, pelo que quanto mais tarde surgir maior é o risco associado <sup>28, 22</sup>.

A amamentação constitui, por outro lado, um fator de proteção, uma vez que atrasa o regresso ao normal ciclo menstrual e diminui os níveis endógenos de hormonas como os estrogénios, cuja exposição é um fator de risco para o desenvolvimento do

cancro da mama. Estima-se uma redução do risco de 4,3% por cada ano de amamentação <sup>28</sup>.

As Terapias de Reposição Hormonal (TRH) combinadas, isto é, com estrogénios e progestina (progesterona sintética), constituem um fator de risco. Por outro lado, quando os estrogénios são usados de forma isolada podem ter efeitos protetores <sup>29</sup>. Seguindo a mesma linha de pensamento, também a contraceção oral, que na grande maioria é composta por uma combinação de estradiol e progestina, aumenta a probabilidade de vir a desenvolver cancro da mama. Estima-se, neste caso, um aumento de cerca de 24% do risco, o qual diminui com a cessação do tratamento <sup>29</sup>.

### **II. Idade**

O risco de desenvolver cancro da mama aumenta com a idade <sup>28</sup>, pelo que grande parte dos casos surgem depois da menopausa. O risco começará a duplicar por cada década de vida até aos 80 anos de idade <sup>30</sup>.

### **III. Historial clínico**

Uma história pessoal de cancro da mama é também considerada um fator de risco para uma possível reincidência, nomeadamente em mulheres jovens com um diagnóstico inicial de carcinoma ductal *in situ* do tipo ER<sup>-</sup> ou HER<sup>-</sup> <sup>28</sup>.

### **IV. Doenças benignas da mama**

A doença proliferativa mamária encontra-se associada a um aumento do risco para desenvolver cancro da mama <sup>28</sup>. Trata-se de um grupo de condições não cancerígenas caracterizadas pelo crescimento de certas células da mama. São exemplos a hiperplasia ductal, a hiperplasia lobular e os papilomas intraductais <sup>31</sup>. Outros tipos de traumas ou abscessos mamários encontram-se também indicados como fatores de risco <sup>30</sup>.

### **V. Densidade mamária**

O *American College of Radiology* classificou os padrões radiológicos de densidade, estimados nas mamografias, em quatro categorias: de 1 (pouco denso) a 4 (opaco) <sup>32</sup>.

O aumento da densidade mamária é considerado como um dos mais importantes indicadores do desenvolvimento do cancro da mama <sup>30</sup>. Quanto maior for a percentagem de tecido fibroso ou glandular e menor for a quantidade de tecido adiposo na mama, maior será a densidade <sup>33</sup>.

### **VI. História familiar**

Aproximadamente 10-15% dos casos de cancro da mama estão relacionados com uma história familiar da doença, com vários membros ao longo de várias gerações diagnosticados <sup>34</sup>.

Trata-se de um dos fatores mais citados pelas mulheres afetadas por esta patologia <sup>30</sup>. De facto, estima-se que mulheres com parentes afetados por esta patologia, nomeadamente parentes em primeiro grau, têm um risco significativamente maior de vir a desenvolver quando comparadas com mulheres sem qualquer caso na família <sup>28</sup>. O risco varia normalmente com o número de familiares diagnosticados <sup>30</sup>, podendo aumentar 1,80, 2,93 e 3,90 vezes se existir um, dois ou três ou mais parentes afetados, respetivamente <sup>28</sup>.

### **VII. Estilos de vida**

Fatores de risco modificáveis, como o consumo de álcool, o sedentarismo e a obesidade, têm uma importante contribuição para o desenvolvimento de inúmeras doenças, entre as quais se inclui o cancro da mama. O consumo de álcool de forma regular e em excesso (cerca de 5,0 a 9,9 gramas por dia, ou 3 a 6 copos por semana), pode aumentar significativamente o risco de cancro <sup>28</sup>, pelo que estará envolvido em cerca de 5% das mortes <sup>30</sup>.

Estima-se que a falta de exercício físico poderá contribuir para cerca de 10% dos casos de morte por cancro da mama, sendo inclusive um dos fatores mais indicados pelas mulheres diagnosticadas como sendo um fator causal da doença. Pode-se então afirmar que a prática de exercício físico constitui um fator de proteção contra esta doença <sup>30</sup>.

### **VIII. Radiação**

Tanto o tecido mamário normal como o cancerígeno são sensíveis à radiação ionizante. Apesar do uso da radiação como terapêutica adjuvante, em situações de

cancro da mama em estádios iniciais, ser eficaz na redução de recidivas e aumentar a taxa de sobrevivência, nas doses habitualmente usadas tem também um potencial carcinogénico para os tecidos saudáveis envolventes, podendo levar a um segundo tumor<sup>35</sup>.

#### **IX. Fatores ambientais**

A exposição a agentes carcinogénicos, como pesticidas (por exemplo diclorodifeniltricloroetano ou DDT), metais pesados, poluição atmosférica, tabagismo (ativo e passivo), substâncias químicas ou radiação, está também associada a um aumento do risco para desenvolver cancro da mama<sup>30</sup>.

#### **X. Predisposição genética**

A maioria dos doentes com cancro da mama (ou ovário) possui mutações em algum dos genes de suscetibilidade já identificados, nomeadamente o *BRCA1* e *BRCA2*. Cerca de 15% das mulheres afetadas têm uma história familiar da doença (1 ou mais parentes em primeiro grau com cancro da mama/ovário), e apenas uma pequena fração da população é portadora deste tipo de mutações hereditárias<sup>36,37</sup>.

Mutações noutros genes - como o *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*), o *TP53* (*Tumor Protein p53*) e o *PALB2* (*Partner and Localizer of BRCA2*) – estão também indicadas como fatores de risco do cancro da mama, mas com uma menor incidência que a observada nos casos de alelos mutantes dos genes *BRCA1/2*<sup>36</sup>.

O estudo da predisposição genética para desenvolver uma dada doença é o primeiro passo para tentar perceber quais serão as bases genéticas por detrás da mesma. No caso do cancro da mama hereditário, dada a sua grande componente genética e heterogeneidade clínica e molecular, este tipo de conhecimento ganha uma importância fundamental quando aplicado ao longo dos processos de diagnóstico, prognóstico, deteção precoce e tratamento<sup>34</sup>.

### **5.3. ESTÁDIOS DA DOENÇA**

O estágio da doença fornece uma descrição da extensão e disseminação do cancro, sendo determinada tendo em conta o tamanho do tumor, o envolvimento de nódulos linfáticos (e do número de nódulos linfáticos) e da propagação ou não das células cancerígenas para outros tecidos para além do mamário (metastização)<sup>4,38</sup>.

O carcinoma da mama pode ser classificado, de acordo com o sistema proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), em estádios de 0 a IV. De acordo com este sistema, o cancro da mama de estágio 0 (também designado de cancro da mama *in situ*) é caracterizado por uma acumulação de células malignas que não se propagaram para os tecidos vizinhos (Anexo I). É, portanto, um cancro confinado apenas ao tecido mamário, enquanto que os estádios I, II, III e IV já envolvem a disseminação para outros tecidos, isto é, o desenvolvimento de metástases <sup>38</sup>.

- Estádio 0 – Carcinoma *in situ*, sem sinais clínicos nem radiográficos de metástases nos gânglios linfáticos nem nouro tipo de tecidos;
- Estádio I - tumor com  $\leq 20$  mm de diâmetro. Podem existir pequenas metástases em 1 a 3 em gânglios linfáticos (detetadas apenas por biópsia);
- Estádio II – O tumor ou é menor que 2 mm e espalhou-se aos gânglios linfáticos (biópsia) axilares ou o tumor tem entre 2 mm e 5 mm de diâmetro, mas não se disseminou para os gânglios linfáticos axilares;
- Estádio III – tumor geralmente com diâmetro  $> 50$  mm e que se disseminou (1) para a parede do tórax e/ou da pele da mama; (2) por pelo menos 10 gânglios linfáticos axilares (apenas detetável através de biópsia); (3) aos gânglios linfáticos próximos do esterno; (4) aos gânglios linfáticos na região da clavícula;
- Estádio IV – tumor de qualquer diâmetro com propagação direta de células cancerígenas (metastização) a outros órgãos do corpo, nomeadamente aos ossos, pulmões, fígado e cérebro (metástases) <sup>38,39,40</sup>.

De uma forma geral, é pressuposto que a maioria dos tumores malignos da mama progridam ao longo dos vários estádios se não forem detetados. No entanto, nem todos os cancros de estágio inicial têm necessariamente de evoluir para um cancro metastático <sup>41</sup>.

O estágio da doença é um dos critérios usados para a determinação do prognóstico da mesma, pelo que se verifica que os estádios 0 e I são os que melhor respondem aos tratamentos atualmente disponíveis, sendo a taxa de sobrevivência aos 5 anos após o diagnóstico de aproximadamente 100%. Por outro lado, quando a doença é diagnosticada em estádios mais avançados a mesma taxa atinge valores mais baixos, com os estádios IV a atingir valores de 51,7% <sup>42</sup>.

#### 5.4. GRAU

O grau do cancro da mama consiste num tipo de classificação anatomopatológica baseada na semelhança que as células tumorais apresentam em relação às células da mama normais. Uma das escalas utilizadas na medição do grau é a escala de Bloom-Richardson, que se baseia em três principais características morfológicas das células do cancro da mama: (1) nível de formação de túbulos, (2) atividade mitótica, e (3) pleomorfismo nuclear. É então atribuído um valor de 1 a 3, sendo que no grau 1 as células do tumor parecem-se o mais possível com as células normais, e no grau 3 as células cancerígenas são menos semelhantes às células normais, pelo que <sup>38,43</sup>:

- Grau 1 – tumor com células mamárias bem diferenciadas, aparentemente normais, com um menor risco de disseminação para outros tecidos;
- Grau 2 - tumor com células mamárias bem diferenciadas;
- Grau 3 - tumor com células mamárias pouco diferenciadas, com grande tendência para a proliferação e disseminação <sup>38</sup>.

O grau do cancro da mama pode ter um papel importante no que diz respeito à evolução clínica da doença. Apesar de estar relacionado com a determinação do estágio aquando do diagnóstico, o grau é uma variável significativamente independente na previsão do prognóstico e do tipo de resposta à terapia adjuvante a que o doente é submetido. Quanto menor o grau, melhor será o prognóstico <sup>38</sup>.

#### 5.5.PATOLOGIA DO CANCRO DA MAMA

A nomenclatura do cancro baseia-se, primariamente, no órgão em que se localizam as células malignas. Por exemplo, o “cancro do pulmão” consiste num tumor maligno com origem em células de estruturas pulmonares. Cada tipo de cancro (órgão-específico) é depois dividido em vários subtipos de acordo com múltiplos fatores, tais como a idade do doente, o tipo de célula mutada, o grau histológico e o tipo de biomarcadores moleculares detetados. Contudo, com a rápida evolução científica das últimas décadas, da qual faz parte a era genómica, a necessidade de um sistema de classificação mais sofisticado e exaustivo tornou-se cada vez mais urgente. Tal deve-se à elevada complexidade do cancro, quanto mais exato e personalizado for o diagnóstico, mais fácil será a deliberação das opções terapêuticas para cada situação e, conseqüentemente, mais favorável será o prognóstico <sup>44</sup>.

Dada a sua enorme complexidade, o cancro da mama é atualmente reconhecido não como uma doença singular mas sim como um conjunto de doenças com diferentes causas e características biológicas e patológicas, diferentes apresentações e comportamentos clínicos e diferentes respostas aos tratamentos<sup>4,21,45</sup>, pelo que pode ser classificado de duas formas principais: classificação histológica e classificação molecular<sup>46</sup>.

A classificação de tumores mamários de acordo com parâmetros histológicos é o método mais antigo e ainda um dos mais utilizados na clinica atual, pelo que são tidas em conta todas as características clinico-patológicas do carcinoma (por exemplo o tamanho do tumor, grau histológico, presença de metástases em nódulos linfáticos axilares)<sup>38,47</sup>. Contudo, por volta dos anos 2000, percebeu-se através de estudos com *microarrays* (técnica que se baseia na hibridação entre uma amostra de ácido nucleico – o alvo – e uma série de sondas de oligonucleótidos, ligados a um suporte sólido, de modo a determinar uma sequência genética ou detetar variações na mesma ou na expressão de um dado gene já previamente mapeado<sup>48</sup>) que as diferenças fenotípicas entre os vários tipos de cancro seriam uma reflexão dos seus perfis de expressão genética, o que se veio mais tarde a confirmar com a “revolução genómica” dos últimos anos<sup>4</sup>. Surge então a classificação molecular, que faz uso da imunohistoquímica para determinar a presença ou ausência de marcadores tumorais, nomeadamente o recetor de estrogénios (ER), o recetor da progesterona (PR) e o recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), mas também o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, de *Epidermal Growth Fator Receptor*) e a proteína tumoral p53<sup>38,46</sup>. A identificação destes marcadores tem-se vindo a tornar uma prática comum, dada a sua utilidade no diagnóstico, na seleção de terapêuticas seletivas e até no próprio prognóstico da doença<sup>38</sup>.

### **5.5.1. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA**

A classificação histológica do cancro da mama tem por base as características celulares do tumor, pelo que uma amostra de tecido mamário, obtido através de uma biópsia ou via cirúrgica, é examinado e estudado ao microscópio<sup>39</sup>. Dependendo do tipo de células envolvidas, da invasibilidade do tumor e do seu comportamento e organização celular, o cancro da mama pode ser dividido em vários tipos histológicos, sendo os dois mais comuns o carcinoma ductal e o carcinoma lobular, que se podem

apresentar tanto na forma *in situ* (ou não invasiva) como na forma invasiva (ou infiltrante) <sup>38</sup>.

O termo *in situ* é atribuído aos tipos de cancro cujas lesões se encontram confinadas aos lóbulos e/ou ductos mamários e são constituídas por células epiteliais anormais, mas muito semelhantes às células dos tumores invasivos quando observadas ao microscópio. Inicialmente supunha-se que estas células teriam a capacidade para se infiltrar pelo estroma mamário adjacente ao local original da lesão, aquando na ausência de tratamento, e eventualmente dar origem a um cancro invasivo. Atualmente sabe-se que tal pressuposto não é verdadeiro, uma vez que as células de tumores *in situ* não expressam, ou expressam de forma incompleta, as características do cancro necessárias para que tal aconteça. Isto é, um cancro *in situ* não tem a capacidade para se tornar num cancro invasivo <sup>49</sup>.

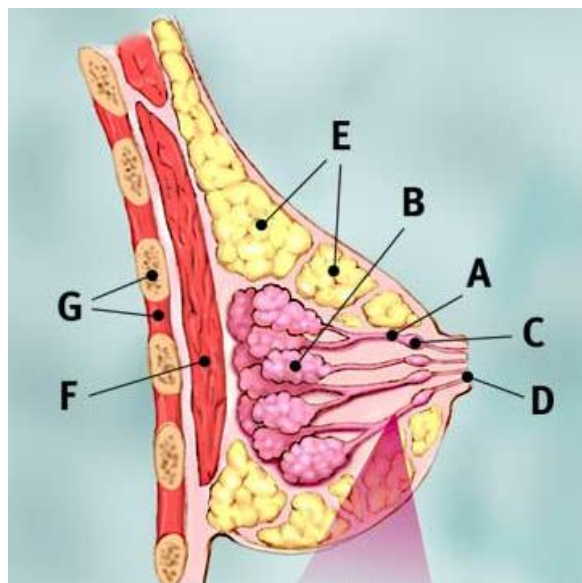
Os dois principais tipos de cancro da mama *in situ* são:

### **I. Carcinoma ductal *in situ***

A mama é constituída por diversos tecidos, nomeadamente ductos e lóbulos suportados por tecido adiposo e conectivo (Figura 5.5.1.1). O leite materno é produzido e armazenado nos lóbulos e transportado até aos mamilos através dos ductos durante a amamentação <sup>50</sup>.

O termo Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS) descreve, portanto, uma proliferação neoplásica de células epiteliais, com diferentes graus de displasia, do sistema ductal mamário (canais de circulação do leite materno) <sup>51</sup>. Tem uma natureza não invasiva, pelo que o prognóstico é geralmente favorável. No entanto, por se tratar de uma entidade biologicamente muito diversa, enquanto que algumas destas lesões podem ser curadas através de uma excisão cirúrgica, outras podem dar origem a recidivas *in situ* ou até dar origem à formação de metástases. O CDIS tem, portanto, inerente uma certa tendência (mas não obrigatória) de progressão para um cancro da mama invasivo, caso não seja devidamente tratado <sup>51,52</sup>.

Aquando do diagnóstico, os doentes podem-se apresentar assintomáticos, sendo apenas visíveis pequenas concentrações de pontos brancos de cálcio (microcalcificações) nos resultados da mamografia ou radiografia, ou com sintomas como massas palpáveis na mama ou corrimento no mamilo <sup>53</sup>.



**Figura 5.5.1.1** – Esquema representativo das estruturas normais da mama. Legenda: A – ducto; B – lóbulo; C – dilatação do ducto para reserva de leite; D – mamilo; E – tecido adiposo; F – tecido muscular; G – caixa torácica [Adaptado de

O CDIS é mais comum em mulheres caucasianas quando comparadas com mulheres de origem africana, asiática e hispânica. Para além disso, fatores como uma história familiar de cancro da mama, mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, idade superior a 50 anos, elevada densidade de tecido mamário e mulheres sem filhos ou com apenas 1 filho também demonstraram conferir um maior risco para o desenvolvimento do CDIS <sup>54</sup>.

## II. Carcinoma lobular *in situ* e Hiperplasia lobular atípica

O termo neoplasia lobular refere-se ao conjunto de lesões epiteliais proliferativas atípicas, não invasivas, com origem na Unidade Ducto-Lobular Terminal (UDLT) – considerada a unidade funcional da mama, onde se originam a maioria dos carcinomas da mama. Engloba, portanto, o Carcinoma Lobular *in situ* (CLIS) e a Hiperplasia Lobular Atípica (HLA) da mama, os quais se diferem pelo grau de envolvimento das estruturas acinares de uma dada UDLT <sup>55,56</sup>. Estas estruturas acinares são as unidades que compõem o tecido glandular mamário que consistem em pequenos sacos, cujas paredes estão revestidas por células especializadas na secreção de leite <sup>57</sup>.

A neoplasia lobular é considerada um precursor não obrigatório do carcinoma da mama invasivo e um fator de risco para o desenvolvimento do mesmo <sup>55</sup>.

O CLIS e a HLA apresentam características histológicas idênticas, mas com um grau de envolvimento das estruturas acinares diferentes <sup>58</sup>. O diagnóstico do CLIS

requer o envolvimento de pelo menos 50% dos ácinos da UDLT afetada, os quais têm de estar distendidos e totalmente preenchidos com células características da neoplasia lobular. A HLA é composta por uma lesão menos desenvolvida onde as células neoplásicas apenas preenchem parte das estruturas acinares da UDLT envolvida, logo o lóbulo apresenta-se menos distendido <sup>55</sup>.

A maior parte das mulheres com neoplasia lobular não apresenta sintomas nem anormalidades no resultado da mamografia, sendo por isso diagnósticas principalmente através de biópsias. Após o diagnóstico muitas vezes não é aplicado nenhum tratamento, já que a maior parte dos doentes não desenvolve cancro da mama (invasivo), mas é recomendado um acompanhamento regular da evolução da lesão <sup>58</sup>.

O cancro da mama invasivo forma-se originalmente nos lóbulos ou ductos mamários e infiltra-se depois pelos tecidos adjacentes, dando origem a tumores secundários (metástases) nos tecidos vizinhos <sup>59</sup>. A grande maioria destes tumores são adenocarcinomas com origem provável no epitélio parenquimatoso da mama, nomeadamente nas UDLTs <sup>56</sup>.

Existem alguns fatores essenciais para que se dê a estimulação do crescimento dos tumores e desenvolvimento de metástases, sendo a angiogénese um dos pré-requisitos com maior destaque <sup>59</sup>.

A angiogénese é o processo pelo qual se dá o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de outros já pré-existentes. A formação de novos capilares num organismo normal adulto é um processo altamente regulado e raro de acontecer, estando apenas associado a eventos como a formação ou reparação de tecidos. A angiogénese pode ser dividida em duas fases: 1) a fase inicial, onde se dá o recrutamento e proliferação de novas células endoteliais que vão dar origem aos vasos sanguíneos imaturos; e 2) a fase final ou tardia, que envolve o recrutamento de células do estroma que vão estabilizar e revestir os vasos recém-formados <sup>60</sup>.

Os tumores são células diferenciadas com uma grande capacidade de multiplicação, tendo por isso um metabolismo elevado. Por sua vez, o metabolismo celular é limitado pela concentração de oxigénio disponível no meio. Assim, para poderem crescer, os tumores estimulam a formação de novos vasos sanguíneos, criando áreas de hipóxia tipicamente adjacentes a zonas em necrose. A hipóxia é um dos mais

potentes indutores da secreção de fatores de angiogénese, como é o caso do fator de crescimento endotelial vascular (VEFD), responsável pela promoção da proliferação de células endoteliais <sup>60</sup>.

Os carcinomas da mama exibem uma grande variedade de fenótipos e tipos histopatológicos com diferentes prognósticos e características clínicas <sup>56</sup>. Abaixo descrevem-se algumas das principais formas de cancro da mama invasivo:

### **a) Carcinoma ductal invasivo**

Carcinoma ductal invasivo, Sem Outra Especificação (SOE), é o termo atribuído ao maior grupo de cancros da mama invasivos, uma vez que abrange todos os tumores que não exibam as características específicas de qualquer um dos outros grupos histológicos existentes, como por exemplo o carcinoma lobular ou tubular. Trata-se, portanto, do tipo de cancro invasivo da mama mais comum e heterogéneo entre os descritos <sup>56,61</sup>.

Em 2012, a terminologia aqui atribuída foi atualizada, passando assim o até então designado carcinoma ductal invasivo, sem outra especificação (2003), a chamar-se carcinoma invasivo Sem Tipo Especifico (STE) de modo a enfatizar a sua distinção dos tumores com um tipo atribuído <sup>61</sup>.

Este tipo de tumores não apresenta características específicas, sejam elas macroscópicas ou histopatológicas, pelo que podem variar consideravelmente de caso para caso. Por exemplo, podem exibir tamanhos abaixo dos 10 mm ou acima dos 100 mm e serem firmes ou até duros à palpação <sup>56</sup>. O diagnóstico é, portanto, feito por exclusão dos outros tipos específicos de cancro invasivo <sup>61</sup>.

### **b) Carcinoma lobular invasivo**

O carcinoma lobular invasivo representa atualmente 5 a 15% dos cancros da mama invasivos, sendo por isso o subtipo mais comum a seguir ao STE <sup>56,62</sup>. Este tipo de tumor é composto por células não-coesas que se podem encontrar dispersas, num estroma de tecido conectivo fibroso, de forma individualizada ou em padrões lineares, formando uma espécie de cordões de células neoplásicas <sup>56</sup>.

Uma das características fundamentais para o diagnóstico diferencial entre carcinoma lobular e carcinoma ductal invasivo é a falta de expressão de caderinas-E, um dos tipos de moléculas de adesão celular mais importantes. A falta destas moléculas é o

fator que leva à disseminação das células mutadas pelos tecidos envolventes, no caso dos carcinomas lobulares invasivos, mas não dos outros subtipos de cancro da mama <sup>62,63</sup>.

Verificou-se, nos últimos 20 anos, um aumento consistente da taxa de incidência deste subtipo de cancro da mama entre mulheres com mais de 50 anos. Percebeu-se então que tal aumento poderá dever-se ao aumento do uso de terapias de substituição hormonal durante a menopausa, o que se confirmou quando, entre o ano 2000 e o ano 2004, a referida taxa de incidência diminuiu juntamente com o número de prescrições de medicação para substituição hormonal. Atribui-se assim à terapia de substituição hormonal um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento desta doença <sup>56,63</sup>. Para além deste, também um historial de neoplasia lobular - pessoal ou familiar - se revelaram importantes fatores de risco <sup>63</sup>.

A maioria das mulheres apresenta massas palpáveis que podem envolver qualquer parte da mama, no entanto a sensibilidade de deteção através da mamografia é um pouco reduzida, pelo que normalmente o diagnóstico é feito quando existem tumores com alguma relevância, detetados num período de 24 meses, ou mais, após uma mamografia com resultado negativo <sup>63</sup>.

### **c) Carcinoma mucinoso invasivo**

Caracteriza-se pela produção excessiva de mucinas, tanto a nível extracelular como a nível intracelular, sendo por isso estes tumores compostos por uma espécie de ninhos de células cancerígenas dispersas em “lagos” de mucinas <sup>45</sup>. As mucinas consistem numa família de glicoproteínas com capacidade de formar géis. São um componente integrante do gel mucoso que protege todas as superfícies epiteliais mucosas do corpo, cuja função principal é proteger o mesmo contra agentes do meio exterior <sup>64</sup>.

Os carcinomas mucinosos puros – com mais de 90% de mucinas – são geralmente diagnosticados em mulheres mais idosas, com 71 anos em média. Este subtipo de tumores pode ser palpável num exame físico, numa mamografia é caracterizado por lesões de baixa densidade e com margens bem definidas. Os nódulos linfáticos raramente são invadidos, pelo que o prognóstico é, em regra, bastante favorável <sup>45</sup>.

**d) Carcinoma tubular invasivo**

O carcinoma tubular representa uma pequena fração dos cancros da mama invasivos diagnosticados, com menos de 2%. Por definição, pelo menos 90% do tumor apresenta uma arquitetura tubular, isto é, estruturas em forma de pequenos túbulos compostos por uma camada única de células epiteliais <sup>45</sup>.

Estes tumores tendem a ser de baixo grau, pelo que as células malignas são aparentemente muito semelhantes às células normais e tendem a multiplicar-se de forma mais lenta. O prognóstico atribuído a este subtipo de cancro da mama é, portanto, favorável na grande maioria dos casos, sendo o envolvimento de nódulos linfáticos também reduzido <sup>56</sup>.

Quando comparado com o STE, o carcinoma tubular da mama tende a formar tumores mais pequenos e diagnosticado em mulheres de idades mais avançadas, geralmente através de uma mamografia <sup>45,56</sup>.

**e) Carcinoma medular invasivo**

O carcinoma medular compõe uma fração de menos de 2% dos casos de cancro da mama diagnosticados, surgindo preferencialmente em mulheres mais jovens. Caracteriza-se por lesões compostas por células pouco diferenciadas, com grandes núcleos e dispostas em “placas” com margens bem definidas detetáveis com mamografia. Para além disso, um dos aspetos fundamentais para o seu diagnóstico é a presença de proeminentes infiltrados linfocitários, tanto no interior como na sua periferia do tumor <sup>45</sup>.

O envolvimento de nódulos linfáticos é geralmente reduzido, quando comparado com outros carcinomas, pelo que o carcinoma medular da mama apresenta em regra um bom prognóstico <sup>45</sup>.

**f) Carcinoma micropapilar invasivo**

Caracteriza-se por uma extensa infiltração nos vasos linfáticos, o que leva a uma elevada propensão para o desenvolvimento de metástases pelos nódulos linfáticos. O carcinoma micropapilar tem, portanto, um prognóstico reservado, associado a uma elevada probabilidade de recidivas, principalmente na pele e região torácica. A idade média de diagnóstico situa-se por volta dos 52 anos <sup>45</sup>.

Os tumores formados nestes casos apresentam-se, na mamografia, como massas de elevada densidade, sendo estas compostas por aglomerados de células tumorais dispostos em espaços de estroma que sofreram contração pelo tecido envolvente, dando a impressão de que o tumor se encontra dentro de espaços vasculares <sup>45,56</sup>.

### **g) Carcinoma metaplásico invasivo**

Consiste num grupo heterogéneo de neoplasias em que geralmente coexistem regiões de adenocarcinoma STE com áreas de diferenciação com aspeto escamoso, de células fusiformes ou mesenquimatoso (condroide ou ósseo). Pode ser classificado em vários subtipos de acordo com as características fenotípicas do tumor <sup>56</sup>.

O carcinoma metaplásico invasivo engloba menos de 1% dos carcinomas mamários, sendo maioritariamente diagnosticado em mulheres de idades que rondam, em média, os 55 anos <sup>56</sup>.

Na mamografia apresenta lesões ovais, lobulares, bem definidas e de elevada densidade. A probabilidade de recidivas e de metastização é elevada, pelo que o prognóstico é geralmente adverso <sup>45</sup>.

### **h) Carcinoma secretor invasivo**

É um dos subtipos de carcinoma da mama mais raros, representando apenas 0,1%-0,2% dos casos, no entanto é o mais comum entre os cancros da mama diagnosticados na idade pediátrica, sendo por isso também designado de carcinoma juvenil. O carcinoma secretor invasivo é normalmente associado a um prognóstico favorável <sup>45</sup>.

As características patológicas que o diferenciam dos restantes subtipos consistem na presença de material eosinófilo, de aspeto similar ao do leite, secretado tanto a nível intracelular como extracelular. Estes tumores são em regra sólidos, microcísticos (como um favo de mel) e com uma arquitetura de aspeto tubular <sup>45,56</sup>.

### **i) Carcinoma adenoide cístico invasivo**

Apenas uma pequena percentagem dos casos diagnosticados (menos de 1%) abrange o carcinoma adenoide cístico, sendo por isso um dos mais raros subtipos de cancro da mama. Afeta sobretudo mulheres após a menopausa, com idades no diagnóstico que rondam os 60 anos <sup>45</sup>.

