



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química e Farmácia



***O PAPEL DA FARMACOGENÓMICA NA  
TERAPÊUTICA COM TAMOXIFENO***

Sofia Isabel Granadeiro Marianito, N.º 34816

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MONOGRAFIA ORIENTADA PELA PROF.<sup>a</sup> DOUTORA VERA RIBEIRO

**2012**



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química e Farmácia



***O PAPEL DA FARMACOGENÓMICA NA  
TERAPÊUTICA COM TAMOXIFENO***

Sofia Isabel Granadeiro Marianito, N.º 34816

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MONOGRAFIA ORIENTADA PELA PROF.<sup>a</sup> DOUTORA VERA RIBEIRO

**2012**

# O PAPEL DA FARMACOGENÓMICA NA TERAPÊUTICA COM TAMOXIFENO

## 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 incluídas.*

---

Copyright by Sofia Marianito, “A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar 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.”

## ABREVIATURAS

- CDI** – Carcinoma ductal invasivo
- CDIS** – Carcinoma ductal *in situ*
- CLI** – Carcinoma lobular invasivo
- CLIS** – Carcinoma Lobular *in situ*
- DDFS** – Distant disease-free survival (“*Sobrevida sem doença à distância*”)
- DFS** - Disease-free survival. (“*Sobrevida sem doença*”)
- DRFS** – Distant relapse-free survival (“*Sobrevida sem recidiva à distância*”)
- DMO** – Densidade mineral óssea
- EM** – Extensive metabolizer (“*Metabolizador rápido*”)
- HER2+** – Positivo para o recetor-2 do fator de crescimento epidérmico humano
- HR** – Hazard Ratio
- IAs** – Inibidores da aromatase
- IM** – Intermediate metabolizer (“*Metabolizador intermédio*”)
- ISRSs** – Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
- mRNA** – RNA mensageiro
- MSRE** – Modelador Seletivo dos Recetores de Estrogénio
- NDMT** – N-desmetil-tamoxifeno
- NR** – Recetor nuclear
- OS** - Overall survival (“*Sobrevivência global*”)
- PKA** – Proteína cinase A
- PM** – Poor metabolizer (“*Metabolizador lento*”)
- RE+** – Positivo para os recetores dos estrogénios
- RFS** – Relapse-free survival (“*Sobrevida sem recidiva*”)
- RH+** – Positivo para os recetores hormonais
- RP+** – Positivo para os recetores dos progestagénios
- RR** – Risco relativo
- SNP** – Single nucleotide polymorphism (polimorfismo nucleotídico pontual)
- TTBR** – Time to breast recurrence (“*Tempo de recorrência*”)
- TTP** – Time to breast progression (“*Tempo de progressão*”)
- UM** – Ultrarapid metabolizer (“*Metabolizador ultra rápido*”)
- 4HT** – 4-Hidroxi-tamoxifeno

## ÍNDICE GERAL

<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Resumo/Abstract .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Introdução .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Carcinoma da Mama.....</b>	<b>18</b>
3.1. Tipos de Carcinoma da Mama.....	19
3.1.1. Carcinoma Ductal <i>In-Situ</i> (CDIS).....	19
3.1.2. Carcinoma Lobular <i>In-Situ</i> (CLIS).....	20
3.1.3. Carcinoma Ductal Invasivo (CDI).....	20
3.1.4. Carcinoma Lobular Invasivo (CLI).....	20
3.1.5. Carcinoma Inflamatório.....	21
3.1.6. Carcinoma Tubular.....	21
3.1.7. Carcinoma Medular.....	21
3.1.8. Carcinoma Mucinoso.....	21
3.1.9. Carcinoma Papilar.....	22
3.1.10. Doença de Paget.....	22
3.2. Diagnóstico do Carcinoma da Mama.....	22
3.2.1. Biópsia.....	23
3.2.2. Classificação Molecular do Carcinoma da Mama.....	24
<b>4. Terapêuticas do Carcinoma da Mama.....</b>	<b>25</b>
4.1. Terapêutica Adjuvante Hormonal.....	26
4.1.1. Terapêutica Adjuvante Hormonal na Pré-Menopausa.....	26
4.1.2. Terapêutica Adjuvante Hormonal na Pós-Menopausa.....	26
4.2. Inibidores da Aromatase.....	27
4.2.1. Tipos de Inibidores da Aromatase.....	28
4.2.2. Reações Adversas dos IAs.....	29
4.2.3. Esquemas Terapêuticos com IAs.....	30
4.3. Tamoxifeno.....	30
4.3.1. Posologia e Modo de Administração.....	30
4.3.2. Farmacocinética.....	31
4.3.3. Mecanismo de Ação.....	31
4.3.4. Reações Adversas.....	35
<b>5. A Farmacogenômica na Terapêutica com Tamoxifeno.....</b>	<b>37</b>
5.1. Genes que Codificam Enzimas do Metabolismo do Tamoxifeno.....	37

5.2.	Interações Importantes no Metabolismo do Tamoxifeno .....	47
5.3.	Resultados de Eficácia do Tamoxifeno .....	51
5.3.1.	Comparação da Eficácia do Tamoxifeno com os IAs .....	52
5.4.	Resistência ao Tamoxifeno pela via da proteína cinase A .....	59
5.5.	Redução da eficácia do tamoxifeno via VEGF .....	62
<b>6.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Taxas de incidência do carcinoma da mama feminino em diversas regiões do mundo, com idade padronizada (50 anos), 2008 <sup>[1]</sup> .....	13
<b>Figura 2</b> - Taxas de incidência do carcinoma da mama feminino nos 27 países da Europa, com idade padronizada (50 anos), 2008 <sup>[1]</sup> .....	13
<b>Figura 3</b> - Imagem ilustrativa da morfologia da mama feminina <sup>[7]</sup> .....	14
<b>Figura 4</b> - Esquema resumo dos diferentes estadios do carcinoma da mama, tendo em conta os fatores T, N e M <sup>[19]</sup> .....	19
<b>Figura 5</b> - Esquema representativo do mecanismo de biossíntese dos estrogénios <sup>[33]</sup> .....	27
<b>Figura 6</b> - Estruturas químicas dos IA do tipo 1 e tipo 2 <sup>[32]</sup> .....	28
<b>Figura 7</b> - Estrutura química do tamoxifeno <sup>[37]</sup> .....	30
<b>Figura 8</b> - Estrutura dos domínios funcionais e dos polimorfismos descritos para o gene do RE $\alpha$ . Os exões (E) são indicados com caixas. A região TAF tem como função a ativação da transcrição <sup>[39]</sup> .....	31
<b>Figura 9</b> - Estrutura dos domínios funcionais e dos polimorfismos descritos para o gene RE $\beta$ . Os exões codificantes (E) são indicados com caixas, e as zonas TAF têm função de ativação da transcrição <sup>[39]</sup> .....	33
<b>Figura 10</b> - Estrutura base dos RE $\alpha$ e RE $\beta$ , com os vários domínios identificados <sup>[40]</sup> .....	34
<b>Figura 11</b> - Esquema resumido do metabolismo do tamoxifeno <sup>[45]</sup> .....	38
<b>Figura 12</b> - Efeitos da concentração de tamoxifeno e dos seus metabólitos sobre a proliferação das células MCF-7. E2, estradiol <sup>[46]</sup> .....	39
<b>Figura 13</b> - Resultados do Kaplan-Meier a) TTBR, b) RFS, C) DFS, e OS d) com base no fenótipo do CYP2D6 (EMs vs Metabolismo Diminuído) <sup>[48]</sup> .....	45
<b>Figura 14</b> - Resultados do Kaplan-Meier sobre a) TTBR, b) RFS, c) DFS e d) OS, com base nos três fenótipos EM, IM e PM <sup>[48]</sup> .....	46
<b>Figura 15</b> - A: Variação nas concentrações de endoxifeno com base no fenótipo do CYP2D6. B: Comparação das concentrações de endoxifeno na coadministração de diferentes inibidores do CYP2D6 <sup>[46]</sup> .....	48
<b>Figura 16</b> - Resultados da atividade da luciferase na presença de diferentes substratos, em células tranfetadas com SRC-1 <sub>623-711</sub> <sup>[53]</sup> .....	60
<b>Figura 17</b> - Resultados da atividade da luciferase na presença de diferentes substratos, em células tranfetadas com SRC-1 <sub>FL</sub> <sup>[53]</sup> .....	61

**Figura 18** - Quantificação da sinalização da RNA polimerase II sobre o gene PRL, a partir de três condições diferentes (CTS, E2 e TAM) e para cada uma delas na presença ou na ausência de Forscolina <sup>[53]</sup> ..... 62

**Figura 19** - Quantificação dos níveis de RNA do RE $\alpha$ , na presença de 4HTM e 4HTM + cAMP, evidenciando as diferenças entre a sequência de referência e a sequência mutada S305A, para as mesmas condições <sup>[53]</sup> ..... 62

**Figura 20** - Resultados da indução da expressão de VEGF, em quatro grupos de ratinhos, que foram suplementados com E2 <sup>[54]</sup> ..... 63

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Efeitos adversos comuns e não comuns na terapêutica com IAS, em comparação com tamoxifeno <sup>[30]</sup> .....	29
<b>Tabela 2</b> - Resultados dos efeitos adversos da terapêutica com tamoxifeno, em comparação a um placebo <sup>[30]</sup> .....	35
<b>Tabela 3</b> - Resumo dos principais genes com variabilidade genética, que afetam a eficácia e segurança do tamoxifeno e seus metabolitos <sup>[43]</sup> .....	37
<b>Tabela 4</b> - Classificação dos diferentes fenótipos possíveis para o CYP2D6 <sup>[47]</sup> .....	40
<b>Tabela 5</b> - Conjunto das variantes mais importantes clinicamente, no gene do CYP2D6. Adaptada de <sup>[42]</sup> .....	41
<b>Tabela 6</b> - Resultados do seguimento de doentes com carcinoma da mama metastático, associando o seu fenótipo da enzima CYP2D6 com o TTP e a OS <sup>[36]</sup> .....	43
<b>Tabela 7</b> - Resultados do modelo multivariado Cox comparando o TTBR, a RFS e a DFS entre EMs e Metabolismo diminuído <sup>[48]</sup> .....	45
<b>Tabela 8</b> - Resultados do modelo univariado de Cox sobre o TTBR, a RFS, a DFS e a OS entre EMs vs IMs, e EMs vs PMs <sup>[48]</sup> .....	46
<b>Tabela 9</b> - Principais inibidores do CYP2D6, separados em função da sua capacidade de inibição e classe farmacoterapêutica. Adaptada de <sup>[46]</sup> .....	49
<b>Tabela 10</b> - Resultados da recorrência e OS em doentes tratadas com tamoxifeno e um inibidor do CYP2D6, comparados às doentes sem inibidor do CYP2D6 <sup>[50]</sup> .....	50
<b>Tabela 11</b> - Determinantes significativos para a recorrência da doença e mortalidade por qualquer causa, em doentes tratadas com tamoxifeno <sup>[50]</sup> .....	50
<b>Tabela 12</b> - Resultados da associação entre a coadministração de inibidores do CYP2D6 e os valores de OS e tempo de progressão da doença <sup>[36]</sup> .....	51
<b>Tabela 13</b> - Resultados da meta-análise que compara o uso de IAs e tamoxifeno, .....	53
<b>Tabela 14</b> - Resultados experimentais sobre a comparação entre vários regimes terapêuticos endócrinos na DFS e OS <sup>[30]</sup> .....	53
<b>Tabela 15</b> - Resultados do ensaio ATAC face à DFS, risco de recorrência, recorrência à distância, carcinoma contralateral e OS <sup>[30]</sup> .....	54
<b>Tabela 16</b> - Resultados do ensaio 1-98 BIG sobre a DFS e OS, com diferentes regimes terapêuticos <sup>[30]</sup> .....	55

**Tabela 17** - Resultados do estudo IES, sobre a DFS e OS, comparando a terapêutica de tamoxifeno 5 anos, com a terapêutica tamoxifeno 2-3 anos e exemestano até 5 anos <sup>[30]</sup>. ..... 56

**Tabela 18**- Resultados da meta-análise que envolveu os estudos ABCSG 8, o ARNO 95 e o ITA, e do estudo N-BC03 SAS comparando o uso apenas de tamoxifeno por 5 anos com o uso sequencial de AI, para perfazer 5 anos de tratamento <sup>[30]</sup>. ..... 56

**Tabela 19** - Resultados do ensaio BIG 1-98 sobre a DFS nos dois regimes terapêuticos contemplados, e do ensaio TEAM sobre a DFS e OS <sup>[30]</sup>. ..... 57

**Tabela 20** - Resultados do ensaio MA.17, que compara os resultados ao nível da DFS, DDFS e OS, para o uso de letrozol após 5 anos de tamoxifeno, com o placebo <sup>[30]</sup>. ..... 58

## 1. RESUMO/ABSTRACT

### *RESUMO*

Entre as doenças oncológicas, o carcinoma da mama apresenta uma elevada percentagem de diagnóstico entre as mulheres, em todo o mundo. Em 2008, cerca de 1,38 milhões de novos casos de carcinoma da mama foram diagnosticados. As taxas de incidência desta patologia são mais elevadas na Europa Ocidental e menores na África Central e Oriental [1].

O carcinoma da mama é bastante complexo e multifatorial, o que leva a uma variação significativa na terapêutica escolhida, no tempo de recorrência (TTBR), na sobrevida sem doença (DFS), na sobrevida sem recidivas (RFS) e na sobrevivência global (OS) do doente [2].

O tamoxifeno continua a ser um fármaco importante no tratamento e prevenção do carcinoma da mama dependente de regulação hormonal, pelo facto de ser um Modelador Seletivo dos Recetores de Estrogénio (MSRE) [3,4]. A sua eficácia depende da ativação metabólica deste pró-fármaco, predominantemente via citocromo P450 2D6, nos metabolitos ativos endoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno [3,5]. A atividade do CYP2D6 pode ser reduzida em função da presença de variantes genéticas ou de fármacos inibidores do enzima, o que leva a uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos dos metabolitos ativos [3,5].

As interações medicamentosas são um dos principais problemas da terapêutica com tamoxifeno, nomeadamente, em situações onde são coadministrados inibidores do CYP2D6, como é o caso dos ISRSs muito usados em doentes com carcinoma da mama [4,5].

A implementação da terapêutica individualizada é difícil, pelo facto de existir variabilidade interindividual na eficácia e na toxicidade do fármaco. O tamoxifeno tem vários efeitos adversos, que incluem eventos vasculares trombóticos e risco de carcinoma do endométrio [4]. A realização de testes de genotipagem prévios ao tratamento é importante para rastrear os doentes que não apresentarão resposta efetiva ao fármaco, tendo, assim, uma menor probabilidade de sobrevivência [6].

**PALAVRAS-CHAVE:** Carcinoma da mama; tamoxifeno; variabilidade genética; inibidores do CYP2D6; testes de genotipagem;

**ABSTRACT**

Among oncologic diseases, breast cancer has a high percentage of diagnosis in women, in the world. In 2008, about 1.38 million new cases of breast cancer were diagnosed. The incidence of the disease is higher in Western Europe and lower in Middle and Eastern Africa [1].

Breast cancer is very complex and multifactorial, which leads to a significant variation in the chosen therapy, the time to breast recurrence (TTBR), disease-free survival (DFS), relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) of patients [2].

Tamoxifen remains an important drug in the treatment and prevention of steroid hormone receptor positive breast cancer, by being an estrogen receptor selective modulator [3,4]. Its effectiveness depends on the metabolic activation predominantly via cytochrome P450 2D6, for the formation of active metabolites 4-hydroxytamoxifen and endoxifen [3,5]. The activity of CYP2D6 may be reduced due to the presence of genetic variants or inhibitors of the enzyme, which leads to a significant decrease in plasma levels of active metabolites [3,5].

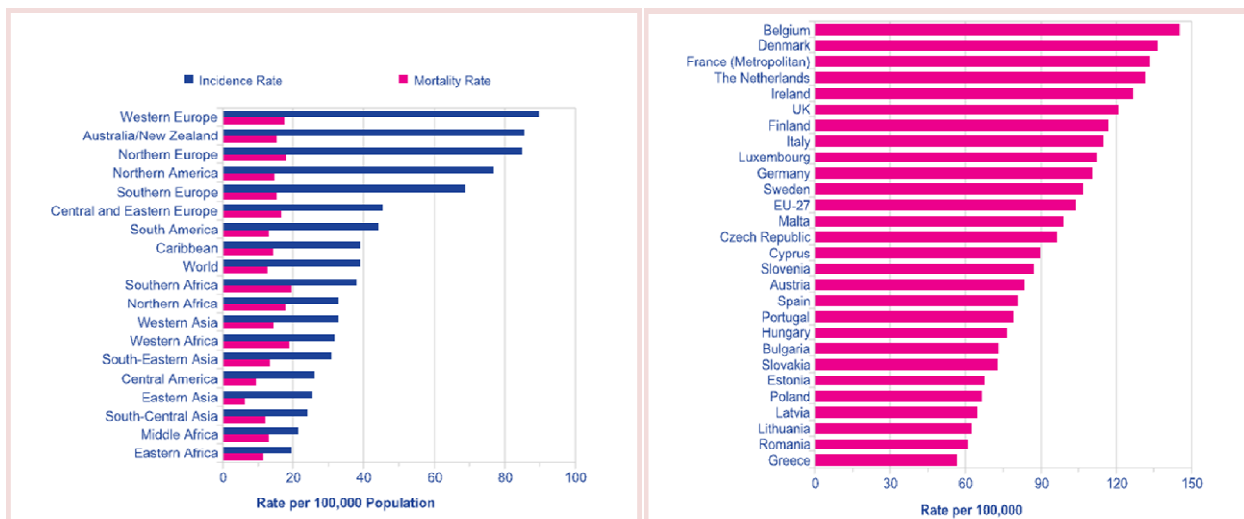
Drug interactions are a major problem of treatment with tamoxifen, particularly in situations where they are co-administered inhibitors of CYP2D6, such as selective inhibitors of serotonin reuptake often used in patients with breast cancer [4,5].

The implementation of individualized therapy is complicated by the fact that there is interindividual variability in efficacy and toxicity of the drug. Tamoxifen has various adverse effects, including thrombotic vascular events and the risk of endometrial carcinoma [4]. Genotype testing prior to treatment is important to identify patients who will not present an effective response to the drug, and thus have a lower probability of survival [6].

**KEYWORDS:** Breast cancer, tamoxifen, genetic variability; inhibitors of CYP2D6; testing of genotyping;

## 2. INTRODUÇÃO

Entre as doenças oncológicas, o carcinoma da mama apresenta uma elevada percentagem de diagnóstico entre as mulheres, em todo o mundo. Em 2008, cerca de 1,38 milhões de novos casos de carcinoma da mama foram diagnosticados. As taxas de incidência desta patologia são mais elevadas na Europa Ocidental e menores na África Central e Oriental, segundo dados de 2008 (figura 1) <sup>[1]</sup>.



**Figura 1** - Taxas de incidência do carcinoma da mama feminino em diversas regiões do mundo, com idade padronizada (50 anos), 2008 <sup>[1]</sup>.

**Figura 2** - Taxas de incidência do carcinoma da mama feminino nos 27 países da Europa, com idade padronizada (50 anos), 2008 <sup>[1]</sup>.

Dentro dos 27 países da União Europeia, a taxa de incidência estimada em 2008 para o carcinoma da mama foi mais elevada na Bélgica (cerca de 145 casos por 100.000 habitantes), enquanto que a menor taxa de incidência da Europa verificou-se na Grécia (cerca de 57 casos por 100.000 habitantes). Portugal ficou no décimo nono lugar (figura 2) <sup>[1]</sup>.

A mama é uma glândula secretora constituída por lóbulos, ductos e estroma. Cada mama encontra-se dividida em 15 a 20 secções, os chamados lobos, que por sua vez, são constituídos por inúmeros lóbulos, onde se encontram as células que produzem o leite. O leite flui dos lóbulos, até ao mamilo, através de canais finos, os ductos. O estroma separa a glândula entre a pele e a parede torácica, sendo constituído por tecido adiposo e tecido conjuntivo, que rodeia e suporta os ductos, lóbulos, vasos sanguíneos e linfáticos. O mamilo situa-se no centro da aréola (figura 3) <sup>[7]</sup>.

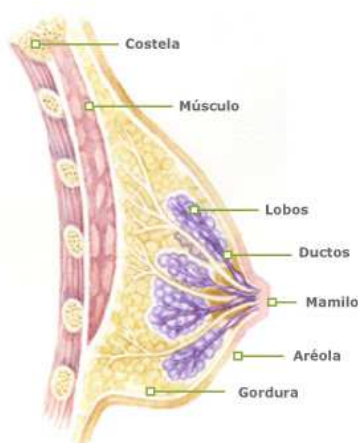


Figura 3 - Imagem ilustrativa da morfologia da mama feminina <sup>[7]</sup>.

O nosso organismo é constituído por muitos milhões de células que se reproduzem pelo processo de divisão celular. Em condições normais, este é um processo ordenado e controlado, responsável pela formação, crescimento e regeneração dos tecidos saudáveis do corpo. No entanto, quando as células perdem a capacidade de regular o seu crescimento e divisão, passando a multiplicar-se muito rapidamente e de forma aleatória, ocorre a formação de um conjunto de células genomicamente iguais, que poderão levar à formação de um tumor <sup>[8]</sup>.