Consiste num carcinoma pouco agressivo - e por isso com um prognóstico favorável – e histologicamente semelhante ao seu homólogo das glândulas salivares, exibindo células epiteliares e mioepiteliares dispostas de forma tubular e com uma baixa atividade mitótica. As lesões distribuem-se de forma equivalente pelas duas mamas, apresentando massas de forma irregular e com densidades assimétricas <sup>45</sup>.

**j) Carcinoma apócrino invasivo**

As células apócrinas da mama são citologicamente idênticas às células das glândulas apócrinas - presentes em regiões como a axila, por exemplo -, apresentando então um citoplasma eosinófilo com um grande núcleo vesicular disposto na base da célula. Este tipo de fenótipo pode ser encontrado num elevado espectro de lesões epiteliares da mama, abrangendo desde metaplasias benignas a carcinomas apócrinos invasivos. Estes últimos apresentam, pelo menos, 90% das suas células tumorais com este tipo de características citológicas e imunohistoquímicas <sup>45,65</sup>.

Os carcinomas apócrinos invasivos evoluem, por sua vez, a partir do epitélio das UDLTs, passando por uma sequência de diferentes fases como a metaplasia, a hiperplasia e atipia até à formação de um carcinoma *in situ* que acaba por dar origem a um carcinoma infiltrante <sup>65</sup>.

Apesar de este tipo de tumores ser morfológicamente bastante distinto das restantes neoplasias da mama descritas, atualmente ainda não existem critérios padrão disponíveis para o seu diagnóstico. Trata-se de um subtipo de cancro da mama raro (0,3 – 0,4% dos casos), principalmente devido à falta de critérios para o seu diagnóstico <sup>45</sup>.

**k) Carcinoma neuroendócrino invasivo**

Os carcinomas neuroendócrinos da mama constituem um grupo de tumores que exibem características morfológicas semelhantes às dos tumores neuroendócrinos, com expressão de marcadores de diferenciação neuroendócrina em mais de 50% da sua população celular. Constituem menos de 1% dos carcinomas da mama reportados <sup>45,56</sup>.

A OMS descreve três subtipos histológicos principais: sólido, de pequenas células e de grandes células. O prognóstico a estes atribuído é ainda um pouco controverso, mas ao tumor de pequenas células e de elevado grau é esperado um prognóstico reservado <sup>45,56</sup>.

Os doentes podem exibir nódulos palpáveis que se apresentam como massas bem definidas num exame por mamografia ou ultrassons, mas não são conhecidas características visíveis neste tipo de exames que os distingam de outro tipo de carcinomas <sup>56</sup>.

#### **1) Carcinoma pleomórfico lobular invasivo**

Trata-se de uma rara variante agressiva do carcinoma STE de elevado grau, caracterizada pela proliferação de células anormais, gigantes e pleomórficas em pelo menos 50% do tumor <sup>56</sup>.

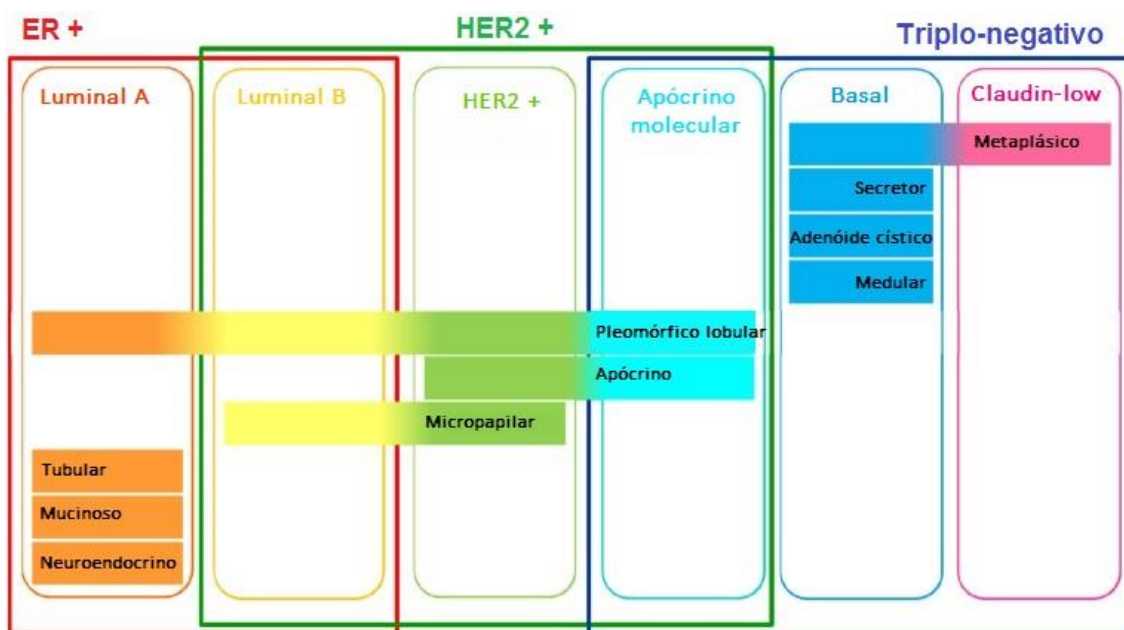
Pode afetar mulheres de qualquer idade, mas apresenta uma maior tendência para mulheres após a menopausa. É um carcinoma que dá origem a massas palpáveis aquando do exame físico. No entanto, a formação de um tumor secundário – metástases decorrentes de invasão linfática - é geralmente a primeira manifestação da doença detetável, sendo por isso atribuído um mau prognóstico neste tipo de carcinomas <sup>45,56</sup>.

#### **5.5.2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR E IMUNOHISTOQUÍMICA**

Tendo por base áreas como a biologia molecular e a imunohistoquímica, rapidamente se compreendeu que o cancro da mama seria muito mais complexo e heterógeno do que era possível perceber apenas com as suas características histológicas até então estudadas. O reconhecimento da importância de determinados recetores hormonais (marcadores) permitiu a estratificação do cancro da mama em vários subtipos moleculares, cujas características permitem determinar mais facilmente qual o melhor esquema terapêutico a adotar e até qual será o prognóstico esperado para cada doente <sup>38</sup>.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o cancro da mama pode ser dividido em pelo menos 21 subtipos histológicos diferentes. As novas abordagens baseadas nos perfis de expressão genética das células malignas permitiram já a identificação de novas classes de cancro da mama com diferentes comportamentos e aspetos biológicos. Assim, com base nos estudos de imunohistoquímica, pode-se dividir o cancro da mama em pelo menos 3 grupos principais: ER<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> e os triplo-negativos (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> e HER2<sup>-</sup>). Mais recentemente, com a segmentação mais aprofundada do cancro da mama em subtipos moleculares intrínsecos baseados nos diferentes padrões de expressão genética levou á identificação de 6 subtipos

moleculares principais com diferentes prognósticos e sensibilidade aos tratamentos: luminal A, luminal B, HER2, basal, apócrino molecular e *Claudin-low*<sup>45,47</sup> (Anexo II). Na Figura 5.5.2.1 encontra-se um esquema representativo da heterogeneidade do cancro da mama.



**Figura 5.5.2.1** – Heterogeneidade do cancro da mama: classificação imunohistoquímica (ER+, HER2+ e triplo-negativo), classificação molecular (luminal A, luminal B, HER2, apócrino molecular, basal e *Claudin-low*) e classificação histológica (tubular, mucinoso, neuroendócrino, micropapilar, pleomórfico lobular, apócrino, medular, adenóide cístico, secretor e metaplásico) [Adaptado de Dieci *et al*<sup>45</sup>].

Cada um dos subtipos conhecidos é caracterizado por determinadas alterações a nível molecular às quais é possível aplicar terapias adaptadas ou direcionadas, aumentando assim não a taxa de sucesso do tratamento e prognóstico do doente, bem como minimizando dos efeitos adversos associados. Assim, este tipo de marcadores tumorais tem vindo, ao longo dos últimos anos, a ser rotineiramente testado em todos os tipos de cancro da mama invasivo diagnosticados. Também em casos de carcinoma ductal *in situ* é feito o teste de expressão do ER<sup>66</sup>.

### I. Tumores ER<sup>+</sup>

O ER consiste num recetor hormonal que funciona como um fator de transcrição nuclear que regula a sinalização e sobrevivência celular uma vez ligado ao estrogénio<sup>66</sup>. Nos tecidos da mama normais, o estrogénio é um importante regulador da proliferação

celular, sendo a sua ação mediada pelo ER<sup>38</sup>. São conhecidas 2 formas do ER: ER $\alpha$  e ER $\beta$ , produtos dos genes *ESR1* (*EStrogen Receptor 1*) e *ESR2* (*EStrogen Receptor 2*) respetivamente. A ER $\alpha$  é a forma predominante no tecido mamário e a mais estudada atualmente<sup>38,66</sup>.

Cerca de 60% a 70% dos carcinomas da mama diagnosticados são ER<sup>+</sup>, isto é, têm uma expressão de recetores dos estrogénios aumentada. Diversos ensaios clínicos conduzidos ao longo dos últimos anos têm demonstrado que o tratamento com bloqueadores de ER, seja com moduladores seletivos do recetor dos estrogénios (SERMs, de *Selective Estrogen Receptor Modulators*) ou com inibidores da aromatase, proporciona a maior taxa de sucesso e de sobrevivência ao doente quando comparado com outras classes de agentes anticancerígenos<sup>66</sup>.

Os tumores ER<sup>+</sup> designam-se então do tipo luminal, uma vez que expressam marcadores da camada epitelial luminal dos ductos mamários normais (como por exemplo a queratina 8 e 18), e podem dividir-se em 2 subtipos: luminal A e luminal B. Apesar de partilharem algumas características, os tumores classificados como sendo do tipo Luminal devem ser tratados com duas entidades distintas, uma vez que apresentam perfis genéticos, prognósticos e sensibilidades ao tratamento diferentes<sup>67</sup>.

Quando comparados com o subtipo luminal A, os tumores do subtipo luminal B apresentam níveis de expressão dos genes que codificam o ER e o PR mais baixos, ou até mesmo nulos. Por outro lado, a taxa de transcrição dos genes envolvidos na proliferação celular (como o Ki-67, marcador de proliferação celular) e na ativação de fatores de crescimento (como o *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF-1R)*) encontra-se bastante acelerada. Ao subtipo luminal B é também associada uma menor sensibilidade à terapêutica endócrina, mas uma maior sensibilidade à quimioterapia, quando comparado com o subtipo luminal A<sup>68</sup>.

Sistematizando, e tendo em conta marcadores imunohistoquímicos, podem-se definir os seguintes fenótipos:

- Luminal A: ER<sup>+</sup> PR<sup>+</sup> HER2<sup>-</sup> Ki-67 reduzido (<14%);
- Luminal B: ER<sup>+</sup> PR<sup>-</sup> HER2<sup>-</sup>, Ki-67 aumentado (>14%)<sup>68</sup>.

No grupo dos tumores ER<sup>+</sup> inserem-se também carcinomas da mama dos subtipos histológicos tubular, mucinoso e neuroendócrino invasivos<sup>45</sup>.

## II. Tumores HER2<sup>+</sup>

O HER2 consiste numa proteína transmembranar da família dos recetores do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR ou HER1), na qual também se incluem recetores como o HER1, HER3 (*Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3*) ou o HER4 (*Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4*), responsáveis pela ativação dos processos de proliferação, migração e invasão celular no cancro. O oncogene *HER2* codifica o recetor da glicoproteína transmembranar intracelular tirosina cinase (TK, de *Tyrosine Kinase*). Não é ainda conhecido nenhum ligando para este recetor, sendo que a sua ativação se deve primariamente à sua dimerização com outros recetores da mesma família <sup>69</sup>.

Estima-se que cerca de 15% a 20% dos casos de cancro da mama invasivos tenham uma amplificação do gene que codifica o HER2 e, conseqüentemente, elevados níveis de atividade do mesmo <sup>66</sup>.

Aos tumores da mama HER2<sup>+</sup> está associado um mau prognóstico da doença, com elevadas taxas de mortalidade mesmo em estágios iniciais e uma grande incidência de formação de metástases e recidivas num curto período de tempo <sup>69</sup>. É uma das proteínas mais utilizada como alvo em estudos de imunohistoquímica de diagnóstico, pelo que desempenha importantes funções no crescimento e diferenciação celular, adesão, mobilidade e transdução de sinais celulares <sup>70</sup>.

Podem-se aqui distinguir 2 subtipos moleculares de carcinoma da mama: HER2 enriquecido e molecular apócrino. O cancro da mama HER2 enriquecido caracteriza-se pela sobreexpressão de HER2 juntamente com a falta de expressão dos genes *ER* e *PR* (isto é, um fenótipo ER<sup>-</sup> PR<sup>-</sup> HER2<sup>+</sup>) <sup>71</sup>. O subtipo molecular apócrino foi descrito mais recentemente após estudos moleculares e histoquímicos mais aprofundados, e caracteriza-se por ter também um perfil de expressão genética HER2<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup>, mas com a particularidade de também ter uma sobreexpressão de recetores dos androgénios (*AR*, de *Androgen Receptor*), aos quais se podem aplicar novas terapêuticas seletivas e, assim, aumentar a taxa de sobrevivência destes doentes. Os androgénios, sendo também hormonas esteroides, à semelhança dos estrogénios e progesterona, constituem elementos chave para o processo de carcinogénese <sup>72</sup>.

Relativamente aos subtipos histológicos anteriormente descritos, os carcinomas micropapilar, apócrino e pleomórfico lobular invasivos apresentam também um nível de expressão de HER2 aumentado, pelo que são igualmente considerados tumores HER2<sup>+</sup>

### III. Tumores triplo-negativos

O TNBC constitui aproximadamente 10% a 20% do total de casos diagnosticados e afeta principalmente mulheres jovens. Os tumores formados são geralmente de grandes dimensões, de graus mais avançados e mais agressivos e com envolvimento do sistema linfático aquando do diagnóstico <sup>73</sup>.

Os TNBC podem então ser divididos em 2 subtipos: tumores do tipo basal e *Claudin-low*. Os tumores do tipo basal expressam marcadores semelhantes aos das células que revestem os ductos mamários, tais como a queratina 5/6. O *Claudin-low* consiste num subtipo de cancro da mama triplo-negativo muito raro e estudo há relativamente pouco tempo. Caracteriza-se pelos reduzidos níveis de expressão dos genes que codificam as proteínas das junções intercelulares (*tight junctions*) e sobreexpressão dos genes envolvidos no processo de transição epitélio-mesénquima (MET, de *Mesenchymal–Epithelial Transition*), normalmente associado à embriogénese <sup>71</sup>. O MET consiste no processo através do qual as células (epiteliais) perdem a sua polaridade e capacidade de adesão intercelular e ganham propriedades migratórias e invasivas, dando origem a células multipotentes designadas mesenquimatosas <sup>74</sup>.

Inserem-se assim neste grupo de tumores triplo-negativos os subtipos histológicos medular, metaplásico, secretor e adenoide cístico invasivos <sup>45</sup>.

Curiosamente, verifica-se uma forte associação entre o cancro da mama hereditário e determinados subtipos. Doentes portadores de mutações no gene *BRCA1* tendem preferencialmente a desenvolver tumores do tipo basal (triplo negativos), ao passo que os portadores de mutações no *BRCA2* tendem a criar tumores do subtipo luminal B.

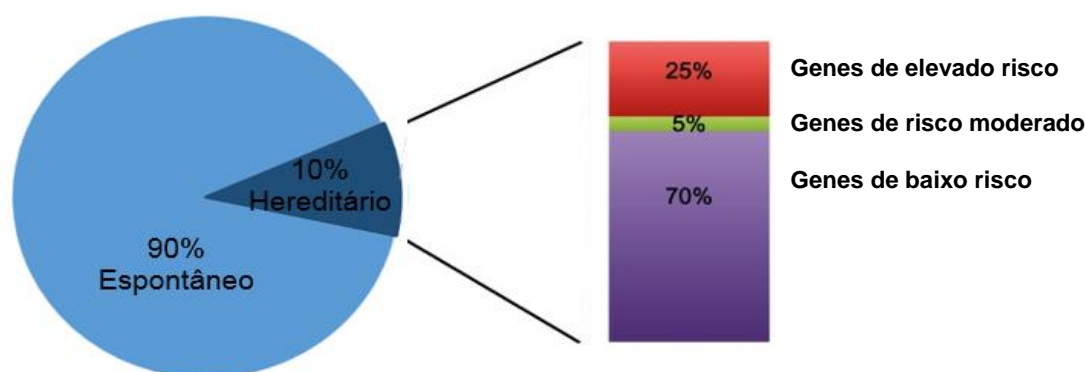
No que diz respeito aos prognósticos esperados, aos subtipos ER negativos como o basal e o HER2 enriquecido é atribuído o pior prognóstico, seguidos do luminal B, apesar de este ter maior probabilidade de recidivas a longo prazo quando comparado com tumores basais ou HER2 enriquecidos. O subtipo luminal A tem geralmente o mais prognóstico favorável <sup>71</sup>. Porém, em geral, o tratamento de pacientes com cancro da mama triplo-negativo (TNBC, de *Triple Negative Breast Cancer*, ou ER<sup>-</sup> PR<sup>-</sup> HER2<sup>-</sup>) é mais complexo, pois não possuem um alvo molecular definido como acontece com os tumores ER<sup>+</sup> ou HER2<sup>+</sup>.

## 6. PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA PARA O CANCRO DA MAMA

O cancro da mama consiste numa doença complexa provocada por uma progressiva acumulação de mutações em determinados genes, combinada com desregulação epigenética de importantes genes e proteínas <sup>75</sup>. Sabe-se atualmente que se trata de um tipo de neoplasia com uma importante componente genética hereditária. Por essa razão, existem várias famílias com elementos de diferentes gerações afetadas <sup>7,75</sup>. Estima-se que as mutações germinais hereditárias poderão estar na origem de 5% a 10% do total de casos de cancro da mama <sup>76</sup>. Os restantes 90% dos casos diagnosticados dever-se-ão a uma acumulação de alterações somáticas – genéticas e epigenéticas – adquiridas <sup>76</sup>.

As mutações germinais, passadas de geração em geração, em genes de elevado risco (como o *BRCA1/2*, o *TP53* e o *PTEN*), representam uma porção bastante significativa dos casos de cancro da mama hereditário (cerca de 25%). Estas variantes, apesar de conferirem um elevado risco para o portador, são bastante raras entre a população global (Figura 6.1). Uma segunda classe de variantes, em genes funcionalmente relacionados com o *BRCA1/2* nos processos de reparação de DNA, confere um risco intermédio para o desenvolvimento do cancro. São também bastante raros, sendo estimada uma incidência de apenas 5% entre os casos de cancro da mama hereditário. Incluem genes como o *CHEK2* (*CHEckpoint Kinase 2*), *ATM* (*Ataxia-Telangiectasia Mutated gene*), *PALB2*, *BRIPI1* (*BRCA1-Interacting Protein 1*) e *RAD51C* (*RAD51 paralog C*). Por outro lado, com uma elevada incidência (70%), mas com um baixo risco para o carcinoma mamário, estão indicados genes como o *TOX3* (*TOX High Mobility Group Box Family Member 3*) e o *FGFR2* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) <sup>7,76</sup>.

A probabilidade que um portador de um gene de elevado risco de vir a desenvolver cancro da mama é pelo menos 5 vezes superior ao risco de uma pessoa não portadora. Os genes de risco intermédio têm uma probabilidade de 1,5 a 5 vezes superior e os de baixo risco aumentam em cerca de 1,5 vezes o risco <sup>77</sup>.



**Figura 6.1** – Suscetibilidade genética no cancro da mama hereditário. Cerca de 10% do total de casos de cancro da mama são provocados por mutações herdadas a partir de células germinais. Genes de elevado risco contribuem para 25% do cancro hereditário, genes de risco moderado representam menos de 5%, sendo os mais comuns os genes de baixo risco [Adaptado de Rizzolo *et al* <sup>76</sup>].

Como referido acima, estima-se que o cancro da mama se deva maioritariamente a um conjunto heterógeno de alterações somáticas espontâneas, como mutações, deleções, amplificações e rearranjos de genes, com um consequente ganho de função que estimula o crescimento, divisão e imortalidade da célula. A desregulação epigenética encontra-se também descrita como um dos fatores etiológicos deste tipo de cancro, uma vez que metilações na zona do promotor de um dado gene podem também contribuir para uma expressão anormal do mesmo <sup>76</sup>. Mais recentemente tem também vindo a ser descrito o contributo de micro RNAs (miRNAs) na modulação da expressão genética envolvida no desenvolvimento da doença <sup>78</sup>.

Tendo em conta a atual conjuntura pós-genómica em que vivemos, é de notar que a perceção relativamente à importância da componente genética associada ao cancro se transformou radicalmente graças à descoberta de que alterações em genes como o *BRCA1* e *BRCA2* contribuem para um aumento do risco de cancro da mama e do ovário. A procura por estratégias terapêuticas, de diagnóstico, prognóstico e prevenção passou a focar-se não só a nível individual, como também a nível populacional, melhorando assim a abordagem a seguir em mulheres (e homens) de alto risco <sup>75</sup>.

Apesar de o diagnóstico ainda depender muito das características clínico-patológicas do tumor e dos marcadores imunohistoquímicos expressos pelo mesmo (entre eles o ER, o PR e o HER2), cada vez mais se comprova que apenas estes parâmetros não são suficientes para o estabelecimento de modelos personalizados para cada doente que proporcionem uma maior segurança e eficácia terapêutica. Neste

seguimento, biomarcadores genómicos têm vindo a ser estudados e incorporados nos laboratórios de patologia <sup>79</sup>.

### 6.1. GENES E POLIMORFISMOS

Com o contínuo aumento do número de *loci* de suscetibilidade genética a ser identificado por GWAS (*Genome-Wide Association Studies*), não só para o cancro mas também para outros tipos de doenças complexas, torna-se cada vez mais importante perceber quais destes *loci* terá de facto utilidade em termos de saúde pública <sup>80</sup>. Com isto, uma variedade de alterações genéticas e epigenéticas têm sido estudadas e o seu possível contributo para o desenvolvimento do cancro da mama descrito <sup>46</sup>.

Através da análise de inúmeros tumores, foram destacadas mutações em pelo menos 40 genes com 73 combinações diferentes entre si. Destaca-se mais uma vez o quão geneticamente diverso pode ser este tipo de cancro e porque é tão complexa sua classificação e divisão em subtipos de cancro da mama. Os genes atualmente identificados têm funções desde regulação de sinais de transdução celulares – *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), *ARID1A* (*AT-Rich Interaction Domain 1A*), *ARID2* (*AT-Rich Interaction Domain 2*), *ASXL1* (*Additional SeX combs Like 1, transcriptional regulator*), *BAP1* (*BRCA1 Associated Protein 1*), *KRAS* (*Kirsten RA Sarcoma viral oncogene homolog*), *MAP2K4* (*Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 4*), *KMT2D/C* (*Lysine MethylTransferase 2D/C*), *NF1* (*NeuroFibromin 1*), *SETD2* (*SET Domain containing 2*), *SF3B1* (*Splicing Factor 3B subunit 1*), *SMAD4* (*SMAD family member 4*) e *STK11* (*Serine/Threonine Kinase 11*) - até ao controlo da apoptose, divisão celular e transcrição - *BRCA1*, *BRCA2*, *RBI* (*RetinoBlastoma 1*), *TP53*, *PTEN*, *AKT1* (*v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 1*), *CDH1* (*CaDHerin 1*), *GATA3* (*GATA binding protein 3*) e *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit alfa*). Mais recentemente foram também identificadas mutações num novo grupo de genes que poderão ter alguma influência no desenvolvimento deste tipo de tumores - *ARID1B* (*AT-Rich Interaction Domain 1B*), *CASP8* (*CASPase 8*), *MAP3K13* (*Mitogen-Activated Protein Kinase 13*), *NCOR1* (*Nuclear receptor CORepressor 1*), *SMARCD1* (*SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily D, member 1*) e *CDK* (Cinases dependentes de ciclinas, de *Cyclin-Dependent Kinases*) <sup>7,46</sup>.

### 6.1.1. *BRCA1* E *BRCA2*

Os genes *BRCA* foram pela primeira vez clonados no início dos anos 90 como sendo os primeiros genes de suscetibilidade de elevado risco para o desenvolvimento do cancro da mama e do ovário, estando disponível o teste genético dos mesmos desde 1996 para o uso clínico. O teste do *BRCA* foi originalmente usado para o estudo do risco e de estratégias de prevenção do cancro, em mulheres com uma marcada história familiar da doença ou que tenham sido diagnosticadas com idades jovens. Atualmente pode inclusive influenciar a decisão terapêutica aquando do diagnóstico do cancro e pode ser feito em qualquer mulher interessada <sup>81</sup>.

Sabe-se que, tal como referido nos pontos 5.2 e 6 da presente monografia, o risco individual para o desenvolvimento de cancro da mama aumenta proporcionalmente com o número de familiares afetados pelo mesmo. Estima-se que 5 a 10% do total de casos siga um padrão de herança do tipo mendeliano (autossómico dominante), sendo caracterizados como hereditários. Destes, pelo menos 30% são atribuídos a mutações a nível das células germinais nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, aos quais se atribui um elevado risco cancerígeno <sup>77</sup>.

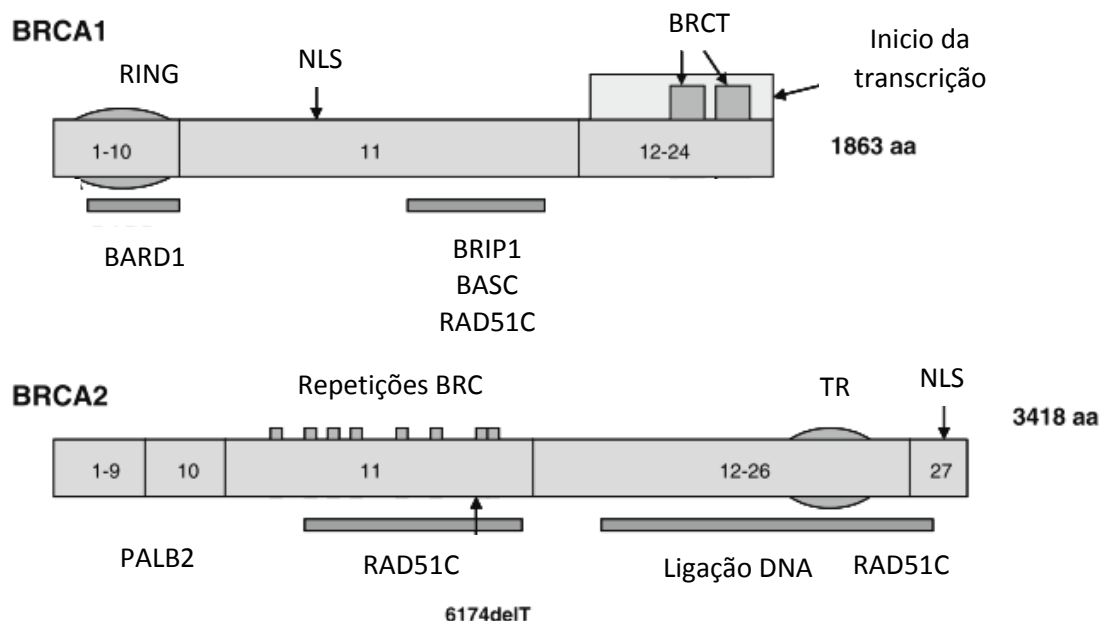
Os portadores de mutações nestes genes supressores de tumores não só têm um risco acrescido para desenvolver cancro da mama, como também cancro do ovário, das trompas de Falópio, do cólon, da pele, da próstata e do pâncreas <sup>7</sup>.

#### I. Estrutura

Tanto o *BRCA1* como o *BRCA2* são constituídos por complexas estruturas genómicas, englobando 24 e 27 exões, respetivamente, pelo que codificam proteínas grandes e complexas – de 1863 aminoácidos para o *BRCA1* e 3418 aminoácidos para o *BRCA2* <sup>7</sup>.

Ao gene *BRCA1* é atribuída a localização citogenética 17q21, isto é, o braço longo (q) do cromossoma 17 na posição 21. Tal como está representado na Figura 6.1.1.1, na extremidade amina, existe um domínio RING (*Really Interesting New Gene*), o qual se encontra envolvido na regulação do crescimento celular. A proteína BARD1 (*BRCA1-Associated RING Domain protein 1*) forma um heterodímero com o domínio RING de modo a estabilizar o BRCA1. Para além disso, o domínio RING é também reconhecido pela E3 (ubiquitina ligase), uma enzima envolvida na cadeia de reações ubiquitina-proteassoma, responsáveis pela marcação e degradação de proteínas. A

atividade da E3 é, por sua vez, aumentada pela formação do heterodímero BRCA1/BARD1 <sup>7,82</sup>.



**Figura 6.1.1.1** - Representação esquemática dos domínios funcionais dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, com respetivos ligandos proteicos [Adaptado de Kuchenbaecker *et al* <sup>7</sup>].

Na região central do gene encontra-se a sequência de localização nuclear (NLS, de *Nuclear Localization Sequence*), onde interagem também proteínas como o RAD51C, o BRIP1 e o complexo de vigilância do genoma associado ao *BRCA1* (BASC, de *BRCA1-Associated genome Surveillance Complex*). O terminal carboxilo do *BRCA1* é composto por duas cópias homólogas de uma mesma sequência, designadas de domínios BRCT (*BRCA1 C Terminus*). Estes domínios atuam na ativação da transcrição e reparação do DNA danificado ao interagirem com domínios de ligação do mesmo <sup>7,82</sup>.

Relativamente ao *BRCA2*, situa-se no braço longo (q) do cromossoma 13 na posição 12.3 (13q12.3). No exão 11, é codificado um conjunto de oito cópias de uma mesma sequência de 20 a 30 aminoácidos, designado de repetições BRC, que desempenham um importante papel durante o processo de recombinação homóloga (HR, de *Homologous Recombination*), uma vez que contêm o local de ligação da proteína RAD51C, mediadora do processo de recombinação homóloga e de cadeias simples de DNA. A região terminal (TR, de *Terminal Region*) do gene contém também

uma sequência NLS que funciona como local de ligação do DNA danificado e da RAD51C <sup>7</sup>.

## II. Função

As proteínas codificadas pelos genes supressores de tumores *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis pela formação de complexos que detetam e ativam a reparação de DNA danificado <sup>7</sup>.

Para além de darem origem a fenótipos patológicos semelhantes, quando existem mutações genómicas, ambas as proteínas atuam durante a HR, uma das etapas com maior fidelidade na reparação de DNA e que faz uso do par de cromátídeos não danificado como molde, de modo a manter a integridade do genoma das células em proliferação <sup>7,82</sup>.

Embora atuem numa via comum do processo de proteção e reparação do DNA, têm funções em diferentes etapas do mesmo <sup>7</sup>. O *BRCA1* codifica uma proteína de resposta aos danos no DNA que funciona tanto na ativação como na reparação, enquanto que a proteína codificada pelo *BRCA2* consiste num mediador do mecanismo central da recombinação homóloga <sup>82</sup>. Muitas outras responsabilidades têm sido descritas para o produto do *BRCA1*, nomeadamente funções na replicação de DNA, no controlo das etapas de ponto de controlo (*checkpoint*) do ciclo celular, na apoptose, na regulação da transcrição, no desdobramento da cromatina e na cadeia de reações ubiquitina-proteassoma. O papel do produto do *BRCA2* atualmente melhor estudado corresponde à reparação de DNA por HR através da regulação da proteína RAD51C. A proteína codificada pelo *BRCA2* facilita a localização do RAD51 no núcleo das células, encaminhando-o para as extremidades das cadeias simples de DNA <sup>83</sup>.

Ainda não se compreende bem qual será a ligação entre estas duas proteínas, mas dado o similar grau elevado de suscetibilidade ao desenvolvimento de cancro que se levanta quando ocorrem mutações nos genes que as codificam, esta interação deverá existir <sup>82</sup>.

## III. Manutenção da integridade genómica

Tanto o produto do *BRCA1* como o produto do *BRCA2* se encontram envolvidos na deteção e reparação de DNA danificado, sendo também responsáveis pela

integridade do genoma e manutenção da estabilidade cromossómica, ainda que com ações distintas <sup>7</sup>.

As quebras da dupla cadeia de DNA são um dos problemas mais ameaçadores para a integridade celular, uma vez que comprometem ambas as cadeias em simultâneo, e podem ser uma consequência tanto de erros durante a replicação como de exposição a radiação ionizante ou a compostos genotóxicos <sup>83</sup>. O stress causado por tais agentes desencadeia uma cascata de eventos celulares de resposta a danos no DNA, a qual é composta por uma gama de agentes com funções interligadas, entre eles os sensores BASC que detetam as quebras da dupla cadeia de DNA, os executores (*BRCA2* e *RAD51*) que desempenham o trabalho de reparação e os mediadores (*PALB2*, *BRIP1* e *BRCA1*) que facilitam as interações entre os sensores e os executores. Durante o processo de resposta a danos no DNA são também ativados pontos de controlo que atrasam o ciclo celular antes e durante a replicação de modo a ganhar tempo para a reparação e assegurar que não sejam transmitidos para a descendência quaisquer erros. Em mamíferos, as quebras da dupla cadeia de DNA são reparadas através de HR (praticamente à prova de erros) ou por junção não homóloga de extremidades (propensa a erros) <sup>82</sup>.

#### IV. Mutações

As regiões codificantes tanto do *BRCA1* como do *BRCA2* não aparentam ter qualquer homologia entre si ou com outras sequências que codificam proteínas já previamente descritas. Se uma cópia de um destes genes estiver mutada nas células da linha germinal, o resultado será o designado síndrome do cancro da mama e do ovário hereditário (HBOC, de *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*), o qual é herdado de forma autossómica dominante, isto é, basta apenas uma cópia do gene para que a doença se exprima. Na ausência de uma mutação a nível das células germinais<sup>a</sup>, torna-se menos provável o desenvolvimento de cancro a partir de mutações espontâneas no *BRCA1/2* <sup>82</sup>.

No ano de 2010, foram registadas pelo *Breast Cancer Information Core (BIC) Database* 1639 e 1853 mutações, polimorfismos e variantes dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, respetivamente <sup>7</sup>, sendo que uma grande parte destas apresentam significância clínica, isto é, levam a um aumento da probabilidade de desenvolvimento de cancro,

---

<sup>a</sup> Mutação germinativa: mutação que ocorre durante a replicação do DNA que precede a meiose, afetando assim os gâmetas e, conseqüentemente, todas as células descendentes.

uma vez que dão origem a um produto proteico não funcional ou até à falta de produção da mesmo <sup>84</sup>.

Existem três domínios principais do *BRCA1* com uma elevada frequência de mutações em doentes com cancro, sendo estes: o domínio RING (codificado pelos exões 2 a 7), a região codificante que abrange os exões 11 a 13 e o domínio BRCT (codificado pelos exões 16 a 24) <sup>84,85</sup>. No *BRCA2*, as mutações ocorrem principalmente no domínio de ligação ao DNA <sup>85</sup>.

## V. Tipos de cancro da mama associado ao *BRCA1/2*

Tanto os tumores relacionados com o *BRCA1* como os relacionados com o *BRCA2* se apresentam maioritariamente como sendo do tipo ductal invasivo (74% e 76%, respetivamente) <sup>7</sup>.

Analisando o perfil genético de ambos os casos, verifica-se que o cancro da mama associado ao *BRCA1* se classifica principalmente como basal, isto é ER<sup>-</sup> PR<sup>-</sup> HER2<sup>-</sup>, enquanto que no caso do *BRCA2* existe uma elevada frequência de tumores do tipo luminal (ER<sup>+</sup>) <sup>71,7</sup>.

### 6.1.2. *TP53*

O *TP53* consiste num gene supressor de tumores, localizado no cromossoma 17p13.1 (braço curto, p, do cromossoma 17 na posição 13.1), que codifica a fosfoproteína nuclear p53 <sup>86</sup>. Tendo um dos papeis mais importantes na regulação do ciclo celular, atua como fator de transcrição que controla a apoptose induzida em situações de stress celular e/ou de danos no material genético <sup>7,87</sup>. O *TP53* promove, portanto, a estabilidade genómica, exercendo efeitos anti-angiogénicos, controlando a inflamação e a resposta imune e reprimindo a formação e evolução de metástases, todas marcas características do cancro <sup>87</sup>.

Mutações germinais no gene *TP53* podem dar origem à denominada Síndrome de Li-Fraumeni (LFS). A maioria dos casos deriva de mutações pontuais no gene, apesar de também poderem existir deleções na região codificante ou do promotor <sup>86</sup>.

A LFS trata-se de um dos mais agressivas síndromes de predisposição genética autossómica dominante para o cancro, estando associado a aproximadamente 1% dos casos de cancro da mama. Para além do cancro da mama, a LFS encontra-se também associado a outros tipos de cancro, como sarcomas, cancro do cérebro, carcinomas

adrenocorticais e leucemias <sup>86</sup>. A incidência de mutações *de novo* no *TP53* é de aproximadamente 10%, pelo que é possível existirem doentes portadores sem qualquer história familiar de LFS <sup>88</sup>.

Os portadores de mutações no *TP53* têm um risco de cerca de 90% para o desenvolvimento de cancro em qualquer idade, sendo a média de idades do primeiro diagnóstico de 25 anos <sup>86</sup> e de 32 anos para o cancro da mama em particular <sup>88</sup>. O cancro da mama é o mais predominante entre os portadores do sexo feminino e representa cerca de um terço dos cancros em famílias com história de LFS <sup>86</sup>.

Tendo em conta o total de casos de cancro da mama reportados, verifica-se que a LFS é responsável apenas por uma pequena fração destes (cerca de 1%). No entanto, uma mulher com LFS tem um risco de 56% e 90% aos 45 e 60 anos de idade respetivamente, o que confere um risco 60 vezes maior quando comparado com a população em geral <sup>86</sup>. Posto isto, e sabendo que o *TP53* se encontra mutado em quase 50% dos casos de cancro, pode-se considerar este gene como um útil biomarcador no diagnóstico e tratamento do cancro. Porém, a prevalência deste tipo de mutações na população em geral é muito baixa e ainda pouco estabelecida <sup>86,87</sup>. Também o facto de o gene *TP53* se encontrar alterado principalmente no cancro da mama relacionado com o *BRCA1* (56% a 100% dos casos) e o *BRCA2* (29% dos casos) quando comparado com o cancro da mama não associado ao *BRCA*, levanta a questão de quão recompensador será investir neste teste genético <sup>7</sup>.

Num dos maiores estudos desenvolvidos sobre o cancro da mama em mulheres portadoras de LFS, verificou-se que os tumores são histologicamente do tipo ductal e, na grande maioria dos casos, ER<sup>+</sup> ou PR<sup>+</sup> (81% e 84% dos casos de cancro da mama invasivo analisados, respetivamente). Para além disso, 63% dos cancros invasivos e 73% dos cancros *in situ* eram também HER2<sup>+</sup>. Assim, pode-se concluir que tratamentos direcionados para os recetores HER2 poderão proporcionar bons resultados neste tipo de situações <sup>89</sup>.

### 6.1.3. *PTEN*

O *PTEN* é um gene supressor de tumores, localizado no cromossoma 10q23.3, que codifica a proteína da família das fosfatases, cuja função exata não é ainda bem conhecida. Sabe-se, no entanto, que uma proteína PTEN disfuncional leva a problemas

na ativação da apoptose e na interrupção do ciclo celular, proporcionando uma sobrevivência anormal das células <sup>90</sup>.

Mutações no gene *PTEN* a nível das células germinais podem levar ao desenvolvimento de uma rara síndrome hereditária autossómica dominante, designada Síndrome de Cowden (CS) ou Síndrome do tumor PTEN-hamartoma (PHTS). O CS é caracterizado pela formação de múltiplos hamartomas, que podem surgir em qualquer parte do corpo, e pelo aumento do risco de desenvolvimento de tumores malignos, nomeadamente cancro da mama, da tiroide e do endométrio <sup>86,88</sup>. Um hamartoma trata-se de uma lesão focal benigna, semelhante a um tumor, constituída por uma mistura anormal de células e tecidos encontrados na região em que se desenvolve e que raramente é precursora de uma lesão maligna <sup>91</sup>.

Qualquer órgão ou sistema podem estar potencialmente envolvidos, mas são as lesões cutâneas as mais comuns nesta síndrome. As lesões mucocutâneas manifestam-se em praticamente 100% dos casos, geralmente na segunda ou terceira décadas de vida, e podem surgir sob a forma de pápulas faciais e triquilemomas (lesões hamartomatosas da camada externa da derme, habitualmente junto a folículos pilosos), queratoses acrais (apresentam como localização preferencial a região extensora das extremidades e/ou região palmoplantar), pápulas verrugosas (podem surgir nos lábios, mucosa oral, palato e amígdalas), entre outras <sup>91</sup>.

O cancro da mama é a manifestação maligna mais comum entre os portadores de CS. Apesar de ser responsável por menos de 1% do total de casos de cancro da mama, as mulheres com mutações no gene *PTEN* têm um risco acrescido para o desenvolvimento da doença que pode atingir os 50%, com uma idade média ao diagnóstico muito inferior ao observado nas situações de cancro da mama esporádico <sup>86</sup>.

Curiosamente, o CS é uma das poucas síndromes associadas ao cancro onde o exame físico (por exemplo, lesões mucocutâneas) pode ter uma sensibilidade clínica superior à do teste molecular <sup>88</sup>.

#### **6.1.4. CHECK2**

Codificada no gene *CHECK2* do cromossoma 22q12.1 encontra-se a proteína CHK2 (checkpoint kinase 2), responsável pela ativação dos pontos de controlo do ciclo celular <sup>7,92</sup>. Vai funcionar como transdutor de sinal de várias proteínas envolvidas na resposta aos danos no DNA, como o p53 e o BRCA1, nomeadamente a quebras na

cadeia dupla (o tipo de dano mais mortal) <sup>86,92,93</sup>. Inicialmente pensou-se que mutações neste gene resultariam no Síndrome de Li-Fraumeni anteriormente mencionado. No entanto, em estudos mais recentes foi possível a identificação de mutações, como a 1100delC, em doentes com cancro da mama sem qualquer sinal do LFS, pelo que foi descartada tal hipótese <sup>7</sup>.

O papel do *CHECK2* como candidato a gene supressor de tumores tem sido estudado e posto em causa nos últimos anos, visto que apenas um pequeno número de casos foi reportado como estando relacionado com mutações neste gene <sup>92,93</sup>. No entanto, e apesar de ser responsável por menos de 1% dos casos de cancro da mama hereditário, o *CHECK2* parece ser um gene importante, uma vez que as suas mutações são detetadas em cerca de 5% dos doentes sem história familiar de mutações nos genes *BRCA* <sup>86</sup>.

A mutação estudada mais relevante até à data é a deleção 1100delC, que demonstrou aumentar significativamente o risco para o desenvolvimento de cancro da mama entre 2 a 3 vezes mais <sup>92</sup>. O risco cumulativo para portadores heterozigóticos com história familiar de cancro da mama foi estimado em 37%. Os homozigóticos, por sua vez, têm uma probabilidade 6 vezes maior em desenvolver a doença <sup>86,92</sup>.

Os tumores mamários associados ao *CHECK2* são na sua maioria do tipo luminal e ER e/ou PR positivos, pelo que tratamentos e prevenção com tamoxifeno deverão ter bons resultados <sup>92</sup>.

### **6.1.5. ATM**

O *ATM*, presente no cromossoma 11q22.3, consiste num gene supressor de tumores que codifica a proteína multifuncional *checkpoint kinase*, uma das mais importantes para a manutenção da estabilidade genómica do DNA e do ciclo celular <sup>7,94</sup>. O *ATM* vai atuar em resposta a danos no DNA (como as quebras da dupla cadeia de DNA) através da fosforilação e ativação de uma serie de outras proteínas envolvidas em fases mais avançadas do processo de reparação, como a p53 e as *BRCA1/2* <sup>95,96</sup>.

Mutações neste gene dão origem a uma síndrome genética autossómica recessiva rara denominado Ataxia Telangiectasia (AT), que se pode manifestar através de degeneração neuronal progressiva, imunodeficiência, hipersensibilidade para a radioterapia e elevada predisposição para alguns tipos de cancro, como linfomas e cancro da mama <sup>94</sup>. No entanto, tal situação apenas se verifica em portadores

homozigóticos do gene mutado. Aos portadores heterozigóticos está associado um maior risco para a ocorrência de tumores sólidos, em particular o cancro da mama, cerca de 2 a 5 vezes maior que a registada para a população em geral <sup>86,94</sup>.

Apesar de se tratar de um gene supressor de tumores, observou-se que o *ATM* pode também ter níveis de expressão consideravelmente aumentados em fases mais avançadas do cancro da mama, contribuindo para a metastização do mesmo, ao contrário do que seria de esperar <sup>96</sup>. De facto, a atividade da proteína ATM pode promover o crescimento e proliferação celular, a síntese proteica, a angiogénese do tumor, modular a resposta à hipóxia (característica do cancro) e do metabolismo da glucose e até promover a função mitocondrial, todos eles aspetos necessários para o rápido crescimento de células neoplásicas <sup>94</sup>.

No que diz respeito aos testes genéticos a este gene em particular, deve ser realizado em pessoas com uma história familiar de mutações no *ATM*, dado o aumento da probabilidade de desenvolvimento de cancro associado a este *locus*. Noutras situações, visto que a incidência de mutações espontâneas é muito baixa (2 a 3%) e ainda não existirem linhas orientadoras específicas, testar este gene poderá não ser o método de diagnóstico mais adequado <sup>86,95</sup>.

#### **6.1.6. *PALB2* E *BRIP1***

Tanto o *PALB2* como o *BRIP1* consistem em dois genes que, quando existem combinações homozigóticas do seu alelo mutado (com perda de função), podem dar origem à Anemia de Fanconi (FA), uma doença autossómica recessiva caracterizada pelo atrasado no crescimento, crescimento ósseo anormal e incapacitante, falhas na medula óssea e aumento do risco de cancro <sup>86,88</sup>. Por outro lado, heterozigotias para o alelo mutado promovem um aumento acentuado da probabilidade de desenvolvimento de cancro da mama e cancro do pâncreas <sup>92,97</sup>.

O *PALB2* (também identificado como *FANCN*), localizado no cromossoma 16p12 <sup>7</sup>, é o gene que codifica a proteína originalmente identificada como um dos factores responsáveis pela localização e ativação do BRCA2, contribuído assim para os mecanismos de reparação do DNA por recombinação homóloga e supressão tumoral <sup>86,97</sup>. Mais tarde, demonstrou-se que podia também interagir com o BRCA1 <sup>97</sup>. Dado que mutações no *PALB2* são raramente reportadas em casos de cancro, foi inicialmente classificado como um oncogene raro e de risco moderado para o desenvolvimento do

cancro da mama. No entanto, vários estudos demonstraram que as alterações funcionais consequentes de mutações no gene *PALB2*, apesar de raras, conferem um risco para desenvolvimento de um cancro da mama consideravelmente elevado. Cerca de 1% das mulheres com história familiar de cancro da mama, mas não portadoras de mutações nos genes *BRCA1/2*, demonstraram ser heterozigóticas para o alelo *PALB2* mutado, o qual confere um risco 2 a 4 vezes superior para o desenvolvimento da doença relativamente à população em geral <sup>86,92</sup>.

Na Finlândia, um estudo conduzido por Erkko e seus colaboradores demonstrou que aproximadamente 1% das mulheres com cancro da mama, sem história familiar da doença, eram portadoras da deleção 1592delT no gene *PALB2*, à qual é associada um risco 6 vezes superior para o cancro da mama <sup>98,97</sup>. Posto isto, pode-se então concluir que o risco mencionado pode chegar a ser ainda superior ao risco conferido pelas mutações em genes de elevado risco como o *BRCA2*, justificando assim a adição do teste genético ao *PALB2* aos testes aos *BRCA1/2* <sup>86,92</sup>.

À semelhança do que se verifica com o *PALB2*, o *BRIP1* (também conhecido como *FANCF*) consiste no gene que codifica a proteína “parceira” e localizadora do *BRCA1*, localizado no cromossoma 17q22 <sup>7</sup>, que na sua forma mutada pode levar a um risco estimado para o desenvolvimento do cancro da mama 2 vezes superior ao da população em geral, tendo também sido detetado em famílias com historial de cancro da mama hereditário não associado ao *BRCA1/2* <sup>86</sup>.

Assim, é possível que muitos dos clínicos atualmente considerem tanto o *PALB2* como o *BRIP1* como sendo genes de elevado risco para o desenvolvimento do cancro da mama, ainda que raros <sup>88</sup>.

#### **6.1.7. *RAD51C***

O *RAD51C* consiste num dos genes parálogos do *RAD51*, e faz parte do processo de reparação dos danos na dupla cadeia de DNA através de recombinação homóloga. Nas fases mais iniciais da recombinação homóloga, a *RAD51C* localiza-se e acumula-se nos locais em que o DNA foi danificado, de modo a estimular a atividade das restantes proteínas envolvidas <sup>99</sup>. Para tal, a *RAD51C* formar um complexo com a *BRCA1* e *BRCA2* que identifica o local de estagnação da forquilha de replicação <sup>100</sup>.

Aos indivíduos homozigóticos para o alelo do *RAD51C* mutado, que apresenta uma redução da sua atividade, está associado um fenótipo semelhante à Anemia de

Fanconi, enquanto que nos heterozigotas se verificam casos de cancro da mama e do ovário hereditário <sup>101</sup>.

As mutações no gene *RAD51C*, tal como demonstrado em vários estudos, ocorrem predominantemente em famílias com historial de cancro da mama e/ou do ovário, com taxas de incidência que variam de acordo com a nacionalidade do doente <sup>86</sup>. Por exemplo, num estudo finlandês, apenas se identificaram este tipo de mutações em famílias afetadas unicamente por cancro do ovário <sup>102</sup>, contrariamente a um estudo espanhol que detetou os alelos mutados em cerca de 1% das famílias com cancro da mama e do ovário <sup>103</sup>.

Assim, a inclusão do gene *RAD51C* nos teste genéticos de rotina permanece ainda uma questão em debate, visto que este tipo de mutações ocorre numa frequência muito baixa na população em geral, com exceção de algumas populações <sup>86</sup>.

No Quadro 6.1.1 encontram-se sumariados alguns das síndromes de suscetibilidade para o cancro da mama hereditário acima referidos, incluindo o gene e a sua localização cromossómica.

**Quadro 6.1.1** - Quadro resumo das síndromes associadas ao cancro da mama hereditário.

<b>Gene</b>	<b>Cromossoma</b>	<b>Risco de cancro da mama</b>	<b>Síndrome</b>
<i>BRCA1</i>	17q21	Elevado	Síndrome do cancro da mama e do ovário hereditário
<i>BRCA2</i>	13q12.3	Elevado	Síndrome do cancro da mama e do ovário hereditário
<i>TP53</i>	17p13.1	Elevado	Síndrome de Li-Fraumeni
<i>PTEN</i>	10q23.31	Elevado	Síndrome de Cowden/ Síndrome do tumor PTEN-hamartoma
<i>ATM</i>	11q22.3	Intermédio	Ataxia Telangiectasia
<i>PALB2/FANCN</i>	16p12	Intermédio	Anemia de Fanconi
<i>BRIP/FANCI</i>	17q22	Intermédio	Anemia de Fanconi

## 7. RASTREIO E DIAGNÓSTICO DO CANCRO DA MAMA

Com a rápida evolução da ciência e medicina que se fez sentir nos últimos, também os métodos de rastreio e diagnóstico de doenças complexas como o cancro da mama se tornaram mais sensíveis e exatos. Com era da medicina personalizada surgem então métodos de diagnóstico sofisticados, como a imagiologia molecular e os testes de expressão genética, permitindo uma melhor identificação e caracterização dos tumores<sup>104</sup>.

Rastreio e diagnóstico são, no entanto, conceitos diferentes. Com o rastreio pretende-se controlar a presença, ou ausência, da doença quando ainda não existem sinais ou sintomas. É nesta etapa que se podem detetar doenças nas suas fases mais iniciais, proporcionando assim uma melhor probabilidade de cura e melhor qualidade de vida para o doente, visto que se reduz a necessidade de recurso a tratamentos mais invasivos<sup>105,106</sup>. São exemplos de exames de rastreio do cancro da mama a mamografia

e os testes genéticos em indivíduos com uma história familiar da doença. No diagnóstico é identificada a doença <sup>106</sup>.

O cancro da mama é muitas vezes diagnosticado após exames de rastreio de rotina, seja através de um exame físico (palpação) seja por exames de rotina como a mamografia. O exame físico pode ser executado tanto pelo médico como pelo próprio doente <sup>105</sup>. Muitos países recomendam uma auto palpação mamária mensal, em busca de possíveis nódulos ou massas. Se for detetada uma alteração na mama, o médico deverá determinar a sua etiologia. Na palpação é possível a distinção entre um nódulo benigno e um cancerígeno. Verifica-se também o tamanho, forma, textura e mobilidade do tumor, bem como os gânglios linfáticos. Por exemplo, um nódulo com uma forma irregular, fixo e duro tem elevadas probabilidades de ser maligno. Adicionalmente é analisada toda a história clínica e familiar do doente, de modo a avaliar o seu potencial risco para desenvolver cancro da mama <sup>106</sup>.

### **7.1.MAMOGRAFIA**

A mamografia é o exame de imagiologia padrão usado no rastreio e diagnóstico do cancro da mama <sup>107</sup>, tendo proporcionado uma redução da taxa de mortalidade em cerca de 19% graças ao diagnóstico precoce de inúmeros casos. É recomendado a todas as mulheres a partir dos 40-45 anos mamografias de forma rotineira <sup>104</sup>.

Para a obtenção da imagem, a mama é atravessada por pequenos pulsos de radiação raio-X, que são depois analisados pelo detetor que se encontra no lado oposto. Este detetor pode ser analógico (convencional), fixando quimicamente a imagem numa placa fotográfica (detetor físico), ou digital, onde um sensor deteta os fotões da radiação emitida e um computador traduz esse sinal de modo a formar uma imagem. As áreas de baixa densidade, tais como o tecido adiposo, têm um aspeto translucido na imagem, enquanto que as zonas de maior densidade, como o tecido conectivo, glandular ou tumoral, surgem como zonas brancas <sup>105</sup>.

O cancro da mama pode muitas vezes não ser detetado na mamografia, pois pode não ter ainda uma lesão visível ou estar ocultado por tecido mamário normal. Para além disso, o exame torna-se menos sensível em mulheres com grande densidade mamária, uma vez que o tecido normal e o tecido cancerígeno têm atenuações radiográficas bastante semelhantes, pelo que se podem facilmente confundir. Também os tumores ER<sup>-</sup>, constituídos por células pouco diferenciadas das normais e com uma

elevada taxa mitótica passam muitas vezes despercebidos nas mamografias convencionais <sup>108</sup>.

Existem, portanto, vários potenciais aspetos negativos no que diz respeito à mamografia convencional, tais como o elevado número de falsos-negativos e falsos-positivos que se registam, a exposição direta a radiação, dor (uma vez que a mama é comprimida durante o exame) e ansiedade <sup>4,104</sup>.

A mamografia digital tem vindo cada vez mais a substituir a mamografia convencional <sup>4</sup>. Foi desenvolvida em parte para melhorar a deteção do cancro da mama em mulheres com maiores densidades mamárias, pelo que tem uma maior sensibilidade na distinção entre o tecido saudável e o tecido maligno <sup>108</sup>. Neste exame, as imagens são exibidas de forma imediata no monitor do computador, permitindo assim uma mais rápida interpretação relativamente à mamografia convencional, uma vez que se baseia em processos físicos onde existe sempre um tempo de espera para a revelação da imagem. A mamografia digital permite ainda o uso de *software* de deteção que reconhecem determinados padrões cancerígenos e permitem centralizar zonas da imagem para uma leitura mais pormenorizada <sup>4,105</sup>.

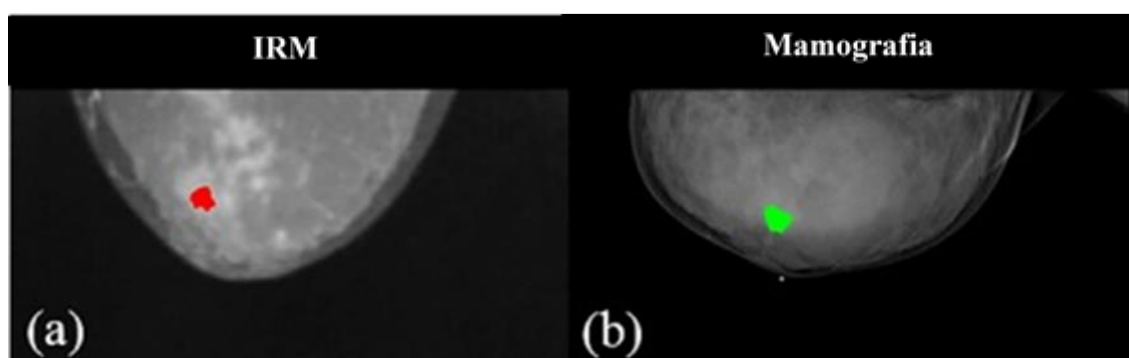
### **7.2.RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E ULTRASSONS**

A Imagem por Ressonância Magnética (IRM) e os ultrassons são ferramentas bastante úteis na avaliação de anormalidades e diagnóstico do cancro da mama. No entanto, não são recomendadas para a população em geral, visto que não se revelaram úteis na diminuição da taxa de mortalidade da população em geral <sup>105</sup>.

A IRM é uma importante ferramenta de diagnóstico do cancro, uma vez que produz imagens com uma elevada resolução sem submeter o doente a qualquer radiação, mas sim a um campo eletromagnético <sup>4</sup>. Depende, no entanto, do uso de agentes de contraste. A neovascularização dos tecidos malignos é caracterizada por uma elevada permeabilidade dos mesmos, pelo que, apesar da baixa seletividade do material de contraste, vai haver uma maior concentração do mesmo nos tecidos tumorais e com maior taxa de proliferação celular. Um grande número de complexos iónicos metálicos paramagnéticos tem sido usado, nomeadamente o manganês, o ferro e o gadolínio, aos quais estão sempre associados alguns efeitos adversos <sup>4</sup>.

Em determinados grupos de elevado risco para o cancro da mama, como por exemplo mulheres com mutações nos genes *BRCA1/2*, é importante a complementação

da mamografia com outros métodos como a IRM, que demonstrou ter uma melhor resolução (Figura 7.2.1) e sensibilidade bastante elevada na deteção de tumores malignos (84,6%) quando comparada com a mamografia (38,6%) ou os ultrassons (39,6%). Assim, é recomendada a complementação da mamografia com um exame por IRM em mulheres com risco para desenvolver cancro da mama superior a 20% - mulheres com mutações genéticas diagnosticadas, uma história familiar da doença ou que tenham passado por tratamentos com radiação envolvendo o tecido mamário <sup>104</sup>. Não é usado como exame de rotina na população em geral devido ao uso de agentes de contraste, à sua baixa seletividade e aos elevados custos que acarreta <sup>4,109</sup>.