A causa principal de morte no carcinoma da mama não é o tumor primário por si, mas as metástases nos órgãos e tecidos distantes. As metástases são responsáveis por mais de 90% das mortes nesta patologia. Milhões de células são liberadas a partir do tumor primário para a circulação sanguínea diariamente, mas apenas uma pequena minoria dessas células sobrevive e coloniza os órgãos distantes. As células cancerígenas são organizadas segundo uma determinada hierarquia: células iniciadoras de tumores (T-ICs), células cancerígenas e células diferenciadas. As T-ICs apresentam propriedades semelhantes às células estaminais, não sendo apenas a fonte do tumor primário, mas também são responsáveis pelo crescimento do tumor, metástases e recidivas <sup>[9]</sup>.

É fulcral que seja feita a deteção e o diagnóstico da doença num estadio precoce, para que a taxa de cura seja consideravelmente elevada. Desde a segunda metade do século XX, a taxa de incidência do carcinoma da mama tem vindo a aumentar, sobretudo nos chamados países desenvolvidos. Esta doença também ocorre nos homens, embora apresente uma incidência e prevalência muito inferior (1 homem para cada 100 mulheres com carcinoma da mama) <sup>[10]</sup>.

Em geral, o carcinoma da mama apresenta uma evolução lenta, podendo ser detetado em fases iniciais de desenvolvimento, antes de ser palpável <sup>[11]</sup>.

Existem diversos tipos de carcinoma da mama, que apresentam características específicas, bem como prognósticos diferentes interindividualmente. Em função destas especificidades, os tratamentos disponíveis para cada tipo de carcinoma da mama poderão ser bastante particulares <sup>[12]</sup>.

A origem do carcinoma da mama é complexa e muitas vezes é multifatorial, sendo assim, estão identificados alguns fatores de risco para a doença, que não apresentam o mesmo grau de importância. Os fatores *major* são aqueles que aumentam realmente o risco de um indivíduo vir a desenvolver carcinoma da mama (mais de duas vezes o risco da população geral), os fatores de risco *minor* são aqueles em que o aumento de risco é muito ligeiro. Dentro destes fatores, podemos ainda fazer uma diferenciação entre aqueles que são evitáveis/modificáveis e os que não o são, sendo inerentes ao doente <sup>[13]</sup>.

Os fatores de risco *major* incluem:

- Idade: a possibilidade de ter carcinoma da mama aumenta com a idade. A grande maioria dos diferentes tipos de carcinoma surge em pessoas com mais de 65 anos.
- História individual de carcinoma da mama: as mulheres que já tenham desenvolvido a doença, numa das mamas, tem maior risco de aparecimento da doença na outra mama.
- História familiar: o risco de ter carcinoma da mama aumenta quando há história familiar da doença.
- Alterações genéticas/mutações: existem alterações em determinados genes, como os genes *BRCA1*, *BRCA2*, entre outros, que aumentam o risco de aparecimento do carcinoma da mama. Estas alterações específicas podem ser detetadas através de testes genéticos. Este grupo de doentes representa uma percentagem muito restrita.
- Radioterapia na zona do peito: mulheres que tenham sido sujeitas a radiação frequente na zona do peito antes dos 30 anos <sup>[13,14]</sup>.

Os fatores de risco *minor* incluem:

- História menstrual prolongada: mulheres que tiveram a primeira menstruação em idade precoce (antes dos 12 anos), que tiveram uma menopausa tardia (depois dos 55 anos), ou que nunca tiveram filhos.

- Terapêutica hormonal de substituição: mulheres que fazem terapêutica hormonal de substituição, durante 5 ou mais anos após a menopausa.
- Etnia: o carcinoma da mama surge com maior frequência em mulheres caucasianas, comparativamente às mulheres latinas, asiáticas ou afro-americanas.
- Densidade do tecido mamário: mulheres mais maduras que têm, essencialmente, tecido conjuntivo na constituição mamária e baixa proporção de tecido adiposo.
- Obesidade depois da menopausa: mulheres obesas ou que têm grande aumento de peso, depois da menopausa.
- Exercício físico: mulheres que não praticam exercício físico regularmente têm maior risco, pois a acumulação de gordura no corpo pode aumentar a produção de estrogénios. Também a obesidade do tipo “pera”, na qual se acumula gordura em torno da cintura, acarreta maiores riscos.
- Consumo de bebidas alcoólicas: a ingestão de bebidas alcoólicas também é um risco [13,14].

Apesar de existir um vasto arsenal de terapêuticas eficazes no carcinoma da mama, muitas vezes verificam-se fenómenos de resistência, toxicidade, interações medicamentosas, respostas com variabilidade interindividual, entre outros, para os quais a farmacogenómica procura apresentar respostas [15].

A terapêutica hormonal adjuvante com tamoxifeno e IAs, os agentes de quimioterapia (antraciclina, taxanos, entre outros), e a terapêutica com base em alvos biológicos (trastuzumab, lapatinib, e bevacizumab), são exemplo da prática clínica onde ocorrem diferenças importantes na efetividade do tratamento, explicadas pelos conhecimentos da farmacogenómica [15].

O tamoxifeno é um fármaco que atua inibindo os recetores dos estrogénios presentes a nível intracelular, e desta forma, podem ocorrer variações no alvo terapêutico, que levem à ocorrência de processos de resistência ao fármaco, que irão colocar em causa a efetividade do tratamento [15].

Ao contrário dos recetores encontrados na superfície da célula, os recetores nucleares (RNs) são uma superfamília restrita para os organismos metazoários, tais como os nemátodos, insetos, e vertebrados. Estas proteínas são fatores da transcrição intracelular, que diretamente regulam a expressão de genes, em resposta a moléculas que são seus ligandos. Eles regulam uma grande variedade de funções, incluindo o metabolismo de ácidos gordos, o

desenvolvimento reprodutivo e processos de eliminação de substâncias estranhas. Muitos dos RNs atuam como fatores de transcrição indutíveis por ligandos, respondendo aos produtos químicos endógenos e exógenos que entram na célula. A classificação inicial destes recetores baseou-se nos seus ligandos, nas propriedades de ligação ao DNA ou na sua caracterização funcional. Uma classificação mais sistemática tem sido proposta, com base na similaridade da sua sequência genómica, assim como a utilizada para os citocromos P450s. A análise filogenética mostrou existirem seis subfamílias. Porém, a maioria dos RNs tem uma estrutura base similar, sendo a região mais conservada o domínio de ligação ao DNA <sup>[16]</sup>.

O RE faz parte da família de recetores nucleares, atuando como fator de transcrição, e apresenta duas isoformas, RE $\alpha$  e RE $\beta$ . A ligação do estradiol (E2) ao RE induz uma mudança na sua conformação, que permite libertá-lo a partir de um complexo inibitório, e induz a sua dimerização <sup>[17]</sup>. Cerca de 5-10% dos RE $\alpha$  celulares estão localizados perto da membrana citoplasmática. Estes podem ativar os recetores de superfície (por exemplo, o recetor do factor de crescimento epidérmico (EGFR), o recetor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), o recetor 1 para os factores de crescimento *insulina-like* (IGF-1R)) ou os recetores acoplados à proteína G, que induzem um sinal através de vias de transdução clássicas, incluindo a PI3K/Akt/mTOR e Ras/Raf/MEK/ERK <sup>[18]</sup>.

### 3. CARCINOMA DA MAMA

A caracterização do carcinoma da mama engloba primeiramente três fatores essenciais, a dimensão ou volume do tumor, a presença de células tumorais nos nódulos linfáticos regionais e a presença de metástases à distância. Será o cruzamento entre estes fatores que permite aferir o estadio da doença. Assim, quanto à dimensão do tumor, segue-se a chamada classificação T, segundo a qual o tumor é considerado como:

- TX – o tumor primário não pode ser avaliado.
- T0 – não existem evidências de tumor primário.
- Tis – presença de carcinoma *in situ*.
  - Tis (DCIS) – carcinoma ductal *in situ*.
  - Tis (LCIS) – carcinoma lobular *in situ*.
  - Tis (Paget's) – doença de Paget's subjacente ao parênquima da mama.
- T1 – tumor com  $\leq 20$  mm, para a sua dimensão maior.
- T2 – tumor  $> 20$  mm e  $\leq 50$  mm, para a sua dimensão maior.
- T3 – tumor  $> 50$  mm, para a dimensão maior.
- T4 – tumor com qualquer tamanho que tenha uma extensão direta para a parede torácica ou para a pele (ulceração ou nódulos na pele).

No que se refere à presença de células tumorais nos nódulos linfáticos regionais, o carcinoma da mama pode ser classificado tendo em conta os resultados de exames clínicos e imagiológicos. Assim, as possíveis classificações são:

- NX – nódulo linfático regional não pode ser avaliado.
- N0 – não existem metástases no nódulo linfático regional.
- N1 – metástase(s) nos níveis I e II, ipsilateral(s) no nódulo linfático axilar.
- N2 – metástase(s) nos níveis I e II, ipsilateral(s) no nódulo linfático axilar de forma fixa.
- N3 – metástase(s) no nível III, ipsilateral(s) intraclavicular(s) no nódulo linfático axilar.

Em relação à presença de metástase à distância, o carcinoma da mama é caracterizado segundo os seguintes indicadores:

- M0 – não existem evidências radiográficas ou clínicas de metástases à distância.

- cM0(I+) – não existem evidências radiográficas ou clínicas de metástases à distância, mas são detetados depósitos ou células tumorais em circulação, na medula óssea ou noutra local, que não seja nos nódulos linfáticos regionais, e que não tenha mais que 0,2 mm.
- M1 – deteção de metástases à distância, com mais de 0,2 mm.

Desta forma, o carcinoma da mama é caracterizado em quatro estadios diferentes, dos quais o estadio I, II e III apresentam subestadios, tendo em linha de conta o cruzamento das três variáveis acima referenciadas, como se encontra de forma resumida na figura 4 <sup>[19]</sup>.

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS							* T1 includes T1mi	
Stage 0	Tis	N0	M0	Stage IIIA	T0	N2	M0	** T0 and T1 tumors with nodal micrometastases only are excluded from Stage IIA and are classified Stage IB.
Stage IA	T1*	N0	M0		T1*	N2	M0	• M0 includes M0(i+).
Stage IB	T0	N1mi	M0		T2	N2	M0	• The designation pM0 is not valid; any M0 should be clinical.
	T1*	N1mi	M0		T3	N1	M0	• If a patient presents with M1 prior to neoadjuvant systemic therapy, the stage is considered Stage IV and remains Stage IV regardless of response to neoadjuvant therapy.
Stage IIA	T0	N1**	M0		T3	N2	M0	• Stage designation may be changed if postsurgical imaging studies reveal the presence of distant metastases, provided that the studies are carried out within 4 months of diagnosis in the absence of disease progression and provided that the patient has not received neoadjuvant therapy.
	T1*	N1**	M0	Stage IIIB	T4	N0	M0	• Postneoadjuvant therapy is designated with "yc" or "yp" prefix. Of note, no stage group is assigned if there is a complete pathologic response (CR) to neoadjuvant therapy, for example, ypT0ypN0cM0.
	T2	N0	M0		T4	N1	M0	
Stage IIB	T2	N1	M0		T4	N2	M0	
	T3	N0	M0	Stage IIIC	Any T	N3	M0	
				Stage IV	Any T	Any N	M1	

Figura 4 - Esquema resumo dos diferentes estadios do carcinoma da mama, tendo em conta os fatores T, N e M <sup>[19]</sup>.

### 3.1. TIPOS DE CARCINOMA DA MAMA

A grande maioria dos carcinomas da mama tem origem nos ductos ou nos lóbulos da mama. Os dois tipos mais frequentes são o carcinoma ductal e o carcinoma lobular <sup>[20]</sup>.

O termo *in situ* está associado ao carcinoma da mama precoce, quando as células tumorais se encontram apenas presentes nos ductos ou nos lóbulos, sem que haja invasão dos tecidos mamários vizinhos ou de outros órgãos <sup>[21]</sup>.

O termo carcinoma refere-se a qualquer tipo de cancro que começa na pele, ou noutros tecidos que cubram os órgãos internos, tais como o tecido mamário <sup>[20,21]</sup>.

#### 3.1.1. CARCINOMA DUCTAL *IN-SITU* (CDIS)

O Carcinoma ductal *in situ* (CDSI) é o mais comum dentro dos carcinomas da mama não invasivos. O substantivo ductal significa que a origem das células tumorais se encontra a

nível dos ductos da mama. O CDIS é não invasivo, porque não afeta qualquer outro tecido mamário adjacente, para além dos ductos.

Praticamente todas as mulheres com CDIS podem ser tratadas e curadas. A mamografia é o melhor método para diagnosticar o carcinoma da mama nesta fase precoce <sup>[20,21]</sup>.

### **3.1.2. CARCINOMA LOBULAR *IN-SITU* (CLIS)**

O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) é um tipo de carcinoma da mama onde se verifica o crescimento de células atípicas ao nível dos lóbulos, e que acarreta um risco elevado de o doente vir a desenvolver, mais tarde, carcinoma de mama invasivo <sup>[20]</sup>.

Apesar do facto de se utilizar o termo carcinoma, o CLIS não é um verdadeiro carcinoma da mama. O diagnóstico do CLIS é uma indicação de que o indivíduo tem maior probabilidade de desenvolver a doença, em relação à média da população. Por esta razão, alguns especialistas preferem utilizar o termo "neoplasia lobular" em vez de "carcinoma lobular." A neoplasia refere-se no fundo à presença de um conjunto de células atípicas. O CLIS é geralmente diagnosticado antes da menopausa, mais frequentemente entre os 40 e 50 anos, e é extremamente raro nos homens <sup>[21]</sup>.

### **3.1.3. CARCINOMA DUCTAL INVASIVO (CDI)**

O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tipo de carcinoma de mama mais comum. Cerca de 80% de todos os carcinomas de mama invasivos são carcinomas ductais. Com o tempo, o CDI pode afetar os nódulos linfáticos e, eventualmente, outros tecidos do corpo. Embora este tipo de carcinoma possa surgir em qualquer idade, são as mulheres com uma idade mais madura que mais são diagnosticadas com esta patologia, sendo também comum nos homens <sup>[20,21]</sup>.

### **3.1.4. CARCINOMA LOBULAR INVASIVO (CLI)**

O Carcinoma lobular invasivo (CLI) é o segundo tipo de carcinoma da mama mais comum, após o CDI. Cerca de 10% de todos os carcinomas da mama invasivos são carcinomas lobulares. À semelhança do caso acima descrito, as células tumorais podem atingir os nódulos linfáticos regionais, e também, outros tecidos do organismo, e é mais comum em mulheres com idade avançada <sup>[20]</sup>.

É diferente do carcinoma ductal, porque a sua imagem na mamografia é mais difícil de aferir, apresentando vários nódulos no tecido mamário. Neste tipo de carcinoma utiliza-se a ressonância magnética da mama, para obter uma melhor caracterização <sup>[20,21]</sup>.

### 3.1.5. CARCINOMA INFLAMATÓRIO

O carcinoma da mama inflamatório é uma forma rara e agressiva desta doença. Cerca de 1-5% de todos os casos da patologia nos Estados Unidos são deste tipo. Este carcinoma inicia-se normalmente com uma vermelhidão e inchaço na mama, e tende a crescer e a metastisar rapidamente. É importante reconhecer os sintomas e procurar um tratamento imediato, pois este tipo de carcinoma progride muito velozmente. Segundo a Sociedade Americana do Cancro (ASCO), o carcinoma da mama inflamatório é mais comum em mulheres afro-americanas <sup>[20]</sup>.

### 3.1.6. CARCINOMA TUBULAR

O Carcinoma tubular da mama é um subtipo de CDI, onde a massa tumoral se apresenta, normalmente, em forma de tubo e é de dimensões pequenas (cerca de 1 cm ou menos). Este tipo de carcinoma tende a ser pouco agressivo, as células tumorais são semelhantes às células saudáveis, tendo, assim, um crescimento lento. Ao mesmo tempo, os carcinomas tubulares representavam cerca de 1-4% de todos os carcinomas da mama <sup>[20]</sup>.

### 3.1.7. CARCINOMA MEDULAR

O carcinoma medular da mama é um subtipo raro de CDI, responsável por cerca de 3-5% de todos os casos de carcinoma da mama. O termo medular está relacionado com o facto de, o tumor se apresentar como uma massa macia e carnuda que se assemelha à medula. O carcinoma medular pode ocorrer em qualquer idade, mas geralmente afeta as mulheres entre os 40 e 50 anos. Esta patologia é mais comum em doentes que apresentam a mutação *BRCA1*. Este tipo de carcinoma não cresce rapidamente e, geralmente, não metastisa para além dos gânglios linfáticos. Por esta razão, é normalmente mais fácil de tratar do que outros tipos de carcinomas da mama <sup>[20]</sup>.

### 3.1.8. CARCINOMA MUCINOSO

O Carcinoma mucinoso da mama, também designado por carcinoma colóide, é uma forma rara de CDI. Neste tipo de carcinoma, o tumor é constituído por células alteradas que se encontram sobre uma espécie de muco, pois a maioria das células tumorais da mama produzem algum muco. Apenas cerca de 2-3% dos carcinomas da mama invasivos são carcinomas mucinosos verdadeiramente. Este tipo de doença é extremamente raro nos

homens. Embora o carcinoma mucinoso possa ser diagnosticado em qualquer idade, tende a afetar com maior prevalência as mulheres na fase pós-menopausa [20].

### **3.1.9. CARCINOMA PAPILAR**

O carcinoma papilar da mama é raro, representando menos de 1-2% dos carcinomas da mama invasivos. Na maioria dos casos, este tipo de tumores são diagnosticados em mulheres numa fase pós-menopausa. Este tipo de carcinoma invasivo geralmente apresenta um bordo bem definido, que por sua vez é composto por pequenos dedos/projeções, semelhantes entre si. Na maioria dos casos de carcinoma papilar invasivo, o CDIS também está presente [20].

### **3.1.10. DOENÇA DE PAGET**

A Doença de Paget do mamilo é uma forma rara de carcinoma de mama, na qual as células tumorais estão colocadas numa posição colateral ou em torno do mamilo. As mudanças incomuns no mamilo e na aréola são muitas vezes o primeiro indício de que a patologia está presente. A etiologia da doença ainda não é clara, mas pensa-se que as células tumorais começam a crescer dentro dos ductos, e depois migram para a superfície do mamilo [20,22].

## **3.2. DIAGNÓSTICO DO CARCINOMA DA MAMA**

Em função da presença ou ausência dos fatores de risco associados à doença, é necessário realizar exames de rotina para avaliar a existência da patologia. Apenas desta forma poderá haver uma detecção precoce, aumentando a probabilidade de sucesso do tratamento [23].

Existem vários tipos de métodos de diagnóstico, que na prática clínica permitem complementar a informação que vai sendo recolhida e caracterizar efetivamente o tipo de carcinoma da mama em questão [24].

O auto exame da mama não é considerado um método de diagnóstico, pois sendo efetuado pelo doente, não há evidências quanto à fiabilidade desta prática. No entanto, o exame clínico da mama, realizado por um clínico especialista, já apresenta algum carácter como forma de diagnóstico da patologia [24].

Todavia, a mamografia é o método de diagnóstico por excelência para a detecção do carcinoma da mama em estadios precoces. Atualmente, recomenda-se que mulheres a partir dos

40 anos devam fazer uma mamografia anual, ou em cada dois anos, e mulheres com risco aumentado para a patologia devem fazer a primeira mamografia aos 35 anos (ou antes dependendo da idade em que familiares próximos desenvolveram a doença). A mamografia é um método de diagnóstico que utiliza doses baixas de radiação, permitindo a detecção de lesões, com grande precisão, e aproximadamente 1 a 2 anos antes de serem palpáveis <sup>[25]</sup>.

Qualquer alteração visível na mamografia que suscite dúvidas deverá ser avaliada através de uma ecografia mamária <sup>[25]</sup>.

Após a avaliação dos resultados obtidos nos primeiros exames, poderá ser necessário a realização de uma biópsia. A biópsia é, na realidade, o único processo através do qual se podem aferir as conclusões definitivas, quanto à existência do carcinoma da mama <sup>[26]</sup>.

### 3.2.1. BIÓPSIA

A biópsia é um método de diagnóstico que consiste na recolha de uma amostra de tecido ou líquido da mama, para poder ser analisada num laboratório especializado. Mesmo que o nódulo seja palpável, a biópsia deve ser feita preferencialmente sob controlo ecográfico. Existem vários tipos de técnicas que podem ser aplicadas na realização de uma biópsia mamária <sup>[26]</sup>.

Os resultados desta análise permitem conhecer e caracterizar melhor o tipo de carcinoma, o que, conseqüentemente, determina o tipo de tratamento a implementar. Os vários testes que se realizam sobre a amostra recolhida incluem a pesquisa de:

- Recetores hormonais: esta informação é relevante para saber se as células cancerígenas necessitam de hormonas endógenas (estrogénios ou progesterona) para proliferarem. Os resultados podem condicionar a escolha e planeamento do tratamento. A pesquisa destes recetores é feita por ensaios imunohistoquímicos <sup>[27]</sup>.
- Recetor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2): este recetor existe na membrana das células tumorais, e num quadro de sobreexpressão, corresponde a um tipo específico de carcinoma da mama, o HER2+. O carcinoma da mama HER2+ está associado a uma maior agressividade da doença. No entanto, já existem terapêuticas específicas para as células HER2+ <sup>[27]</sup>.