**Figura 7.2.1** – Comparação de imagens por ressonância magnética (a) e por mamografia (b) de uma senhora de 54 anos com cancro da mama ductal invasivo, em que é visível a maior resolução e qualidade de imagem por IRM (a) em comparação à mamografia (b) [Adaptado de Yang *et al* <sup>183</sup>].

Os ultrassons são uma boa solução para doentes que não possam ser submetidos a um exame por IRM ou que tenham um risco moderado para cancro da mama, como por exemplo mulheres com densidades mamárias elevadas ou que sejam alérgicas aos agentes de contraste. Este tipo de exame tem, no entanto, a desvantagem de necessitar de um operador especializado e de produzir uma elevada taxa de falsos-positivos <sup>104</sup>.

### 7.3.BIÓPSIA

Quando existem massas suspeitas na mamografia, geralmente é feita uma biópsia da mesma para confirma ou descartar a possibilidade de cancro da mama. Uma biópsia consiste na recolha de uma amostra de células ou tecidos para posterior estudo <sup>110</sup>.

O procedimento, atualmente adotado, com maior precisão e sensibilidade no diagnóstico do cancro da mama é o designado teste triplo, que consiste numa

combinação entre o exame físico e clínico do doente, a mamografia e a citologia por aspiração com agulha fina. Este método permite fazer um diagnóstico com menos de 1% de erro <sup>111</sup>. Uma vez que a grande maioria dos resultados das biópsias acaba por ser benigna, não é tão importante o uso de técnicas mais invasivas <sup>110</sup>.

Existem dois tipos de biópsias principais no diagnóstico do cancro da mama: biópsia com agulha fina e a biópsia com agulha grossa <sup>4</sup>.

A biópsia com agulha fina é um pouco invasivo, preferível em relação a outros tipos de biópsia e bastante preciso no diagnóstico do cancro <sup>112</sup>. Neste procedimento, é inserida uma agulha de pequeno diâmetro, oca, na mama de modo a aspirar células da massa suspeita, que são depois submetidas a exames laboratoriais <sup>4</sup>. O diagnóstico pode, no entanto, ser por vezes desafiante para os patologistas na distinção de doenças facilmente confundíveis, como é o caso do carcinoma ductal atípico e o carcinoma *in situ*, ou o carcinoma ductal e o lobular <sup>104</sup>. Por ser um método pouco invasivo, é muitas vezes preferível em relação a outros procedimentos mais robustos, uma vez que tem menor probabilidade de provocar hematomas ou outras complicações como o pneumotórax <sup>111</sup>.

A biópsia com agulha grossa faz uso de uma agulha mais larga, uma vez que não são aspiradas apenas algumas células, mas sim removidos pequenos cilindros de tecido, com o tamanho de um grão de arroz. São normalmente removidas 3 ou mais amostras, conforme as necessidades <sup>4</sup>. O tecido extraído pode depois ser analisado por testes genómicos, imunohistoquímicos ou através da deteção de biomarcadores tumorais específicos <sup>110</sup>. Este método proporciona um diagnóstico mais robusto e fidedigno do que a biópsia com agulha fina, mas mais invasivo, desconfortável para o doente, caro, demorado e com mais risco acrescidos <sup>112</sup>.

Existem outro tipo de biópsias às quais se podem recorrer para determinar se um dado tumor é ou não invasivo, tais como as biópsias de incisão. Contudo procedimentos como este, mais invasivos, têm sido associados a uma maior taxa de reincidência local do tumor e de metastização dos nódulos linfáticos. Para além disso, existem evidências científicas de que o trauma cirúrgico na presença de uma neoplasia pode potenciar o seu crescimento e proliferação de metástases <sup>110</sup>.

#### **7.4. IMUNOHISTOQUÍMICA**

A imunohistoquímica é caracterizada pelo conjunto de metodologias nas quais se utilizam anticorpos específicos capazes de identificar e estabelecer ligações com determinados antígenos de tecidos. Esta ligação permite identificar a presença de certas substâncias através da formação de complexos antígeno-anticorpo que podem ser corados ou são capazes de emitir radiação fluorescente. Para tal é adicionado um marcador ao anticorpo que proporciona a visualização de tais resultados quando há reação com o antígeno <sup>4,113</sup>.

Como referido em capítulos anteriores da presente monografia, o cancro da mama consiste numa doença altamente heterogénea, que pode ser classificada em vários subtipos moleculares distinguidos de acordo com os perfis de expressão molecular que exibem. Estes perfis são determinados por métodos imunohistoquímicos, onde é estudada a expressão de determinadas proteínas características dos tumores mamários: o ER, o PR e o HER2 <sup>114</sup>.

A imunohistoquímica é um importante método de diagnóstico, uma vez que a determinação do subtipo molecular do tumor é fundamental na implementação do plano de tratamento a seguir. Por exemplo, tumores com amplificação do recetor HER2 são um dos subtipos com pior prognóstico associado, mesmo quando submetidos a terapia hormonal adjuvante. Contudo, certos medicamentos seletivos para o recetor HER2 têm melhorado significativamente a taxa de sobrevivência, tanto em fases precoces como em fases mais avançadas da doença. São exemplos o trastuzumab, o pertuzumab e o lapatinib <sup>70</sup>.

#### **7.5. MARCADORES TUMORAIS**

Os testes sanguíneos para deteção e estudo de determinados biomarcadores tumorais pode ser usado como exame complementar à mamografia, por exemplo. Atualmente não existem marcadores conhecidos que possam ser usados como diagnóstico ou rastreio do cancro da mama, mas alguns marcadores como o antígeno carcinoembrionário (CEA, de *CarcinoEmbryonic Antigen*) e os antígenos “carboidrato” 15-3 (CA 15-3, de *Cancer Antigen 15-3*) e 27.29 (CA 27.29, de *Cancer Antigen 27.29*) podem ter úteis para a tomada de decisões terapêuticas e como ferramentas de prognóstico. Outros biomarcadores promissores são os anticorpos

específicos para o p53, o qual se descobriu existir no soro de doentes com cancro, ainda que em muito reduzidas quantidades <sup>115</sup>.

Os biomarcadores não podem, no entanto, ser usados como diagnóstico dada a sua reduzida sensibilidade e especificidade, nomeadamente no que diz respeito a tumores em fases precoces <sup>4</sup>.

O CEA consiste numa glicoproteína de adesão celular, normalmente produzida durante o desenvolvimento fetal até pouco antes do nascimento. Assim, o CEA não se encontra normalmente presente no soro de adultos, apesar de poder ser detetado em indivíduos com fortes hábitos tabágicos. Este marcador pode-se encontrar em níveis elevados no soro de doentes portadores de, por exemplo, cancro colorretal, do pulmão e da mama, principalmente quando estão metastizados <sup>116</sup>. O seu doseamento pode ser útil na monitorização da resposta ao tratamento. No entanto, apenas 50 a 60% dos doentes com tumores invasivos exibem níveis detetáveis de CEA <sup>117</sup>.

Os CA 15-3 e CA 27.29 consistem nas moléculas usadas para a deteção e doseamento de formas solúveis da mucina 1 associada à membrana celular (MUC-1), em circulação no soro sanguíneo <sup>117</sup>. Tradicionalmente, as mucinas podem estar implicadas na proteção, lubrificação e hidratação das superfícies externas dos tecidos epiteliais que revestem estruturas tubulares ocas, como os ductos mamários ou o sistema gastrointestinal. No entanto, verificou-se nos últimos anos uma associação entre a expressão de mucinas e a progressão do cancro, podendo estas influenciar o crescimento, diferenciação, transformação, adesão e invasão das células neoplásicas <sup>118</sup>.

Uma vez que os níveis de CA 15-3 e de CA 27.29 (e consequentemente de MUC1) parecem estar relacionados com o estágio do tumor, e não com o seu tipo histológico, o doseamento deste tipo de marcadores pode ser útil para o prognóstico e estudo da evolução do cancro, mas não para o seu diagnóstico <sup>117,118</sup>.

Outras moléculas encontram-se neste momento sobre investigação como ferramentas de diagnóstico e/ou prognóstico do cancro da mama, tais como as Células Endoteliais Circulantes (CEC), Células Endoteliais Precursoras (CEP) derivadas da medula óssea, DNA e RNA livre no soro. As CEC e as CEP desempenham importantes papéis na neovascularização e crescimento dos tumores, pelo que podem ser bons candidatos como ferramentas de monitorização de tratamentos antiangiogénicos. A apoptose e necrose celular características do cancro fazem com que os níveis de

DNA/RNA livres no sangue aumente drasticamente, pelo que podem também ser bons candidatos a marcadores tumorais <sup>4</sup>.

## 7.6. TESTES GENÓMICOS

Tem-se verificado, nos últimos 20 anos, um grande aumento dos casos de sucesso de doentes submetidos ao tratamento do cancro, devido não só à evolução das técnicas de diagnóstico que permitem uma deteção cada vez mais precoce da doença, como também das opções terapêuticas cada vez mais especializadas para cada tipo de situação e, por isso, mais eficazes <sup>119</sup>.

Atualmente, oncologistas envolvidos na gestão clínica do cancro da mama têm de aliar todo um leque de características clínicas e moleculares dos tumores às preferências do doente e suas comorbilidades para que possam formular uma solução terapêutica que melhor se adapte a cada caso e tenha as maiores possibilidades de cura, de modo a preservar o mais possível a qualidade de vida do doente <sup>120</sup>.

Nas características clínico-patológicas avaliadas incluem-se a dimensão do tumor, o grau e estágio do tumor, o envolvimento de nódulos linfáticos, o perfil de expressão de proteínas como o ER, o PR e o HER2 (determinados por imunohistoquímica) e a taxa de crescimento <sup>120</sup>. Contudo, e como já foi referido anteriormente, o cancro da mama é uma doença altamente heterogénea. Assim, mesmo tumores com características clínico-patológicas semelhantes, podem ter diferentes tipos de resposta à terapêutica <sup>119</sup>.

Este tipo de avaliação não deixa, apesar de tudo, de ser uma ferramenta fundamental para a caracterização e avaliação dos fatores de risco a partir dos quais se pode avaliar o prognóstico da doença <sup>121</sup>. Por exemplo, a tumores de baixo grau histológico, ER<sup>+</sup> e HER2<sup>-</sup> está associado um prognóstico favorável em doentes tratados apenas com cirurgia ou com terapia endócrina adjuvante, sendo menos sensíveis à quimioterapia. Por outro lado, tumores de elevado grau histológico e de rápido crescimento têm um pior prognóstico, mas uma maior sensibilidade à quimioterapia <sup>120</sup>.

Com a era genómica, novos conhecimentos sobre as bases genéticas das quais dependem o desenvolvimento, expressão e progressão do cancro permitiram o estabelecimento de novas abordagens de previsão prognóstica para cada doente, de uma forma individualizada e personalizada, através da interpretação de um painel de genes relacionados com o cancro <sup>121,122</sup>. Através do padrão de expressão genética, é então

possível identificar os tumores biologicamente mais agressivos e quantificar o risco de recidivas de uma forma mais robusta, quando usado em combinação com os métodos clinico-patológicos tradicionais <sup>121</sup>.

Encontram-se já comercializados vários testes genómicos, especificamente desenhados para avaliar o perfil de expressão genética de tumores malignos da mama, capazes de prever o risco de recidiva e o prognóstico que se pode esperar para cada doente <sup>122</sup>. No Quadro 7.6.1 alguns dos indicativos-chave para a execução de um teste genético, aplicados ao próprio indivíduo ou a parentes próximos de si. Entre os mais relevantes e utilizados nesta área são o MammaPrint® (Agendia) e o Oncotipo DX® (Genomic Health) <sup>121</sup>.

**Quadro 7.6.1** – Critérios chave, aplicados ao próprio doente e/ou a parentes próximos de si, para a execução de testes de suscetibilidade genética para o cancro da mama [Adaptado de Weitzel <sup>88</sup>]

---

**Indicadores chave para teste genético de suscetibilidade**

---

**Diagnóstico de cancro da mama  $\leq$  45 anos de idade**

---

**Cancro da mama triplo negativo < 60 anos de idade**

---

**Cancro da mama bilateral (com primeiro diagnóstico  $\leq$  50 anos de idade)**

---

**Cancro da mama masculino**

---

**Cancro do ovário**

---

**7.6.1. MAMMAPRINT®**

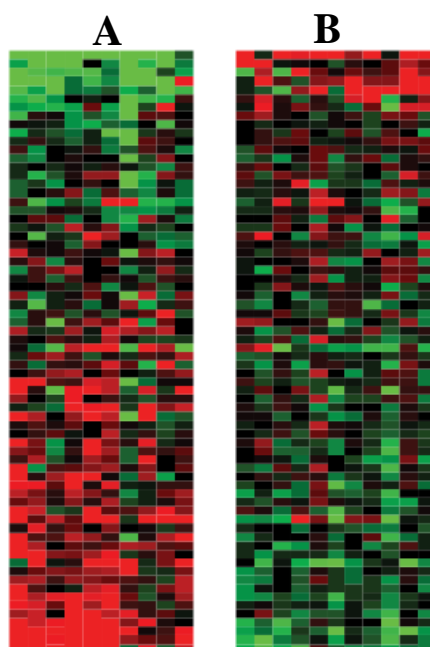
O MammaPrint® foi um dos primeiros testes de mapeamento genómico comercializados. Analisando o perfil de expressão de 70 genes envolvidos no processo de carcinogénese, pode ser usado para estimar o prognóstico de doentes com cancro da mama em fases iniciais e avaliar o seu potencial risco de recidivas <sup>123</sup>.

O MammaPrint® foi desenhado de modo a dividir os doentes em dois grupos: doentes de elevado risco (prognóstico reservado) e doentes de baixo risco (prognóstico favorável) de recidivas em 5 anos <sup>120</sup>, estando associadas taxas de sobrevivência sem metástases em 10 anos < 90% e > 90%, respetivamente <sup>121</sup>.

Para o desenvolvimento deste teste, foram estudados pelo Instituto do Cancro Holandês (NKI) 78 tumores de mulheres com cancro da mama primário, diagnosticadas antes dos 55 anos de idade, sem envolvimento de nódulos linfáticos, com massas de diâmetro inferior a 5 cm e sem historia pessoal de outros tumores malignos. Após

análise por *microarrays*, os 231 genes que estavam aparentemente correlacionados com a doença foram analisados e ordenados de acordo com a sua importância no desenvolvimento e progressão do cancro da mama <sup>122</sup>. Os 70 primeiros desta escala foram então os selecionados para a composição do MammaPrint®. Estes genes encontram-se envolvidos nos processos de controlo do ciclo celular, invasão, metastização, proliferação, imortalização celular, extravasão e angiogénese, característicos das células malignas <sup>121,122</sup>.

Uma vez que o teste se baseia na medição da expressão genética por análise de *microarrays* (Figura 7.6.1.1), a qualidade do RNA tem de ser garantida durante a obtenção e conservação da amostra <sup>120</sup>. A preservação de tecidos embebidos em parafina e fixados por meio de formaldeído (FFPE, de *Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded*) permite o armazenamento por tempo indeterminado e à temperatura ambiente das amostras. No entanto, não existem ainda protocolos devidamente estabelecidos que garantam a integridade do RNA para a realização do MammaPrint® <sup>123</sup>. São então usadas amostras frescas ou congeladas para a realização do exame, que necessitam de ser transportadas em azoto líquido para o laboratório, o que revela ser uma desvantagem para o seu uso regular clínico <sup>122</sup>.



**Figura 7.6.1.1** – Padrões dos resultados dicotómicos do MammaPrint® obtidos por *microarrays*: (A) Tumores de elevado risco, com prognóstico reservado; (B) Tumores de baixo risco, com prognóstico favorável [Adaptado de Sapino et al <sup>123</sup>].

Os resultados do MammaPrint® podem depois ser associados aos resultados do tradicional exame clínico-patológico de modo a selecionar o melhor tipo de tratamento a aplicar em cada caso. Este método tem como principal objetivo poupar os doentes dos efeitos citotóxicos característicos da quimioterapia que tem sido muitas vezes usada sem que fosse necessária <sup>47</sup>. Por exemplo, tumores ER<sup>+</sup> e HER2<sup>-</sup>, com prognóstico favorável, são menos sensíveis à quimioterapia <sup>120</sup>.

Esta possibilidade foi então estudada pelo ensaio MINDACT (*Microarray in Node Negative Disease May Avoid Chemotherapy Trial*), envolvendo 6000 doentes de 5 países da Europa em 3 anos. Daqui resultaram 3 cenários possíveis (tendo em conta o resultado dos testes clínico-patológicos convencionais e do MammaPrint®) <sup>122,123</sup>:

- Ambos determinam prognóstico reservado: tratamento com quimioterapia adjuvante e terapia hormonal (se o tumor for ER<sup>+</sup>);
- Ambos determinam prognóstico favorável: tratamento com terapia hormonal adjuvante (se o tumor for ER<sup>+</sup>);
- Não há concordância entre testes: ou se considera o teste clínico-patológico ou se considera o MammaPrint® <sup>122</sup>.

No Anexo III encontra-se uma tabela de comparação entre o MammaPrint® e outros testes genómicos atualmente já comercializados.

### 7.6.2. ONCOTIPO DX®

O Oncotipo DX® consiste também num teste de expressão genética que pode ser utilizado para a avaliação do prognóstico de um doente. Baseia-se em técnicas de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa) em tempo real para medir o nível de expressão de 21 genes, a partir de RNA extraído de amostras de tecidos fixados em parafina (amostras FFPE) <sup>124</sup>. Tendo por base o perfil de expressão analisado, é depois atribuído um valor de 0 (zero) a 100 (cem) de acordo com o risco que o doente tem de vir a sofrer recidivas dentro de um período de 10 anos (escala de reincidência) <sup>120</sup>.

De acordo com o valor da escala de reincidência calculado, os doentes podem ser divididos em 3 grupos possíveis <sup>121</sup>:

- Baixo risco: ER < 18;
- Risco intermédio:  $18 \leq ER \leq 30$ ;
- Elevado risco: ER > 30.

O Oncotipo DX® foi originalmente desenhado para estimar o risco de recidivas de um grupo de doentes com cancro da mama invasivo, de estágio I ou II, ER<sup>+</sup>, sem invasão dos nódulos linfáticos (NL<sup>-</sup>) e previamente tratados com tamoxifeno <sup>124</sup>.

Para o seu desenvolvimento foram identificados 250 genes candidatos, posteriormente analisados num total de 447 doentes provenientes de 3 estudos individualizados, dos quais 21 foram selecionados para o algoritmo de cálculo da escala de reincidência. Estes podem ainda ser divididos em 2 grupos tendo em conta a sua influência na escala de risco: 16 estão relacionados com o próprio cancro, e 5 são usados como genes referência <sup>121</sup>.

À semelhança do MammaPrint®, também os resultados do Oncotipo DX® podem ser usados para a tomada de decisão entre submeter ou não um doente à quimioterapia como terapêutica adjuvante do cancro da mama. O grupo de baixo risco é, aparentemente, mais sensível à terapêutica endócrina, enquanto que em doentes de elevado risco a quimioterapia será a melhor opção <sup>47</sup>.

Apesar de tanto o MammaPrint como Oncotipo DX serem usados na determinação do prognóstico em doentes com cancro da mama, o seu desenho não se baseia nos mesmos princípios, pelo que apenas são válidos sob determinadas circunstâncias. O Oncotipo DX foi testado e validado em doentes com tumores ER<sup>+</sup> de estádios iniciais (I e II) após terem sido submetidas a terapia endócrina. Por outro lado, o MammaPrint foi desenvolvido tendo em conta doentes portadores de qualquer tipo de cancro da mama, sem que tenham feito qualquer tipo de terapia sistémica adjuvante. Assim, o tipo de teste a executar deve de ser selecionado tendo em conta tais características do doente para que sejam obtidos resultados mais fiáveis <sup>121</sup>.

## **8. FARMACOGENÓMICA DO CANCRO DA MAMA**

Para que o tratamento do cancro da mama, e de outros tipos de cancro, tenha maiores probabilidades de sucesso são necessários dois fatores fundamentais: a deteção precoce do tumor e o tratamento sistémico mais adequado a cada tipo de cancro da mama <sup>125</sup>. Tal como referido no capítulo 7 da presente monografia, a deteção precoce vai depender principalmente de exames imagiológicos de rotina, como a mamografia, nomeadamente no caso de mulheres a partir dos 40 a 50 anos de idade e indivíduos com história familiar da doença <sup>105</sup>.

A terapêutica do cancro da mama é feita através de duas abordagens complementares: a cirurgia (ou radioterapia) e o tratamento sistémico. No que diz respeito ao tratamento sistémico, este pode ser submetido de duas formas diferentes: como tratamento adjuvante ou como tratamento neoadjuvante. Estes tratamentos sistémicos incluem a quimioterapia, a terapia endócrina e os agentes seletivos para os diferentes subtipos elegíveis de tumores <sup>126</sup>. A escolha sobre qual será a melhor hipótese terapêutica é ainda uma questão sob debate <sup>127</sup>.

O tratamento adjuvante é aquele que é administrado ao doente após a cirurgia de excisão (ou radioterapia) baseado no pressuposto que as micrometástases, que não podem ser removidas cirurgicamente, existem na maioria dos doentes <sup>128</sup>. Tem então por objetivo eliminar possíveis células malignas que não tenham sido removidas na cirurgia e prevenir o aparecimento de metástases. O tratamento neoadjuvante, em contrapartida, é aquele que é administrada antes do tratamento cirúrgico (ou radioterapêutico) definitivo. Esta opção é normalmente escolhida em casos de tumores de grandes dimensões com o intuito de diminuir o tamanho do tumor de modo a facilitar a sua total excisão cirúrgica e evitar uma mastectomia (remoção total da mama) <sup>128,129</sup>.

Apesar dos vários esforços aplicados na área do cancro da mama e da constante descoberta de novos fármacos e técnicas inovadoras, estima-se que cerca de 30% a 50% dos doentes com cancro de estádios avançados aquando do diagnóstico irão sofrer recidivas. Para além disso, entre 5% e 10% dos doentes com cancro da mama possuem já metástases no momento do diagnóstico <sup>125</sup>.

Tradicionalmente, seria de esperar que quando a doença é totalmente eliminada e o doente pode ter uma esperança média de vida normal, sem a ameaça da possibilidade de vir a desenvolver novos tumores, o doente seja considerado curado <sup>128</sup>. No que diz respeito ao cancro, o conceito de “cura” ganha um novo significado, pelo que não se pode afirmar que o paciente esteja verdadeiramente curado <sup>125,128</sup>.

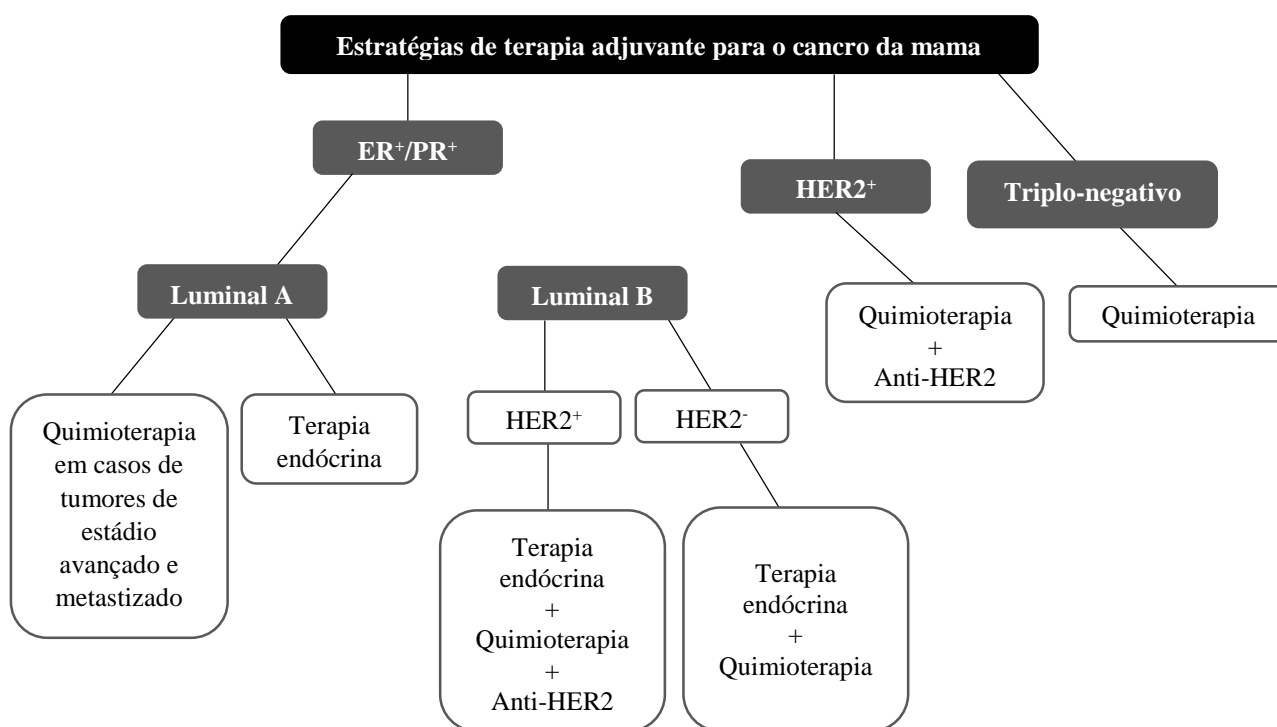
Mesmo com os mais avançados métodos de diagnóstico, laboratoriais ou imagiológicos, nunca se pode afirmar com certeza de que um cancro tenha sido eliminado totalmente. O cancro pode-se apresentar tanto numa forma macroscópica como numa forma microscópica, que pode persistir despercebidamente por tempo indeterminado. Diz-se então que o doente se encontra em remissão durante o período de tempo em que não existem vestígios detetáveis da doença <sup>130</sup>.

Contudo, pode-se considerar que um doente foi curado se o mesmo tiver vivido durante um número de anos considerado normal e morrido sem quaisquer sinais ou sintomas de cancro, seja a nível microscópico como a nível macroscópico <sup>128</sup>.

Apesar de tudo, os avanços no campo na genómica possibilitaram um melhor entendimento sobre a biologia da célula maligna e a identificação de diversos marcadores tumorais fundamentais para o desenvolvimento, invasão e persistência do cancro da mama, que podem contribuir para uma abordagem prognóstica e terapêutica personalizada para cada doente <sup>3</sup>. Os critérios usados para a escolha do melhor esquema terapêutico incluem o imunofenótipo do tumor (ER, PR ou HER2 positivo/negativo), envolvimento dos nódulos linfáticos, tamanho do tumor e, nos estádios mais avançados da doença, o tipo e localização dos tumores secundários (metástases) <sup>104</sup>.

A medicina personalizada e o tratamento seletivo ganham então cada vez mais peso na abordagem ao cancro <sup>3</sup>. Este tipo de estratégia direcionada a certos alvos moleculares que distinguem as células malignas das benignas, e que estão envolvidos no seu desenvolvimento e progressão <sup>131</sup>, vão assim permitir um aumento das taxas de sucesso do tratamento, de uma doença ainda considerada incurável. Para além disso, conferem também uma melhor qualidade de vida ao doente, visto não provocarem os efeitos adversos nefastos e debilitantes associados à quimioterapia <sup>3,104</sup>.

A cada tipo imunohistoquímico de cancro da mama é então associado uma abordagem terapêutica sistémica específica (Figura 8.1) <sup>3</sup>.



**Figura 8.1** – Opções de terapia adjuvante sistémica de acordo com o tipo imunohistoquímico de cancro da mama [Adaptado de Nounou *et al* <sup>4</sup>].

### 8.1.CANCRO ER<sup>+</sup> (E PR<sup>+</sup>)

O cancro hormono-positivo, caracterizado pela expressão exagerada de recetores de estrogénios (ER) e/ou de progesterona (PR), é um dos mais frequentes tipos de cancro da mama diagnosticados, abrangendo cerca de 70% <sup>66</sup> do total dos casos e 85% dos diagnosticados em mulheres com mais de 70 anos de idade <sup>132</sup>. Este tipo de expressão imunohistoquímica dá maioritariamente origem a tumores do subtipo luminal:

- Luminal A: tem a maior taxa de expressão de ER e marcadores luminais;
- Luminal B: tem menor expressão de ER mas grande expressão de marcadores de proliferação <sup>68</sup>.

O cancro ER positivo é caracterizado principalmente pela sua sobreexpressão de recetores dos estrogénios (ER). O ER, incluído na família dos recetores de transcrição nucleares, é ativado por hormonas esteroides. A exposição a estrogénios endógenos

(estrogénio, estradiol e estriol) resulta na dimerização e ativação dos ER, o que leva à promoção da transcrição e sobreexpressão do gene <sup>3,133</sup>.

Os estrogénios fazem parte de diversos processos fisiológicos de diversos tipos de tecidos do organismo, pelo que a sua ação vai ter impacto na diferenciação, crescimento e função da mama, do trato genitourinário, dos ossos, do fígado, dos vasos sanguíneos e do tecido do sistema nervoso central <sup>134</sup>. Para além disso, encontram-se também associados a marcas características o cancro, como a proliferação celular, a inibição da apoptose, invasão e angiogénese <sup>3</sup>. Estes efeitos vão depender da ligação destas hormonas aos recetores dos estrogénios, a qual regula a via de ativação da transcrição dos genes que os codificam. Para além do ligando (estrogénios), é também necessária a presença dos co-ativadores e co-repressores como reguladores da ativação ou inibição dos referidos processos, variando de tecido para tecido <sup>134</sup>.

Existem duas isoformas do ER (ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ ), ambas expressas no tecido glandular mamário normal. A isoforma ER- $\alpha$  é, no entanto, a que está diretamente envolvida em processos patológicos como o cancro da mama <sup>66</sup>. Este tipo de tumores é caracteristicamente bem diferenciado, pouco agressivo, de crescimento lento e com um prognóstico mais favorável <sup>3</sup>.

Uma expressão ER positiva é considerada um dos mais importantes biomarcadores do cancro da mama, sendo por isso o principal requisito para a seleção da terapia endócrina. O cancro da mama pode também expressar outro tipo de recetores de esteroides, como o recetor da progesterona (PR), sendo também nestes casos aplicada a terapia endócrina <sup>3</sup>.

Dada a elevada expressão e estimulação dos recetores hormonais, interessa então tentar bloquear o efeito dos estrogénios envolvidos no crescimento tumoral. A terapia endócrina tem por base tal princípio, podendo atuar por diferentes mecanismos, seja pela inibição da atividade transcricional dos recetores de estrogénios, seja pela redução da própria síntese hormonal estrogénica <sup>135</sup>. Podem-se aqui incluir várias classes de medicamentos, sendo os principais os moduladores seletivos dos recetores de estrogénios (SERMs) e os inibidores da aromatase (AI). Os análogos da hormona de libertação da hormona luteinizante (LHRH, de *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone*), os repressores (“*downregulators*”) seletivos dos níveis do recetor dos

estrogénios (SERD, de *Selective Estrogen Receptor Down-regulator*), as terapias seletivas e sobredosagem de estrogénios são também classes de terapia endócrina<sup>3,133</sup>.

Neste tipo de cancro, a idade da doente vai ter um peso importante na escolha da abordagem a seguir, uma vez que o mecanismo de produção hormonal vai-se alterando com a idade. Em mulheres mais jovens, os ovários são a principal fonte de produção destas hormonas, pelo que abordagens como a remoção cirúrgica dos ovários, irradiação ou a sua supressão temporária por administração de LHRHs têm sido testadas como soluções terapêuticas para o cancro da mama ER<sup>+</sup><sup>126,133</sup>.

No caso de mulheres que já tenham entrado na fase da menopausa<sup>b</sup>, estas hormonas são obtidas a partir das glândulas adrenais, que libertam androgénios que vão ser convertidos em estrogénios pela enzima aromatase no tecido adiposo e muscular. Assim, os AIs aparentam ser a solução mais apropriada, uma vez que previnem a ação da enzima responsável pela síntese de estrogénios após a cessação da função dos ovários que se verifica nestas idades<sup>126,133</sup>. Para além disso, estudos demonstraram que o uso prolongado de tamoxifeno (inserido na classe dos SERMs) ou AIs, após 5 anos de tratamento adjuvante inicial, permite uma redução de recidivas e da taxa de mortalidade aqui associada<sup>126</sup>.

No Anexo IV encontra-se uma tabela resumo com as diversas classes de terapia endócrina do cancro da mama com os respetivos medicamentos, suas ações terapêuticas e consequentes efeitos adversos associados.

### **8.1.1. MODULADORES SELETIVOS DOS RECEPTORES DE ESTROGÉNIO**

Os SERMs foram introduzidos como compostos capazes de mimetizar os ligandos dos recetores de estrogénios. Apresentam um perfil de atividade que varia de acordo com o tecido em que atuam, pelo que podem agir tanto como antagonistas como agonistas ou agonistas parciais dos ER<sup>134</sup>. Para além disso, cada SERM adquire uma conformação diferente quando ligado ao ER, o que resulta em perfis de efeitos farmacológicos diferentes entre si – como por exemplo a potência do efeito ou o tempo de semivida do fármaco<sup>136</sup>.

---

<sup>b</sup> A menopausa é definida pela cessação permanente da menstruação. Na área do cancro da mama o termo é utilizado quando se verifica uma profunda e permanente diminuição/inibição da síntese de estrogénios pelos ovários, decorrente do normal avançar da idade ou de tratamentos oncológicos como a remoção cirúrgica dos ovários, radiação ou administração de LHRH<sup>126</sup>.

Os SERMs são atualmente usados não só no tratamento (tamoxifeno, toremifeno) como também na prevenção (tamoxifeno, raloxifeno) em mulheres com elevado risco para desenvolvimento do cancro da mama. Para além disso, tem também utilidade terapêutica em casos de osteoporose (raloxifeno) e de dispareunia<sup>c</sup> decorrente da menopausa (ospemifeno) <sup>136</sup>.

O tamoxifeno, um trifeniletileno sintetizado nos anos 60, foi um dos primeiros SERMs a ser sintetizado e um dos agentes endócrinos mais utilizados como terapêutica adjuvante do cancro da mama à escala mundial <sup>134,135</sup>.

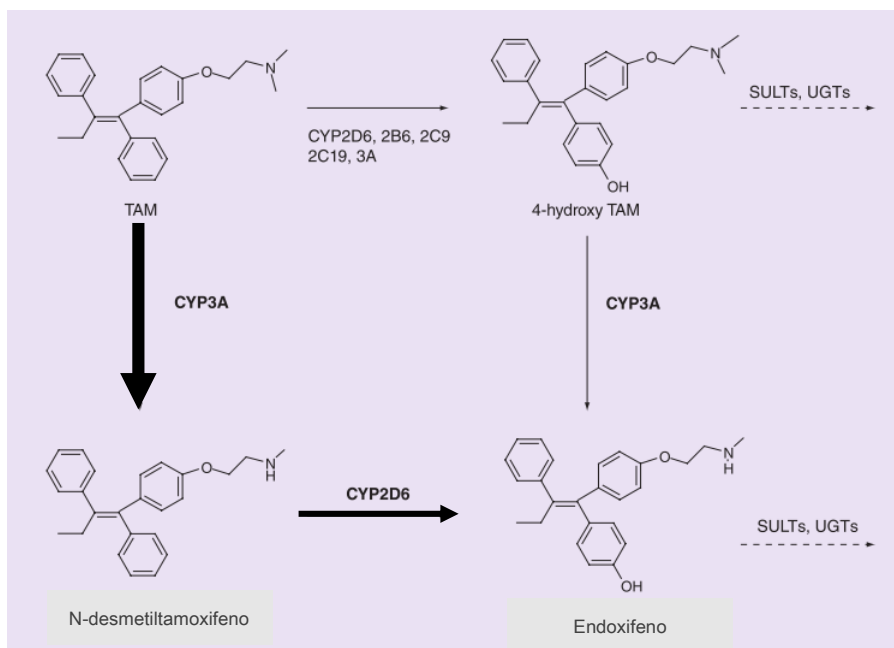
Na mama vai funcionar como um agente anti-estrogénios. Sabe-se que a ligação estrogénio-ER se encontra envolvida do desencadeamento de sinais proliferativos nas células tumorais do cancro da mama. O tamoxifeno, ao ligar-se os ER, impede esta ligação e, conseqüentemente, inibe a proliferação e crescimento de tumores <sup>137</sup>. Por outro lado, em tecidos como o ósseo, o tamoxifeno exerce efeitos análogos aos dos estrogénios, pelo que inibe a formação e diferenciação dos osteoclastos (células envolvidas no processo de reabsorção do tecido ósseo) <sup>134</sup>.

O tamoxifeno pode ser considerado um pró-fármaco, uma vez que não é a sua forma original que apresenta uma afinidade significativamente forte para os ER, mas sim os seus metabolitos primários e secundários <sup>138</sup>.

O metabolismo hepático (e o da parede dos intestinos) do tamoxifeno leva à formação de pelo menos 22 metabolitos de fase I no Homem. A principal via metabólica envolve processos de desmetilação do tamoxifeno por parte de enzimas como o CYP3A4 e o CYP3A5, que dão origem ao N-desmetiltamoxifeno, o qual vai ser depois hidroxilado pelo CYP2D6 para formar o seu metabolito mais importante, designado por endoxifeno (N-desmetil-4-hidroxitamoxifeno) <sup>135</sup>. Numa segunda via metabólica, igualmente importante no processo de bioativação do tamoxifeno, verifica-se o inverso do anterior, isto é, o tamoxifeno sofre primeiro a hidroxilação por parte do CYP2D6 (sendo que os CYP450 2B6, 2C9, 2C19 e 3A também podem reagir nesta etapa) seguida da desmetilação pelo CYP3A4 e CYP3A5, formando assim os metabolitos e endoxifeno respetivamente (Figura 8.1.1.1). Estes metabolitos ativos são depois destoxificados por enzimas transferases como a SULfoTransferase (SULT) e a Uridina 5'-difosfo-GlucuronosilTransferase (UGT) <sup>138</sup>.

---

<sup>c</sup> A dispareunia é a dor genital ou pélvica profunda sentida durante a relação sexual <sup>182</sup>.



**Figura 8.1.1.1** - Metabolismo do tamoxifeno via CYP450. Os metabolitos hidroxilados sofrem posterior conjugação pela SULT e UGT. A principal via metabólica encontra-se representada com as setas largas. SULT: sulfotransferase; TAM: tamoxifeno; UGT: uridina 5'-difosfoglucuronosiltransferase [Adaptado de Zembutsu <sup>138</sup>].

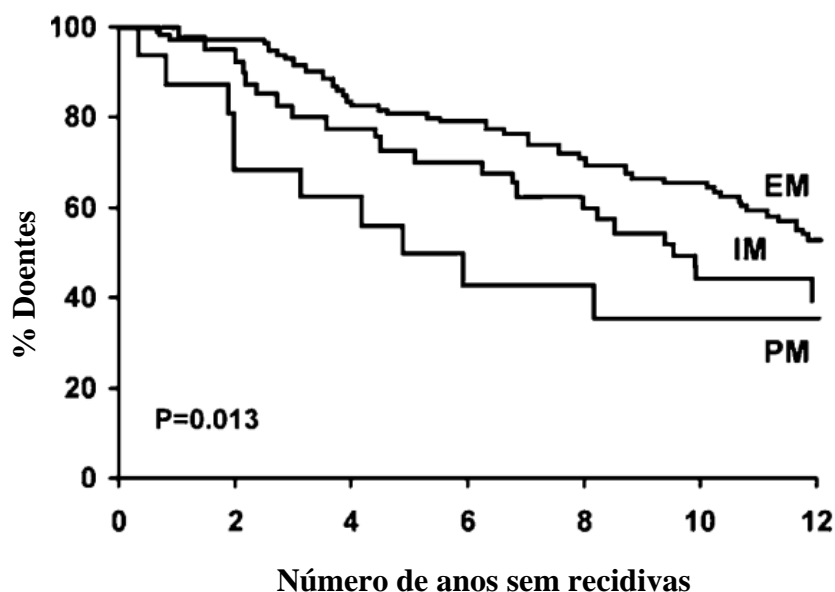
Entre os inúmeros metabolitos formados a partir do tamoxifeno, o endoxifeno e o 4-OH-tamoxifeno demonstram ser os mais ativos farmacologicamente, pelo que apresentam atividades antiestrogénicas 30 e 100 vezes, respetivamente, mais potentes relativamente ao original (tamoxifeno) e ao seu produto desmetilado (N-desmetiltamoxifeno). O endoxifeno é, no entanto, o metabolito mais importante uma vez que, apesar de não ser o mais potente, apresenta-se uma concentração sérica 5 vezes superior à do 4-OH-tamoxifeno <sup>135</sup>.

O uso do tamoxifeno no tratamento e prevenção do cancro da mama permitiu uma diminuição significativa da taxa de mortalidade e reincidência da doença <sup>139</sup>. No entanto, a sua ação não demonstrou ser eficaz em todos os indivíduos submetidos a este tipo de terapêutica, tendo sido inclusive reportadas situações de resistência ao fármaco <sup>135</sup>.

Sendo o tamoxifeno considerado um pró-fármaco, a variabilidade genética interindividual tem um peso preponderante para o sucesso da terapêutica. O CYP2D6 é conhecido por ser uma das enzimas mais importantes para a obtenção de 4-OH-tamoxifeno e endoxifeno. Têm sido reportados inúmeros polimorfismos genéticos deste enzima, incluindo alelos que levam à diminuição da função e/ou quantidade do produto transcrito. De acordo com o fenótipo expresso pelo CYP2D6, este pode ser classificado

em 3 grupos: metabolizadores lentos (PM), metabolizadores intermédios (IM) e metabolizadores rápidos (EM) <sup>138</sup>. Assim, apesar de todos os doentes receberem uma dose padrão de 20 mg de tamoxifeno por dia, nem todos vão reagir da mesma forma ao tratamento. Por exemplo, metabolizadores lentos revelam ter uma maior resistência ao tamoxifeno que os metabolizadores rápidos, uma vez que não são capazes de obter concentrações mínimas terapêuticas dos seus metabolitos ativos. Métodos de genotipagem, fenotipagem ou monitorização terapêutica de fármacos poderão ser soluções para o cálculo das doses mais adequadas para cada doente em substituição da administração da dose padrão <sup>135</sup>.

O tipo de metabolização pelo CYP2D6 que o doente apresenta, para além de influenciar a taxa de sucesso do tratamento com o tamoxifeno, também vai contribuir para a probabilidade de recidiva do mesmo, sendo aos metabolizadores lentos atribuído o menor número de anos em remissão (Figura 8.1.1.2) <sup>140</sup>. É também importante salientar a importância dos testes genéticos para a seleção da medicação mais indicada para aliviar os efeitos adversos associados a este tipo de tratamentos endócrinos, nomeadamente a depressão e os afrontamentos. Os antidepressivos da classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS), como a fluoxetina, a paroxetina e a venlafaxina, são também substratos do CYP2D6 e como tal vão inibir a biotransformação do tamoxifeno nos seus metabolitos ativos, reduzindo assim a eficácia do tratamento <sup>140,141</sup>.



**Figura 8.1.1.2** – Comparação do número de anos sem recidivas que os diferentes tipos de metabolizadores para o CYP2D6 apresentam, após serem submetidos ao tratamento do cancro da mama com tamoxifeno. A percentagem de doentes que sobreviveram 2 anos sem recidivas no grupo dos metabolizadores lentos é visivelmente menor que a observada para os grupos dos metabolizadores intermédios e rápidos. PM: Metabolizador lento; IM: Metabolizador intermédio; EM: Metabolizador rápido [Adaptado de Goetz *et al* <sup>140</sup>].

Outro efeito secundário frequentemente relacionado com o tamoxifeno é a perda de densidade mamária, a qual é considerada um fator de risco para o cancro da mama e uma interferência para a deteção da doença por mamografia <sup>136</sup>.

O tamoxifeno pode ser usado tanto em mulheres com idades de pré-menopausa, as quais são submetidas a tratamentos de pelo menos 5 anos com tamoxifeno, como em mulheres que já entraram na menopausa, sendo neste caso aplicado um inibidor da aromatase durante os 2 primeiros anos seguido de tamoxifeno durante mais 2 ou 3 anos <sup>142</sup>.

Depois da síntese do tamoxifeno, tinha-se como objetivo o desenvolvimento de uma molécula capaz de reter os efeitos terapêuticos do tamoxifeno na mama e até no osso, mas que proporcionasse menos riscos e efeitos adversos e um melhor controlo dos sintomas da menopausa a estes associados. Desenvolveram-se então os SERMs de segunda geração como o raloxifeno, toremifeno, bazedoxifeno, fulvestrant, entre outros <sup>136</sup>.

O raloxifeno tem uma ação estrogénica no tecido ósseo sem provocar os mesmos efeitos estimulatórios no endométrio (hiperplasia, pólipos, cancro do endométrio) e no tecido mamário (elevada densidade mamária, dor/sensibilidade), pelo

que é indicado para o tratamento e/ou prevenção da osteoporose em mulheres após a menopausa e para a redução do risco do cancro da mama nas mesmas <sup>134</sup>.

O toremifeno é um análogo clorinatado do tamoxifeno com efeitos fisiológicos similares, mas não idênticos, a este. Está atualmente aprovado para o tratamento do cancro da mama com metastização ou de estágio 4 em mulheres com idades mais avançadas (na menopausa) <sup>134,136</sup>. Foi desenvolvido com o objetivo de evitar o desenvolvimento de carcinomas hepáticos consequentes de terapêuticas com o tamoxifeno, uma vez que evita a formação de adutos no DNA das células hepáticas que potenciam o aparecimento de certos tipos de cancro <sup>136</sup>.

O bazedoxifeno apresenta efeitos antagonistas dos ER na mama, com a particularidade de ter uma elevada afinidade tanto para com o ER- $\alpha$  como para com o ER- $\beta$ . Comparando com o raloxifeno, o bazedoxifeno tem uma menor afinidade e seletividade para com o ER- $\alpha$ . O seu mecanismo de ação envolve a promoção da degradação dos recetores ER- $\alpha$  e consequentemente silenciamento da proliferação das células cancerígenas mamárias. Encontra-se já aprovado em vários países (inclusive países Europeus como a Itália, Espanha e atualmente Portugal) para o tratamento da osteoporose pós-menopausa <sup>134,136</sup>.

O fulvestrant vai atuar não só como um antagonista dos estrogénios puro, como também como um degradador seletivo dos recetores dos estrogénios, isto é, reduz a expressão de ER ao mesmo tempo que inibe a sua migração entre o núcleo e o citoplasma <sup>136</sup>. Possui então uma ação antiestrogénica em todos os tecidos em que atua, pelo que é categorizado como SERD (repressor seletivo do recetor dos estrogénios) <sup>133</sup>. O fulvestrant é assim uma outra opção como terapia endócrina, pós-menopausa, do cancro da mama de estádios avançados e/ou metastizados <sup>136</sup>.

### **8.1.2. INIBIDORES DA AROMATASE**

Os inibidores da aromatase (AI, de *Aromatase Inhibitor*) consistem em moléculas capazes de inibir a conversão endógena de androgénios em estrogénios, pelo que são atualmente usados como terapêutica adjuvante do cancro da mama ER<sup>+</sup> e PR<sup>+</sup>, seja ele localizado ou já metastizado. Não estão, no entanto, ainda aprovados como terapêutica de prevenção <sup>143</sup>. A conversão de androgénios em estrogénios é levada a cabo pelo enzima aromatase, a qual consiste no alvo terapêutico dos AIs <sup>133</sup>.

A aromatase consiste num complexo enzimático constituído por 2 proteínas: (1) um citocromo da família P450 (CYP450, de *CYtochromes P450*), o CYP19, e (2) uma redutase (NADPH-citocromo P450 redutase). A CYP19 é a hemoproteína encarregue da conversão hormonal propriamente dita, enquanto que a redutase consiste no biocatalizador responsável pela transferência de eletrões desde a NADPH até ao CYP19 de modo a ativar a sua ação <sup>144</sup>.

A aromatase está envolvida apenas na etapa final da síntese biológica de estrogénios, pelo que a sua inibição não vai afetar a produção de outras hormonas esteroides que sigam vias comuns <sup>145,146</sup>. Faz a conversão de androstenediona em esterona e de testosterona em estradiol <sup>147</sup>. Assim, a aromatase é considerada um importante alvo para o tratamento e prevenção de tumores dependentes de estrogénios para o seu desenvolvimento e proliferação <sup>126</sup>.

Os AIs, podem ser categorizados tendo em conta vários aspetos. De acordo com as suas estruturas químicas, podem ser separados em 2 categorias: esteroides e não esteroides. Relativamente à ordem do seu desenvolvimento clínico podem ser categorizados em gerações: primeira geração, segunda geração, e por aí adiante. Tendo em conta o seu mecanismo de ação, dividem-se em AIs do tipo I e do tipo II <sup>145,147</sup>.

Os AIs esteroides apresentam uma estrutura semelhante à da androstenediona, a qual tem uma grande afinidade para a aromatase. Este tipo de inibidores interage diretamente com o sitio ativo do enzima, sendo por isso identificados como inibidores do tipo I <sup>146</sup>.

Os inibidores do tipo I ligam-se ao local catalítico do enzima, onde são metabolizados, sendo os produtos desta reação as moléculas que se ligam ao sitio ativo do enzima, de forma irreversível (inibidores suicida), bloqueando a sua atividade. Os enzimas permanecem assim inativos mesmo quando o fármaco já não se encontra em circulação. Os fármacos que seguem este tipo de mecanismo podem ser administrados em doses reduzidas, visto que o seu efeito não vai depender do tempo de exposição ao fármaco <sup>145,146</sup>.

Os AIs não esteroides são os considerados inibidores do tipo II. Neste caso verifica-se uma inibição reversível da aromatase <sup>146</sup>. A sua ação vai depender de uma continua exposição ao fármaco, sendo por isso necessárias doses maiores e administradas de forma mais regular quando comparados com os inibidores do tipo I <sup>145</sup>.

O formestano, o exemestano e o atamestano são três dos AIs esteroides clinicamente mais estudados. O formestano foi o primeiro a entrar nos ensaios clínicos dos inibidores esteroides da aromatase como substrato suicida <sup>145</sup>. Era até à data o mais potente, seletivo e efetivo fármaco deste grupo, porém requeria uma administração via injeção intramuscular, o que se tornou uma desvantagem dado que são necessários largos meses e até anos de tratamento <sup>146</sup>.

A pesquisa de novas moléculas que não acarretassem tantas desvantagens levou à síntese do exemestano, o qual demonstrou ser ainda mais potente e eficaz que o formestano, podendo inclusive ser administrado por via oral <sup>145,146</sup>. A administração de uma única dose de exemestano é suficiente para provocar uma diminuição acentuada dos níveis plasmáticos do fármaco, pelo que 25 mg diárias é normalmente suficiente para o tratamento <sup>145</sup>.

O atamestano é o mais recente entre os três. Demonstrou ter uma grande afinidade para a aromatase, inibindo irreversivelmente a sua ação sem provocar outro tipo de efeitos endócrinos que se verificavam com outras moléculas, o que torna o atamestano um fármaco promissor para o tratamento de doenças estrogénio-dependentes <sup>146</sup>.

Os AIs demonstraram ser uma estratégia terapêutica ainda mais eficaz no tratamento do cancro ER e PR positivo pós-menopausa do que o tamoxifeno <sup>3</sup>. Em mulheres com cancro metastizados, verificou-se uma melhor resposta ao tratamento e melhores taxas de sobrevivência, e em mulheres com cancro da mama de estádios iniciais, os AIs proporcionaram uma redução do risco de recidivas locais, regionais e distantes relativamente ao revelado por doentes tratadas com tamoxifeno <sup>3,148</sup>. No entanto, em mulheres mais jovens, a diminuição da produção periférica de estrogénios vai estimular o aumento da produção dos mesmo pelos ovários, num mecanismo de *feedback* negativo. Assim, os AIs são principalmente indicados para o tratamento do cancro da mama pós-menopausa <sup>133</sup>.

Os AIs podem ainda ser usados noutros tipos de patologias associadas ao excesso de ação de estrogénios, nas quais se incluem o cancro do endométrio, ginecomastia masculina, puberdade precoce ou tardia, oligo- e anovulação e a endometriose <sup>145</sup>.

## 8.2. CANCRO HER2<sup>+</sup>

O recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) consiste num dos membros da família dos EGFR, na qual estão também incluídos o HER1 (também designado EGFR), HER2, HER3 e HER4 <sup>69</sup>.

A ativação constitutiva do fator de crescimento, decorrente da amplificação do oncogene HER2 <sup>149</sup>, desencadeia a ação de vários processos conducentes à carcinogénese, como a regulação da proliferação celular, angiogénese, sobrevivência e imortalidade, migração e invasão de células tumorais <sup>3,6</sup>.

O cancro da mama HER2<sup>+</sup> constitui cerca de 15% a 20% dos casos de cancro da mama invasivo, ao qual é associado um prognóstico bastante desfavorável <sup>3,69,149</sup>, uma vez que se traduz num tumor resistente a vários tipos de terapêutica, como a terapia endócrina, e com uma apresentação clínica agressiva, que inclui elevadas taxas de mortalidade em fases iniciais da doença, um curto intervalo de tempo sem recidivas e uma marcada incidência de metástases <sup>150</sup>.

Os estudos levados a cabo sobre o envolvimento do HER2 no processo de carcinogénese permitiram o desenvolvimento de terapias seletivas para este recetor, capazes de inibir os seus efeitos, o que veio revolucionar o tratamento de mulheres com cancro da mama HER2<sup>+</sup> cujo potencial sucesso era até aí muito pouco provável <sup>69,150</sup>.

Testes farmacológicos desenvolvidos nos últimos anos, fundamentais para a identificação dos doentes que podem beneficiar com terapêuticas seletivas para o HER2, demonstraram ainda a existência de uma grande heterogeneidade, do ponto de visto clínico e biológico, mesmo entre tumores do tipo HER2<sup>+</sup>. Assim, nem mesmo com uma terapia direcionada para o problema central é possível ter sucesso em todos os doentes <sup>3,149</sup>.

Ao longo da última década, inúmeros agentes seletivos para o HER2 foram introduzidos no mercado, nos quais se incluem anticorpos monoclonais, pequenas moléculas inibidoras e conjugados de anticorpos e fármacos <sup>69</sup>, que promovem a inibição do crescimento do tumor e sua consequente apoptose através de mecanismos diferentes entre si <sup>3</sup>.

Aos pacientes com cancro da mama HER2<sup>+</sup> é apresentado um plano de ação primário composto por quimioterapia associada à terapia biológica, tanto como tratamento adjuvante como em situações de metastização. Esta abordagem veio mudar

dramaticamente a história natural deste tipo de doentes, sendo até sugerida muitas vezes como opção de primeira linha <sup>149,151</sup>.

A combinação de agentes anti-HER2 e quimioterapia, independentemente do tipo de expressão dos recetores hormonais (ER e PR) foi estabelecida tendo em conta a análise de diversos estudos <sup>149</sup>:

- A análise retrospectiva de doentes tratados antes do desenvolvimento de agentes seletivos como o trastuzumab demonstrou que, tumores HER2<sup>+</sup> seriam mais sensíveis á quimioterapia do que os tumores ER<sup>+</sup> e PR<sup>+</sup>, nomeadamente com regimes de antraciclinas <sup>152</sup>;
- Os efeitos sinérgicos entre o trastuzumab e agentes como o paclitaxel, docetaxel ou a vinorelbina (quimioterapia) foram sugeridos em vários estudos pré-clínicos <sup>153</sup>;
- Os efeitos sinérgicos acima referidos foram depois confirmados em ensaios piloto e estudos de fase II onde se comprovou o aumento da taxa de resposta ao tratamento e da taxa de sobrevivência dos doentes <sup>154</sup>.

Mais recentemente, novos estudos como o “*Clinical Evaluation of Pertuzumab and Trastuzumab study*” (CLEOPATRA) têm estudado os efeitos de um regime composto por dois agentes anti-HER2. Contudo, a grande heterogeneidade que se verifica no cancro da mama HER2<sup>+</sup> no que diz respeito ao seu tipo de expressão hormonal (ER e PR positivo ou negativo) demonstra ter um peso maior do que o esperado. Tumores ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> são menos sensíveis à quimioterapia e mais sensíveis à terapia endócrina, pelo que o tipo de terapêutica a associar aos agentes anti-HER2 deverá ter em conta este tipo de condições <sup>149</sup>.

Atualmente existem seis fármacos principais, intitulados como agentes biológicos ou seletivos para o HER2, aprovados para uso clínico, sendo eles: (1) trastuzumab; (2) pertuzumab; (3) bevacizumab; (4) lapatinib; (5) trastuzumab-emtansina; (6) everolimus <sup>151</sup>.

### **8.2.1. TRASTUZUMAB**

O trastuzumab (Herceptina®) consiste num anticorpo monoclonal humanizado seletivo para o domínio IV extracelular do recetor HER2, prevenindo assim a ativação do mesmo (a qual é dependente de ligando) <sup>3,151</sup>. Deste modo, é então possível reduzir a sobreexpressão e atividade do HER2 que se encontra aumentada em alguns casos de

cancro da mama e que está na origem da proliferação e imortalização das células malignas <sup>69,155</sup>. Para além disso, sendo este um anticorpo humanizado, vai desencadear uma resposta imune contra as células onde se verifica uma expressão anormalmente aumentada de HER2, através de um mecanismo de citotoxicidade que promove a lise das células tumorais <sup>69,155</sup>.

Foi o primeiro fármaco biológico/seletivo para o HER2 a ser desenvolvido, pelo que mudou drasticamente o prognóstico deste grupo de doentes, até então bastante desfavorável <sup>150,156</sup>. Este anticorpo é composto por uma imunoglobulina G1 (IgG1) humanizada obtida a partir de ratos, a partir dos quais é obtida a sequência capaz de reconhecer o epitopo extracelular dos recetores HER2 <sup>150</sup>.

Demonstrou-se a eficácia do trastuzumab em situações de cancro da mama HER2<sup>+</sup> avançado, terapêutica neoadjuvante e adjuvante, bem como terapêutica de cancros metastizados <sup>3,151</sup>. Usado em monoterapia ou combinado com quimioterapia, o trastuzumab proporcionou um aumento das taxas de resposta ao tratamento e de sobrevivência, com uma simultânea redução da velocidade de progressão do cancro <sup>150,157</sup>.

O trastuzumab foi numa primeira fase aprovado para o cancro da mama metastizado. Infelizmente, nem todos os doentes respondem positivamente ao tratamento com trastuzumab. De facto, tumores metastizados que inicialmente respondiam ao tratamento frequentemente desenvolviam também resistência ao mesmo <sup>3,69</sup>. Posteriormente, foi estudado o seu potencial em tumores de estádios precoces <sup>69</sup>.