A determinação dos REs é sempre recomendada quando se trata do CDIS, e dos REs e RPs para todos os tipos de carcinoma invasivos, devendo ser repetida a análise a estes recetores para o local onde ocorre a primeira metastização, caso o resultado tenha sido anteriormente desconhecido ou negativo <sup>[17]</sup>.

Os resultados da determinação dos RHs apresentam uma variação interlaboratorial importante, que está muitas vezes relacionada com o uso de diversas metodologias e diferentes esquemas de interpretação para a avaliação do grau de relação destes recetores com as células tumorais. Segundo o National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Task Force, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e o College of American Pathologists (CAP), o carcinoma da mama que apresente pelo menos 1% de células tumorais positivas para os REs é considerado RE+ <sup>[17]</sup>.

A pesquisa de HER2 procede-se através da contagem do número de cópias do gene do HER2 por hibridação *in situ*, ou por um método complementar pelo qual a quantidade de HER2 presente na superfície das células é avaliada por técnicas imunohistoquímicas. A avaliação de HER2 por deteção do mRNA não é recomendada <sup>[17]</sup>.

### 3.2.2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA DA MAMA

A classificação mais comumente utilizada divide o carcinoma da mama em quatro grupos moleculares principais: o subtipo "basal-like", que é predominantemente RE-, RP-, e HER2-; o subtipo "HER2-like", caracterizado por um aumento da expressão do gene HER2, e em pelo menos dois subtipos "luminal-like", predominantemente RE+, chamados luminal A e B <sup>[28]</sup>.

Algumas alterações genéticas fundamentais foram identificadas, recentemente, que podem ter impacto na via de sinalização dos REs e na resposta à terapêutica endócrina. Estas alterações podem ocorrer nos REs, nos recetores de superfície (HER1, HER2, recetor 1 para os factores de crescimento *insulina-like* (IGFR-1), recetor 1 para os factores de crescimento dos fibroblastos (FGFR-1)), nas vias de sinalização da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e proteína cinase A ativadas por mitogénios (MAPK) e nos níveis de factores de transcrição (myc, ciclina D1) <sup>[28]</sup>.

As mutações no gene da subunidade alfa da fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase catalítica (PIK3CA) estão presentes em cerca de 26% dos carcinomas da mama, especialmente nos subtipos RE+ e HER2+. Uma sensibilidade aumentada ao tamoxifeno foi também observada em células mutantes para o PI3K. As mutações no AKT1 são observadas em 4% dos casos, e a amplificação do FGFR1 ocorre em cerca de 10% dos carcinomas, e tem sido associada a um mau prognóstico nos casos RE+. A sobreexpressão do c-Myc e da ciclina D1 ocorre em 38% e 45% dos doentes, respetivamente, e tem sido associada com mecanismos de resistência ao tamoxifeno <sup>[28]</sup>.

## 4. TERAPÊUTICAS DO CARCINOMA DA MAMA

A componente central para o tratamento do carcinoma da mama passa pelo conhecimento da extensão da doença e das suas características biológicas. Estes fatores contribuem para a determinação do estadió da doença, permitindo estimar o risco associado à patologia e obter informação acerca da resposta à terapêutica (por exemplo, quando há evidências da presença de células tumorais que dependem dos RE e/ou RP, ou HER2) <sup>[19]</sup>.

Aproximadamente 70% dos carcinomas da mama são RE+, no momento do diagnóstico, e estes doentes, geralmente, beneficiam de tratamentos endócrinos, porque a proliferação é resultado da ação dos estrogénios, através dos REs <sup>[29]</sup>.

Todos os tipos de terapêuticas endócrinas, incluindo antagonistas dos REs, tais como os MSREs (tamoxifeno e raloxifeno) e o fulvestrante, vão inibir a sinalização intracelular dos estrogénios. No entanto, o benefício destas terapêuticas endócrinas é limitado pelo desenvolvimento de resistência, um processo que parece resultar da regulação positiva de um fator de crescimento e da proteína cinase, que fornecem um mecanismo alternativo para a proliferação e sobrevivência das células tumorais <sup>[29]</sup>.

Concetualmente, o tratamento para esta doença inclui uma ação local com cirurgia ou radioterapia, ou ambas, tratamento sistémico através de quimioterapia, terapêutica endócrina ou terapêutica biológica. Porém, a escolha de diferentes esquemas terapêuticos tem como base a presença ou ausência dos diversos fatores que podem estar associados em cada doente. Estes fatores incluem a histologia do tumor, características clínicas e patológicas do tumor primário, células tumorais RE+ e/ou HER2+, resultados de testes genéticos para múltiplos genes, presença ou ausência de metástases, comorbilidades do doente, idade e menopausa <sup>[19]</sup>.

O tratamento do carcinoma da mama divide-se em: terapêutica para carcinomas não invasivos (CLIS e CDIS); cirurgia para carcinomas invasivos na zona linfática regional com ou sem associação a carcinomas não invasivos (estádios I, II e IIIA); carcinomas invasivos na zona linfática regional inoperáveis com ou sem associação a carcinomas não invasivos (estádios IIIB, IIIC e alguns IIIA); carcinomas recorrentes ou metastáticos (estádio IV) <sup>[19]</sup>.

## **4.1. TERAPÊUTICA ADJUVANTE HORMONAL**

A terapêutica adjuvante hormonal é o tratamento padrão para o carcinoma da mama RH+, em estadio inicial. O tamoxifeno tem sido utilizado há várias décadas como terapêutica base, e os seus benefícios foram demonstrados em várias meta-análises. Num período mais recente os IAs tornaram-se o padrão do tratamento adjuvante para mulheres na pós-menopausa [30].

### **4.1.1. TERAPÊUTICA ADJUVANTE HORMONAL NA PRÉ-MENOPAUSA**

As diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) de 2010, recomendam o uso de tamoxifeno em mulheres na pré-menopausa, uma vez que os IAs são contraindicados em mulheres com função ovariana residual [30].

O National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomenda o uso de tamoxifeno durante 5 anos, com ou sem supressão ou ablação ovariana, se a doente se encontra na pré-menopausa no momento do diagnóstico. No final dos 5 anos, se a doente se encontrar numa fase pós-menopausa, o tratamento durante mais 5 anos com um IA deve ser considerado [19,30].

O Painel de Peritos St. Gallen (2011) recomenda o uso apenas de tamoxifeno, mas considera que a supressão ovariana juntamente com tamoxifeno é uma alternativa aceitável para as mulheres na pré-menopausa. Nas situações em que há contraindicação do uso de tamoxifeno, é recomendada a supressão da função ovariana juntamente com um IA.

A meta-análise mais recente do Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) confirmou os benefícios do uso de tamoxifeno, em mulheres com menos de 45 anos, para reduzir o risco de recidiva (HR = 0,63; P = 0,001) e mortalidade (HR = 0,71; P = 0,00002) [30].

### **4.1.2. TERAPÊUTICA ADJUVANTE HORMONAL NA PÓS-MENOPAUSA**

As orientações da ASCO, em 2010, referem que as mulheres diagnosticadas com carcinoma da mama RH+, após a menopausa, devem considerar a utilização de um IA quer como terapêutica inicial, quer como terapêutica sequencial (após 2 a 3 anos de tamoxifeno), ou ainda na terapêutica adjuvante mais longa (após 5 anos de tamoxifeno). Os dados disponíveis ainda não permitem definir o momento ideal para proceder à finalização do uso de tamoxifeno e iniciar com um IA [30].

As diretrizes do NCCN estão de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica. Se a doente se encontra na pós-menopausa no momento do diagnóstico, as opções incluem um IA durante 5 anos, ou o tamoxifeno durante 2 a 3 anos seguidos de um IA para completar 5 anos de tratamento, ou ainda um IA durante 2 a 3 anos seguido do tamoxifeno para completar 5 anos. Outra opção é o uso de tamoxifeno durante 4,5 a 6 anos, seguido por um IA durante mais 5 anos. Se a doente tem alguma contraindicação ou intolerância a um IA, o tamoxifeno durante 5 anos deve ser a opção considerada [19,30].

## 4.2. INIBIDORES DA AROMATASE

Como a própria designação sugere, estes fármacos atuam por inibição ou inativação da aromatase, enzima responsável pela última fase da síntese dos estrogénios, estrona e estradiol, a partir dos substratos androgénicos, androstenediona e testosterona, respetivamente (figura 5), de onde resulta uma marcada supressão das concentrações plasmáticas dos estrogénios [31,32].

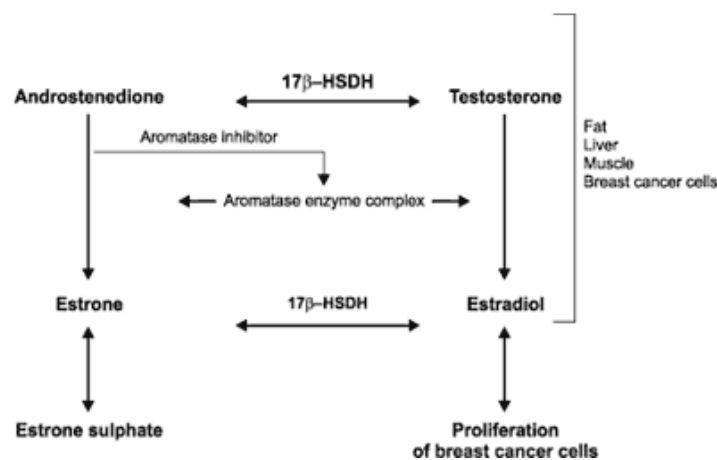


Figura 5 - Esquema representativo do mecanismo de biossíntese dos estrogénios [33].

Estes fármacos pertencem ao grupo farmacoterapêutico: 16.2.2.3 Medicamentos antineoplásicos e imunomoduladores. Hormonas e anti-hormonas. Anti-hormonas. Inibidores da Aromatase [34].

A enzima aromatase pertence à superfamília dos citocromos P450s, e é codificada pelo gene CYP19. Existe em grande concentração na placenta e nos folículos dos ovários, e em concentrações mais baixas no tecido adiposo subcutâneo, no fígado, músculo, cérebro e mama. No carcinoma da mama, em doentes no período de pós-menopausa, a concentração de

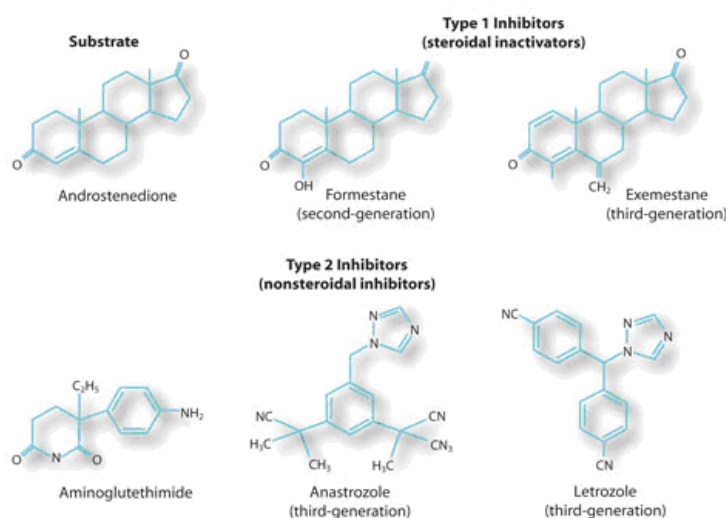
estradiol intracelular é 10 vezes superior à do plasma, provavelmente devido à existência de aromatase intratumoral [31].

#### 4.2.1. TIPOS DE INIBIDORES DA AROMATASE

Os inibidores da aromatase de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> geração são divididos em dois tipos de classes, os esteróides (tipo 1) e não esteróides (tipo 2). Os do tipo 1, também designados como suicidas, são análogos da androstenediona, que se ligam ao centro ativo da aromatase, mas de um modo irreversível, atuando como inativadores enzimáticos. A ligação covalente à aromatase é feita através de uma hidroxilação. Os do tipo 2 são imidazóis ou triazóis, que se ligam preferencialmente, de um modo reversível, à enzima, através da ligação ao átomo de ferro do grupo heme com o anel azólico dos inibidores da aromatase. A eficácia destes inibidores depende, portanto, das concentrações e afinidade entre a enzima e o inibidor [31,32].

A aminoglutetimida pertence à 1<sup>a</sup> geração, é menos potente, apresenta reações adversas por vezes limitantes e não apresenta estrutura esteróide. Como exemplos de inibidores de 2<sup>a</sup> geração dos tipos 1 e 2 temos o formestano e o fadrozol, respetivamente. O seu uso clínico é controverso devido a reações adversas significativas, tais como, *rash*, náuseas e supressão mineralocorticóide [31,32].

A 3<sup>a</sup> geração de inibidores é, sem dúvida, a mais aplicada na prática clínica, sendo desprovida de efeitos sobre as concentrações basais de cortisol e aldosterona. Nela se incluem o exemestano (tipo 1) e o letrozol e anastrozol (tipo 2), cujas estruturas químicas estão na figura 6 [31,32].



Source: Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:2431-2442. Copyright © 2003 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Figura 6 - Estruturas químicas dos IA do tipo 1 e tipo 2 [32].

#### 4.2.2. REAÇÕES ADVERSAS DOS IAS

Em comparação com o tamoxifeno, os IAs têm um perfil de toxicidade distinto (tabela 1). Este facto foi demonstrado numa meta-análise de sete estudos randomizados de fase III, que incluiu 30.023 doentes, onde se verificou uma diminuição da incidência de eventos de tromboembolismo venoso e carcinoma do endométrio, em doentes que tomavam IAs, em comparação com o tamoxifeno. No entanto, o risco de doença cardiovascular foi aumentado em doentes a tomar IAs, o que pode parecer contraditório, pelo facto de o tamoxifeno poder reduzir a ocorrência de eventos cardiovasculares. Porém, um dos fatores que pode afetar o risco de eventos cardiovasculares está relacionado com o estado de hipercolesterolemia do indivíduo, havendo uma maior incidência de hipercolesterolemia em doentes que tomam IAs. A taxa de fraturas ósseas encontrava-se aumentada nos doentes que receberam letrozol, em comparação aos que tomaram tamoxifeno (3,1% vs 5,2%,  $P = 0,02$ ), tal como a taxa de osteoporose recentemente diagnosticada (1,6% vs 5,3%;  $P < 0,0001$ ). Os efeitos colaterais mais comuns observados com IAs são, também, mialgias e artralguas. No ensaio Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination (ATAC), 27,8% das mulheres que receberam anastrozol relataram lesões músculo-esqueléticas, em comparação com 21,3% daquelas que receberam tamoxifeno. Os IAs aceleram, também, a perda óssea em mulheres na pós-menopausa <sup>[30]</sup>.

Adverse Effect	OR	P Value	95% CI	Absolute Incidence With Als	Absolute Incidence With Tamoxifen
Venous thromboembolism	0.55	$P < .001$	0.46–0.64	1.6%	2.8%
Endometrial cancer	0.34	$P < .001$	0.22–0.53	0.1%	0.5%
Cardiovascular disease	1.30	$P = .01$	1.06–1.61	4.2%	3.4%
Hypercholesterolemia	2.36	$P < .001$	2.15–2.60		

AI = aromatase inhibitor; CI = confidence interval; OR = odds ratio.

**Tabela 1** - Efeitos adversos comuns e não comuns na terapêutica com IAs, em comparação com tamoxifeno <sup>[30]</sup>.

Os eventos adversos dos IAs incluem, ainda, sintomas vasomotores, secreta vaginal, depressão, desconforto gastrointestinal, ganho de peso e alteração dos níveis lipídicos, para valores elevados. A perda óssea é um efeito colateral predominante, e os bisfosfonatos, tais como ácido alendrónico, têm sido utilizados para contrariar este efeito. Os doentes devem fazer um suplemento de vitamina D e de cálcio. Este grupo terapêutico está contraindicado em mulheres grávidas <sup>[32]</sup>.

### 4.2.3. ESQUEMAS TERAPÊUTICOS COM IAS

Os IAs devem ser considerados em doentes com carcinoma da mama RH+, num estadio inicial, podendo ser utilizados segundo três regimes terapêuticos diferentes: (1) regime inicial: tratamento com um IA durante 5 anos, (2) regime sequencial: utilização de tamoxifeno, durante 2 a 3 anos, seguido por um IA para completar 5 anos de tratamento, (3) regime adjuvante prolongado: utilização de um IA durante 5 anos, após 5 anos de tamoxifeno <sup>[30]</sup>.

## 4.3. TAMOXIFENO

O tamoxifeno tem sido a terapêutica hormonal padrão no tratamento do carcinoma da mama RE+, há mais de 30 anos <sup>[30]</sup>.

Este fármaco pertence ao grupo farmacoterapêutico: 16.2.2.1 Medicamentos antineoplásicos e imunomoduladores. Hormonas e anti-hormonas. Anti-hormonas. Antiestrogénios. O tamoxifeno é considerado um fármaco não esteróide, cuja estrutura base é o núcleo trifeniletileno (figura 7), apresentando assim um espectro de efeitos farmacológicos complexo em diferentes tecidos, como antagonista e como agonista estrogénico. Nos doentes com carcinoma da mama, este atua primariamente como um antiestrogénio, evitando a ligação destas hormonas aos seus recetores <sup>[35,36]</sup>.

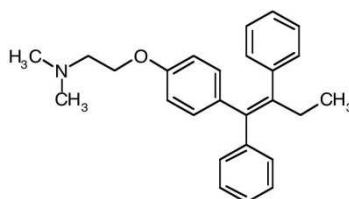


Figura 7 - Estrutura química do tamoxifeno <sup>[37]</sup>.

### 4.3.1. POSOLOGIA E MODO DE ADMINISTRAÇÃO

O tamoxifeno é utilizado em adultos num intervalo posológico de 20 a 40 mg, administrado em toma única diária, ou duas vezes por dia, via oral. A duração ótima da terapêutica com tamoxifeno é variável, em função das características da patologia e dos fatores associados ao doente. Nas crianças não se recomenda a utilização de tamoxifeno, visto que não foram estabelecidas a sua segurança nem eficácia <sup>[35]</sup>.

### 4.3.2. FARMACOCINÉTICA

O tamoxifeno é rapidamente absorvido via oral, atingindo as concentrações plasmáticas máximas ao fim de 4 – 7 horas, da sua administração. As concentrações no estado estacionário (cerca de 300 ng/ml) são atingidas ao fim de quatro semanas de tratamento com 40 mg diários. É importante também frisar que este fármaco liga-se fortemente à albumina sérica (> 99%).

A excreção do tamoxifeno ocorre principalmente pelas fezes, sendo a semivida de eliminação de, aproximadamente, 7 dias para o fármaco não metabolizado, e de 14 dias para o metabolito N-desmetiltamoxifeno [35].

### 4.3.3. MECANISMO DE AÇÃO

O tamoxifeno, tal como outros MSREs, liga-se aos REs presentes nas células da mama, antagonizando o efeito dos estrogénios sobre os mecanismos de regulação da expressão de diversos genes, associados à divisão celular. O efeito predominante do tamoxifeno é citostático, através do prolongamento do período G1 do ciclo celular, atrasando assim a proliferação celular [38].

Para entender o seu mecanismo de ação é fulcral conhecer a estrutura destes recetores nucleares. Existem dois REs funcionais, nomeadamente o RE $\alpha$  e o RE $\beta$ , que são codificados por genes diferentes. O gene humano do RE $\alpha$  está localizado no cromossoma 6q25. É composto por oito exões, separados por sete regiões intrónicas e abrange mais de 140 kb. O gene do RE $\beta$  está localizado no cromossoma 14q23-24.1, e é composto por oito exões que abrangem cerca de 40 kb. O RE $\beta$  é menor do que RE $\alpha$ , mas possui uma homologia considerável na região de ligação do DNA e no domínio de ligação dos ligandos [39].

No locus do gene do RE $\alpha$  existem vários sítios polimórficos. A estrutura do

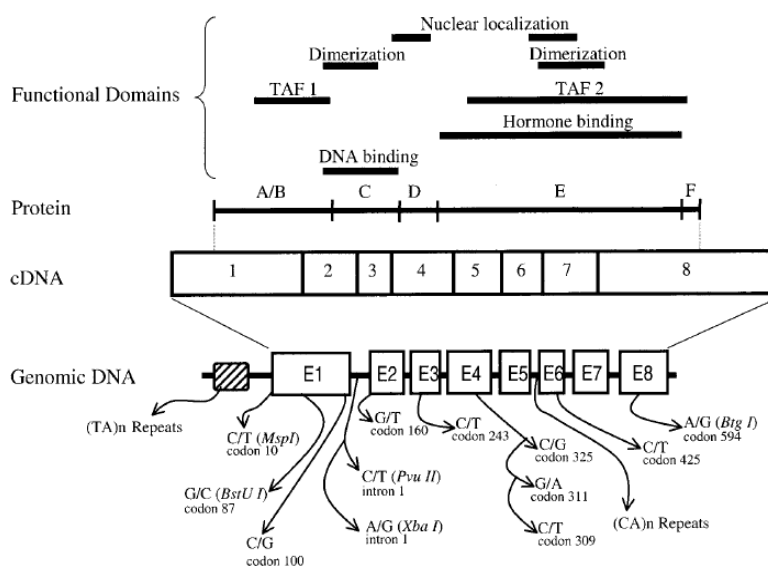


Figura 8 - Estrutura dos domínios funcionais e dos polimorfismos descritos para o gene do RE $\alpha$ . Os exões (E) são indicados com caixas. A região TAF tem como função a ativação da transcrição [39].

gene RE $\alpha$ , com as suas regiões polimórficas, está representada na figura 8. Os polimorfismos mais estudados são o *PvuII* (T397C) e o *XbaI* (C351G), que provocam uma alteração no comprimento do intrão 1, e a variação no número de repetições (TA), dentro da região do promotor do gene. Em diferentes estudos, estes polimorfismos têm sido associados a várias condições patológicas, como o carcinoma de mama e de próstata, osteoporose, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares. Os locais polimórficos *PvuII* e *XbaI* localizam-se numa zona intrónica, que é aparentemente uma área não funcional do gene, e como seria esperado para dois polimorfismos separados por 50 pares de bases, estão em desequilíbrio de *linkage*. Assim, os alelos P e X (ausência de locais de restrição), bem como os alelos p e x (presença de locais de restrição), estão fortemente associados um com o outro <sup>[39]</sup>.

O haplótipo pX não foi observado na maioria dos estudos, enquanto que, o haplótipo Px foi detetado, embora com baixa frequência, o que indica que o desequilíbrio de *linkage* não é completo, e que, ou a recombinação genética ou múltiplas mutações têm ocorrido entre estes genes <sup>[39]</sup>.

Recentemente, observou-se que a mutação T397C está associada com a perda do locus *PvuII* (alelo P), resultando num potencial sítio de ligação para fatores de transcrição MYB que, na presença de ligandos, são capazes de aumentar *in vitro* a transcrição de um *reporter* a jusante, cerca de 10 vezes. Assim, em algumas situações, a presença do alelo P poderia amplificar a transcrição do RE $\alpha$ . Uma explicação alternativa é a de que, os dois polimorfismos no intrão 1 possam estar em desequilíbrio de *linkage* com polimorfismos noutras partes do gene ou, menos provável, num gene adjacente. A este respeito, está bem estabelecido que os polimorfismos no intrão 1 estão em desequilíbrio de *linkage* com o polimorfismo no promotor do gene (variação do número de repetições (TA)). As frequências alélicas para o polimorfismo no número de repetições (TA) na região do promotor, e para os polimorfismos *PvuII* e *XbaI*, já têm sido estudadas, onde para o primeiro caso verificam-se diferenças entre as populações de ascendência europeia e asiática, com máximos de 14 e 15 repetições, respetivamente. Embora haja uma ligeira diferença étnica na distribuição dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI*, é importante considerá-las. As populações asiáticas mostraram um aumento na frequência do haplótipo Px, e menor frequência do haplótipo PX, em relação a populações caucasianas de ascendência europeia, enquanto que, o haplótipo px está presente com uma menor frequência na população africana <sup>[39]</sup>.

Em 1998, realizou-se a primeira caracterização da repetição dinucleotídica altamente polimórfica (CA), no intrão 5 do gene RE $\beta$ , numa população japonesa. Subsequentemente, foram detetadas outras mutações sistemáticas, que incluem três polimorfismos. O primeiro

trata-se de um polimorfismo silencioso (T1421C) no exão 7, o segundo também é um SNP silencioso (G1082A), que fica no domínio de ligação ao ligando, no exão 5, e o terceiro trata-se de um SNP (A1730G) na região 3' do gene, no exão 8. Embora a importância funcional desses polimorfismos não foi ainda esclarecida, as diferenças na sua distribuição alélica entre caucasianos e populações asiáticas têm sido descritas. Mais recentemente, cinco polimorfismos foram identificados numa população africana, três deles (C143T no exão 1, A566T no exão 2, e T1100G no exão 5) são SNPs silenciosos, enquanto os outros dois alteram a sequência de aminoácidos do recetor. Estes incluem o SNP A105G, no exão 1, e o SNP T1057G, no exão 5. Estas alterações estão presentes na figura 9 [39].

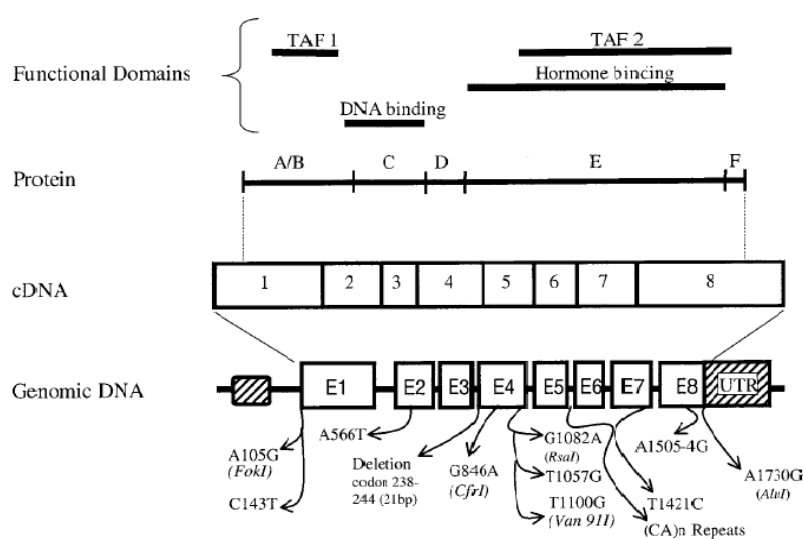


Figura 9 - Estrutura dos domínios funcionais e dos polimorfismos descritos para o gene *REβ*. Os exões codificantes (E) são indicados com caixas, e as zonas TAF têm função de ativação da transcrição [39].

assim, fornecer ou quantitativamente ou qualitativamente respostas diversas na expressão dos seus genes alvo. Da mesma forma, diferentes ligandos, que interagem com o mesmo recetor, podem induzir diferentes conformações estruturais no complexo recetor-ligando, e, assim, levar ao recrutamento de coativadores distintos, que, conseqüentemente, produzem alterações no padrão da expressão genética [40].

A estrutura base dos recetores de estrogénio inclui as zonas com funções de ativação (AFs), onde os coativadores se ligam ao recetor, o domínio de ligação ao DNA (DBD), que permite ao recetor ligar-se à sequência do gene alvo, o domínio de ligação do ligando (LBD), e ainda, uma zona que permite alguma flexibilidade ao recetor e aos complexos recetor-ligandos, para adquirir a conformação mais estável (*Hinge*). Os diferentes domínios destes recetores estão representados na figura 10 [40].

Durante vários anos acreditava-se que, um ligando indutor da transcrição atuava, simplesmente, através da deslocação do equilíbrio da conformação inativa do recetor, para a conformação ativa. Hoje sabe-se que, diferentes recetores que se ligam à mesma sequência genética podem recrutar coativadores distintos e,

Segundo o modelo clássico de ação dos estrogénios, o RE nuclear livre reside no núcleo das células alvo numa forma inativa. A ligação a um agonista, como o estradiol, altera as propriedades físico-químicas do RE, permitindo que o complexo recetor-ligando possa interagir com as sequências de DNA alvo, ao nível dos promotores dos genes responsivos. Assim, o complexo em causa regula a transcrição dos genes alvo, positiva ou negativamente [41].

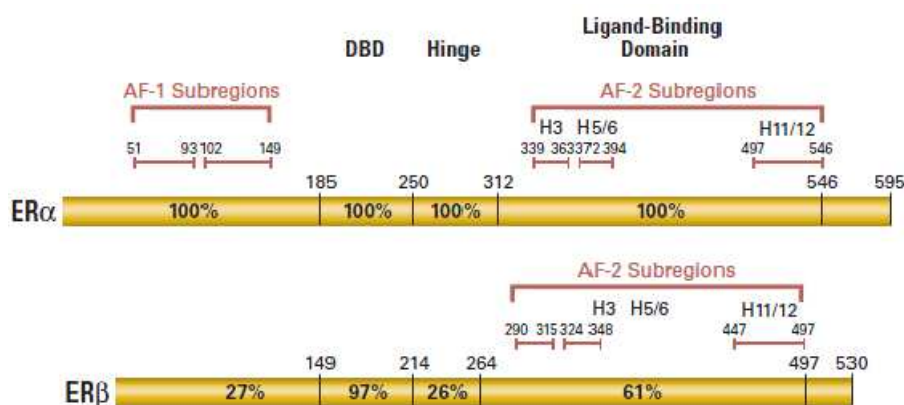


Figura 10 - Estrutura base dos REα e REβ, com os vários domínios identificados [40].

No entanto, pelo facto de se ter percebido que o tamoxifeno e outros MSREs têm uma atividade diferenciada, dentro de cada tecido específico (agonista ou antagonista), levou à constatação de que o modelo clássico era incompleto. A maior parte da farmacologia dos MSREs pode ser explicada por três mecanismos: expressão diferencial dos REs nos tecidos, conformação diferencial do complexo recetor-ligando, e expressão diferencial das proteínas correguladoras do RE. Por outro lado, as células alvo podem conter concentrações variáveis de homodímeros dos REβ e REα. O REα é sempre ativador da transcrição, enquanto, o REβ pode ser inativador. Assim, os níveis relativos de expressão destas duas isoformas de RE irão afetar a capacidade de resposta celular aos ligandos. O tamoxifeno funciona como antagonista puro quando atua através do REβ, podendo funcionar como agonista parcial quando atua sobre o REα [41].

Quando ocorre a ligação de um agonista, ou de um antagonista, ao RE (quer seja β ou α), este sofre uma alteração conformacional, que permite a sua dimerização e facilita a interação subsequente do dímero com elementos de resposta estrogénica (EREs), localizados nos genes alvo. O estrogénio e outras moléculas com efeito agonista facilitam a interação e o recrutamento de coativadores dos REs. Um antagonista do RE, por outro lado, interage preferencialmente com uma proteína corressora da transcrição. A ligação de diferentes

MSREs ao recetor permite adotar estados distintos conformacionais do complexo ligando-recetor, e assim, favorecer o recrutamento de correpressores ou coativadores. Segundo este modelo de ação, a atividade dos MSREs será influenciada pelos níveis relativos da expressão dos cofatores (correpressores e coativadores) nas células alvo <sup>[41]</sup>.

Na ausência do ligando, o RE fica alojado num complexo, que compreende o recetor e as proteínas HSP90, Hsp70, FKBP52/51, e possivelmente outras proteínas. A localização celular do presente complexo inativo é controversa, havendo evidências que pode ser citoplasmática ou nuclear, dependendo do tipo de célula. Como já foi dito, a consequência da ligação do ligando ao recetor é uma clara mudança conformacional na estrutura do recetor, que marca o início do processo de transdução de sinal. Assim, a ligação do ligando induz uma dissociação de proteína HSP90 e ocorre a libertação monomérica do recetor, a partir do complexo. Os REs atuam no DNA sob a forma de homodímeros, ao contrário do que sucede com a maioria dos outros recetores nucleares, que atuam sob a forma de heterodímeros <sup>[16]</sup>.

A ligação ocorre em função do potencial eletroestático do recetor, que permite atrair o ligando, e com a mudança conformacional do complexo, o ligando é impedido de sair. O complexo recetor-ligando tem que ser mais estável, do que ambos na forma inativa. O ligando torna-se parte integrante do núcleo hidrofóbico da região LBD. Esta modificação estrutural é diferente para ligandos que são agonistas totais, em comparação àqueles que são agonistas parciais ou antagonistas. Muito importante é, também, a acessibilidade ao domínio AF-2 para as proteínas recrutadas. O domínio AF-2 pode servir como um ativador da transcrição quando ativado, a partir das proteína recrutadas, e interagir com um domínio de ligação ao DNA <sup>[16]</sup>.

#### 4.3.4. REAÇÕES ADVERSAS

Os efeitos colaterais do tamoxifeno estão bem documentados em diversos estudos, como por exemplo o estudo National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 (NSABP P-1), que comparou o tamoxifeno com um placebo, em 13.000 mulheres com alto risco de desenvolver carcinoma de mama. As mulheres tratadas com tamoxifeno reportaram um aumento de afrontamentos, corrimento vaginal, e dificuldades em algumas

Adverse Effect	HR	95% CI
Pulmonary embolism	2.15	1.08–4.51
Deep venous thrombosis	1.44	0.91–2.30
Endometrial cancer	3.28	1.87–6.03
Bone fractures	0.68	0.51–0.92

CI = confidence interval; HR = hazard ratio; NSABP = National Adjuvant Surgical Breast and Bowel Project.

**Tabela 2** - Resultados dos efeitos adversos da terapêutica com tamoxifeno, em comparação a um placebo <sup>[30]</sup>.

áreas do funcionamento sexual. Não houve diferenças entre o tamoxifeno e o braço placebo no que diz respeito à depressão, à qualidade global física ou mental de vida, e ganho de peso. Os efeitos colaterais mais sérios incluíram embolia pulmonar, trombose venosa profunda, e carcinoma do endométrio (tabela 2). O tamoxifeno reduziu o risco de fraturas ósseas, e melhorou o perfil lipídico das doentes <sup>[30]</sup>.

## 5. A FARMACOGENÓMICA NA TERAPÊUTICA COM TAMOXIFENO

Um exemplo extremamente importante do impacto da farmacogenômica é o do tratamento adjuvante do carcinoma da mama com tamoxifeno. Vários estudos retrospectivos e prospectivos demonstraram um impacto significativo, do genótipo do CYP2D6, nas concentrações plasmáticas dos metabolitos ativos do tamoxifeno, e ao nível dos seus efeitos adversos <sup>[42]</sup>. Existem diferentes polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo e alvo terapêutico do tamoxifeno, que podem afetar a sua eficácia e segurança, tais como o CYP2D6, a SULT1A1 e os REs (tabela 3) <sup>[43]</sup>.

<i>Drug</i>	<i>Gene with described variants that may effect drug efficacy or safety</i>	<i>Role of gene</i>	<i>Possible events due to genetic polymorphism</i>
Tamoxifen	ER	Target	Primary resistance, acquired resistance, tamoxifen-stimulated growth
	CYP2D6	DME	May affect other tamoxifen benefits/risks Diminished concentrations of 4-hydroxy- <i>N</i> -desmethyl-tamoxifen (endoxifen); effect on efficacy or safety unknown
	SULT1A1	Elimination of active metabolites	Two-fold lower sulfation of the antiestrogenic metabolite 4-hydroxy-tamoxifen

**Tabela 3** - Resumo dos principais genes com variabilidade genética, que afetam a eficácia e segurança do tamoxifeno e seus metabolitos <sup>[43]</sup>.

### 5.1. GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS DO METABOLISMO DO TAMOXIFENO

O tamoxifeno é um pró-fármaco metabolizado hepaticamente via citocromo P450, ocorrendo, assim, a formação dos seus metabolitos primários: *N*-desmetiltamoxifeno (NDMT) e 4-hidroxi-tamoxifeno (4-HT), que são sintetizados pelo CYP3A4/5 e CYP2D6, respetivamente. O NDMT é convertido, pelo CYP2D6, em 4-hidroxi-*N*-desmetiltamoxifeno ou endoxifeno, termo comumente utilizado. Assim esta enzima é essencial para o metabolismo deste pró-fármaco (figura 11) <sup>[36,42,44]</sup>.

O endoxifeno e o 4-HT são os metabolitos mais potentes do tamoxifeno. No entanto, no estado estacionário, as concentrações plasmáticas de endoxifeno são 5-10 vezes mais elevadas do que as concentrações do 4-HT <sup>[36,42,44]</sup>. Por isso, o efeito anti-RE total do endoxifeno é quantitativamente mais forte, em comparação ao do 4HT, pois a sua via de síntese é a via principal do metabolismo do tamoxifeno no organismo, e como tal as concentrações de

endoxifeno atingidas são bastante superiores. Para além disso, parece haver uma maior capacidade de inibição dos RE por parte do endoxifeno, segundo os dados da figura 12. O crescimento de células MCF-7, estimulado pelos estrogénios, é inibido minimamente pelo tamoxifeno e pelos seus metabolitos (sem endoxifeno), mas o crescimento é bloqueado completamente na presença de concentrações crescentes de endoxifeno (até 1000 nmol/L). Note-se que 20 nmol/L de endoxifeno é a concentração observada em PMs, enquanto 100 nmol/L é a concentração observada em EMs (figura 12) [46].

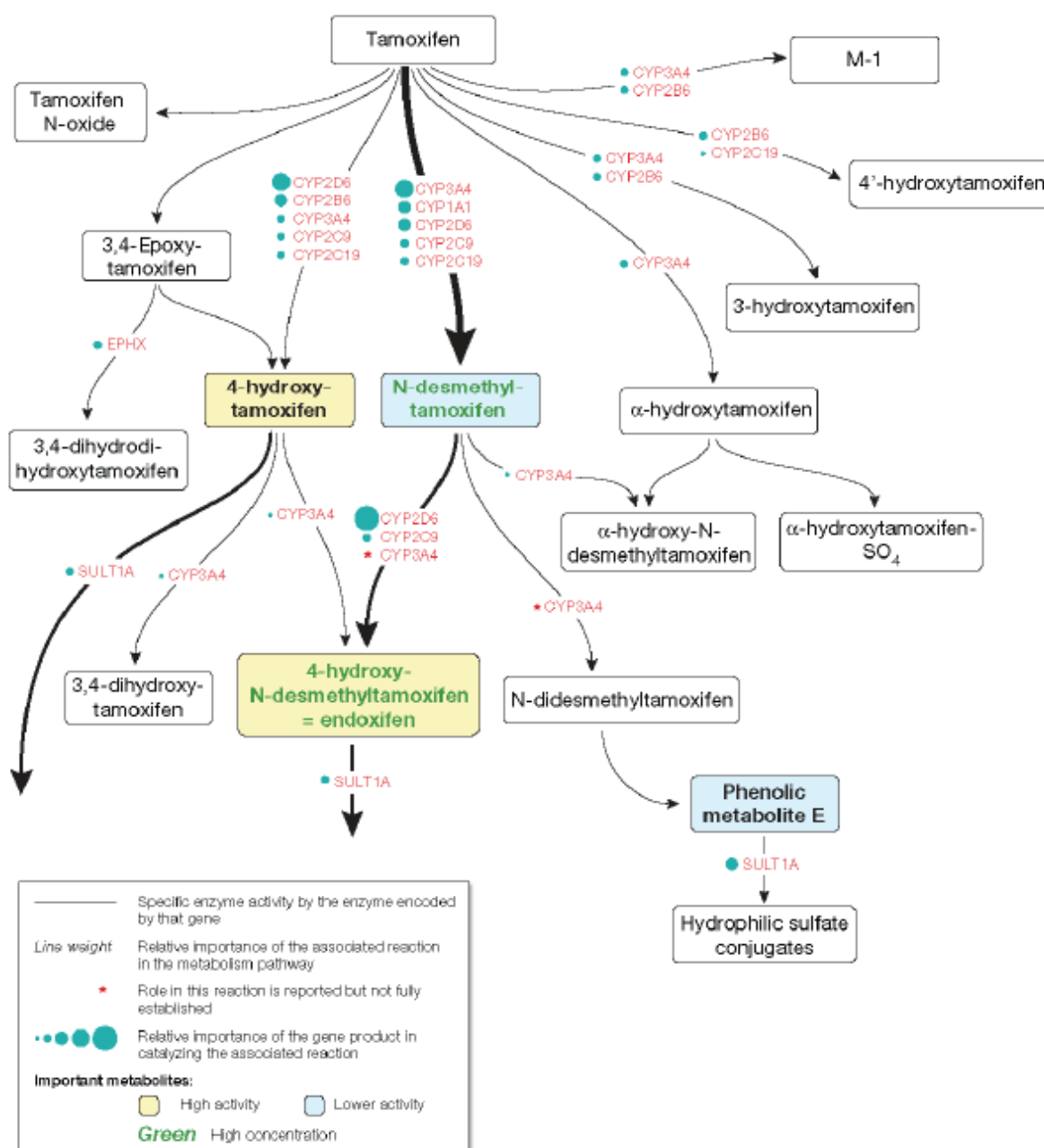
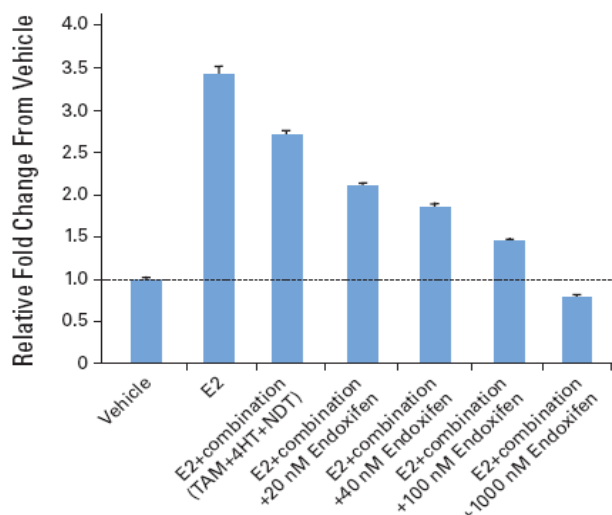


Figura 11 - Esquema resumido do metabolismo do tamoxifeno [45].



**Figura 12** - Efeitos da concentração de tamoxifeno e dos seus metabólitos sobre a proliferação das células MCF-7. E2, estradiol <sup>[46]</sup>.

O CYP2D6 foi o primeiro citocromo P450 para o qual se descreveu um polimorfismo genético, e como tal, tornou-se num enzima intensamente estudado em termos de variabilidade da sua sequência genética <sup>[42]</sup>. Este enzima é principalmente expresso no fígado, mas também está presente nos neurónios, onde participa no metabolismo de diversos fármacos, de forma local. Entre todos os P450s, o CYP2D6 é, sem dúvida, aquele que apresenta o maior carácter polimórfico <sup>[42]</sup>.