O sucesso demonstrado pelo trastuzumab como terapêutica seletiva para o HER2 levou então à investigação e desenvolvimento de outras moléculas seletivas ainda melhores, como o lapatinib, o pertuzumab ou o conjugado trastuzumab-emtansina <sup>150</sup>.

### **8.2.2. PERTUZUMAB**

O pertuzumab (Perjeta®) é também, à semelhança do trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado, tendo sido o primeiro da sua classe — os inibidores da dimerização do HER2 — a ser desenvolvido <sup>69,155</sup>.

Desenhado para se ligar ao domínio extracelular II do HER2, apresenta um mecanismo de ação complementar mas não igual ao do trastuzumab, uma vez que vai inibir a dimerização HER2-HER3 responsável por desencadear vias de sinalização

intracelulares envolvidas em processos mitóticos, enquanto que o trastuzumab impede a ligação do ligando do HER2<sup>151,155</sup>.

Este tipo de agentes permite assim uma atenuação da proliferação celular, invasão e imortalização características e fundamentais para o desenvolvimento e progressão do cancro. Para além disso, à semelhança do trastuzumab, por se tratar de um anticorpo, vai também ativar uma resposta imunitária contra as células que expressão HER2 com sua consequente lise<sup>155</sup>.

A combinação entre o trastuzumab e o pertuzumab tem sido estudada em vários ensaios clínicos como forma de prevenção ao mecanismo de resistência ao trastuzumab que se desenvolve em vários casos. Tal apenas é possível dados os mecanismos de ação diferentes que apresentam entre si<sup>156</sup>.

### **8.2.3. BEVACIZUMAB**

Dada a elevada taxa de proliferação celular associada às células malignas, são consumidas elevadas quantidades de oxigénio e nutrientes na manutenção do metabolismo acelerado associado a tumores sólidos. Assim, para que possam crescer, os tumores necessitam de estimular a formação de uma rede de vasos sanguíneos heterogénea (com diferentes calibres) capaz de suportar as necessidades energéticas das suas células<sup>158</sup>.

Para a estimulação da angiogénese, os tumores desenvolvem áreas de hipóxia no seu ambiente envolvente. A hipóxia funciona como um sinal estimulador do processo de angiogénese na generalidade dos tecidos, sendo normalmente ativada quando existem lesões nesses mesmo tecidos de forma a contribuir no processo de cura<sup>60,158</sup>.

Os tumores recriam no seu microambiente este mesmo tipo de situações, com a concomitante estimulação produção de fatores proangiogénicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, de *Vascular Endothelial Growth Factor*). A angiogénese constitui assim um pilar fundamental para o desenvolvimento de tumores, tornando-se assim num possível alvo terapêutico<sup>60,158</sup>.

Sendo o VEGF um dos principais regulares da angiogénese, secretado pela maioria das células malignas, o bloqueio da sua ação tem-se revelado uma abordagem bem-sucedida no tratamento de inúmeros tipos de cancro, entre eles o cancro da mama. Para além da angiogénese, o VEGF estimula processos como a proliferação, migração e sobrevivência celulares, a expressão de moléculas de adesão e potencia o aumento da

permeabilidade vascular, visto que os vasos recém formados são caracteristicamente muito permeáveis <sup>159</sup>.

O bevacizumab (Avastin®) pertence também ao grupo dos anticorpos monoclonais humanizados, sendo neste caso seletivo para o VEGF circulante <sup>151</sup>. Trata-se, portanto, de um agente antiangiogénico. A adição do bevacizumab a um agente citotóxico como tratamento de primeira linha do cancro da mama metastizado tem demonstrado contribuir para o aumento da taxa de sobrevivência dos doentes. O mesmo não se verifica quando usado como monoterapia <sup>158</sup>.

#### **8.2.4. LAPATINIB**

O lapatinib (Tykerb®) consiste num inibidor reversível da tirosina cinase duplo, ou seja, trata-se de uma pequena molécula capaz de se ligar e inibir de forma reversível a tirosina cinase presente nos domínios tanto do HER2 como do HER1 (ou EGFR) <sup>69,151</sup>.

A tirosina cinase é a enzima responsável pelo envio do transdução de sinal necessário para a ativação de processos como a proliferação e sobrevivência celular. Para o envio deste tipo de sinais é necessário um processo de fosforilação por parte da tirosina cinase, o qual é ATP-dependente. O lapatinib atua precisamente como um competidor do ATP, inibindo a sua ligação ao HER2 e EGFR <sup>160</sup>.

Num cenário clínico, o lapatinib em combinação com fármacos citotóxicos como a capecitabina revelou ter resultados terapêuticos favoráveis em doentes com cancro da mama HER2<sup>+</sup> progressivo, após um tratamento primário com quimioterapia e trastuzumab. Uma vez que inibe também o HER2, embora por um mecanismo distinto do seguido pelo trastuzumab, pode ser usado em casos de resistência ao mesmo <sup>156,160</sup>.

Apesar de tudo, alguns pacientes são já constitutivamente resistentes a este tipo de agentes, sendo que, mesmo em pessoas suscetíveis, a doença muitas vezes progride graças à seleção de células que adquiriram resistência ao fármaco <sup>160</sup>.

#### **8.2.5. TRASTUZUMAB-EMTANSINA**

O trastuzumab-emtansina (Kadcyla®) trata-se de uma conjugação entre um anticorpo monoclonal e um agente citotóxico que inibe a formação dos microtúbulos durante a divisão celular <sup>69</sup>. Encontra-se atualmente aprovado para o tratamento de doentes com cancro da mama HER2<sup>+</sup> metastizado que tenham sido previamente tratados

com trastuzumab e citotóxicos da família dos taxanos, em combinação ou separadamente <sup>3</sup>.

A combinação entre um anticorpo monoclonal contra HER2 e um potente agente citotóxico permite assim identificar as células malignas, com base no seu perfil de expressão de HER2 e entregar seletivamente elevados níveis de fármacos citotóxicos que vão provocar a sua destruição. Este tipo de mecanismo tem a vantagem de poupar as células normais dos efeitos tóxicos associados ao tratamento e assim garantir uma melhor qualidade de vida ao doente durante a terapêutica <sup>161</sup>.

### 8.2.6. EVEROLIMUS

O everolimus (Afinitor®) consiste num derivado do sirolimus (formalmente designado por rapamicina) <sup>151</sup>. O sirolimus trata-se de um fármaco imunossupressor utilizado, por exemplo, em transplantes renais, que inibe a ativação e proliferação dos linfócitos T do sistema imunitário, tendo sido o primeiro inibidor da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, de *mammalian Target Of Rapamycin*) descoberto e aprovado <sup>162</sup>.

O mTOR é uma cinase serina/treonina cujas funções se desenrolam em pontos centrais de uma variedade de vias de sinalização intracelulares, nomeadamente no que diz respeito à regulação do ciclo celular e da síntese proteica. Possibilita assim a disponibilidade de fatores de crescimento, nutrientes e energia para a sobrevivência, crescimento, proliferação e motilidade das células <sup>163</sup>.

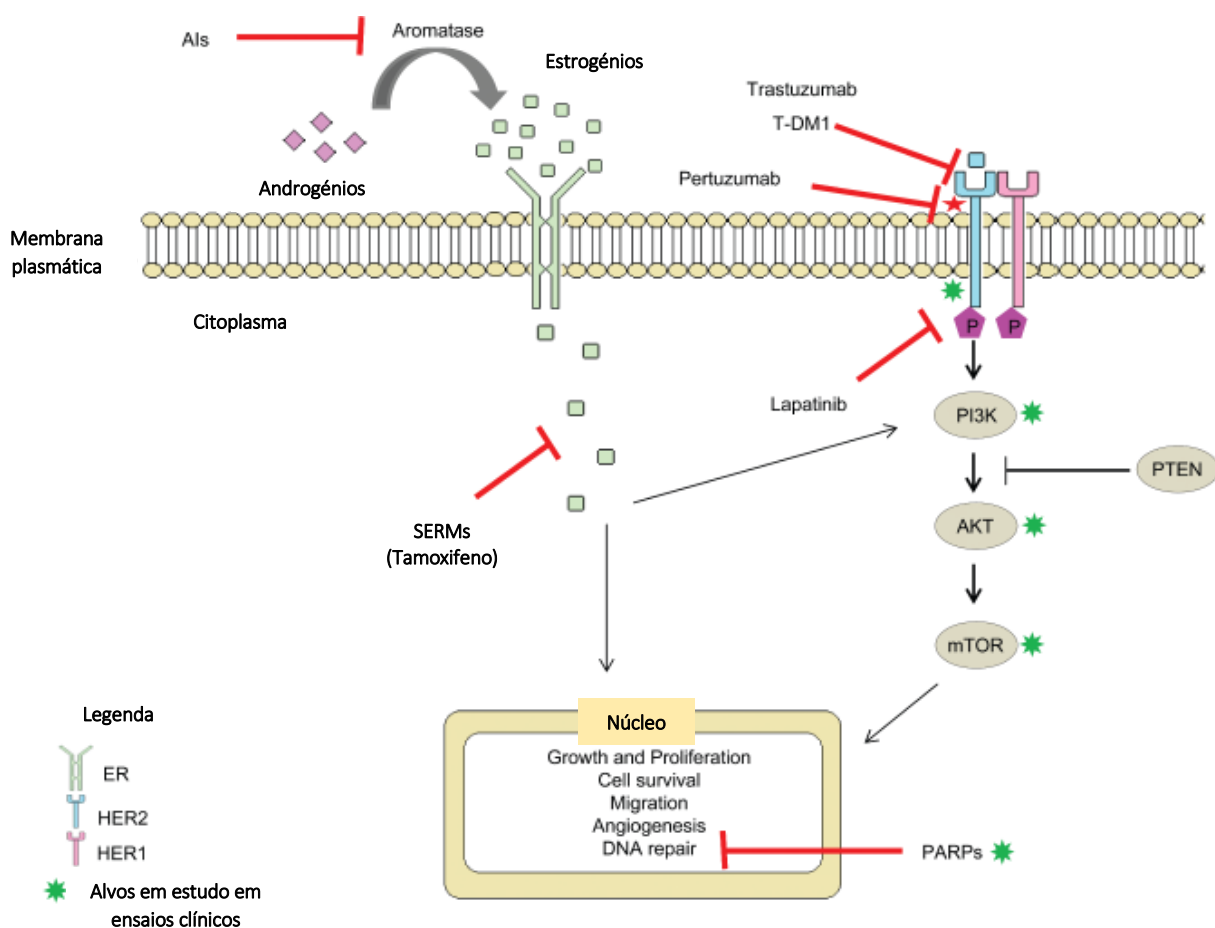
Contudo, dadas as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas pouco favoráveis da rapamicina, tornou-se necessário o desenvolvimento de outras moléculas análogas a esta, entre as quais se inclui o everolimus, cuja administração se faz por via oral <sup>162</sup>.

O everolimus foi inicialmente desenvolvido como imunossupressor destinado a doentes transplantados (de órgãos sólidos) <sup>164</sup>. Inibe o mTOR de uma forma indireta, isto é, necessita primeiro de se ligar ao recetor intracelular FKB12, pelo qual possui uma elevada afinidade, para então poder interagir com o mTOR e inibir as suas vias de sinalização. Como resultado, verifica-se a supressão do tumor decorrente da paragem do ciclo celular <sup>156,164</sup>.

Após vários estudos pré-clínicos, foi demonstrada a sua promissora atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais, o que levou mais tarde à sua

aprovação para o tratamento de alguns tipos de cancro, tais como o cancro renal avançado e, mais tarde, o cancro da mama. Existe também a hipótese que a resistência à terapia hormonal pode estar associada a interações entre as vias de sinalização associadas aos ER e as vias associadas ao mTOR. Assim, a administração concomitante de inibidores do mTOR com terapia hormonal tem sido testada com o objetivo de restabelecer a suscetibilidade das células tumorais ao tratamento <sup>164</sup>.

Na Figura 8.2 encontra-se representado um esquema que sumariza as principais classes terapêuticas seletivas acima referidas e seus alvos de ação farmacológica contra o cancro da mama recetor-positivo.



**Figura 8.2** - Representação esquemática das classes terapêuticas usadas no cancro ER<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup>, com seus respectivos alvos de ação [Adaptado de De Abreu *et al* <sup>3</sup>].

### 8.3. CANCRO TRIPLO-NEGATIVO

O cancro triplo negativo é definido pela falta de expressão imunohistoquímica de recetores dos estrogénios, da progesterona e do fator de crescimento epitelial humano 2 (ER, PR e HER2 respetivamente) <sup>165</sup>. Representa cerca de 10 a 20 % do total de casos de cancro da mama <sup>166,167</sup>, sendo mais prevalente em mulheres mais jovens (< 50 anos) de etnia negra <sup>166</sup>.

A falta de expressão destes recetores representa um importante desafio clínico, uma vez que torna este tipo de tumores resistente a qualquer tipo de terapia endócrina (muito eficaz noutro tipo de tumores) ou seletiva atualmente existente, visto não existirem ainda alvos conhecidos e característicos deste tipo de cancro <sup>168</sup>. Contudo, apresentam uma maior sensibilidade à quimioterapia <sup>166</sup>.

Um outro grande obstáculo para o desenvolvimento de fármacos seletivos e eficazes neste tipo de casos prende-se ao facto de existir uma grande variedade intra- e inter-tumoral, tendo todos os estudos em busca de um alvo comum acabado por falhar <sup>169</sup>. Muitos destes casos expressam um fenótipo molecular do tipo basal, do ponto de vista do perfil de expressão genética, e partilham características clínicas e patológicas com os tumores hereditários relacionados com mutações no gene de suscetibilidade BRCA1 <sup>165</sup>. Estudos de expressão molecular mais recentes revelaram também casos com um perfil de expressão característicos dos subtipos moleculares normal e *claudin-low* <sup>166</sup>.

O cancro da mama triplo negativo trata-se, portanto, de um grupo altamente heterogéneo de tumores com uma característica em comum: uma natureza distintivamente agressiva, com elevadas taxas de recidivas e poucos casos de sobrevivência quando metastizado (apesar de o seu potencial de metastização ser semelhante ao dos outros subtipos) <sup>168,169</sup>. É, assim, o subtipo de cancro da mama mais fatal e com o pior prognóstico de entre todos os restantes subtipos atualmente conhecidos <sup>166,170</sup>.

De uma forma geral, os tumores do subtipo triplo negativo:

- As características do subtipo molecular basal e de tumores hereditários decorrentes de mutações no *BRCA1* são as que mais se assemelham às dos tumores triplo negativos;
- Afetam principalmente mulheres jovens (< 50 anos) e de etnia negra;
- Têm maior quimiossensibilidade que os tumores ER, PR e/ou HER2 positivos;

- Não existe uma grande associação entre o tamanho do tumor e a invasão e metastização do cancro nos nódulos linfáticos;
- São mais agressivos e com maiores probabilidades de recidivas <sup>166</sup>;
- Apresentam o menor número de anos de sobrevivência após o primeiro evento metastático (cerca de 1 ano) <sup>169</sup>;
- É o subgrupo com o pior prognóstico associado <sup>166</sup>.

Dada a inexistência de um alvo molecular conhecido, a quimioterapia consiste na única opção terapêutica sistémica atualmente aprovada capaz de proporcionar positivos <sup>170</sup>. Apesar de alguns doentes responderem à quimioterapia, esta consiste num tratamento altamente tóxico e não seletivo, isto é, não é capaz de distinguir as células normais das cancerígenas, pelo que vai reagir com todo o tipo de células que encontra. Uma grande percentagem dos doentes tratados em estádios iniciais acaba por sofrer recidivas, geralmente após um curto espaço de tempo após o tratamento, e acaba por morrer <sup>169</sup>.

### 8.3.1. QUIMIOTERAPIA CITOTÓXICA

A quimioterapia é normalmente aplicada após a cirurgia (terapia adjuvante), com o objetivo de erradicar possíveis células cancerígenas residuais que não tenham sido eliminadas cirurgicamente, destruindo-as e impedindo a sua divisão e migração para outros tecidos vizinhos <sup>128</sup>.

As células cancerígenas tendem a crescer e dividir-se de uma forma mais acelerada que as células normais, sem qualquer ordem ou controlo. Os fármacos usados em quimioterapia, apesar de não serem seletivos para qualquer alvo molecular característico das células cancerígenas, vão atuar preferencialmente nestas células de rápida divisão, uma vez que vão reagir e danificar o DNA durante o ciclo de replicação celular, principalmente durante a fase S <sup>171</sup>.

O ciclo celular é composto pelos seguintes passos:

- 1 – Fase que precede a replicação do DNA (G1);
- 2 – Fase de replicação do DNA (S);
- 3 – Fase pré-mitótica (G2), com a duplicação de todo o conteúdo celular;
- 4 – Fase mitótica (M), onde se verifica a divisão em duas células filhas.

As células filhas podem depois entrar na fase G0, onde permanecem num estado não proliferativo e se diferenciam num determinado tipo de células especializadas,

incapazes de se multiplicarem, ou entraram num novo ciclo de divisão celular. A duração do ciclo pode variar de acordo com o tipo de célula em questão <sup>171</sup>.

Quanto maior for a taxa de crescimento de um dado tumor, mais suscetível será à quimioterapia citotóxica. Sendo o cancro da mama triplo negativo um dos tipos com maior taxa de proliferação celular, é então de esperar que seja o mais suscetível à quimioterapia citotóxica, tal como se verifica na clínica <sup>169,170</sup>.

Apesar de a maioria das células normais crescer e dividir-se de forma ordeira e precisa, células como as que compõem os folículos capilares, unhas e mucosas orais e do trato digestivo (como a mucosa gástrica) e a medula óssea, possuem também uma taxa de proliferação superior à das restantes células do organismo, pelo que vão também ser bastante afetadas durante o tratamento. A destruição destas células normais é o que está na origem dos efeitos adversos, já conhecidos pela população em geral, associados a este tipo de tratamentos, como a alopecia (queda do cabelo), as náuseas e vómitos, alterações na pele e nas unhas, perda de apetite, obstipação/diarreia, anemia, leucopenia e mucosites <sup>172,173</sup>.

Durante o processo de divisão celular, possíveis mutações espontâneas ou induzidas por fármacos citotóxicos mutagénicos (como, por exemplo, a ciclofosfamida) são fixadas no DNA da célula. Por consequência, na fase de replicação de DNA, o complexo enzimático replicativo ao encontrar uma lesão vai parar o processo de síntese das cadeias nascentes, de modo a que se possa proceder à reparação da lesão. As células cancerígenas têm uma menor capacidade de reparação de danos no DNA, acabando assim por ser induzida a morte celular. As células quiescentes, uma vez que não estão no processo de replicação do DNA, os danos provocados pelos fármacos mutagénicos citotóxicos poderão não ser letais. Assim, em cada ciclo é apenas eliminada uma fração das células tumorais, dado que existem sempre uma subpopulação quiescente capaz de “sobreviver” aos danos provocados pela terapia citotóxica <sup>171,172</sup>.

Visto que também as células normais em divisão celular podem entrar em apoptose, antes de uma próxima administração, é necessário dar um tempo de repouso ao doente de modo que seja o suficientemente longo para que haja a regeneração das células normais do doente, mas ao mesmo tempo não permita um novo crescimento do tumor. O número de ciclos e o tempo de repouso entre administrações são depois estimados pelo médico após uma avaliação completa do doente e do seu tipo de cancro em particular <sup>171</sup>.

A quimioterapia não é normalmente um tratamento único, mas sim uma série de tratamentos cujos princípios são em grande parte complementares a outro tipo de terapêuticas. A dose individual deve ser a mais próximo possível da máxima admitida e administrada o mais frequentemente possível de modo a evitar o crescimento do tumor e maximizar a intensidade do tratamento <sup>172</sup>. Entre as principais classes de fármacos citotóxicos usados no tratamento do cancro da mama existem:

### I. Ciclofosfamida

O potencial tóxico dos agentes alquilantes foi originalmente descoberto durante a Primeira Guerra Mundial através do designado gás mostarda, muito utilizado em tempos de guerra devido aos seus efeitos altamente tóxicos. Estudos conduzidos por Goodman, Gilman e seus colaboradores em Yale confirmaram posteriormente o potencial uso clínico das mostardas e seus derivados como antineoplásicos, lançando assim a era moderna da quimioterapia do cancro <sup>171</sup>.

Os agentes alquilantes consistem em pró-fármacos que, após sofrerem ativação por metabolismo hepático, dão origem a metabolitos capazes de reagir com proteínas constituintes dos ácidos nucleicos adicionando-lhes um grupo alquilo. Este grupo alquilo vai assim interferir com o normal processo de replicação das células e, conseqüentemente, induzir a sua apoptose <sup>174,175</sup>.

A ciclofosfamida é um dos mais importantes agentes alquilantes usados no tratamento de inúmeros tipos de cancro, entre eles o cancro da mama. À semelhança do tamoxifeno, a ciclofosfamida é um pró-fármaco que necessita de passar por duas reações conduzidas por CYP450 do metabolismo hepático de modo a dar origem ao seu metabolito ativo, a aldofosfamida. A sua excreção dá-se posteriormente a nível renal através da enzima aldeído desidrogenase 1A1 (ALDH1A1, de *ALdehyde DeHydrogenase 1 family member A1*) <sup>171,172</sup>.

Ao contrário do gás mostarda, a ciclofosfamida não é um agente vesicante e não produz irritação no local da administração. Os seus efeitos em tecidos de rápido crescimento, como tumores ou a medula óssea, são praticamente imediatos, enquanto que em células de divisão mais lenta se manifestam mais tardiamente. A sua administração pode ser por via oral ou intravenosa, numa dose que pode variar amplamente de acordo com uma série de parâmetros, como o tipo de protocolo seguido, a combinação de agentes seguida ou até o tipo de resposta do doente <sup>171</sup>.

Dado que se verifica uma significativa variabilidade nas concentrações plasmáticas dos metabolitos da ciclofosfamida entre doentes sujeitos a uma mesma dose do fármaco, o perfil de expressão genética — nomeadamente no que diz respeito às enzimas envolvidas no seu metabolismo — do doente poderá ter aqui um peso importante na sua capacidade de resposta ao tratamento <sup>175</sup>.

Um outro exemplo de agente alquilante é a mitomicina C, muito usada no tratamento do cancro da bexiga.

### II. Antimetabolitos

Os antimetabolitos são agentes que interferem com a síntese de ácidos nucleicos ao mimetizarem e substituírem metabolitos normal envolvidos no processo de replicação ou através da inibição de enzimas envolvidas no referido processo. Muitos destes fármacos são análogos estruturais de moléculas como o ácido fólico, purinas ou pirimidinas <sup>172</sup>.

A capecitabina e a gemcitabina são dois exemplos de fármacos usados na quimioterapia do cancro. A capecitabina consiste no pró-fármaco, administrado por via oral, que dá origem ao 5-fluoroUracilo (5-FU), um análogo do uracilo <sup>175</sup>. Após a sua conversão intracelular no núcleo das células, interfere com a síntese do DNA, por bloqueio da conversão do ácido desoxiuridílico em ácido timidílico, pela enzima celular timidilato sintetase, o que acaba por induzir a apoptose da célula. Uma vez que mimetizam o nucleótido uracilo, estes antimetabolitos vão também interferir com a síntese de RNA <sup>171</sup>.

Dentro da classe dos agentes citotóxicos antimetabolitos inserem-se também fármacos como a citarabina, a mercaptopurina, a tioguanina e o metotrexato, também utilizado no tratamento da artrite reumatóide.

### III. Antraciclina

As antraciclina, como a doxorubicina e a epirubicina, consistem numa das mais importantes classes de fármacos citotóxicos usados não só no tratamento de uma variedade de tumores sólidos, como o cancro da mama, como também de tumores hematológicos <sup>176</sup>. São compostos derivados do antibiótico rodomicina B, inicialmente isolado em 1950 a partir de uma estirpe Gram negativa de *Streptococcus* encontrada numa amostra de solo na Índia. A doxorubicina foi isolada a partir de uma estirpe

mutante do original encontrada perto do mar Adriático, tendo sido por isso inicialmente designada por Adriamicina <sup>177</sup>.

As antraciclinas, incluídas então no grupo dos antibióticos, induzem a apoptose das células ao reagirem com a topoisomerase II, a enzima responsável pela quebra das ligações de hidrogénio entre os pares de bases do DNA antes da sua replicação. Não havendo separação das duas cadeias de DNA, o complexo de replicação e transcrição celular fica impedido de ler o código genético, o que acaba por induzir a apoptose das células <sup>165,175</sup>.

#### IV. Antimicrotúbulos (taxanos)

Fármacos do grupo dos taxanos, como o paclitaxel e o docetaxel, consistem num dos mais importantes agentes citotóxicos na luta contra o cancro da mama, estando indicados tanto como terapêutica adjuvante como em situações de cancro metastizado. Os taxanos, ao ligarem-se à proteína  $\beta$ -tubulina, inibem a formação dos microtúbulos que compõem o citoesqueleto da célula e impedem a divisão celular, visto que não ocorre a segregação dos cromossomas para os polos durante a anáfase <sup>171</sup>.

Apesar do seu mecanismo de ação único, o desenvolvimento inicial do paclitaxel foi um processo moroso dada a sua escassez (isolado a partir da casca do Teixo do Pacífico) e fraca solubilidade em água. Eventualmente foi desenvolvida uma formulação de paclitaxel solubilizada em *Cremophor*. No entanto, esta ficou associada a inúmeros casos de hipersensibilidade ao solúvel, o que implicou uma pré-medicação com corticosteroides e anti-histamínicos <sup>177</sup>.

Com o objetivo de contornar os problemas associados ao paclitaxel, foi desenvolvido um agente semissintético, derivado das agulhas das árvores do Teixo do Pacífico, o docetaxel. Para além de possuir um mecanismo de ação semelhante e igualmente eficaz no tratamento de neoplasias, trata-se de um agente mais potente e mais solúvel em água que o original paclitaxel. O docetaxel existe então em formulações com polissorbato-80 que, apesar de ser um solvente diferente do usado com o paclitaxel, também necessita da administração prévia de corticosteroides e anti-histamínicos de modo a evitar possíveis reações alérgicas ou de acumulação de fluidos, como consequência das suas infusões <sup>171,176</sup>.

Uma comparação direta entre os dois taxanos discutidos acima no tratamento do cancro da mama metastizado demonstrou uma maior eficácia do docetaxel, mas também uma maior toxicidade <sup>172</sup>.

O recurso a uma combinação (regime) de diferentes fármacos citotóxicos com diferentes mecanismos de ação entre si permite não só diminuir o desenvolvimento de resistências, como também garantir um melhor sucesso terapêutico. No Quadro 8.3.1.1 encontram-se alguns destes regimes <sup>177</sup>:

**Quadro 8.3.1.2** – Regimes de quimioterapia com maior eficácia demonstrada na luta contra o cancro da mama, reportada por vários estudos clínicos [Adaptado de Anampa *et al* <sup>177</sup>].

REGIME <sup>d</sup>	FÁRMACOS*					
	Ciclofosfamida	Metotrexato	5-FU	Doxorrubicina	Epirrubicina	Docetaxel
CMF	X	X	X			
AC	X			X		
FEC	X		X		X	
CAF (FAC)	X		X	X		
DC	X					X
DAC	X			X		X

\*As doses, o número de ciclos e a sequência de administração dos fármacos que compõem cada ciclo, apesar de existirem protocolos já estabelecidos, podem variar amplamente de acordo com a sensibilidade e capacidade de resposta do tumor à terapia, o que depende de inúmeros fatores, como o perfil de expressão genética e o tipo de cancro em causa <sup>131,177</sup>.

### 8.3.2. TERAPIA SELETIVA: NOVOS ALVOS

Apesar de tudo, e com a crescente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e de novas estratégias para o tratamento do cancro, existem atualmente inúmeros estudos com alvo na caracterização das células neoplásicas do cancro da mama, e em especial do cancro da mama triplo negativo, em busca de biomarcadores a partir dos quais se possam criar novos fármacos seletivos e mais eficazes <sup>167</sup>.

<sup>d</sup> CMF: ciclofosfamida + metotrexato + 5-FU; AC: doxorrubicina + ciclofosfamida; FEC: 5-FU + epirrubicina + ciclofosfamida; CAF: ciclofosfamida + doxorrubicina + 5-FU; DC: docetaxel + ciclofosfamida; DAC: docetaxel + doxorrubicina + ciclofosfamida.

O potencial terapêutico de novas moléculas, seletivas para determinados alvos na célula cancerígena, encontra-se já a ser estudado e em testes clínicos. Podem-se aqui incluir fármacos antiangiogénicos por inibição do VEGF, como é o caso do bevacizumab discutido no subcapítulo anterior, fármacos inibidores da tirosina cinase, como o lapatinib, que vão ter uma ação antiproliferativa, e fármacos inibidores da poli-ADP ribose polimerase (PARP) <sup>131</sup>.

A poli-ADP ribose polimerase também desempenha um importante papel no processo de reparação do DNA à semelhança do BRCA, mas ao contrário deste, é capaz de reconhecer quebras em cadeias simples (o BRCA apenas reconhece danos na dupla cadeia) e reparar o mesmo através de um mecanismo de excisão de bases <sup>165</sup>. Para além disso, este tipo de enzimas pode também estimular o desenrolar de fases iniciais do processo de reparação por recombinação homóloga <sup>166</sup>.

A inibição da PARP tem demonstrado uma atividade anticancerígena seletiva para casos de cancro da mama associado a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Tendo o cancro da mama triplo negativo uma acentuada associação com tumores derivados de mutações no *BRCA*, a aplicação de inibidores da PARP permite assim um sinergismo de ações que levam ao designado estado de “letalidade sintética”, isto é, as células cancerígenas ficam duplamente incapazes de se regenerar e reparar os danos provocados por outros agentes citotóxicos, como por exemplo a ciclofosfamida <sup>165,166</sup>.