A atividade do CYP2D6 é determinada geneticamente, mas também pode ser afetada pela presença de outros fármacos, que por exemplo, sejam inibidores do metabolismo mediado por este enzima. Segundo dados bibliográficos, existem mais de 75 variantes alélicas do gene do CYP2D6. Cada variante leva à expressão de um enzima com atividade diferente, criando-se assim várias situações genómicas possíveis: (a) enzima funcional, com atividade de referência, do tipo selvagem (wt), que inclui os alelos \*1 e \*2; (b) enzima com uma atividade reduzida, que inclui os alelos \*10 e \*17; (c) enzima não funcional, sem atividade metabólica, que inclui os alelos \*3, \*4, \*5 e \*6; e (d) alelos que expressam um enzima com atividade desconhecida <sup>[42, 44]</sup>.

A atividade do enzima CYP2D6, em cada indivíduo, é determinada pela caracterização dos dois alelos herdados. Assim, cerca de 5-10% dos caucasianos possuem dois alelos que dão origem a um enzima que apresenta uma atividade nula, por isso, são considerados PMs, fenótipo que tem uma frequência de apenas 0-1% em africanos e asiáticos. O alelo mais frequente, nestas situações, é o \*4, com uma frequência alélica de cerca de 20-25% em caucasianos, sendo responsável por 70-90% de todos os indivíduos PMs. O alelo \*5 leva à

deleção do gene do CYP2D6, estando presente numa frequência de 3-5% na maioria das populações. Os alelos \*3 e \*6 estão presentes em frequências ligeiramente acima de 1% em caucasianos, sendo que, todos os alelos que expressam um enzima com atividade nula são muito raros na população caucasiana [42].

O chamado fenótipo de IM ocorre em cerca de 10-15% dos caucasianos, sendo que, na maioria dos casos os IMs são portadores do alelo \*41, que leva a uma diminuição parcial da atividade do enzima. O mecanismo pelo qual o alelo \*41 reduz a função do enzima está relacionado com a mutação 2988G> A, no intrão 6, que leva a que ocorra uma anomalia no splicing do mRNA. Em africanos e asiáticos, existem outros alelos com decréscimo parcial da atividade do enzima, que são os alelos \*17 e \*10, respetivamente. Em populações africanas o alelo \*17 está presente com frequências até aos 30%, enquanto a variante \*10 ocorre até 50% nos asiáticos. Como seria de esperar, os indivíduos EM correspondem à maioria da população, sendo portadores de dois alelos com a sequência de referência para o gene do CYP2D6, (wt/wt), que tanto pode ser o \*1 ou \*2 (tabela 4) [42].

Metaboliser status	Activity	Genotype and CYP2D6 inhibitor status <sup>a</sup>
Poor metabolisers	No activity	Two null alleles ( <i>CYP2D6</i> *3, *4, *5, *6, *11), or one null allele and a strong inhibitor
Intermediate metabolisers	Reduced activity	One null allele ( <i>CYP2D6</i> *3, *4, *5, *6, *11) or one or two variants *9, *10, *17, *41, and/or a moderate inhibitor
Extensive metabolisers	Normal activity	Two 'wild-type' or normal alleles ( <i>CYP2D6</i> *1, *2, *35) and no inhibitor
Ultrarapid metabolisers	Excess activity	*1xN, *2xN, *35xN, *41xN and no inhibitor

**Tabela 4** - Classificação dos diferentes fenótipos possíveis para o CYP2D6 [47].

O locus do CYP2D6 está localizado no cromossoma 22, onde também se incluem dois pseudogenes, CYP2D7 e CYP2D8P. Um *crossover* desigual entre estes genes pode conduzir a processos de recombinação, que resultam em variantes estruturais onde o gene funcional pode ser suprimido (\*5) ou duplicado, levando ao fenótipo de UM [42]. A ocorrência de duplicação do gene CYP2D6 é conhecida com vários alelos, incluindo \*1, \*2, \*4, \*6, \*10, \*17, \*29, \*35, \*41, \*43 e \*45 (tabela 4). A frequência do fenótipo de UM varia entre 10% e mais de 50% em algumas etnias, incluindo as populações árabe e da África oriental, e populações do Pacífico, enquanto na Europa as frequências estão, geralmente, entre 1 e 5%. As frequências elevadas do fenótipo UM em algumas populações podem estar relacionadas com o facto de o CYP2D6 ser metabolizador de alcalóides, presentes em diversas plantas, tendo assim, ocorrido fenómenos de seleção natural em populações que dependiam de alimentos ricos em

alcalóides, muitas vezes tóxicos, levando a uma maior sobrevivência dos indivíduos portadores de alelos com um maior número de cópias e maior atividade do enzima <sup>[42]</sup>.

As variantes do CYP2D6 que são recomendadas para inclusão na genotipagem na prática clínica encontram-se na tabela 5 <sup>[42]</sup>.

CYP allele designation	Key mutation(S), rs number	Location, protein effect	Allele frequencies	Functional effect
<i>CYP2D6*3</i>	2549delA rs35742686	Frameshift	0.00-0.01 for all ethnicities	Null allele
<i>CYP2D6*4</i>	1846G>A rs3892097	Splicing defect	0.15-0.25 Ca <0.01 for most of the others	Null allele
<i>CYP2D6*5</i>	Recombination	Deletion	0.03-0.03 for all ethnicities	Null allele
<i>CYP2D6*6</i>	1707delT rs5030655	Frameshift	0.00-0.01 for all ethnicities	Null allele
<i>CYP2D6*10</i>	100C>T rs1065852	P34S	0.02 Ca 0.40-0.50 As	↓ Expression and activity
<i>CYP2D6*17</i>	1023C>T rs28371706 2850C>T rs16947	T107I R296C	0.34 Af 0.00 As, Ca	↓ Expression and activity
<i>CYP2D6*41</i>	2988G>A rs28371725	Splicing defect	0.085 Ca <0.01 for all others	↓ Expression and activity
<i>CYP2D6*Nxn</i>	Recombination	Copy number variations	0.01-0.09 Ca up to 0.30 Af, Ar	↑ Expression and activity

**Tabela 5** - Conjunto das variantes mais importantes clinicamente, no gene do CYP2D6. Adaptada de <sup>[42]</sup>.

Vários estudos demonstraram um impacto significativo do genótipo CYP2D6 nas concentrações plasmáticas dos metabolitos ativos do tamoxifeno e ao nível dos seus efeitos adversos. De acordo com esses estudos, doentes com fenótipos PM e IM (por exemplo, \*41 ou alelo sem atividade) têm níveis extremamente baixos dos metabolitos ativos e, portanto, verifica-se uma acentuada diminuição da eficácia do tratamento <sup>[42]</sup>.

De entre os inúmeros estudos conduzidos sobre esta temática, podemos tomar como exemplo o estudo feito para avaliar a importância de conhecer previamente o fenótipo do CYP2D6 dos indivíduos, sobre os resultados do tratamento com tamoxifeno no carcinoma da mama metastático <sup>[36]</sup>.

Neste estudo, o recrutamento de doentes com carcinoma da mama metastático decorreu entre 2000 e 2008, no centro oncológico Daniel den Hoed do hospital universitário Erasmus MC, na Holanda, e todas elas teriam que ter sido tratadas com tamoxifeno, com uma dose diária de 40 mg, que é a dose standard em situações metastáticas RE+. Todas as voluntárias que fizeram a terapêutica com tamoxifeno num período inferior a 30 dias eram excluídas do estudo. A participação neste ensaio implicava a confirmação por parte das voluntárias do ano

em que iniciaram a terapêutica com tamoxifeno, a sua etnia, se a doença metastática era RE+ ou RP+ (valores da determinação laboratorial), terapêuticas anteriores ao tamoxifeno, número e localizações das metástases, medicação coadministrada que envolvesse inibidores do CYP2D6, bem como os valores de TTP e OS teriam de ser estimados, previamente <sup>[36]</sup>.

As doentes foram monitorizadas desde o início do tratamento com tamoxifeno até à sua morte ou até ao término do estudo (Julho de 2009). O TTP foi definido como o tempo entre a primeira prescrição de tamoxifeno e o início de evidências de progressão da doença. A OS foi definida como o tempo que decorre desde a primeira prescrição de tamoxifeno, até ao óbito da doente, por qualquer causa de morte. Todas as voluntárias foram genotipadas para o enzima CYP2D6 <sup>[46]</sup>.

A combinação dos diferentes genótipos com a coadministração de fármacos inibidores do CYP2D6 permitiu a distinção de três diferentes fenótipos, no estudo em causa. Foi necessário ter um período observacional de 3 até 6 meses, após começarem a surgir os efeitos da terapêutica adjuvante, para então se iniciar no mínimo durante 6 meses a coadministração do inibidor do CYP2D6. Todas as doentes que não são portadoras de um genótipo que leva à não expressão ou a uma atividade nula do enzima (CYP2D6\*3, \*4, \*5 ou \*6), e que não foram medicadas com um inibidor do CYP2D6 eram consideradas EMs. As IMs são todas as homozigotas para os alelos \*10 e \*41, ou heterozigotas \*10/alelo que leva a uma atividade nula do CYP2D6, ou \*41/alelo que leva a uma atividade nula do CYP2D6, ou heterozigotas \*3/wt, \*4/wt, \*5/wt ou \*6/wt, e que não foram medicados com um inibidor do CYP2D6, ou ainda, homozigotas wt/wt, que utilizaram um inibidor fraco ou moderado do CYP2D6. As doentes com fenótipo PM tinham que ser portadoras de dois alelos que levam a uma atividade nula do enzima (CYP2D6 \*3/\*3, \*3/\*4 ou \*4/\*4) e medicadas com um inibidor moderado, ou portadores do genótipo (wt/wt), e medicadas com um inibidor forte do CYP2D6 <sup>[36]</sup>.

Dentro dos diversos resultados obtidos no estudo em relação à prevalência das diferentes variantes, ao número de doentes caucasianos, africanos e asiáticos, ao número e local das metástases, às terapêuticas prévias ao tamoxifeno e à coadministração de inibidores do CYP1D6, os valores apresentados encontram-se alocados dentro do esperado. Na tabela 6 podemos verificar efetivamente o impacto do fenótipo dos indivíduos sobre os fatores TTP e OS. Verificou-se uma diferença não significativa entre os EMs e os IMs no que se refere à OS (HR = 0.87; P = 0.62). Contudo, a diferença entre os valores para a OS entre os EMs e os PMs é claramente substancial (HR = 2.09; P = 0.034) <sup>[36]</sup>.

Embora os valores de TTP não sejam verdadeiramente significativos entre os doentes PMs e EMs (HR = 1.69; P = 0.11), a média da OS foi para os PMs de 5 anos (CI 95%: 4.1 –

5.9) em comparação com os 7,9 anos (CI 95%: 6.2 – 9.5) estimados para os outros fenótipos, o que é estatisticamente significativo ( $P = 0.012$ ) [36].

CYP2D6 phenotype <sup>a</sup>	Time to progression			Overall survival		
	Cases (n = 99)	HR <sup>b</sup> (95% CI)	P-value	Cases (n = 67)	HR <sup>b</sup> (95% CI)	P-value
EM	48	1.00 (ref)		33	1.00 (ref)	
IM	38	0.99 (0.64–1.55)	0.98	22	0.87 (0.50–1.50)	0.62
PM	13	1.69 (0.90–3.19)	0.11	12	2.09 (1.06–4.12)	0.03

Abbreviations: CI = confidence interval; CYP2D6 = cytochrome P450 2D6; EM = extensive metabolisers; HR = hazards ratio; IM = intermediate metabolisers; PM = poor metabolisers; ref = reference. <sup>a</sup>On the basis of CYP2D6 genotype (CYP2D6\*3, \*4, \*5, \*6, \*10 and \*41) and concomitant use of CYP2D6-inhibiting medication. <sup>b</sup>HRs were calculated using Cox-proportional hazards models and were adjusted for age at the index date.

**Tabela 6** - Resultados do seguimento de doentes com carcinoma da mama metastático, associando o seu fenótipo da enzima CYP2D6 com o TTP e a OS [36].

Neste estudo, foi demonstrado que doentes com carcinoma da mama metastático RE+, tratadas com tamoxifeno, e que sejam portadores do fenótipo PM para o CYP2D6, terão provavelmente uma OS significativa mais curta do que doentes com um fenótipo IM ou EM [36].

Neste estudo, os indivíduos EM e IM não apresentam diferenças significativas em termos de TTP, embora diferenças entre estes grupos tenham sido encontradas noutros estudos, quando a dosagem de tamoxifeno era de 20 mg por dia. É possível que 40 mg por dia permita que os doentes IM tenham uma concentração no estado estacionário semelhante aos EM, ou pelo menos suficientemente elevada para beneficiar do tratamento [36].

Neste estudo não foi encontrada uma associação direta entre o genótipo do CYP2D6 e o TTP ou a OS, em doentes com carcinoma metastático. Isto pode ser explicado pelo grupo relativamente pequeno de CYP2D6 PMs, dentro do total de voluntárias. Uma explicação alternativa pode estar relacionada com o facto de o efeito do genótipo ser menos pronunciado em doentes metastáticos. A obtenção de resultados conflitantes pode ser parcialmente explicada pelas diferenças ou heterogeneidade nas populações entre estudos. Outras causas apontadas à não correspondência dos resultados com o que teoricamente seria esperado são situações de não adesão à terapêutica ou ocorrência de viés na seleção dos participantes do estudo [36].

A utilização de doses de tamoxifeno superiores a 40 mg diárias pode, teoricamente, ser necessária, para atingir a concentração plasmática terapêutica, em doentes portadores do fenótipo PM, tendo também em linha de conta a coadministração de inibidores do CYP2D6. Uma das formas de perceber a dose ideal para este grupo de indivíduos seria administrar uma sonda, que esteja sujeita às mesmas vias de metabolização do tamoxifeno, avaliando-se assim a quantidade metabolizada e não metabolizada através da urina e fezes [36].

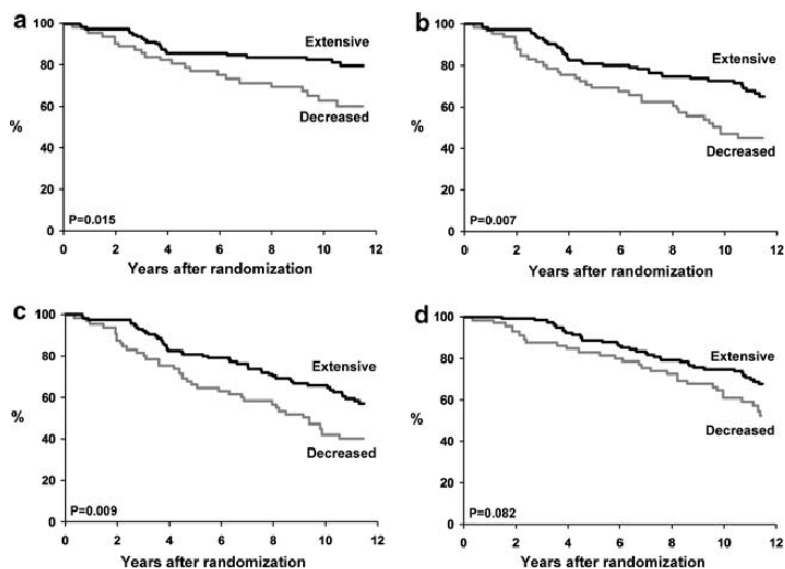
Um grupo de investigadores do North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) realizou um estudo randomizado de fase III, em doentes na pós-menopausa com carcinoma da mama RE+, para avaliar o valor da adição do androgénio fluoximesterona, durante 1 ano, na terapêutica adjuvante com tamoxifeno padrão, de 5 anos (estudo NCCTG 89-30-52). No entanto, o mesmo grupo pretendeu avaliar o papel dos inibidores do CYP2D6 em doentes randomizados, apenas para o braço do tamoxifeno, a partir do estudo anterior<sup>[48]</sup>.

As doentes foram avaliadas de modo a determinar se os seguintes inibidores do CYP2D6 foram coadministrados, durante os 5 anos de terapêutica com tamoxifeno: inibidores potentes (fluoxetina e paroxetina), e inibidores moderados (sertralina, cimetidina, amiodarona, doxepina, ticlopidina ou haloperidol). A duração da coadministração de inibidores do CYP2D6 e tamoxifeno foi definida como se segue: menos de 1, 1-2, 2-3, 3-4 e 4-5 anos<sup>[48]</sup>.

As EMs eram portadoras do genótipo (wt/wt) para o CYP2D6, e não estavam a fazer nenhum inibidor do CYP2D6. As IMs foram definidas como: (1) heterozigotas para o alelo \*4 (\*4/wt), sem coadministração de um inibidor de CYP2D6; (2) genótipo wt/wt, com coadministração de um inibidor fraco/moderado. As PMs foram definidas como as doentes: (1) homozigotas para o alelo \*4, (2) genótipo \*4/wt, coadministradas com um inibidor moderado ou potente, ou (3) genótipo wt/wt, com coadministração de um inibidor potente<sup>[48]</sup>.

Os principais objetivos deste estudo foram determinar o efeito do genótipo do CYP2D6, sobre os resultados do tempo de recorrência (TTBR), sobrevida sem recidivas (RFS), sobrevida sem doença (DFS) e sobrevivência global (OS). O TTBR foi definido como o tempo desde a randomização das voluntárias, à documentação de um evento de recidiva local, regional, ou distante ou à documentação de carcinoma da mama colateral (incluindo CDIS). A RFS foi definida como o tempo desde a randomização, até à documentação da ocorrência dos seguintes eventos: qualquer recorrência (local, regional, ou distante) de carcinoma da mama, carcinoma colateral ou morte da doente. A DFS foi definida como o tempo desde a randomização, até à documentação do primeiro dos seguintes eventos: qualquer recorrência (local, regional ou distante) de carcinoma da mama, carcinoma colateral, um segundo carcinoma primário, ou morte da doente por qualquer causa. A OS foi estimada como o tempo de registo de óbito, por qualquer causa de morte. As distribuições globais de TTBR, RFS, DFS, e OS foram estimados pelo método de Kaplan-Meier. O Log-rank é um modelo de risco proporcional univariado Cox, usado para determinar o impacto do fenótipo para o CYP2D6 na RFS, DFS, e na OS<sup>[48]</sup>.

Em termos de resultados, o benefício clínico foi significativamente menor para as mulheres com diminuição do metabolismo para o CYP2D6, em relação às mulheres com um metabolismo rápido. As doentes com um metabolismo diminuído obtiveram valores significativamente menores de TTBR ( $P = 0,015$ ), RFS ( $P = 0,007$ ), DFS ( $P = 0,009$ ), e tendem a ter uma pior OS ( $P = 0,082$ ), em comparação com doentes EMs (figura 13) <sup>[48]</sup>.



**Figura 13** - Resultados do Kaplan-Meier a) TTBR, b) RFS, C) DFS, e OS d) com base no fenótipo do CYP2D6 (EMs vs Metabolismo Diminuído) <sup>[48]</sup>.

O modelo de risco proporcional Cox demonstrou que, o tamanho do tumor superior a 3 centímetros e a presença de células tumorais na região nodal têm uma forte associação com os fatores TTBR, RFS, DFS, e OS. Assim, as doentes com um metabolismo lento para o CYP2D6, que apresentam uma dimensão do tumor superior a 3 cm e têm a região nodal afetada, demonstram resultados significativamente piores de TTBR ( $P = 0,034$ ; HR = 1,91); RFS ( $P = 0,017$ ; HR = 1,74) e DFS ( $P = 0,027$ ; HR = 1,60), em relação àquelas que são consideradas EMs. Apenas a OS não revela uma diferença significativa entre estes dois grupos ( $P = 0,223$ ; HR = 1,34) (Tabela 7) <sup>[48]</sup>.

Endpoint	Size ( $\geq 3$ cm vs. $< 3$ cm)	Node positive (yes vs. no)	CYP2D6 metabolism (decreased vs. extensive)
TTBR	2.71 (1.16–4.07)	1.79 (0.93–3.08)	1.91 (1.05–3.45)
RFS	1.75 (1.06–2.88)	1.57 (1.00–2.48)	1.74 (1.10–2.74)
DFS	1.94 (1.24–3.04)	1.71 (1.13–2.58)	1.60 (1.06–2.43)

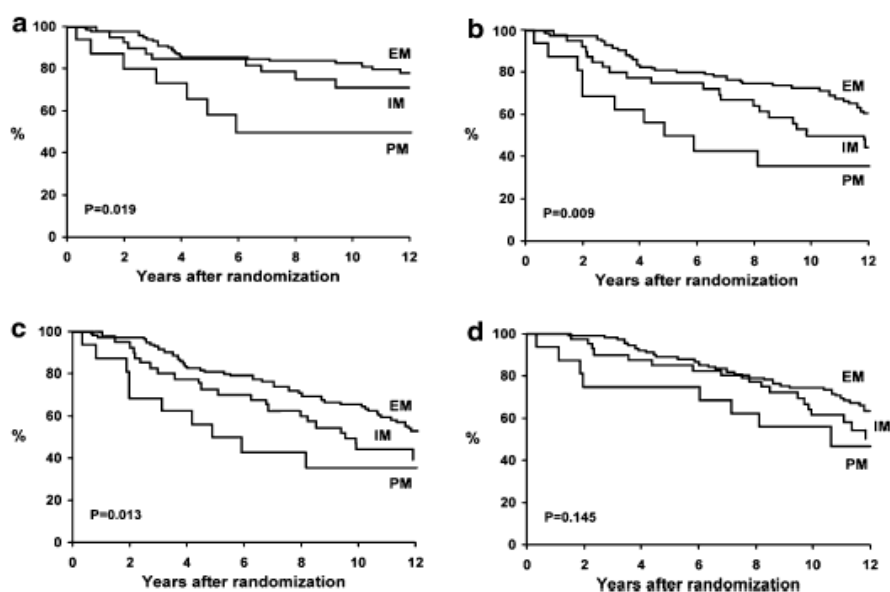
Hazard ratios (and corresponding 95% CI)

**Tabela 7** - Resultados do modelo multivariado Cox comparando o TTBR, a RFS e a DFS entre EMs e Metabolismo diminuído <sup>[48]</sup>.

Para as doentes cujo fenótipo pôde ser determinado ( $n = 171$ ), o modelo de Cox foi utilizado para avaliar se o benefício clínico foi significativamente inferior entre as IMs ou PMs, em relação às EMs. As doentes PMs apresentaram valores significativamente menores de TTBR ( $P = 0,007$ ), de RFS ( $P = 0,005$ ), de DFS ( $P = 0,008$ ), e tendem a ter uma OS pior ( $P = 0,077$ ), em comparação com as EMs. As IMs não apresentam um TTBR inferior ( $P = 0,338$ ), mas tendem a ter pior RFS ( $P = 0,075$ ) e DFS ( $P = 0,097$ ), em comparação com as EMs (Tabela 8). As curvas de Kaplan-Meier para o TTBR, a RFS, a DFS e a OS dentro dos três fenótipos determinados estão presentes na figura 14. Ao fim de dois anos os valores de RFS foram de 98%, 92%, e 68% para as EMs, IMs e PMs, respetivamente (figura 14, gráfico b) <sup>[48]</sup>.

Outcome	Estimated unadjusted hazard ratio relative to extensive metabolizers (corresponding 95% CI)	<i>p</i> value
Time to Breast Recurrence		
Poor Metabolizer	3.2 (1.37–7.55)	0.007
Intermediate Metabolizer	1.4 (0.68–3.05)	0.3375
Relapse-Free Survival		
Poor Metabolizer	2.69 (1.34–5.37)	0.005
Intermediate Metabolizer	1.63 (0.95–2.78)	0.075
Disease-Free Survival		
Poor Metabolizer	2.44 (1.27–4.69)	0.008
Intermediate Metabolizer	1.52 (0.93–2.49)	0.097
Overall Survival		
Poor Metabolizer	2.0 (0.92–4.17)	0.077
Intermediate Metabolizer	1.40 (0.80–2.43)	0.240

**Tabela 8** - Resultados do modelo univariado de Cox sobre o TTBR, a RFS, a DFS e a OS entre EMs vs IMs, e EMs vs PMs <sup>[48]</sup>.



**Figura 14** - Resultados do Kaplan-Meier sobre a) TTBR, b) RFS, c) DFS e d) OS, com base nos três fenótipos EM, IM e PM <sup>[48]</sup>.

Este estudo demonstrou que as doentes com um metabolismo diminuído para o CYP2D6 têm um risco de recorrência da doença bastante elevado, independentemente do seu padrão de marcadores de prognósticos. As PMs apresentam um risco de recorrência cerca de três vezes maior (HR = 3,12, P = 0,007) em comparação com EMs. Além disso, esta variabilidade fenotípica está relacionada à coadministração habitual de fármacos inibidores da enzima, para o tratamento da depressão, entre outros problemas, que deve ser tida em linha de conta na prática clínica. Cerca de 25% das doentes tratados com tamoxifeno, são também medicadas para atenuar os afrontamentos, RAM bastante frequente desta terapêutica<sup>[48]</sup>.

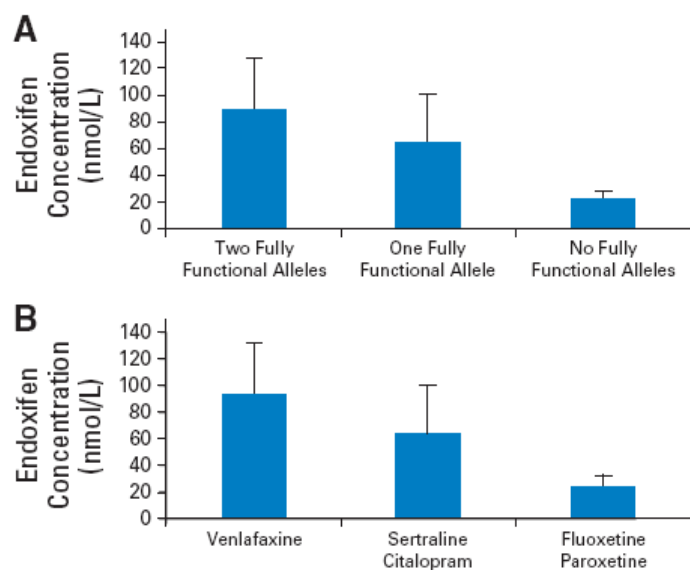
Um dos factos negativos apontados à terapêutica com tamoxifeno é o aumento do risco de recidiva nos primeiros 2-3 anos de tratamento. Neste estudo, como houve uma divisão das doentes segundo os diferentes fenótipos, verificaram-se diferenças importantes ao fim de 2 anos em relação à RFS (98%, 92%, e 68%) (figura 14). Estes dados sugerem que o decréscimo na RFS, após o início do uso de tamoxifeno, pode ser devido a um subconjunto de indivíduos que têm um fenótipo de PM. Quanto à OS, são necessários mais estudos para determinar se a avaliação *a priori* do metabolismo do CYP2D6 vai permitir identificar os indivíduos mais adequados para a terapêutica hormonal. Estes dados sugerem que o metabolismo do CYP2D6 pode apresentar características que sustentam a implementação de uma terapêutica endócrina mais individualizada, para o carcinoma da mama<sup>[48]</sup>.

## 5.2. INTERAÇÕES IMPORTANTES NO METABOLISMO DO TAMOXIFENO

Os eventos depressivos são uma das complicações mais frequentes do carcinoma da mama, o que leva à coadministração de fármacos ISRSs juntamente com a terapêutica endócrina adjuvante. Além disso, os ISRSs também são utilizados para tratar os afrontamentos, um dos efeitos adversos do tamoxifeno. A paroxetina e a fluoxetina são considerados fármacos com elevado poder de inibição do CYP2D6. A inibição desta enzima pode resultar numa diminuição da formação dos seus metabolitos, afetando os dados de segurança e eficácia padrão, do tratamento do carcinoma da mama RE+<sup>[49]</sup>.

Como resultado da variação genética ao nível da enzima CYP2D6, as concentrações de endoxifeno, variam significativamente. Num estudo prospetivo realizado, a concentração de endoxifeno variou de acordo com o número de alelos funcionais do CYP2D6 e com a

coadministração de fármacos que inibem a atividade do CYP2D6. Por exemplo, no mesmo estudo, indivíduos EM tratados com tamoxifeno concomitantemente com inibidores potentes do CYP2D6, tais como paroxetina ou fluoxetina, apresentaram concentrações semelhantes de endoxifeno às de indivíduos PM para o CYP2D6 (figura 15) [46].



**Figura 15** - A: Variação nas concentrações de endoxifeno com base no fenótipo do CYP2D6. B: Comparação das concentrações de endoxifeno na coadministração de diferentes inibidores do CYP2D6 [46].

Um inibidor potente deve, em teoria, ser capaz de demonstrar *in vivo* a conversão de um EM para um PM, o que se traduz geralmente numa diminuição de 80% da depuração de um substrato, na presença do inibidor. No entanto, nem sempre é possível avaliar o verdadeiro impacto de um inibidor do CYP2D6 na prática clínica, existindo, assim, um restrito número de antidepressivos e outros fármacos de classes farmacoterapêuticas distintas, para os quais há evidências de uma diminuição da efetividade do tamoxifeno. A tabela 9 apresenta os medicamentos mais importantes na coadministração com tamoxifeno, sendo estes agrupados em fracos, moderados e potentes inibidores [46].

Class	Moderate-to-Potent inhibitors with clearly demonstrated or expected <i>in vivo</i> inhibition	Weak-to-Moderate inhibitors that have demonstrated or could potentially have some <i>in vivo</i> effect	Alternative drugs expected to have little <i>in vivo</i> inhibition
<b>SSRI/SNRIs</b>	Paroxetine Fluoxetine Bupropion Duloxetine	Sertraline Citalopram Fluvoxamine	Venlafaxine Desvenlafaxine Reboxetine Escitalopram Mirtazapine
<b>Tricyclic antidepressants</b>		Clomipramine Doxepin Desipramine Imipramine Amitriptyline Nortriptyline	
<b>Antipsychotics</b>	Thioridazine Perphenazine Pimozide	Chlorpromazine Fluphenazine Haloperidol	Thiothixene Clozapine Risperidone
<b>Cardiac Medications</b>	Quinidine Ticlopidine	Amiodarone Verapamil Amiodipine	Diltiazem
<b>H2 blockers</b>		Cimetidine	Ranitidine
<b>Medications for infectious diseases</b>	Terfenadine Quinidine	Ritonavir Chloroquine	Indinavir Saquinavir Nelfinavir

**Tabela 9** - Principais inibidores do CYP2D6, separados em função da sua capacidade de inibição e classe farmacoterapêutica. Adaptada de <sup>[46]</sup>.

O uso concomitante de inibidores do CYP2D6 foi documentado num estudo com 59 doentes, para uma duração média de 1,9 anos. A paroxetina foi o fármaco mais comum (n = 35; 59,3%), seguida da fluoxetina (n = 10; 16,9%), cimetidina (n = 4; 6,8%), amiodarona (n = 3; 5,1%), anafranil (n = 2; 3,4%), clorfeniramina (n = 2; 3,4%), haloperidol e quinidina (n = 1). Após um acompanhamento médio de 5,9 anos, os casos de recorrência da doença foram registados em 169 doentes. A DFS, aos 3 anos de seguimento (5 anos após o início do tratamento com tamoxifeno), foi de 93,1% e, estatisticamente, não diferiu entre os utilizadores e não utilizadores de inibidores do CYP2D6 (92,7% e 93,0%, respetivamente). A taxa de risco de recorrência da doença para os utilizadores, em comparação com não utilizadores de inibidores da CYP2D6 foi de 0,64 (CI 95%: 0,30- 1,37; P = 0,26), e não mudou substancialmente depois do ajuste para a idade, co morbidades e nível de risco associado à patologia (HR = 0,74, IC 95%: 0,35-1,58, P = 0,44) (Tabela 10). Numa análise ao subgrupo de doentes que usaram paroxetina como CYP2D6 inibidor (n = 35), não houve diferença na DFS, em comparação aos que não tomaram paroxetina (HR = 0,84; CI 95%: 0,34-2,05; P ajustado = 0,70) <sup>[50]</sup>.

Variable	All patients (n = 912)	CYP2D6 inhibitors (n = 59)	No CYP2D6 inhibitors (n = 853)	P value
Recurrent breast cancer	169 (18.5%)	7 (11.9%)	162 (19.0%)	0.17
Systemic	135 (14.8%)	6 (10.2%)	129 (15.1%)	1.0
Local	34 (3.7%)	1 (1.7%)	33 (3.9%)	
DFS at 3 years of follow-up [95% CI]	93.1% [91.3–94.9%]	92.7% [85.8–99.6%]	93.0% [91.2–94.8%]	0.44*
OS at 3 years of follow-up [95% CI]	92.8% [91.0–94.6%]	89.3% [81.3–97.3]	93.0% [91.2–94.8]	0.20*

\*P values from Cox proportional hazard analysis, adjusted for age, concomitant diseases (heart disease, hypertension, and diabetes mellitus), and breast cancer risk status (high/low)

**Tabela 10** - Resultados da recorrência e OS em doentes tratadas com tamoxifeno e um inibidor do CYP2D6, comparados às doentes sem inibidor do CYP2D6<sup>[50]</sup>.

Durante o seguimento 118 doentes morreram, 104 entre os não utilizadores e 14 entre os utilizadores de inibidores do CYP2D6. A taxa de risco de morte nos utilizadores de inibidores do CYP2D6 foi quase duas vezes superior (HR = 1,97, IC 95%: 1,13-3,44, P = 0,017), mas após o ajuste para as covariáveis idade, comorbidades (doenças cardíacas, hipertensão e diabetes), e nível de risco associado à doença, esta associação foi enfraquecida e deixou de ser estatisticamente significativa (HR = 1,45, CI 95%: 0,82-2,55, P = 0,20) (Tabela 11). Na análise multivariada, as determinantes significativas para a OS foram a idade (HR = 1,09 para cada ano adicional, P = 0,001), diabetes mellitus (HR = 1,72, P = 0,011), risco associado à doença (HR = 2,55 para o grupo "alto risco" vs "baixo risco", P = 0,001), e problemas cardíacos (HR = 1,57, P = 0,075) (Tabela 11). Na análise deste subgrupo, a razão de risco para a mortalidade geral entre as doentes que tomaram paroxetina, comparados às que não tomaram, não foi estatisticamente significativa (HR = 1,54, CI 95%: 0,74- 3,20; P ajustado = 0,18)<sup>[50]</sup>.

Variable	Disease recurrence		Overall mortality	
	Adjusted HR (95% CI)	P value	Adjusted HR (95% CI)	P value
Age	1.00 (0.98–1.02)	0.93	1.09 (1.07–1.11)	<0.001
Heart disease	1.63 (0.86–3.07)	0.14	1.57 (0.96–2.58)	0.075
Hypertension	0.91 (0.61–1.33)	0.61	1.00 (0.68–1.48)	1.00
Diabetes mellitus	0.58 (0.31–1.10)	0.09	1.72 (1.13–2.60)	0.011
High-risk group	3.64 (2.47–5.37)	<0.001	2.55 (1.61–4.05)	<0.001
Use of CYP2D6 inhibitors	0.74 (0.35–1.58)	0.44	1.45 (0.82–2.55)	0.20

HR hazard ratio. The Cox proportional hazard model included age, comorbidities (heart disease, hypertension, and diabetes mellitus), breast cancer risk status, and use of CYP2D6 inhibitors as covariates

**Tabela 11** - Determinantes significativos para a recorrência da doença e mortalidade por qualquer causa, em doentes tratadas com tamoxifeno<sup>[50]</sup>

Em contrapartida, os resultados sobre a coadministração de inibidores do CYP2D6 parecem ser diferentes dos anteriores, noutros estudos, revelando que há efetivamente um

impacto nos fatores preditivos da evolução da doença, como é o caso do estudo referenciado. Embora não se verificasse uma associação significativa entre o genótipo do CYP2D6 e o tempo de progressão (TTP) ou a OS (HR = 1,29; P = 0,49; CI 95%: 0,63-2,66 e HR = 1,38; P = 0,42, IC 95%: 0,63-2,99, respetivamente), as sete doentes que utilizaram o tamoxifeno juntamente com um inibidor do CYP2D6 obtiveram um TTP significativamente pior (HR = 2,97; P = 0,008; CI 95%: 1,33-6,67) e uma OS menor (HR = 3,55; P = 0,002; CI 95%: 1,59-7,96), comparadas com as doentes sem coadministração de inibidores do CYP2D6 (Tabela 12) [36].

CYP2D6-inhibiting Co-medication <sup>a</sup>	Time to progression			Overall survival		
	Cases (n = 102)	HR <sup>b</sup> (95% CI)	P-value	Cases (n = 70)	HR <sup>b</sup> (95% CI)	P-value
No	95	1.00 (ref)		63	1.00 (ref)	
Yes	7	2.97 (1.33–6.67)	0.008	7	3.55 (1.59–7.96)	0.002

Abbreviations: CI = confidence interval; CYP2D6 = cytochrome P450 2D6; HR = hazards ratio; ref = reference. <sup>a</sup>Co-medication: paroxetine (n = 4), fluoxetine (n = 1), sertraline (n = 1) and citalopram (n = 1). <sup>b</sup>HRs were calculated using Cox-proportional hazards models and were adjusted for genotype (PM, IM and EM based on CYP2D6\*3, \*4, \*5, \*6, \*10 and \*41) and age at the index date.

**Tabela 12** - Resultados da associação entre a coadministração de inibidores do CYP2D6 e os valores de OS e tempo de progressão da doença [36].

### 5.3. RESULTADOS DE EFICÁCIA DO TAMOXIFENO

A meta-análise mais recente do EBCTCG incluiu dados atualizados de 20 estudos (n = 21.457) sobre o uso do tamoxifeno durante 5 anos. Para as doentes com carcinoma RE+ (n = 10.645), o uso de tamoxifeno reduziu a taxa de recorrência em 39% (RR = 0,61; P <0,00001). Especificamente, o tamoxifeno reduziu para metade o risco de recorrência durante os anos 0 a 4 (RR = 0,53; P <0,00001), e reduziu em um terço, durante os anos 5 a 9 (RR = 0,68; P <0,00001). Depois de 10 anos, as taxas de recorrência foram semelhantes (RR = 0,97) nos dois grupos, aferindo que não há decréscimo dos ganhos obtidos durante os anos de 0 a 9. Os benefícios do tamoxifeno são independentes dos níveis de RP+, idade, estado nodal, o grau do tumor, o diâmetro do tumor ou a utilização de quimioterapia. O tamoxifeno mostrou um benefício substancial, mesmo em doentes com baixos níveis de positividade para os REs. Este fármaco reduziu a mortalidade em cerca de um terço (RR = 0,70; P <0,00001) ao longo dos primeiros 15 anos. Reduziu, ainda, os riscos de recorrência local (RR = 0,54; P <0,00001), a ocorrência de carcinoma da mama colateral (RR = 0,62; P <0,00001) e a ocorrência de metástases à distância (RR = 0,63; P <0,00001) [30].

A duração estabelecida para a terapêutica com tamoxifeno é de 5 anos. A continuação do tratamento por mais de 5 anos não apresenta benefícios. No ensaio clínico B-14 NSABP, 1.172 mulheres que permaneceram livres da doença, após 5 anos de tamoxifeno, foram aleatoriamente alocadas para receber um placebo ou o tratamento adicional de mais 5 anos de tamoxifeno. O seguimento foi de 7 anos após a randomização, havendo uma ligeira melhoria observada na DFS (82% vs 78%,  $P = 0.03$ ), na RFS (94% vs 92%,  $P = 0.13$ ) e na OS (94% vs 91%;  $P = 0.07$ ), para as mulheres que interromperam o uso de tamoxifeno. Em contraste, resultados distintos foram observados em dois estudos mais recentes, o Adjuvant Tamoxifen Long Against Short (ATLAS) e o estudo Adjuvant Tamoxifen Treatment Offer More (ATTom). No caso do ensaio ATLAS, foram escolhidas 11.500 mulheres de forma aleatória (59% RE+, 41% RE-/RE não testado), que se encontravam livres da doença, após 5 anos de uso terapêutico com tamoxifeno. Um dos grupos foi submetido a mais 5 anos de tamoxifeno, enquanto o outro grupo ficou apenas com a terapêutica inicial, tendo sido observada uma redução do risco de recorrência da doença de 12%, para o grupo de mulheres que esteve sujeita ao tratamento mais longo que os 5 anos standard (HR = 0,88;  $P = 0.05$ )<sup>[30]</sup>.

O estudo ATTom alocou aleatoriamente 6.934 mulheres (39% RE+, 61% RE não testado) num grupo que realizou mais 5 anos adicionais de tamoxifeno, e noutro grupo que cessou a terapêutica ao fim dos 5 anos de referência. Com um acompanhamento médio de 4,2 anos, houve uma melhoria não significativa para o braço das mulheres que realizaram 10 anos de tratamento (RR = 0,94; CI 95%: 0,81-1,09,  $P = 0,4$ ). Assim, a duração ótima do tratamento não é conhecida, mas é certamente pelo menos 5 anos<sup>[30]</sup>.

### 5.3.1. COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DO TAMOXIFENO COM OS IAS

O EBCTCG conduziu uma meta-análise de estudos randomizados, onde foi comparado o uso de IAs com tamoxifeno. Em dois estudos prospetivos randomizados, formados por 9.856 doentes, os IAs foram comparados ao tamoxifeno, em monoterapia. Com uma média de 5,8 anos de seguimento, houve uma redução significativa na recorrência, mas não da mortalidade por carcinoma da mama, para o grupo dos IAs em monoterapia (Tabela 13). Em quatro ensaios, Arimidex-Nolvadex (ARNO 95), Breast International Group (BIG 02-97), Italian Tamoxifen Arimidex (ITA) e Austrian Breast Cancer Study Group (ABCSG), um total de 9.015 doentes foram distribuídas aleatoriamente após 2 a 3 anos de tratamento com tamoxifeno, para continuar o uso de tamoxifeno ou mudar para um IA, de modo a perfazer um total de 5 anos de terapêutica endócrina. Com um seguimento médio de 3,9 anos, a mudança

para um IA demonstrou uma redução no risco de recorrência e mortalidade (Tabela 13). Não houve diferença no benefício associado com a idade, *status* nodal, grau do tumor, ou estado RP<sup>[30]</sup>.