A deficiência no mecanismo de reparação por recombinação homóloga de danos na dupla cadeia, derivada de mutações nos genes *BRCA1/2*, aliada à inibição do processo de reparação de danos em cadeias simples proporcionada pelos inibidores da PARP, permitem assim uma maior sensibilização das células malignas à quimioterapia e, conseqüentemente, uma maior eficácia terapêutica <sup>166,167</sup>.

### **8.4. CIRURGIA E RADIOTERAPIA**

Após um diagnóstico de cancro da mama, a cirurgia é muitas vezes o primeiro passo do longo percurso de tratamento, embora que em algumas situações mais avançadas a paciente possa ter de ser submetida primeiro a um tratamento sistémico (neoadjuvante) de modo a reduzir, por exemplo, o tamanho do tumor e assim evitar ou facilitar a própria cirurgia <sup>128</sup>.

Existem várias abordagens cirúrgicas por onde o clínico pode seguir, de acordo com as características que o tumor apresenta e até com o prognóstico previsto para cada caso, entre elas: a cirurgia conservadora da mama, a mastectomia e lumpectomia <sup>104,166</sup>.

Durante a primeira metade do século 20, mulheres diagnosticadas com cancro da mama eram muitas vezes submetidas a mastectomias radicais, até serem reportados casos de cancro da mama de estádios precoces em que a lumpectomia associada à radiação proporcionava resultados tão bons quanto os obtidos com a mastectomia e com a vantagem de poupar a doente de um procedimento tão invasivo <sup>104</sup>.

A mastectomia consiste no procedimento cirúrgico onde todo o tecido mamário é removido, sendo que, dependendo da extensão de tecido que é removida, pode se dividir em mastectomia poupadora de pele, onde se evita a remoção de grande parte da pele e até do mamilo de modo a possibilitar uma posterior reconstrução da mama; mastectomia total, com remoção do mamilo, e mastectomia radical, em que é removida a totalidade dos tecidos que compõem a mama e por vezes parte do musculo torácico <sup>104</sup>.

Quando os tumores são de dimensões mais reduzidas e apresentam margens bem definidas, é possível uma excisão cirúrgica bem-sucedida dos mesmos sem que seja necessária a remoção da totalidade dos tecidos mamários. A cirurgia conservadora da mama (tumorectomia) consiste, portanto, num procedimento menos invasivo que a mastectomia, não só do ponto de vista físico como psicológico para a mulher. Por vezes pode também ser necessária a remoção de parte do tecido envolvente (tumorectomia alargada) ou até mesmo de um quadrante da mama (quadrantectomia), isto é, a remoção cirúrgica de um segmento anatómico da mama <sup>178,179</sup>.

Em situações de cancro invasivo, onde existe já o envolvimento de gânglios linfáticos, é recomendada a remoção de alguns ou mesmo todos os gânglios da linha da axila (lumpectomia), os primeiros a ser invadidos pelas células neoplásicas da mama <sup>179</sup>. Para a determinação de quais os gânglios a ser removidos, foi recentemente desenvolvida a biópsia do gânglio sentinela. Através da administração por via endovenosa de uma pequena quantidade de material radioativo e de um corante, é possível a identificação do primeiro gânglio (sentinela) a receber fluido linfático do tumor. Se o gânglio sentinela não apresentar células tumorais, então os gânglios seguintes provavelmente também não terão sido afetados. Esta técnica permite evitar

uma desnecessária remoção total dos gânglios linfáticos da zona da axila que levavam frequentemente a efeitos secundários como edema da mão e do braço dos doentes <sup>104,179</sup>.

A radioterapia adjuvante continua, juntamente com a cirurgia e a terapia sistémica, um dos componentes fundamentais da gestão multidisciplinar do cancro da mama, nomeadamente dos tumores de estádios precoces. O uso deste tipo de energia ionizante no tratamento, não só do cancro da mama, como também de outros tipos e tumores sólidos, baseou-se na observação dos seus efeitos letais sobre bactérias e outros animais de laboratório, em estudos realizados no início do século XX <sup>180</sup>.

A radioterapia faz uso dos raios-X de elevada energia para destruir as células cancerígenas. À semelhança da cirurgia, trata-se de um tratamento localizado do cancro realizado de forma regular e repetida periodicamente de modo a obter o maior efeito sobre as células malignas, mas limitando os danos às células normais, uma vez que também não é seletivo <sup>104,179</sup>.

A radioterapia, associada à cirurgia de preservação da mama, tem demonstrado elevadas taxas de controlo da doença (90 a 95%) dentro de um período de tempo de 10 anos após o tratamento, muito próximas das registadas com a mastectomia radical <sup>104</sup>.

Este tipo de tratamento físico pode então ser aplicado de várias formas: (1) após a cirurgia, de modo a destruir possíveis células cancerígenas remanescentes. Permite desta forma reduzir a probabilidade de recidivas, especialmente em doentes submetidas a cirurgia conservadora da mama em que as hipóteses de remoção a 100% das células tumorais é menor que as proporcionadas pela mastectomia; (2) Após a cirurgia para tratar os gânglios linfáticos da zona da axila, caso tenham sido invadidos por células malignas do cancro da mama e não tenham sido removidos cirurgicamente <sup>104,179</sup>; (3) Como tratamento neoadjuvante local, do modo a reduzir as dimensões do tumor antes da cirurgia; (4) Antes, durante ou após as sessões de quimioterapia (preferencialmente após) <sup>104,128</sup>; (5) Para tratar o cancro diagnosticado já em estádios avançados, uma vez que pode ajudar a aliviar os sintomas e a dor associada à metastização do tumor <sup>180</sup>.

Uma vez que a radiação vai incidir diretamente na zona do tórax, os efeitos secundários que se fazem sentir vão ser maioritariamente locais. Como afeta tanto células cancerígenas como células normais, os efeitos secundários podem ser tanto temporários, pois as células normais têm uma maior capacidade de regeneração que as neoplásicas, como permanentes <sup>179,181</sup>. Entre os efeitos mais comuns estão incluídos:

- Efeitos cutâneos como vermelhidão, inflamação e hiperpigmentação da pele;
- Telangiectasias;
- Edema do membro superior, devido aos danos causados pela radiação nos vasos linfáticos que dificultam a drenagem linfática;
- Toxicidade cardíaca e pulmonar <sup>181</sup>.

### 8.5. CONCLUSÃO

Os avanços dos últimos anos na área da genómica do cancro da mama proporcionaram um melhor entendimento sobre os processos que levam ao desenvolvimento da doença, bem como das suas características a nível molecular.

Com isto, e sendo o cancro da mama uma doença altamente heterogénea, tornou-se possível a implementação de métodos de diagnóstico, como os testes genómicos (MammaPrint® e Oncotipo DX®), a partir dos quais se podem delinear estratégias terapêuticas personalizadas para cada doente. Estas novas técnicas de diagnóstico tornaram-se assim ferramentas fundamentais para a tomada de decisões terapêuticas por parte dos profissionais de saúde envolvidos na gestão de doenças oncológicas, sendo que devem ser usadas em conjunto com os exames patológicos e clínicos ditos “tradicionais” (por exemplo, mamografia, história clínica e familiar) e não como seus substitutos.

As novas terapêuticas seletivas desenvolvidas na área do cancro da mama, nas quais se incluem os fármacos hormonais, como os inibidores da aromatase, e os fármacos biológicos como o trastuzumab, levaram conseqüentemente a um aumento significativo das taxas de sucesso terapêutico e de sobrevivência até então muito reduzidas.

Assim, o conceito de “medicina personalizada” tem vindo a ganhar cada vez mais interesse no âmbito das doenças oncológicas. No entanto, são necessários muitos mais estudos de modo a tornar este conceito mais prático funcional para todos os doentes.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. WHO | Cancer. (2016). at <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>
2. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**, 87–108 (2015).
3. De Abreu, F. B., Schwartz, G. N., Wells, W. a. & Tsongalis, G. J. Personalized therapy for breast cancer. *Clin Genet* **86**, 62–67 (2014).
4. Nounou, M. I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S. & Syed-Sha-Qhattal, H. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer (Auckl)* **9**, 17–34 (2015).
5. Jackson, R. A. & Chen, E. S. Synthetic lethal approaches for assessing combinatorial efficacy of chemotherapeutic drugs. *Pharmacol Ther* (2016).
6. Ernst, B. & Anderson, K. S. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Curr Oncol Rep* **17**, 5 (2015).
7. van der Groep, P., van der Wall, E. & van Diest, P. J. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)* **34**, 71–88 (2011).
8. Kuchenbaecker, K. B., Neuhausen, S. L., Robson, M., Barrowdale, D., McGuffog, L., Mulligan, A. M., Andrulis, I. L., Spurdle, A. B., Schmidt, M. K., Schmutzler, R. K., Engel, C., Wappenschmidt, B., Nevanlinna, H., Thomassen, M., Southey, M., Radice, P., Ramus, S. J., Domchek, S. M., Nathanson, K. L., Lee, A., Healey, S., Nussbaum, R. L., Rebbeck, T. R., Arun, B. K., James, P., Karlan, B. Y., Lester, J., Cass, I., Registry, B. C. F., Terry, M. B., Daly, M. B., Goldgar, D. E., Buys, S. S., Janavicius, R., Tihomirova, L., Tung, N., Dorfling, C. M., van Rensburg, E. J., Steele, L., V O Hansen, T., Ejlertsen, B., Gerdes, A.-M., Nielsen, F. C., Dennis, J., Cunningham, J., Hart, S., Slager, S., Osorio, A., Benitez, J., Duran, M., Weitzel, J. N., Tafur, I., Hander, M., Peterlongo, P., Manoukian, S., Peissel, B., Roversi, G., Scuvera, G., Bonanni, B., Mariani, P., Volorio, S., Dolcetti, R., Varesco, L., Papi, L., Tibiletti, M. G., Giannini, G., Fostira, F., Konstantopoulou, I., Garber, J., Hamann, U., Donaldson, A., Brewer, C., Foo, C., Evans, D. G., Frost, D., Eccles, D., Douglas, F., Brady, A., Cook, J., Tischkowitz, M., Adlard, J., Barwell, J., Ong, K.-R., Walker, L., Izatt, L., Side, L. E., Kennedy, M. J., Rogers, M. T., Porteous, M. E., Morrison, P. J., Platte, R., Eeles, R., Davidson, R., Hodgson, S., Ellis, S., Godwin, A. K., Rhiem, K., Meindl, A., Ditsch, N., Arnold, N., Plendl, H., Niederacher, D., Sutter, C., Steinemann, D., Bogdanova-Markov, N., Kast, K., Varon-Mateeva, R., Wang-Gohrke, S., Gehrig, A., Markiefka, B., Buecher, B., Lefol, C., Stoppa-Lyonnet, D., Rouleau, E., Prieur, F., Damiola, F., Barjhoux, L., Faivre, L., Longy, M., Sevenet, N., Sinilnikova, O. M., Mazoyer, S., Bonadona, V., Caux-Moncoutier, V., Isaacs, C., Van Maerken, T., Claes, K., Piedmonte, M., Andrews, L., Hays, J., Rodriguez, G. C., Caldes, T., de la Hoya, M., Khan, S., Hogervorst, F. B., Aalfs, C. M., de Lange, J. L., Meijers-Heijboer, H. E., van der Hout, A. H., Wijnen, J. T., van Roozendaal, K., Mensenkamp, A. R., van den Ouweland, A. M., van Deurzen, C. H., van der Luijt, R. B., Olah, E., Diez, O., Lazaro, C., Blanco, I., Teulé, A., Menendez, M., Jakubowska, A., Lubinski, J., Cybulski, C., Gronwald, J., Jaworska-Bieniek, K., Durda, K., Arason, A., Maugard, C., Soucy, P.,

- Montagna, M., Agata, S., Teixeira, M. R., Olswold, C., Lindor, N., Pankratz, V. S., Hallberg, E., Wang, X., Szabo, C. I., Vijai, J., Jacobs, L., Corines, M., Lincoln, A., Berger, A., Fink-Retter, A., Singer, C. F., Rappaport, C., Kaulich, D. G., Pfeiler, G., Tea, M.-K., Phelan, C. M., Mai, P. L., Greene, M. H., Rennert, G., Imyanitov, E. N., Glendon, G., Toland, A. E., Bojesen, A., Pedersen, I. S., Jensen, U. B., Caligo, M. A., Friedman, E., Berger, R., Laitman, Y., Rantala, J., Arver, B., Loman, N., Borg, A., Ehrencrona, H., Olopade, O. I., Simard, J., Easton, D. F., Chenevix-Trench, G., Offit, K., Couch, F. J. & Antoniou, A. C. Associations of common breast cancer susceptibility alleles with risk of breast cancer subtypes in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Breast Cancer Res* **16**, 3416 (2014).
9. Exner, R., Bago-Horvath, Z., Bartsch, R., Mittlboeck, M., Retèl, V. P., Fitzal, F., Rudas, M., Singer, C., Pfeiler, G., Gnant, M., Jakesz, R. & Dubsy, P. The multigene signature MammaPrint impacts on multidisciplinary team decisions in ER+, HER2- early breast cancer. *Br J Cancer* **111**, 837–42 (2014).
  10. Grant, K. A., Pienaar, F. M., Brundyn, K., Swart, G., Gericke, G. S., Myburgh, E. J., Wright, C. A., Apffelstaedt, J. P. & Kotze, M. J. Incorporating microarray assessment of HER2 status in clinical practice supports individualised therapy in early-stage breast cancer. *Breast* **24**, 137–142 (2015).
  11. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
  12. National Cancer Institute. Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute. (2016). at <<http://www.cancer.gov/>>
  13. Monteagudo, Á. & Santos, J. Studying the capability of different cancer hallmarks to initiate tumor growth using a cellular automaton simulation. Application in a cancer stem cell context. *BioSystems* **115**, 46–58 (2014).
  14. Desaulniers, D., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Azqueta, A., Bisson, W. H., Brown, D., Brunborg, G., Charles, A. K., Chen, T., Colacci, A., Darroudi, F., Forte, S., Gonzalez, L., Hamid, R. A., Knudsen, L. E., Leyns, L., De Cerain Salsamendi, A. L., Memeo, L., Mondello, C., Mothersill, C., Olsen, A. K., Pavanello, S., Raju, J., Rojas, E., Roy, R., Ryan, E., Ostrosky-Wegman, P., Salem, H. K., Scovassi, I., Singh, N., Vaccari, M., Van Schooten, F. J., Valverde, M., Woodrick, J., Zhang, L., Van Larebeke, N., Kirsch-Volders, M., Collins, A. R., Langie, S. A. S. & Koppen, G. Causes of genome instability: The effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis* **36**, 61–88 (2015).
  15. Brooks Robey, R., Weisz, J., Kuemmerle, N., Salzberg, A. C., Berg, A., Brown, D. G., Kubik, L., Palorini, R., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Colacci, A., Mondello, C., Raju, J., Woodrick, J., Ivana Scovassi, A., Singh, N., Vaccari, M., Roy, R., Forte, S., Memeo, L., Salem, H. K., Amedei, A., Hamid, R. A., Williams, G. P., Lowe, L., Meyer, J., Martin, F. L., Bisson, W. H., Chiaradonna, F. & Ryan, E. P. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: Cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis* **36**, 203–231 (2015).
  16. Winkler, G. C., Barle, E. L., Galati, G. & Kluwe, W. M. Functional differentiation of cytotoxic cancer drugs and targeted cancer therapeutics. *Regul*

- Toxicol Pharmacol* **70**, 46–53 (2014).
17. Global Burden of Disease. Europe PMC Funders Group Global , regional , and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death , 1990-2013 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **385**, 117–171 (2015).
  18. Miranda, N., Portugal, C., Nogueira, P. J., Farinha, C. S., Soares, A., Alves, M. I., Rosa, M. V., Oliveira, A. L., Serra, L., Martins, J., Afonso, D., Rocha, S., Silva, D. & Oliveira, N. *Portugal - Doenças Oncológicas em números – 2014. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas*. (Direção-Geral de Saúde, Lisboa, 2014).
  19. Coleman, M. P. Cancer survival: Global surveillance will stimulate health policy and improve equity. *Lancet* **383**, 564–573 (2014).
  20. Polyak, K. Review series introduction Heterogeneity in breast cancer. **121**, 2011–2013 (2011).
  21. Anderson, K., Schwab, R. & Martinez, M. Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature. **144**, 1–10 (2015).
  22. Barnard, M. E., Boeke, C. E. & Tamimi, R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1856**, 73–85 (2015).
  23. Lippman, M. E. in *Harrison's Princ Intern Med* (eds. Longo, D. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, J. L. & Loscalzo, J.) **I**, 754–763 (The McGraw-Hill Companies, Inc., 2012).
  24. Russnes, H. G., Navin, N., Hicks, J. & Borresen-Dale, A. L. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest* **121**, 3810–3818 (2011).
  25. Safarpour, D. & Tavassoli, F. A. A targetable androgen receptor - Positive breast cancer subtype hidden among the triple-negative cancers. *Arch Pathol Lab Med* **139**, 612–617 (2015).
  26. Manuscript, A. Europe PMC Funders Group The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* **1**, 505–527 (2015).
  27. World Health Organization. WHO | Breast cancer: prevention and control. (2016). at <<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>>
  28. Shah, R., Rosso, K. & Nathanson, S. D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol* **5**, 283–98 (2014).
  29. Brisken, C., Hess, K. & Jeitziner, R. Progesterone and overlooked endocrine pathways in breast cancer pathogenesis. *Endocrinology* **156**, 3442–3450 (2015).
  30. Dumalaon-Canaria, J. A., Hutchinson, A. D., Prichard, I. & Wilson, C. What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. *Cancer Causes Control* **25**, 771–785 (2014).
  31. National Cancer Institute. Benign proliferative breast disease: NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. (2016). at <<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=44788>>

32. Seabra, Z. T. & Lourenço, J. Imagiologia no Carcinoma da Mama. *Rev Port Cirúrgia* **27**, 59–70 (2013).
33. Harvey, J. a & Bovbjerg, V. E. Quantitative assessment of mammographic breast density: relationship with breast cancer risk. *Radiology* **230**, 29–41 (2004).
34. Lynch, H., Synder, C. & Wang, S. M. Considerations for Comprehensive Assessment of Genetic Predisposition in Familial Breast Cancer. *Breast J* **21**, 67–75 (2015).
35. Drooger, J. C., Hooning, M. J., Seynaeve, C. M., Baaijens, M. H. A., Obdeijn, I. M., Sleijfer, S. & Jager, A. Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: A critical review of the literature. *Cancer Treat Rev* **41**, 187–196 (2015).
36. Lynch, J. A., Venne, V. & Berse, B. Genetic tests to identify risk for breast cancer. *Semin Oncol Nurs* **31**, 100–107 (2015).
37. Couch, F. J., Nathanson, K. L. & Offit, K. Two decades after *BRCA*: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. *Science* **343**, 1466–70 (2014).
38. Phipps, A. & Li, C. in *Breast Cancer Epidemiol* (ed. Li, C.) 47–72 (Springer, 2010).
39. Jezdic, S., Kornek, G. & Catane, R. Cancro da mama: um guia para o doente. *Am Fund* **3**, 1–46 (2013).
40. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. *Am Jt Comm Cancer* (Springer, 2010).
41. Collins, L. C., Tamimi, R. M., Baer, H. J., Connolly, J. L., Colditz, G. A. & Schnitt, S. J. Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: Results from the nurses' health study. *Cancer* **103**, 1778–1784 (2005).
42. Howlader, N., AM, Noone, A., Krapcho, M., Garshell, J., Miller, D., Altekruse, S., Kosary, C. L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D. R., Chen, H. S., Feuer, E. J. & Cronin, K. A. National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2010. *Natl Cancer Inst* (2015).
43. Nccn. Cancro da mama: Linhas de orientação NCCN para doentes. *Nccn* 1–110 (2011). at <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Cancro+da+mama#7>
44. Song, Q., Merajver, S. D. & Li, J. Z. Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Hum Genomics* **9**, 27 (2015).
45. Dieci, M. V., Orvieto, E., Dominici, M., Conte, P. & Guarneri, V. Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. *Oncologist* **19**, 805–813 (2014).
46. Byler, S., Goldgar, S., Heerboth, S., Leary, M., Housman, G., Moulton, K. & Sarkar, S. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res* **34**, 1071–1077 (2014).

47. Geyer, F. C., Lopez-Garcia, M. A., Lambros, M. B. & Reis-Filho, J. S. Genetic characterization of breast cancer and implications for clinical management. *J Cell Mol Med* **13**, 4090–103 (2009).
48. National Center for Biotechnology Information. Microarrays. *US Natl Libr Med* (2014). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techmicroarray/>>
49. Ward, E. M., DeSantis, C. E., Lin, C. C., Kramer, J. L., Jemal, A., Kohler, B., Brawley, O. W. & Gansler, T. Cancer statistics: Breast cancer in situ. *CA Cancer J Clin* **65**, 481–95 (2015).
50. Love, S. M. & Barsky, S. H. Anatomy of the nipple and breast ducts revisited. *Cancer* **101**, 1947–1957 (2004).
51. Mardekian, S. K., Bombonati, A. & Palazzo, J. P. Ductal carcinoma in situ of the breast: The importance of morphologic and molecular interactions. *Hum Pathol* **49**, 114–123 (2016).
52. Pang, J.-M. B., Gorringer, K. L., Wong, S. Q., Dobrovic, A., Campbell, I. G. & Fox, S. B. Appraisal of the technologies and review of the genomic landscape of ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res* **17**, 80 (2015).
53. Kaufman, S. A., Harris, E. E. R., Bailey, L., Chadha, M., Dutton, S. C., Freedman, G. M., Goyal, S., Halyard, M. Y., Horst, K. C., Novick, K. L. M., Park, C. C., Suh, W. W., Toppmeyer, D., Zook, J. & Haffty, B. G. ACR Appropriateness Criteria® Ductal Carcinoma in Situ. *Oncology (Williston Park)* **29**, 446–58, 460–1 (2015).
54. Kuerer, H. M. Ductal carcinoma in situ : treatment or active surveillance ? 777–785 (2015).
55. King, T. A. & Reis-Filho, J. S. Lobular neoplasia. *Surg Oncol Clin N Am* **23**, 487–503 (2014).
56. Ellis, I. ., Schnitt, S. J., Bussalati, G. & Tavassoli, F. . CHAPTER 1 WHO histological classification of tumours of the breast. *Pathol Genet Breast Female Genit Organs* 432 (2003).
57. Jesinger, R. A. Breast anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol* **17**, 3–9 (2014).
58. Jorns, J., Sabel, M. S. & Pang, J. C. Lobular neoplasia: Morphology and management. *Arch Pathol Lab Med* **138**, 1344–1349 (2014).
59. Li, Y., Wei, X., zhang, S. & Zhang, J. Prognosis of invasive breast cancer after adjuvant therapy evaluated with VEGF microvessel density and microvascular imaging. *Tumor Biol* **36**, 8755–8760 (2015).
60. Hall, A. P. The role of angiogenesis in cancer. *Comp Clin Path* **13**, 95–99 (2005).
61. Sinn, H. P. & Kreipe, H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care* **8**, 149–154 (2013).
62. Gómez Macías, G. S., Pérez Saucedo, J. E., Cardona Huerta, S., Garza Montemayor, M., Villarreal Garza, C. & García Hernández, I. Invasive lobular carcinoma of the breast with extracellular mucin: A case report. *Int J Surg Case Rep* **25**, 33–36 (2016).

63. Christgen, M., Steinemann, D., Kühnle, E., Länger, F., Gluz, O., Harbeck, N. & Kreipe, H. Lobular breast cancer: Clinical, molecular and morphological characteristics. *Pathol - Res Pract* 1–15 (2016).
64. Corfield, A. P. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1850**, 236–252 (2015).
65. Celis, J. E., Gromova, I., Gromov, P., Moreira, J. M. A., Cabeza, T., Friis, E. & Rank, F. Molecular pathology of breast apocrine carcinomas: A protein expression signature specific for benign apocrine metaplasia. *FEBS Lett* **580**, 2935–2944 (2006).
66. Calhoun, B. C. & Collins, L. C. Predictive markers in breast cancer: An update on *ER* and *HER2* testing and reporting. *Semin Diagn Pathol* **32**, 362–369 (2015).
67. Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., De Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C. & Piccart, M. Luminal B breast cancer: Molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol* **32**, 2794–2803 (2014).
68. Ignatiadis, M. & Sotiriou, C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol* **10**, 494–506 (2013).
69. Ahmed, S., Sami, A. & Xiang, J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer* **22**, 101–116 (2015).
70. Gheybi, M. K., Baradaran, A., Mohajeri, M. R., Ostovar, A., Hajalikhani, P. & Farrokhi, S. Validity of immunohistochemistry method in predicting *HER-2* gene status and association of clinicopathological variables with it in invasive breast cancer patients. *Apmis* **124**, 365–371 (2016).
71. Maloy, S., Hughes, K., Boone, P. M. & Stankiewicz, P. Array Comparative Genomic Hybridization. *Brenner's Encycl Genet* **973**, 193–197 (2013).
72. Lehmann-Che, J., Hamy, A.-S., Porcher, R., Barritault, M., Bouhidel, F., Habelleh, H., Leman-Detours, S., de Roquancourt, A., Cahen-Doidy, L., Bourstyn, E., de Cremoux, P., de Bazelaire, C., Albiter, M., Giacchetti, S., Cuvier, C., Janin, A., Espié, M., de Thé, H. & Bertheau, P. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either *HER2* or *GCDFP15*. *Breast Cancer Res* **15**, R37 (2013).
73. Lehmann, B. D. B., Bauer, J. a J., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, a B., Shtyr, Y. & Pietenpol, J. a. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* **121**, 2750–2767 (2011).
74. Kalluri, R. & Weinberg, R. a. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420–1428 (2009).
75. Olopade, O. I., Grushko, T. A., Nanda, R. & Huo, D. Advances in breast cancer: Pathways to personalized medicine. *Clin Cancer Res* **14**, 7988–7999 (2008).
76. Rizzolo, P., Silvestri, V., Falchetti, M. & Ottini, L. Inherited and acquired alterations in development of breast cancer. *Appl Clin Genet* **4**, 145–158 (2011).
77. Economopoulou, P., Dimitriadis, G. & Psyrris, A. Beyond *BRCA*: New hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev* **41**, 1–8 (2015).

78. Lo, P.-K. & Sukumar, S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* **9**, 1879–902 (2008).
79. Geyer, F. C., Lopez-Garcia, M. A., Lambros, M. B. & Reis-Filho, J. S. Genetic characterization of breast cancer and implications for clinical management. *J Cell Mol Med* **13**, 4090–4103 (2009).
80. Garcia-Closas, M., Gunsoy, N. B. & Chatterjee, N. Combined associations of genetic and environmental risk factors: implications for prevention of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **106**, 1–6 (2014).
81. Moreno, L., Linossi, C., Esteban, I., Gadea, N., Carrasco, E., Bonache, S., Gutierrez-Enriquez, S., Cruz, C., Diez, O. & Balmana, J. Germline BRCA testing is moving from cancer risk assessment to a predictive biomarker for targeting cancer therapeutics. *Clin Transl Oncol* (2016).
82. Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. *BRCA1* and *BRCA2*: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* **12**, 68–78 (2012).
83. Perspective, A. R. Review article *BRCA* Gene Structure and Function in Tumor Suppression. **16**, (2010).
84. Clark, S. L., Rodriguez, A. M., Snyder, R. R., Hankins, G. D. V. & Boehning, D. Structure-Function of the Tumor Suppressor Brca1. *Comput Struct Biotechnol J* **1**, 1–8 (2012).
85. Walsh, M. F., Nathanson, K. L. & Couch, F. J. *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer*. **882**, (2016).
86. Economopoulou, P., Dimitriadis, G. & Psyrris, A. Beyond *BRCA*: New hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev* **41**, 1–8 (2015).
87. Bertheau, P., Lehmann-Che, J., Varna, M., Dumay, A., Poirot, B., Porcher, R., Turpin, E., Plassa, L.-F., de Roquancourt, A., Bourstyn, E., de Cremoux, P., Janin, A., Giacchetti, S., Espié, M. & de Thé, H. P53 in Breast Cancer Subtypes and New Insights Into Response To Chemotherapy. *Breast* **22 Suppl 2**, S27-9 (2013).
88. Weitzel, J. N. The Genetics of Breast Cancer: What the Surgical Oncologist Needs to Know. *Surg Oncol Clin N Am* **24**, 705–732 (2015).
89. Masciari, S., Dillon, D. A., Rath, M., Robson, M., Weitzel, J. N., Balmana, J., Gruber, S. B., Ford, J. M., Euhus, D., Lebensohn, A., Telli, M., Pochebit, S. M., Lypas, G. & Garber, J. E. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: A Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 1125–1130 (2012).
90. Leslie, N. R. & Longy, M. Inherited *PTEN* mutations and the prediction of phenotype. *Semin Cell Dev Biol* **52**, 30–38 (2016).
91. Uppal, S., Mistry, D. & Coatesworth, A. P. Cowden disease: A review. *Int J Clin Pract* **61**, 645–652 (2007).
92. Kleibl, Z. & Kristensen, V. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *The Breast* **28**, 136–144 (2016).
93. Perona, R., Moncho-Amor, V., Machado-Pinilla, R., Belda-Iniesta, C. & Sánchez

- Pérez, I. Role of *CHK2* in cancer development. *Clin Transl Oncol* **10**, 538–42 (2008).
94. Stagni, V., Manni, I., Oropallo, V., Mottolese, M., Di Benedetto, A., Piaggio, G., Falcioni, R., Giaccari, D., Di Carlo, S., Sperati, F., Cencioni, M. T. & Barilà, D. ATM kinase sustains *HER2* tumorigenicity in breast cancer. *Nat Commun* **6**, 6886 (2015).
  95. Feng, X., Li, H., Dean, M., Wilson, H. E., Kornaga, E., Enwere, E. K., Tang, P., Paterson, A., Lees-Miller, S. P., Magliocco, A. M. & Bebb, G. Low ATM protein expression in malignant tumor as well as cancer-associated stroma are independent prognostic factors in a retrospective study of early-stage hormone-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* **17**, 65 (2015).
  96. Guo, X., Yang, C., Qian, X., Lei, T., Li, Y., Shen, H., Fu, L. & Xu, B. Estrogen receptor alpha regulates ATM expression through miRNAs in breast cancer. *Clin Cancer Res* **19**, 4994–5002 (2013).
  97. Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkäs, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leener, K., Fostira, F., Tomiak, E., Neuhausen, S. L., Teo, Z. L., Khan, S., Aittomäki, K., Moilanen, J. S., Turnbull, C., Seal, S., Mannermaa, A., Kallioniemi, A., Lindeman, G. J., Buys, S. S., Andrulis, I. L., Radice, P., Tondini, C., Manoukian, S., Toland, A. E., Miron, P., Weitzel, J. N., Domchek, S. M., Poppe, B., Claes, K. B. M., Yannoukakos, D., Concannon, P., Bernstein, J. L., James, P. A., Easton, D. F., Goldgar, D. E., Hopper, J. L., Rahman, N., Peterlongo, P., Nevanlinna, H., King, M.-C., Couch, F. J., Southey, M. C., Winqvist, R., Foulkes, W. D. & Tischkowitz, M. Breast-cancer risk in families with mutations in *PALB2*. *N Engl J Med* **371**, 497–506 (2014).
  98. Erkkö, H., Xia, B., Nikkilä, J., Schleutker, J., Syrjäkoski, K., Mannermaa, A., Kallioniemi, A., Pylkäs, K., Karppinen, S.-M., Rapakko, K., Miron, A., Sheng, Q., Li, G., Mattila, H., Bell, D. W., Haber, D. a, Grip, M., Reiman, M., Jukkola-Vuorinen, A., Mustonen, A., Kere, J., Aaltonen, L. a, Kosma, V.-M., Kataja, V., Soini, Y., Drapkin, R. I., Livingston, D. M. & Winqvist, R. A recurrent mutation in *PALB2* in Finnish cancer families. *Nature* **446**, 316–319 (2007).
  99. Somyajit, K., Subramanya, S. & Nagaraju, G. *RAD51C*: A novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer. *Carcinogenesis* **31**, 2031–2038 (2010).
  100. Somyajit, K., Subramanya, S. & Nagaraju, G. Distinct roles of fanco/rad51c protein in DNA damage signaling and repair implications for fanconi anemia and breast cancer susceptibility. *J Biol Chem* **287**, 3366–3380 (2012).
  101. Sopik, V., Akbari, M. R. & Narod, S. A. Genetic testing for *RAD51C* mutations: In the clinic and community. *Clin Genet* **88**, 303–312 (2015).
  102. Pelttari, L. M., Heikkinen, T., Thompson, D., Kallioniemi, A., Schleutker, J., Holli, K., Blomqvist, C., Aittomaki, K., Butzow, R. & Nevanlinna, H. *RAD51C* is a susceptibility gene for ovarian cancer. *Hum Mol Genet* **20**, 3278–3288 (2011).
  103. Blanco, A., Gutiérrez-Enríquez, S., Santamariña, M., Montalban, G., Bonache, S., Balmaña, J., Carracedo, Á., Diez, O. & Vega, A. *RAD51C* germline mutations found in Spanish site-specific breast cancer and breast-ovarian cancer families.

- Breast Cancer Res Treat* **147**, 133–143 (2014).
104. McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P. & Freedman, G. M. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med* **57**, 9S–16S (2016).
  105. Fuller, M. S., Lee, C. I. & Elmore, J. G. Breast cancer screening: An evidence-based update. *Med Clin North Am* **99**, 451–468 (2015).
  106. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Breast Cancer Screening (PDQ®): Patient Version. *PDQ Cancer Inf Summ* (2002). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389160>>
  107. Lee, C. S., Bhargavan-Chatfield, M., Burnside, E. S., Nagy, P. & Sickles, E. A. The national mammography database: Preliminary data. *Am J Roentgenol* **206**, 883–890 (2016).
  108. Kerlikowske, K., Hubbard, R. A., Miglioretti, D. L., Geller, B. M., Yankaskas, B. C., Lehman, C. D., Taplin, S. H. & Sickles, E. A. Comparative effectiveness of digital versus film-screen mammography in community practice in the United States: A cohort study. *Ann Intern Med* **155**, 493–502 (2011).
  109. Health Quality Ontario, H. Q. Cancer screening with digital mammography for women at average risk for breast cancer, magnetic resonance imaging (MRI) for women at high risk: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser* **10**, 1–55 (2010).
  110. Mathenge, E. G., Dean, C. A., Clements, D., Vaghar-Kashani, A., Photopoulos, S., Coyle, K. M., Giacomantonio, M., Malueth, B., Nunokawa, A., Jordan, J., Lewis, J. D., Gujar, S. A., Marcato, P., Lee, P. W. K. & Giacomantonio, C. A. Core needle biopsy of breast cancer tumors increases distant metastases in a mouse model. *Neoplasia* **16**, 950–60 (2014).
  111. Yu, Y.-H., Wei, W. & Liu, J.-L. Diagnostic value of fine-needle aspiration biopsy for breast mass: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **12**, 41 (2012).
  112. Bukhari, M. H., Arshad, M., Jamal, S., Niazi, S., Bashir, S., Bakshi, I. M. & Shaharyar. Use of fine-needle aspiration in the evaluation of breast lumps. *Patholog Res Int* **2011**, 689521 (2011).
  113. Boenisch, T. Antibodies. *Immunohistochem Stain Methods* 172 (2009).
  114. Wu, W., Cheng, S., Deng, H., Wu, J., Mao, K. & Cao, M. Impact of Breast Cancer Subtype Defined by Immunohistochemistry Hormone Receptor and HER2 Status on the Incidence of Immediate Postmastectomy Reconstruction. *Medicine (Baltimore)* **95**, e2547 (2016).
  115. Schummer, M., Thorpe, J., Giraldez, M., Bergan, L., Tewari, M. & Urban, N. Evaluating serum markers for hormone receptor-negative breast cancer. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
  116. Wu, S. gang, He, Z. yu, Zhou, J., Sun, J. yuan, Li, F. yan, Lin, Q., Guo, L. & Lin, H. xin. Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer. *Breast* **23**, 88–93 (2013).
  117. Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M. R., Hayes, D. F. & Bast, R. C. American society of clinical

- oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* **25**, 5287–5312 (2007).
118. Manuscript, A. & Syndromes, G. P. Mucines in the Pathogenesis of Breast Cancer: Implications in Diagnosis, Prognosis and Therapy. **48**, 1–6 (2010).
  119. Mook, S., Van't Veer, L. J., Rutgers, E. J. T., Piccart-Gebhart, M. J. & Cardoso, F. Individualization of therapy using mammaprint: From development to the MINDACT trial. *Cancer Genomics and Proteomics* **4**, 147–156 (2007).
  120. Györffy, B., Hatzis, C., Sanft, T., Hofstatter, E., Aktas, B. & Pusztai, L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res* **17**, 11 (2015).
  121. Kittaneh, M. & Montero, A. J. Molecular Profiling for Breast Cancer : A Comprehensive Review. *Biomark Cancer* **5**, 61–70 (2013).
  122. Slodkowska, E. a & Ross, J. S. MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn* **9**, 417–422 (2009).
  123. Sapino, A., Roepman, P., Linn, S. C., Snel, M. H. J., Delahaye, L. J. M. J., van den Akker, J., Glas, A. M., Simon, I. M., Barth, N., de Snoo, F. a, van T Veer, L. J., Molinaro, L., Berns, E. M. J. J., Wesseling, J., Riley, L. B., Anderson, D., Nguyen, B. & Cox, C. E. MammaPrint Molecular Diagnostics on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *J Mol Diagn* **16**, 190–197 (2013).
  124. Marrone, M., Stewart, A. & Dotson, W. D. Clinical utility of gene-expression profiling in women with early breast cancer: an overview of systematic reviews. *Genet Med* 1–14 (2014).
  125. Cheng, Y. C. & Ueno, N. T. Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer* **19**, 191–9 (2012).
  126. Li, J.-J. & Shao, Z.-M. Endocrine therapy as adjuvant or neoadjuvant therapy for breast cancer: selecting the best agents, the timing and duration of treatment. *Chinese Clin Oncol* **5**, (2016).
  127. Moorcraft, S. Y., Smyth, E. C. & Cunningham, D. Adjuvant or neoadjuvant therapy for operable esophagogastric cancer? *Gastric Cancer* **18**, 1–10 (2014).
  128. Paganì, O., Senkus, E., Wood, W., Colleoni, M., Cufer, T., Kyriakides, S., Costa, A., Winer, E. P. & Cardoso, F. International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *J Natl Cancer Inst* **102**, 456–63 (2010).
  129. Loibl, S., Denkert, C. & von Minckwitz, G. Neoadjuvant treatment of breast cancer - Clinical and research perspective. *Breast* **24 Suppl 2**, S73-7 (2015).
  130. Güth, U., Huang, D. J., Dirnhofer, S., Rochlitz, C. & Wight, E. Distant metastatic breast cancer as an incurable disease: a tenet with a need for revision. *Cancer J* **15**, 81–6 (2009).
  131. Cleator, S., Heller, W., Coombes, R. C., Ln, S. & Ln, S. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol* **8**, 235–244 (2007).
  132. Grann, V. R., Troxel, A. B., Zojwalla, N. J., Jacobson, J. S., Hershman, D. & Neugut, A. I. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort

- of patients with breast carcinoma. *Cancer* **103**, 2241–51 (2005).
133. Reinbolt, R. E., Mangini, N., Hill, J. L., Levine, L. B., Dempsey, J. L., Singaravelu, J., Koehler, K. A., Talley, A. & Lustberg, M. B. Endocrine therapy in breast cancer: The neoadjuvant, adjuvant, and metastatic approach. *Semin Oncol Nurs* **31**, 146–155 (2015).
  134. Ellis, A. J., Hendrick, V. M., Williams, R. & Komm, B. S. Selective estrogen receptor modulators in clinical practice: A safety overview. *Expert Opin Drug Saf* **14**, 921–934 (2015).
  135. Jager, N. G. L., Linn, S. C., Schellens, J. H. M. & Beijnen, J. H. Tailored tamoxifen treatment for breast cancer patients: A perspective. *Clin Breast Cancer* **15**, 241–244 (2015).
  136. Pickar, J. H. & Komm, B. S. Selective estrogen receptor modulators and the combination therapy conjugated estrogens/bazedoxifene: A review of effects on the breast. *Post Reprod Heal* **21**, 112–121 (2015).
  137. Johnson, M. D., Zuo, H., Lee, K. H., Trebley, J. P., Rae, J. M., Weatherman, R. V., Desta, Z., Flockhart, D. A. & Skaar, T. C. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **85**, 151–159 (2004).
  138. Zembutsu, H. Pharmacogenomics toward personalized tamoxifen therapy for breast cancer. *Pharmacogenomics* **16**, 287–96 (2015).
  139. Sawesi, S., Carpenter, J. S. & Jones, J. Reasons for nonadherence to tamoxifen and aromatase inhibitors for the treatment of breast cancer: A literature review. *Clin J Oncol Nurs* **18**, (2014).
  140. Goetz, M. P., Knox, S. K., Suman, V. J., Rae, J. M., Safgren, S. L., Ames, M. M., Visscher, D. W., Reynolds, C., Couch, F. J., Lingle, W. L., Weinshilboum, R. M., Fritcher, E. G. B., Nibbe, A. M., Desta, Z., Nguyen, A., Flockhart, D. A., Perez, E. A. & Ingle, J. N. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **101**, 113–121 (2007).
  141. Jin, Y., Desta, Z., Stearns, V., Ward, B., Ho, H., Lee, K. H., Skaar, T., Storniolo, A. M., Li, L., Araba, A., Blanchard, R., Nguyen, A., Ullmer, L., Hayden, J., Lemler, S., Weinshilboum, R. M., Rae, J. M., Hayes, D. F. & Flockhart, D. A. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* **97**, 30–39 (2005).
  142. Markopoulos, C. J. Minimizing early relapse and maximizing treatment outcomes in hormone-sensitive postmenopausal breast cancer: Efficacy review of AI trials. *Cancer Metastasis Rev* **29**, 581–594 (2010).
  143. Olin, J. L. & St Pierre, M. Aromatase inhibitors in breast cancer prevention. *Ann Pharmacother* **48**, 1605–1610 (2014).
  144. Narashimamurthy, J., Rao, A. R. R. & Sastry, G. N. Aromatase inhibitors: a new paradigm in breast cancer treatment. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **4**, 523–34 (2004).
  145. Yadav, M. R., Barmade, M. A., Tamboli, R. S. & Murumkar, P. R. Developing steroidal aromatase inhibitors-an effective armament to win the battle against

- breast cancer. *Eur J Med Chem* **105**, 1–38 (2015).
146. Ahmad, I. & Shagufta. Recent developments in steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors for the chemoprevention of estrogen-dependent breast cancer. *Eur J Med Chem* **102**, 375–386 (2015).
  147. Van Asten, K., Neven, P., Lintermans, A., Wildiers, H. & Paridaens, R. Aromatase inhibitors in the breast cancer clinic: Focus on exemestane. *Endocr Relat Cancer* **21**, (2014).
  148. Chlebowski, R. T., Schottinger, J. E., Shi, J. & Chung, J. Aromatase Inhibitors , Tamoxifen , and Endometrial Cancer in Breast Cancer Survivors. 1–9 (2015).
  149. Montemurro, F., Di Cosimo, S. & Arpino, G. Human epidermal growth factor receptor 2 (her2)-positive and hormone receptor-positive breast cancer: New insights into molecular interactions and clinical implications. *Ann Oncol* **24**, 2715–2724 (2013).
  150. Hicks, D. G. & Turner, B. Pathologic diagnosis, immunohistochemistry, multigene assays and breast cancer treatment: progress toward ‘precision’ cancer therapy. *Biotech Histochem* **90**, 81–92 (2015).
  151. Barroso-Sousa, R., Santana, I. A., Testa, L., de Melo Gagliato, D. & Mano, M. S. Biological therapies in breast cancer: Common toxicities and management strategies. *Breast* **22**, 1009–1018 (2013).
  152. Gennari, A., Sormani, M. P., Pronzato, P., Puntoni, M., Colozza, M., Pfeffer, U. & Bruzzi, P. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: A pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* **100**, 14–20 (2008).
  153. Pegram, M. D., Konecny, G. E., O’callaghan, C., Beryt, M., Slamon, D. J. & Pietras, R. J. Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **96**, 739–749 (2004).
  154. Marty, M., Cognetti, F., Maraninchi, D., Snyder, R., Mauriac, L., Tubiana-Hulin, M., Chan, S., Grimes, D., Ant??n, I., Lluch, A., Kennedy, J., O’Byrne, K., Conte, P., Green, M., Ward, C., Mayne, K. & Extra, J. M. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: The M77001 study group. *J Clin Oncol* **23**, 4265–4274 (2005).
  155. Kawajiri, H., Takashima, T., Kashiwagi, S., Noda, S., Onoda, N. & Hirakawa, K. Pertuzumab in combination with trastuzumab and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **15**, 17–26 (2015).
  156. Zanardi, E., Bregni, G., Braud, F. de & Cosimo, S. Di. Better Together: Targeted Combination Therapies in Breast Cancer. *Semin Oncol* **42**, 887–895 (2015).
  157. Yeo, B., Kotsori, K., Mohammed, K., Walsh, G. & Smith, I. E. Long-term outcome of HER2 positive metastatic breast cancer patients treated with first-line trastuzumab. *Breast* **24**, 751–757 (2015).
  158. Tredan, O., Lacroix-Triki, M., Guiu, S., Mouret-Reynier, M.-A., Barriere, J., Bidard, F.-C., Braccini, A.-L., Mir, O., Villanueva, C. & Barthelemy, P. Angiogenesis and tumor microenvironment: bevacizumab in the breast cancer

- model. *Target Oncol* **10**, 189–198 (2015).
159. Dvorak, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* **20**, 4368–80 (2002).
  160. D’Amato, V., Raimondo, L., Formisano, L., Giuliano, M., De Placido, S., Rosa, R. & Bianco, R. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat Rev* **41**, 877–883 (2015).
  161. Moasser, M. M. & Krop, I. E. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol* **2**, (2015).
  162. Zhou, H., Luo, Y. & Huang, S. Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* **10**, 571–81 (2010).
  163. Jiang, B. H. & Liu, L. Z. Role of mTOR in anticancer drug resistance: Perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat* **11**, 63–76 (2008).
  164. Ng, V. C., Johnson, J. J. & Cuellar, S. Targeting the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: Implications for the management of metastatic breast cancer. *J Oncol Pharm Pract* **21**, 433–42 (2015).
  165. Yadav, B. S., Sharma, S. C., Chanana, P. & Jhamb, S. Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World J Clin Oncol* **5**, 125–33 (2014).
  166. Kumar, P. & Aggarwal, R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* **293**, 247–269 (2016).
  167. Du, F. Le, Eckhardt, B. L., Lim, B., Litton, J. K., Moulder, S., Meric-Bernstam, F., Gonzalez-Angulo, A. M., Ueno, N. T., Du, F. Le, Eckhardt, B. L., Lim, B., Litton, J. K., Moulder, S., Meric-Bernstam, F. & Ana M. Gonzalez-Angulo, N. T. U. Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget* **6**, 12890–12908 (2015).
  168. Hudis, C. A. & Gianni, L. Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *Oncologist* **16**, 1–11 (2011).
  169. Abramson, V. G., Lehmann, B. D., Ballinger, T. J. & Pietenpol, J. A. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer* **121**, 8–16 (2015).
  170. Sharma, P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist* 1–13 (2016).
  171. Goodman, L. S. & Gilman, A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (The McGraw-Hill Companies, Inc, 2010).
  172. Mackinght, J. Principles of Chemotherapy. *Clin Tech Small Anim Pract* **18**, 67–72 (2003).
  173. Partridge, A. H., Burstein, H. J. & Winer, E. P. Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Early-Stage Breast Cancer. **2115**, 135–142 (2001).
  174. Bodai, B. I. & Tusso, P. Breast cancer survivorship: a comprehensive review of long-term medical issues and lifestyle recommendations. *Perm J* **19**, 48–79 (2015).

175. Westbrook, K. & Stearns, V. Pharmacogenomics of breast cancer therapy: an update. *Pharmacol Ther* **139**, 1–11 (2013).
176. Adão, R., Keulenaer, G. De, Leite-moreira, A. & Brás-silva, C. Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. *Rev Port Cardiol* **32**, 395–409 (2013).
177. Anampa, J., Makower, D. & Sparano, J. A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Med* **13**, 195 (2015).
178. Kawamoto, H., Ogata, H., Ohta, T. & Fukuda, M. [Breast-conserving surgery: quadrantectomy]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* **103**, 811–5 (2002).
179. Lester, J. Local treatment of breast cancer. *Semin Oncol Nurs* **31**, 122–133 (2015).
180. Kunkler, I. H., Ward, C. & Langdon, S. P. Technical innovation in adjuvant radiotherapy : Evolution and evaluation of new treatments for today and tomorrow. *The Breast* 1–6 (2015).
181. Meattini, I., Guenzi, M., Fozza, A. & Vidali, C. Overview on cardiac , pulmonary and cutaneous toxicity in patients treated with adjuvant radiotherapy for breast cancer. *Breast Cancer* (2016).
182. Simonelli, C., Eleuteri, S., Petruccelli, F. & Rossi, R. Female sexual pain disorders. *Curr Opin Psychiatry* **27**, 406–412 (2014).
183. Yang, S.-N., Li, F.-J., Liao, Y.-H., Chen, Y.-S., Shen, W.-C. & Huang, T.-C. Identification of Breast Cancer Using Integrated Information from MRI and Mammography. *PLoS One* **10**, e0128404 (2015).

---

# ANEXOS

---

**ANEXO I:** Estadiamento do cancro da mama segundo o sistema de categorias TNM

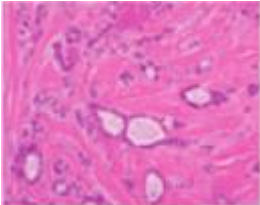
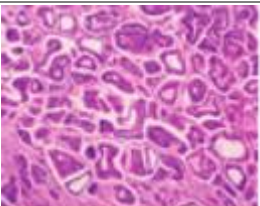
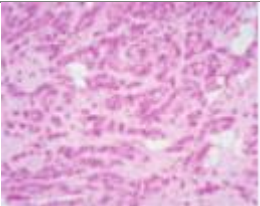
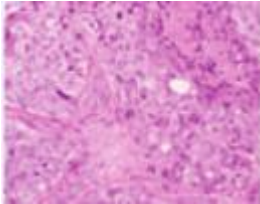
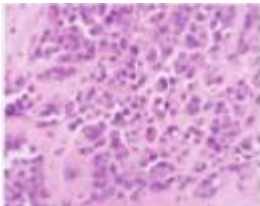
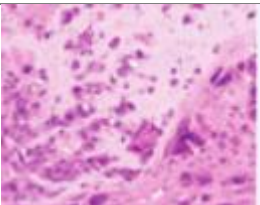
**Quadro 1** – Estadiamento do cancro da mama segundo o sistema de categorias TNM\*, sendo que os vários estádios identificam tipos de tumor com prognóstico semelhante e que consequentemente são tratados de uma maneira semelhante. [Adaptado de American Joint Committee on Cancer <sup>40</sup>].

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

\*A categoria T descreve o tamanho do tumor, medido em centímetros e o seu crescimento em estruturas adjacentes (T0: Ausência de tumor; Tis: Tumor presente só no interior dos ductos ou só nos lóbulos; T1: Tumor de diâmetro de 2 cm ou menos; T2: Tumor maior do que 2 cm mas inferior a 5 cm de diâmetro; T3: Tumor maior do que 5 cm de diâmetro; T4: Tumor presente na parede torácica ou na pele). A categoria N determina a extensão do cancro ao nível dos gânglios linfáticos (segundo as características anatomo-patológicas, tem-se N0: Gânglios não envolvidos; N1: 1-3 gânglios axilares envolvidos; N1mi: Gânglios envolvidos com tamanho de 2mm ou menos; N2: 4-9 gânglios axilares envolvidos; N3: 10 ou mais gânglios axilares envolvidos ou gânglios de outras áreas à volta da mama). A categoria M descreve se o tumor está presente em órgãos distantes (M0: Sem metástases à distância; M1: Com metástases em órgãos distantes).

**ANEXO II:** Subtipos moleculares de cancro da mama.

**Quadro 2** – Subtipos moleculares de cancro da mama com respetivos tipos de expressão genética, capacidade proliferativa, grau e tipo histológico preferencial dos tumores que originam e imagem por microscopia ótica [Adaptado de Geyer *et al* <sup>47</sup>].

Subtipo molecular	ER	PR	HER2	Capacidade proliferativa	Grau histológico	Tipo histológico	Morfologia
<b>Luminal A</b>	+++	+++	-	Baixa	1 ou 2	Carcinoma tubular, cribriforme, lobular, ductal invasivo SOE	
<b>Luminal B</b>	+	+/-	+/-	Elevada	2 ou 3	Carcinoma micropapilar, ductal invasivo SOE	
<b>HER2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup></b>	-	-	+	Elevada	3	Carcinoma invasivo ductal SOE	
<b>Triplo negativo</b>	-	-	-	Elevada	3	Carcinoma invasivo ductal SOE, metaplásico, medular, adenoide cístico	
<b>Molecular apócrino</b>	-	-	+/-	Elevada	2 ou 3	Carcinoma invasivo ductal SOE, apócrino, pleomórfico lobular	
<b>Claudin-low</b>	-	-	-	Elevada	3	Carcinoma invasivo ductal SOE, metaplásico	

**ANEXO III:** Comparação entre o teste MammaPrint® e outros testes de suscetibilidade genética para o cancro da mama.

**Quadro 3** – Comparação entre as características do MammaPrint e outros testes genómicos de suscetibilidade para o cancro da mama existentes no mercado ou em desenvolvimento [Adaptado de Slodkowska *et al* <sup>122</sup>].

TESTE	NÚMERO DE GENES DE TESTADOS	MÉTODO	AMOSTRA DE TECIDO	INDICATIVO PARA TRATAMENTO ESPECIFICO
Mammostrat®	5	IHC	FFPE	TAMOXIFENO
eXagenBC	3	FISH	FFPE	NÃO
Invasiveness Signature	186	<i>Microarray</i>	Fresca/congelada	NÃO
MammaPrint®	70	<i>Microarray</i>	Fresca/congelada	TAMOXIFENO (ADJUVANTE) + QUIMIOTERAPIA (NEOADJUVANTE)
OncotipoDX®	21	RT-PCR	FFPE	TAMOXIFENO + REGIME CMF
Molecular Portraits/50 Gene Classifier	50	RT-PCR + <i>microarray</i>	Fresca/congelada	QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE
Theros TwoGene ratio	6	RT-PCR	FFPE	TAMOXIFENO
Celera Metastasis Test	14	RT-PCR	FFPE	TAMOXIFENO
Rotterdam Signature	76	<i>Microarray</i>	Fresca/congelada	POSSÍVEL (TAMOXIFENO)
NuvoSelect (TFAC/FR)	200	<i>Microarray</i>	Fresca/congelada	NEOADJUVANTE +

IHC: imunohistoquímica; RT-PCR: PCR por transcriptase reversa (de *Reverse Transcriptase PCR*); FFPE: tecidos embebidos em parafina e fixados por meio de formaldeído (de *Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded*); CMF: ciclofosfamida + metotrexato + 5-fluorouracilo; TFAC: paclitaxel + 5-fluorouracilo + adriamicina + ciclofosfamida

**ANEXO IV:** Sumário dos vários tipos de terapia endócrina do cancro da mama.

**Quadro 4** – Resumo das várias classes de terapia endócrina usada no cancro da mama, com exemplos de fármacos e respetivos efeitos tóxicos e ações. AVC: acidente cardiovascular; PO: *per os* (administração por via oral); SC: subcutâneo; IM: intramuscular; mTor: *mammalian target of rapamycin* [Adaptado de Reinbolt *et al* <sup>133</sup>].

<b>Fármaco (Nome comercial)</b>	<b>Dose</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>Comentários</b>
<b>Moduladores seletivos dos recetores de estrogénios (SERM)</b>			
<b>Tamoxifeno (Nolvadex®)</b>	20 mg PO/dia	Eventos trombóticos, AVC, hiperplasia do endométrio e cancro, cataratas, afrentamentos, náuseas, corrimento vaginal	Ação estrogénica no endométrio, via da coagulação, ossos e fígado; Ação antiestrogénica na mama e mucosa vaginal
<b>Toremifeno (Fareston®)</b>	60 mg PO/dia	vaginal	Usado no cancro metastizado
<b>Repressores seletivos dos recetores de estrogénios (SERD)</b>			
<b>Fulvestrant (Faslodex®)</b>	500 mg IM a cada 28 dias	Dor no local da injeção, dor óssea, artralgia, dor de cabeça, costas, extremidades e sistema musculoesquelético, fadiga, afrentamentos, náuseas, vómitos, anorexia, astenia, tosse, dispneia e obstipação	Aprovado apenas para mulheres após a menopausa

<b>Fármaco (Nome comercial)</b>	<b>Dose</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>Comentários</b>
<b>Inibidores da aromatase (IA)</b>			
<b>Anastrozole (Arimidex®)</b>	2,5 mg PO/dia	Astenia, mialgia/artralgia, dor de cabeça, diarreia, afrontamentos, náuseas, secura vaginal, possível perda de massa óssea com uso prolongado	Inibidor reversível da aromatase não esteroide
<b>Letrozole (Femara®)</b>	1 mg PO/dia	Afrontamentos, náusea, dor de cabeça, fadiga, artralgia, possível perda de massa óssea com uso prolongado	Inibidor reversível da aromatase não esteroide
<b>Exemestano (Aromasin®)</b>	25 mg PO/dia	Fadiga, afrontamentos, náusea, dispneia, ansiedade, insónia, dor no local do tumor, astenia	Inibidor esteroide irreversível da aromatase
<b>Agonista da hormona de libertação da hormona luteinizante (Agonistas LHRH)</b>			
<b>Goserelina (Zoladex®)</b>	3.6 mg SC a cada 28 dias	Afrontamentos, reação inflamatória no local da injeção, possível perda de massa óssea com uso prolongado	Aprovado para o cancro da mama
<b>Leuprolida (Lupron®)</b>	3,75 mg IM a cada 28 dias		Não aprovado para o cancro da mama
<b>Triptorelina (Trelstar®)</b>	3,75 mg IM a cada 28 dias		Não aprovado para o cancro da mama

<b>Fármaco (Nome comercial)</b>	<b>Dose</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>Comentários</b>
<b>Inibidores da tirosina cinase (TKIs)</b>			
<b>Everolimus (Afinitor®)</b>	10 mg PO/dia	Inflamação do estômago e pulmões, efeitos metabólicos (hiperlipidemia, hipertrigliceridemia e hiperglicemia), risco aumentado de infeção	Inibidor do mTor; Usado em combinação com o exemestano ou tamoxifeno