	HR	P Value	Absolute Difference	P Value
<b>Als vs tamoxifen as monotherapy</b>				
Reduction in breast cancer recurrence	0.77	2P < .00001	2.9%	2P < .00001
Reduction in breast cancer mortality	0.89	2P > .1	1.1%	2P < .1
<b>Als vs tamoxifen as sequential therapy</b>				
Reduction in breast cancer recurrence	0.71		3.1%	2P < .00001
Reduction in breast cancer mortality	0.78		0.7%	2P = .02

Als = aromatase inhibitors; EBCTCG = Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group; HR = hazard ratio.

**Tabela 13** - Resultados da meta-análise que compara o uso de IAs e tamoxifeno, em monoterapia ou após 2-3 anos de tamoxifeno, no risco de recorrência e mortalidade<sup>[30]</sup>.

Outra meta-análise, que reuniu os resultados de nove ensaios clínicos randomizados, sobre a comparação entre o uso de IAs e do tamoxifeno, englobou no total 28.632 mulheres. Foram abordadas três estratégias de tratamento: monoterapia, terapêutica sequencial e terapêutica prolongada (Tabela 14) Os valores da DFS foram significativamente melhores para o regime de monoterapia com IAs, e na terapêutica sequencial. Não houve diferenças significativas na OS entre o regime de monoterapia e a terapêutica prolongada. A conclusão dos autores foi que a terapêutica sequencial parece ser o tratamento com melhores resultados clínicos<sup>[30]</sup>.

	HR	P Value	95% CI
<b>DFS</b>			
Monotherapy	0.89	P = .002	0.83–0.96
Sequential therapy	0.72	P < .00001	0.63–0.83
<b>Extended therapy</b>			
<b>OS</b>			
Monotherapy	0.94	P = .39	0.82–1.08
Sequential therapy	0.78	P = .001	0.68–0.91
Extended therapy	0.86	P = .67	0.79–1.17

CI = confidence interval; DFS = disease-free survival; HR = hazard ratio; OS = overall survival.

**Tabela 14** - Resultados experimentais sobre a comparação entre vários regimes terapêuticos endócrinos na DFS e OS<sup>[30]</sup>.

O estudo ABCSG 12 reuniu aleatoriamente 1.803 mulheres na pré-menopausa, com carcinoma RE+, na fase I-II da doença, disponíveis para receber goserelina (ensaio Zoladex) e tamoxifeno, ou anastrozol e goserelina (ensaio Arimidex). Com um seguimento médio de 62 meses, não houve diferença na DFS (HR = 1,08; CI 95%: 0,81 – 1,44, P = 0,591), mas a OS foi menor com o anastrozol do que com tamoxifeno (HR = 1,75; CI 95%: 1,08 – 2,83, P = 0,02). Foi realizada, também, uma análise de um subgrupo deste estudo, com base no índice de massa corporal (IMC), onde os resultados mostraram que, para doentes com excesso de peso tratadas com anastrozol, verifica-se um aumento significativo no risco de recorrência da doença (HR = 1,49; CI 95%: 0,93 – 2,38, P = 0,08) e mortalidade (HR = 3,03, CI 95%: 1,35 – 6,82, P = 0,004), em comparação com doentes tratadas com tamoxifeno [30].

Em relação à terapêutica adjuvante inicial, o ensaio ATAC foi o primeiro estudo a mostrar um benefício dos IAs (anastrozol), sobre o tamoxifeno. Neste estudo duplo-cego, placebo controlado, 9.366 mulheres na pós-menopausa foram aleatoriamente alocadas para receber anastrozol, ou tamoxifeno, ou a combinação de ambos durante 5 anos (Tabela 15). O braço do estudo sujeito à combinação da terapêutica foi fechado devido ao número reduzido de mulheres. Com um acompanhamento médio de 120 meses, os resultados da DFS foram significativamente superiores com o anastrozol. O anastrozol, também, foi associado a um maior tempo de recorrência, maior tempo para recidiva à distância, e diminuiu o número de casos de carcinoma colateral. As maiores reduções relativas à DFS, tempo de recorrência e carcinoma colateral verificaram-se nos primeiros 2 anos, mas mantiveram-se durante todo o período de acompanhamento, persistindo após o término do tratamento. Não houve diferenças significativas na OS (Tabela 15) [30, 51].

	HR	P Value	95% CI
DFS	0.91	P = .04	0.83–0.99
Time to recurrence	0.84	P = .001	0.75–0.93
Time to distant recurrence	0.87	P = .03	0.77–0.99
Contralateral breast cancer	0.68	P = .01	0.50–0.91
OS	0.95	P = .4	0.84–1.06

ATAC = Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination; CI = confidence interval; DFS = disease-free survival; HR = hazard ratio; OS = overall survival.

**Tabela 15** - Resultados do ensaio ATAC face à DFS, risco de recorrência, recorrência à distância, carcinoma contralateral e OS [30].

O ensaio 1-98 BIG demonstrou que o letrozol foi mais benéfico do que o tamoxifeno. Foi um estudo de fase III, duplamente cego, e contou com 8.010 mulheres na pós-menopausa, com carcinoma RE+ e/ou RP+, que foram divididas aleatoriamente, durante 5 anos de

terapêutica hormonal, num dos quatro braços: tamoxifeno, letrozol, tamoxifeno 2 anos seguido por letrozol 3 anos, ou letrozol 2 anos seguido de tamoxifeno durante 3 anos. Os braços de monoterapia incluíram 4.922 mulheres, com um acompanhamento médio de 51 meses, onde se verificou uma vantagem na DFS para o braço do letrozol, em comparação ao tamoxifeno. Uma análise de 71 meses mostrou uma diferença não significativa na OS, favorecendo o uso de letrozol. O benefício para a DFS com letrozol em monoterapia foi confirmado, havendo um benefício na OS, também. O letrozol foi favorecido em quase todos os subgrupos (Tabela 16) <sup>[30, 52]</sup>.

	HR	P Value	95% CI
DFS (51-mo follow-up)	0.82	P = .007	0.71–0.95
OS (71-mo follow-up)	0.87	P = .08	0.75–1.02

BIG = Breast International Group; CI = confidence interval; DFS = disease-free survival; HR = hazard ratio; OS = overall survival.

**Tabela 16** - Resultados do ensaio 1-98 BIG sobre a DFS e OS, com diferentes regimes terapêuticos <sup>[30]</sup>.

Alguns ensaios compararam, ainda, a mudança para um IA, após 2 a 3 anos de tamoxifeno, com tamoxifeno em monoterapia, para um total de 5 anos. No estudo Intergroup Exemestane Study (IES), 4724 mulheres na pós-menopausa, com carcinoma RE+ ou RE não testado, que estavam livres da doença após 2 a 3 anos de tamoxifeno, foram aleatoriamente alocadas para continuar o tamoxifeno, ou mudar para o exemestano. Com um seguimento médio de 55,7 meses, a DFS foi superior para aquelas que mudaram para o IA. As diferenças não foram significativamente melhores para todo o grupo de doentes que mudaram, mas houve uma melhoria significativa na OS, quando os 122 pacientes que eram RE- foram excluídos (HR = 0,83; CI 95%: 0,69 – 1,00, P = 0,05) (Tabela 17). Na publicação mais recente do mesmo grupo, com um seguimento médio de 91 meses, o benefício naquelas doentes que trocaram o tratamento para exemestano foi sustentado. Continuou a haver um benefício na DFS para o grupo de RE+ e RE não testado, e um benefício na OS foi observado para as doentes que mudaram para exemestano <sup>[30]</sup>.

	HR	P Value	95% CI
<b>Median follow-up of 55.7 mos</b>			
DFS	0.76	<i>P</i> = .001	0.66–0.88
OS for entire group	0.85	<i>P</i> = .08	0.71–1.02
OS with ER-negative patients removed	0.83	<i>P</i> = .05	0.69–1.00
<b>Median follow-up of 91 mos</b>			
Breast cancer-free survival	0.81	<i>P</i> < .001	0.71–0.92
OS	0.86	<i>P</i> < .04	0.75–0.99

CI = confidence interval; DFS = disease-free survival; ER = estrogen receptor; HR = hazard ratio; IFS = International Exemestane Study.

**Tabela 17** - Resultados do estudo IES, sobre a DFS e OS, comparando a terapêutica de tamoxifeno 5 anos, com a terapêutica tamoxifeno 2-3 anos e exemestano até 5 anos<sup>[30]</sup>.

Uma meta-análise foi realizada com base em três ensaios clínicos, que comparavam a mudança para anastrozol, após 2 a 3 anos de tamoxifeno, com 5 anos de tamoxifeno. Os estudos incluídos foram o ABCSG 8, o ARNO 95 e o ITA. Estes ensaios incluíram um total de 4.006 mulheres, na pós-menopausa com carcinoma RE+, num estadio inicial. No ARNO 95 e no ITA, apenas as doentes que estavam livres de recorrência após 2 a 3 anos de tamoxifeno foram randomizados. Nesta meta-análise, a mudança para o anastrozol demonstrou uma vantagem na DFS, bem como melhorias significativas na DFS, sobrevida sem doença à distância (DDFS) e na OS. A mudança para o anastrozol foi benéfica, independentemente do estado nodal, estado RP, quimioterapia anterior ou tamanho do tumor. O National Surgical Adjuvant Breast Cancer Study 03 (N-BC03 SAS), estudo que envolveu 706 mulheres japonesas aleatoriamente, após 1 a 4 anos de tamoxifeno, comparou a continuação do tamoxifeno com a mudança para anastrozol, para 5 anos de terapêutica endócrina adjuvante totais. Com um seguimento médio de 42 meses, os valores de DFS, bem como os de RFS favorecem

uma mudança para o anastrozol (Tabela 18)<sup>[30]</sup>.

Meta-analysis	HR	P Value	95% CI
DFS	0.59	<i>P</i> < .0001	0.48–0.74
Event-free survival	0.55	<i>P</i> < .001	0.42–0.71
DDFS	0.61	<i>P</i> = .002	0.45–0.83
OS	0.71	<i>P</i> = .03	0.52–0.98
<b>N-SAS BC03 trial</b>			
DFS	0.69	<i>P</i> = .14	0.42–1.14
RFS	0.54	<i>P</i> = .06	0.29–1.02

**Tabela 18**- Resultados da meta-análise que envolveu os estudos ABCSG 8, o ARNO 95 e o ITA, e do estudo N-BC03 SAS comparando o uso apenas de tamoxifeno por 5 anos com o uso sequencial de AI, para perfazer 5 anos de tratamento<sup>[30]</sup>.

ABCSG = Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group; CI = confidence interval; DDFS = distant disease-free survival; DFS = disease-free survival; DRFS = distant relapse-free survival; HR = hazard ratio; N-SAS BC03 = National Surgical Adjuvant Study Breast Cancer 03; OS = overall survival; RFS = relapse-free survival.

Alguns estudos avaliaram, também, a ordem mais vantajosa clinicamente da terapêutica hormonal adjuvante. No ensaio BIG 1-98, os dois braços com terapêutica sequencial (tamoxifeno 2 anos seguido de letrozol por 3 anos; letrozol por 2 anos seguidos de tamoxifeno durante 3 anos) foram comparados com o letrozol em monoterapia. Com um acompanhamento médio de 71 meses, não houve diferença significativa na DFS, para qualquer um dos braços com regimes sequenciais, em comparação com a monoterapia (Tabela 19). O ensaio Tamoxifen Exemestan Adjuvant Multinacional (TEAM), de fase III, foi inicialmente desenhado para comparar 5 anos de monoterapia com exemestano, a 5 anos de monoterapia com tamoxifeno. No entanto, com base nos resultados favoráveis do estudo IES, o desenho do estudo foi alterado para comparar o tamoxifeno por 2 a 3 anos, seguido de exemestano até perfazer de 5 anos de tratamento, com o exemestano sozinho durante 5 anos. Este ensaio clínico randomizado contou com 9.229 mulheres na pós-menopausa, com um acompanhamento médio de 5,1 anos, não revelando diferenças nos valores da DFS (Tabela 19). Nos ensaios de IES, ARNO 95 e ITA, as doentes eram randomizadas apenas se estivessem livres da doença após 2 a 3 anos de tratamento, excluindo doentes com um pior prognóstico, cuja doença teria recorrido numa fase inicial. Um ensaio verdadeiro requer que a randomização seja feita sem conhecer a evolução da doença. Além disso, este estudo permite sustentar as opções clínicas, uma vez que, na prática não se pode prever se a doença irá apresentar recidivas, nos primeiros 2 a 3 anos de tratamento com tamoxifeno<sup>[30]</sup>.

	HR	P Value	95% CI
<b>BIG 1-98</b>			
DFS for tamoxifen followed by letrozole	1.05		0.84–1.32
DFS for letrozole followed by tamoxifen	0.96		0.76–1.21
<b>TEAM</b>			
DFS	0.97	P = .60	0.88–1.08
OS	1.00	P > .99	0.89–1.14

BIG = Breast International Group; CI = confidence interval; DFS = disease-free survival; HR = hazard ratio; OS = overall survival; TEAM = Tamoxifen Exemestane Adjuvant Multinational trial.

**Tabela 19** - Resultados do ensaio BIG 1-98 sobre a DFS nos dois regimes terapêuticos contemplados, e do ensaio TEAM sobre a DFS e OS<sup>[30]</sup>.

Em relação ao regime mais extenso de terapêutica hormonal adjuvante, um estudo avaliou o uso de IAs, após 5 anos de tamoxifeno – MA.17. Este ensaio é de fase III, randomizado, duplamente cego, com placebo controlado. Englobou 5.187 mulheres na pós-

menopausa, que completaram cerca de 5 anos de tamoxifeno, e que foram aleatoriamente alocadas para receber mais 5 anos de letrozol ou placebo. Com uma média de 2,5 anos de acompanhamento, houve melhorias significativas na DFS, bem como na DDFS para as mulheres que receberam o letrozol. Não houve diferenças na OS entre os dois grandes braços, mas para o subconjunto de doentes que apresentavam positividade ao nível dos linfonodos, a OS obteve uma melhoria estatisticamente significativa para aqueles que receberam o letrozol (Tabela 20). Às doentes do braço do placebo foi proposto fazer letrozol, numa média de 2,8 anos, após a conclusão do tamoxifeno. Das 2.594 doentes do braço do placebo, 66% (1.579 doentes) que optaram por iniciar o letrozol, quando comparadas com as mulheres do grupo placebo que não escolheram nenhuma terapêutica adicional, tiveram uma melhoria na DFS e na DDFS (Tabela 20) <sup>[30]</sup>.

O mesmo estudo, com um seguimento médio de 64 meses, demonstrou uma diferença significativa na DFS, mas não houve diferenças significativas na OS, entre os grupos da randomização inicial, letrozol vs placebo (Tabela 20) <sup>[30]</sup>.

	HR	P Value	95% CI
<b>2.5-y median follow-up</b>			
DFS	0.58	<i>P</i> < .001	0.45–0.76
DDFS	0.60	<i>P</i> = .002	0.43–0.84
OS in all patients	0.92	<i>P</i> = .3	0.57–1.19
OS in patients with positive lymph nodes	0.61	<i>P</i> = .04	0.38–0.98
<b>2.8-y median follow-up</b>			
DFS	0.37	<i>P</i> < .0001	0.23–0.61
DDFS	0.39	<i>P</i> > .004	0.20–0.74
<b>64-mo median follow-up</b>			
DFS	0.68	<i>P</i> < .001	0.55–0.83
DDFS	0.81	<i>P</i> = .08	0.63–1.04
OS	0.99	<i>P</i> = .85	0.79–1.24

AI = aromatase inhibitor; CI = confidence interval; DDFS = distant disease-free survival; DFS = disease-free survival; HR = hazard ratio; IPCW = inverse probability of censored weighted; OS = overall survival.

**Tabela 20** - Resultados do ensaio MA.17, que compara os resultados ao nível da DFS, DDFS e OS, para o uso de letrozol após 5 anos de tamoxifeno, com o placebo <sup>[30]</sup>.

#### 5.4. RESISTÊNCIA AO TAMOXIFENO PELA VIA DA PROTEÍNA CINASE A

Os mecanismos de resistência ao tamoxifeno são observados em metade dos casos de recorrência do carcinoma da mama, onde o tamoxifeno perde a sua atividade antiestrogénica, e adquire propriedades agonistas na transativação do RE $\alpha$ . Vários processos podem ser responsáveis pela insensibilidade ao tamoxifeno, incluindo a ativação da proteína cinase A ativada por mitogénios (MAPK), da proteína cinase A (PKA) e da proteína cinase-1 ativada pela p21 (PAK-1), cujas vias de sinalização mostram um aumento de atividade em células resistentes ao tamoxifeno. No entanto, os detalhes moleculares de como estes fatores contribuem para os processos de resistência permanecem ainda pouco conhecidos. Os antagonistas do RE $\alpha$  atuam provocando uma alteração na orientação da região C-terminal, localizada na hélice-12 do domínio de ligação ao ligando (LBD). Quando ocorre uma interação agonista com o recetor, os cofatores ligam-se na zona das hélices 3, 4, 5 e 12. Os MSREs ao induzirem uma distorção na hélice-12, impedem a associação entre os coativadores da família p160 e o RE. Estes cofatores são essenciais para iniciar a transcrição e incluem os coativadores dos recetores dos esteróides (SRC-1, SRC-2 e SRC-3). O SRC-1 pode interagir com as zonas N-terminal do domínio AF-1, e C-terminal do domínio AF-2 do RE $\alpha$ . A atividade do SRC-1 é modificada por fosforilação em múltiplos locais, dois dos quais são controlados pela PKA. A sobreexpressão de SRC-1 e SRC-3 está correlacionada com a resistência ao tamoxifeno, e para além disso a atividade agonista do tamoxifeno é reforçada pela sobreexpressão do SRC-1 nos tecidos uterinos <sup>[53]</sup>.

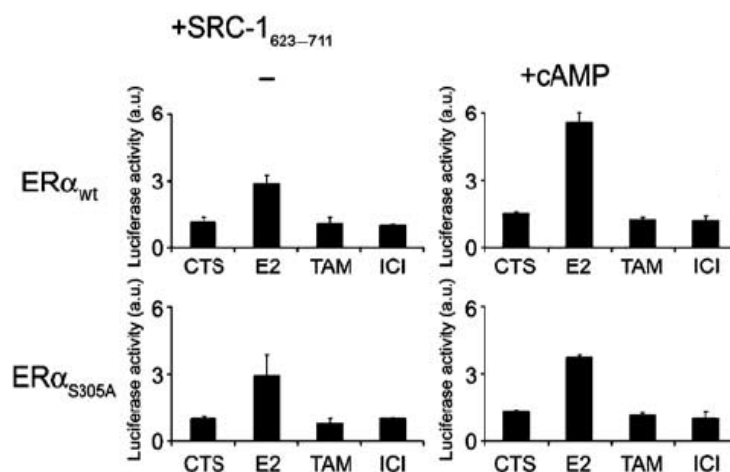
A fosforilação da serina na posição 305 (S305) do RE $\alpha$ , quer pela PKA ou pela PAK-1, parece ser fundamental para a explicação dos mecanismos de resistência ao tamoxifeno. Esta fosforilação altera a atividade do tamoxifeno de antagonista para agonista do RE $\alpha$ . Os detalhes mecanísticos deste processo não são, ainda, claros. Este estudo mostra que a fosforilação mediada pela PKA, na S305 do RE $\alpha$ , altera a orientação entre este e o coativador SRC-1, em células tratadas com tamoxifeno. Esta alteração conformacional leva ao recrutamento da RNA polimerase II, ocorrendo a transativação do recetor, em células tratadas com tamoxifeno <sup>[53]</sup>.

Para avaliar as interações entre o RE $\alpha$  e o cofator SRC-1, foram utilizadas células U2OS, como modelo de linha de células, uma vez que, estas são facilmente transfetadas. Os mesmos resultados, também, foram obtidos em células HeLa, em células T47D e MCF7, derivadas de carcinoma da mama, noutros estudos <sup>[53]</sup>.

Para mostrar que a S305 é realmente fosforilada pela PKA, as células U2OS foram tratadas com 8-Br-cAMP ou forskolina (substratos que ativam a PKA), sendo utilizadas como controlo. A mutação RE $\alpha$ S305A, onde a S305 é substituída por uma alanina, serviu para avaliar a ausência de fosforilação pela PKA [53].

Para analisar as interações entre o RE $\alpha$  e o SRC-1 utilizaram-se células U2OS transfetadas com o DNA do SRC-1 (fragmento 623-711 – SRC-1<sub>623-711</sub>, e o fragmento com o comprimento total SRC-1<sub>FL</sub>), do RE $\alpha$  (wt ou S305A), da luciferase GAL4 e da luciferase Renilla, num meio de cultura contendo apenas soro tratado com carvão ativado (CTS), ou na presença de 1 mM de Estradiol (E2), de 1 mM de ICI 182.780 ou de 1 mM 4HT, durante noventa e seis horas. Vinte e quatro horas antes foram adicionados 100 mM de 8-Br-cAMP. A atividade de luciferase foi medida e relacionada com os valores obtidos para o ICI 182.780, sem cAMP, para cada transfetante, sendo estes valores definidos como 1 [53].

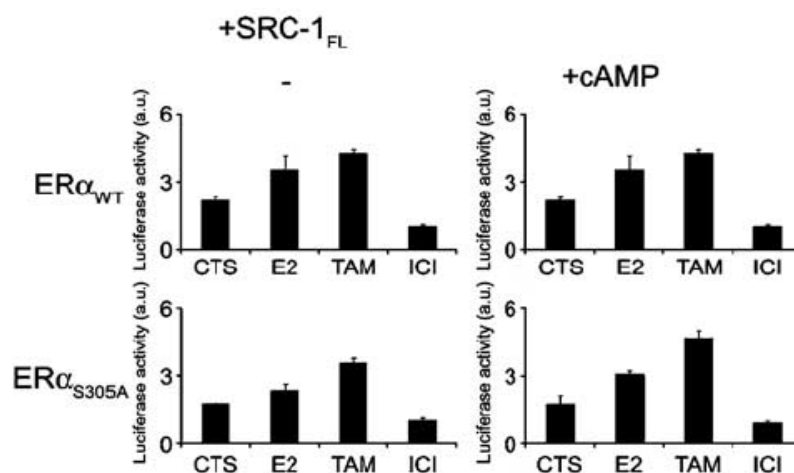
Para distinguir entre a interação do SRC-1 com os domínios AF-1 e/ou AF-2 do RE $\alpha$ , foi usado um SRC-1 truncado, o 623-711 (SRC-1<sub>623-711</sub>), que só se liga ao domínio AF-2 do recetor, bem como o SRC-1<sub>FL</sub>, que interage com ambos os domínios AF-1 e AF-2. Neste ensaio, a atividade da luciferase é diretamente relacionada com a ligação entre as duas proteínas de fusão. O SRC-1<sub>623-711</sub> interagiu com o RE $\alpha$  na presença de E2, mas a interação não foi observada na presença de tamoxifeno e de ICI 182.780 (Figura 16).



**Figura 16** - Resultados da atividade da luciferase na presença de diferentes substratos, em células transfetadas com SRC-1<sub>623-711</sub> [53].

A ligação do SRC-1<sub>FL</sub> foi aumentada pelo E2 e, também pelo tamoxifeno (Figura 17). O tratamento com o antagonista ICI 182.780 resultou numa perda da ligação entre o coativador e o recetor, em ambos os casos (Figuras 16 e 17). O ICI 182.780 não só inibe a atividade do

RE $\alpha$ , mas também induz a sua degradação. A interação entre RE $\alpha$  e SRC-1<sub>FL</sub> não foi influenciada pela presença do 8-Br-cAMP, em todas as condições testadas. Estes resultados indicam que a ativação da PKA não afeta a ligação global entre o RE $\alpha$  e o SRC-1. Além disso, enquanto que a ligação de SRC-1<sub>623-711</sub> ao domínio AF-2 é induzida pelo E2 e foi revogada pelo tamoxifeno, a ligação do SRC-1 ao domínio AF-1 prevaleceu na presença de E2 e do tamoxifeno, como foi relatado anteriormente <sup>[53]</sup>.

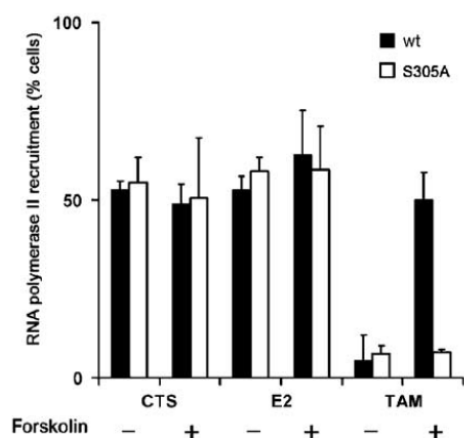


**Figura 17** - Resultados da atividade da luciferase na presença de diferentes substratos, em células tranfetadas com SRC-1<sub>FL</sub> <sup>[53]</sup>.

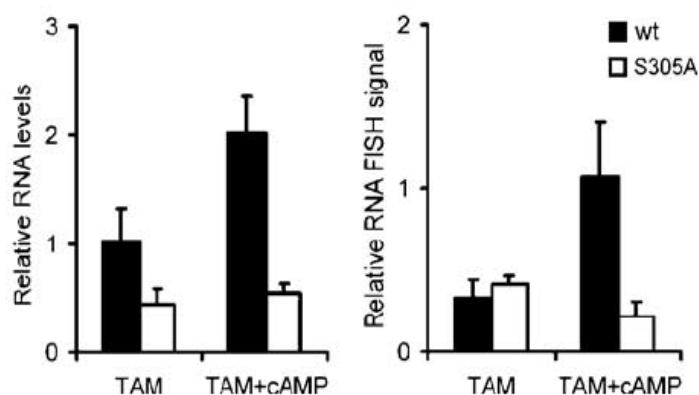
A resistência ao tamoxifeno implicaria, também, o recrutamento da RNA-polimerase II, pela transativação do complexo RE $\alpha$ /SRC-1. E como tal, foi estudado o recrutamento da RNA polimerase II para a região reguladora do gene da prolactina (um alvo bem estabelecido da regulação pelos RE), onde aproximadamente metade das células que expressam o RE $\alpha$  (wt) e o SRC-1<sub>FL</sub> mostraram uma localização da RNA polimerase II no elemento regulador da prolactina tanto na situação do tratamento com E2, como apenas em presença de CTS (Figura 18).

Os resultados da ativação pela PKA, por meio da forskolina, revelam que os níveis das três proteínas (RE $\alpha$ , SRC-1 e RNA polimerase II), se mantêm sob condições de CTS e E2. A ativação pela PKA, na presença de tamoxifeno, resultou no recrutamento da RNA polimerase II para o gene PRL, o que indica que a ativação pela PKA influencia a orientação entre o RE $\alpha$  e o SRC-1. A mutação S305A resulta numa diminuição significativa do recrutamento da RNA polimerase II, sob condições idênticas (Figura 19). Isto indica que o recrutamento da RNA polimerase II, em células tratadas com tamoxifeno, requer a fosforilação do RE $\alpha$  na S305,

pela PKA, que leva a uma reorientação da região C-terminal do recetor com o coativador, estimulando a sua transativação [53].



**Figura 18** - Quantificação da sinalização da RNA polimerase II sobre o gene PRL, a partir de três condições diferentes (CTS, E2 e TAM) e para cada uma delas na presença ou na ausência de Forscolina [53].



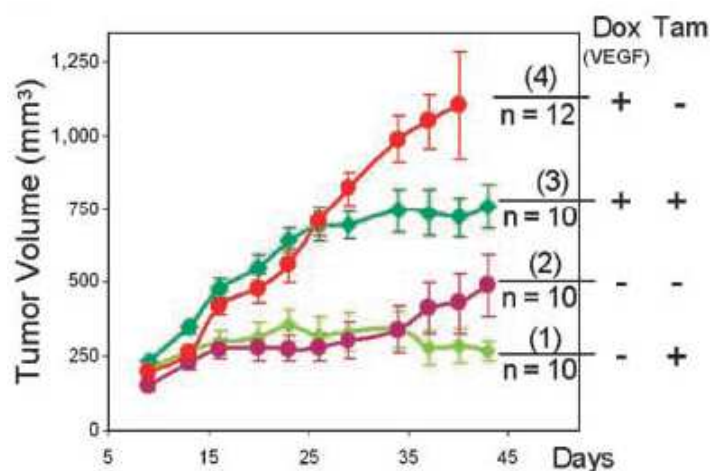
**Figura 19** - Quantificação dos níveis de RNA do RE $\alpha$ , na presença de 4HTM e 4HTM + cAMP, evidenciando as diferenças entre a sequência de referência e a sequência mutada S305A, para as mesmas condições [53].

### 5.5. REDUÇÃO DA EFICÁCIA DO TAMOXIFENO VIA VEGF

Estudos clínicos demonstraram que níveis elevados de VEGF-A<sub>165</sub> estão associados a uma menor DFS e RFS, em doentes com carcinoma da mama avançado, que recebem tamoxifeno como uma terapêutica de primeira linha. Os níveis elevados do factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) também estão associados com uma menor OS. Embora vários estudos tenham demonstrado a importância do VEGF como indicador de prognóstico da gravidade do carcinoma da mama, a sua capacidade para aumentar a resistência ao tamoxifeno está, ainda, pouco documentada [54].

Um grupo de investigadores avaliou a associação entre a indução da expressão do VEGF, com a redução da eficácia do tamoxifeno, *in vivo*, e a aquisição de capacidade metastática das células tumorais. Os ensaios foram realizados em ratinhos ovariectomizados, divididos em quatro grupos. Dois dos quatro grupos foram tratados com doxiciclina, dada a sua capacidade para induzir a expressão do VEGF, no modelo utilizado, que incorporava o gene do VEGF num vetor de expressão *tet-inducible*. Um dos grupos tratados com doxiciclina recebeu, simultaneamente, tratamento com tamoxifeno, o outro não. Os resultados revelam que o volume dos tumores no grupo experimental tratado com tamoxifeno, e que não recebeu

doxiciclina, tornou-se estático e, eventualmente, ocorreu uma regressão. Em contraste, o volume dos tumores no grupo de ratinhos tratados com tamoxifeno, que receberam simultaneamente doxiciclina, continuou a aumentar (Figura 20). A indução da expressão do VEGF aumentou significativamente o crescimento do tumor, no grupo tratado com tamoxifeno (grupo 3 vs grupo 1,  $P < 0,01$ ) e no grupo que recebeu estradiol (grupo 4 vs grupo 2,  $P < 0,01$ ) (Figura 20). Foi fornecido doxiciclina a 0,2 mg/mL, para os grupos 3 e 4. No dia 11, quando o tamanho médio do tumor em todos os grupos atingiu os 200 mm<sup>3</sup>, os animais dos grupos 1 e 3 receberam tamoxifeno, em vez de estradiol<sup>[54]</sup>.



**Figura 20** - Resultados da indução da expressão de VEGF, em quatro grupos de ratinhos, que foram suplementados com E2<sup>[54]</sup>.

## 6. CONCLUSÃO

Durante várias décadas, o tamoxifeno tem sido o tratamento padrão para a terapêutica endócrina adjuvante, do carcinoma da mama RH+, em estadios iniciais da doença. Para as doentes que se encontram na pré-menopausa, este fármaco continua a ser o tratamento escolhido pela maioria dos clínicos. Em doentes na pós-menopausa, os estudos mais recentes têm demonstrado que, os IAs apresentam um maior benefício, do que o tamoxifeno, no risco de recorrência da doença.

A principal questão que se continua a colocar está relacionada com a duração ideal da terapêutica endócrina adjuvante que se deve praticar, e se existem diferenças na efetividade entre os diferentes IAs, bem como se existe um benefício claro para o tratamento adjuvante prolongado.

A farmacogenómica é uma área importante para explicar as variações que ocorrem no metabolismo do tamoxifeno, e que se refletem nos resultados de efetividade do tratamento. É incontornável o facto de as concentrações dos metabolitos ativos serem alteradas consoante os diferentes fenótipos, presentes nas populações, para o principal enzima do metabolismo deste pró-fármaco.

Para além disso, existe também a possibilidade de coadministração de inibidores do CYP2D6, que altera as características fenotípicas dos indivíduos, o que na prática poderá ter impacto no sucesso da terapêutica.

A genotipagem prévia ao tratamento com tamoxifeno seria importante para identificar os indivíduos que são considerados PMs, estando, assim, em risco de inefetividade da terapêutica.

Os mecanismos de resistência ao tamoxifeno são um outro problema associado a esta terapêutica, onde a farmacogenómica deve tentar aprofundar a recolha de informação, que venha a possibilitar a criação de ferramentas que permitam o rastreio destes casos, mais precocemente.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1]. <http://info.cancerresearchuk.org/>. Acedido a 26 de Maio de 2012.
- [2]. Ziogas D. (2012) Risk factors and early detection of breast cancer: facts, questions, and genome-based perspectives. *Current Oncology*, 19:1.
- [3]. Brauch H., Mürdter T., Eichelbaum M., Schwab M. (2009). Pharmacogenomics of Tamoxifen Therapy. *Clinical Chemistry*, 55: 1770 – 1782.
- [4]. Goetz M., Loprinzi C. (2003). A Hot Flash on Tamoxifen Metabolism. *Journal of the National Cancer Institute*, 95: 1734 – 1735.
- [5]. Ferraldeschi R., Howell S. J., Thompson A. M., Newman W.G. (2010). Avoidance of CYP2D6 Inhibitors in Patients Receiving Tamoxifen. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 28: e584 – e585.
- [6]. Garber K. (2005) Tamoxifen Pharmacogenetics Moves Closer to Reality. *Journal of the National Cancer Institute*, 97: 412 – 413.
- [7]. Gudjonsson T., Adriance M., Sternlicht M., Petersen O., Bissell M. (2005) Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10:261 – 72.
- [8]. Schedin P., Elias A. (2004) Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Res*, 6:93 – 101.
- [9]. Setiawan V., Wendy, Monroe K., Wilkens L., Kolonel L., Pike M. Henderson B. (2008) Breast Cancer Risk Factors Defined by Estrogen and Progesterone Receptor Status The Multiethnic Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 169:1251 – 1259.
- [10]. Martinez-Alonso M., Vilaprinyo E., Marcos-Gragera R., Rue M. (2010) Breast cancer incidence and overdiagnosis in Catalonia (Spain). *Breast Cancer Research*, 12: R58.
- [11]. White J., Morrow M., Moughan J., Owen J., Pajak T., DesHarnais S., Winchester D., Wilson J., et al. (2003) Compliance with breast-conservation standards for patients with early-stage breast carcinoma. *Cancer*, 97:893 – 904.
- [12]. Wilkinson N., Shahryarinejad A., Winston J., Watroba N., Edge S. (2003) Concordance with breast cancer pathology reporting practice guidelines. *J Am Coll Surg*, 196:38 – 43.

- [13]. Yang X., Chang-Claude J., Goode E., Couch F., Nevanlinna H., Milne R., Gaudet M., Schmidt M., Broeks A., Cox A., Fasching P., Hein R., et al (2010) Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor Subtypes: A Pooled Analysis From the Breast Cancer Association Consortium Studies. *J Natl Cancer Inst*, 103:250 – 263.
- [14]. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Cancer Epidemiology Unit, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Richard Doll Building, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7LF, UK (2011) Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *British Journal of Cancer*, 105: 709 – 722.
- [15]. Tan S., Lee S., Goh B., et al. (2008) Pharmacogenetics in Breast Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 14:8027 – 8041.
- [16]. <http://nrresource.org/> Acedido a 3 de Julho de 2012.
- [17]. Tilghman S., Nierth-Simpson E., Wallace R., et al. (2010) Environmental hormones: Multiple pathways for response may lead to multiple disease outcomes. *Steroids*, 75:520 – 523.
- [18]. Hammes S., Levin E. (2007) Extranuclear steroid receptors: Nature and actions. *Endocr Rev*, 28:726 – 741.
- [19]. Guidelines da Prática Clínica em Oncologia do cancro da mama, do National Comprehensive Cancer Network. Versão I, 2012.
- [20]. <http://www.breastcancer.org/> Acedido a 26 de Junho de 2012.
- [21]. Ellis I. (2010) Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and molecular biology. *Modern Pathology*, 23: S1 – S7.
- [22]. Karakas C. (2011) Paget's disease of the breast. *Journal of Carcinogenesis*, 10: 100 – 108.
- [23]. Sadler G., Ko C., Cohn J., White M., Weldon R., Wu P. (2007) Breast cancer knowledge, attitudes, and screening behaviors among African American women: the Black cosmetologists promoting health program. *BMC Public Health*, 7: 57 - 65.
- [24]. Fancher T., Palesty J., Paszkowiak J., Kiran R., Malkan A., Dudrick S. (2011) Can Breast Self-Examination Continue to Be Touted Justifiably as an Optional Practice? *International Journal of Surgical Oncology*, 5.
- [25]. Autier P., Bonio M., Middleton R., Dore J., He´ry C., Zheng T., Gavin A. (2010) Advanced breast cancer incidence following populationbased mammographic screening. *Annals of Oncology*, 22: 1726 – 1735.

- [26]. Ames V., Britton P. (2010) Stereotactically guided breast biopsy: a review. *Insights Imaging*, 2:171 – 176.
- [27]. Allred D., Harvey J., Berardo M., Clark G. (1998) Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 11:155 – 168.
- [28]. Criscitiello C., Fumagalli D., Saini K., Loi S. (2011) Tamoxifen in early-stage estrogen receptor positive breast cancer: overview of clinical use and molecular biomarkers for patient selection. *Oncotargets and Therapy*, 4: 1 – 11.
- [29]. Bergamaschi A., Christensen B. Katzenellenbogen. (2011) Reversal of endocrine resistance in breast cancer: interrelationships among 14-3-3 $\alpha$ , FOXM1, and a gene signature associated with mitosis. *Breast Cancer Research*, 13:R70.
- [30]. Rao R., Cobleigh M. (2012) Adjuvant Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Oncology*, 26:1 – 12.
- [31]. M. Eugénia Araújo Pereira (2005) Inibidores da Aromatase. Boletim do CIM, Ordem do Farmacêuticos, rof 2.
- [32]. Smith J. (2008) The Third-Generation Aromatase Inhibitors. *U.S. Pharmacist*, 33:20 – 30.
- [33]. Cuzick, J. (2005) Anastrozole. *Drugs Today*, 41: 227.
- [34]. Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. Resumo das Características do Medicamento do Anastrozol.
- [35]. Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. Resumo das Características do Medicamento do Tamoxifeno.
- [36]. Lammers L., Mathijssen R., Gelder T., Bijl M., Graan A-J., Seynaeve C., Fessem M., Berns E., Vulto A. e Schaik R. (2010) The impact of CYP2D6-predicted phenotype on tamoxifen treatment outcome in patients with metastatic breast cancer. *British Journal of Cancer*, 103: 765 – 771.
- [37]. Lin S., Chen J., Mazumdar M., Poirier D., Wang C., Azzi A., Zhou M. (2010) Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. *Nature Reviews Endocrinology*, 6:485 – 493.
- [38]. Osborne C., Zhao H. Fuqua S. (2000) Selective Estrogen Receptor Modulators: Structure, Function, and Clinical Use. *J Clin Oncol*, 18: 3172 – 3186.
- [39]. Gennari L., Merlotti D., De Paola V., Calabrò A., Becherini L., Martini G., Nuti R. (2005) Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and the Genetics of Osteoporosis: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*, 161:307 – 320.

- [40]. Jordan V., O'Malley B. (2007) Selective Estrogen-Receptor Modulators and Antihormonal Resistance in Breast Cancer. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 25: 5815 – 5824.
- [41]. Riggs B. L., Hartmann L. C. (2003) Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *N Engl J Med*, 348:618 – 29.
- [42]. Zanger U., Turpeinen M., Klein K., Schwab M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*, 392:1093 – 1108.
- [43]. Stearns V., Davidson N., Flockhart D. (2004) Pharmacogenetics in the treatment of breast cancer. *The Pharmacogenomics Journal*, 4:143 – 153.
- [44]. Seruga B., Amir E. (2010) Cytochrome P450 2D6 and outcomes of adjuvant tamoxifen therapy: results of a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 122: 609 – 617.
- [45]. Dunn B., Greene M., Kelley J., Costantino J., Clifford R., Hu Y., Tang G., Kazerouni N., Rosenberg P., Meerzaman D., Buetow K. (2010) Novel pathway analysis of genomic polymorphism-cancer risk interaction in the Breast Cancer Prevention Trial. *J Mol Epidemiol Genet*, 1: 332 – 349.
- [46]. Sideras K., Ingle J., Ames M., Loprinzi C., Mrazek D., Black J., Weinshilboum R., Hawse J., Spelsberg T., Goetz M. (2010) Coprescription of Tamoxifen and Medications That Inhibit CYP2D6. *J Clin Oncol* 28:2768 – 2776.
- [47]. Stearns V., Rae J. (2011) Pharmacogenetics and breast cancer endocrine therapy: CYP2D6 as a predictive factor for tamoxifen metabolism and drug response? *Expert Rev Mol Med*, 10: 17.
- [48]. 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., Barr Fritcher E., Nibbe A. M., Desta Z., Nguyen A., Flockhart D. A., Perez E. A., Ingle J. N. (2007). The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*, 101:113 – 121.
- [49]. Appiani F., Carroll B., Muñoz C., Trecco J. (2011) Tamoxifen-SSRIs interaction: Clinical manifestations of inhibition and lack of inhibition of CYP2D6. *Annals of Clinical Psychiatry*, 23: 152 – 153.

- [50]. Siegelmann-Danieli N., Lomnický D., Katzir J., Bialik M., Loebstein R. (2011) Potent CYP2D6 Inhibiting drugs do not increase relapse rate in early breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Epidemiology*, 125: 505 – 510.
- [51]. Howell A, Cuzick J, Baum M *et al.* (2005) Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*, 365(9453):60 – 2.
- [52]. Regan M., Price K., Giobbie-Hurder A., Thürlimann B., Gelber R. (2011) Interpreting Breast International Group (BIG) 1-98: a randomized, double-blind, phase III trial comparing letrozole and tamoxifen as adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive, early breast cancer. *Breast Cancer Research*, 13:209 – 225.
- [53]. Zwart W., Griekspoor A., Berno V., Lakeman K., Jalink K., Mancini M., Neeffjes J., Michalides R. (2007) PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ERα towards co-activator SRC-1. *The EMBO Journal*, 26. 3534 – 3544.
- [54]. Qu Z., Ginkel S., Roy A., et al. (2008) Vascular Endothelial Growth Factor Reduces Tamoxifen Efficacy and Promotes Metastatic Colonization and Desmoplasia in Breast Tumors. *Cancer Res*, 68: 6232 – 6240.