

Eu, Sofia Sá Leão Alves Martins, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010117, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Julho de 2014.

Orientador:

Professora Dra. Isabel Barbosa

Estagiário:

Sofia Sá Leão Alves Martins

Resumo

Os biomarcadores como indicadores de processos biológicos e patogénicos são uma nova perspectiva de diagnóstico, de terapêutica e de monitorização. No cancro da mama, distinguem-se o RE/RP, o HER2, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, entre outros. O tipo de biomarcador permite fazer o diagnóstico, direccioná-lo para uma terapêutica e ainda, é factor essencial na monitorização desta patologia, ou seja, introduzir o conceito de medicina personalizada.

Actualmente, já existem testes diagnósticos no mercado, principalmente para os genes BRCA, que avaliam a predisposição da mulher vir a desenvolver cancro da mama. Esses testes são realizados a partir de amostras de sangue periférico ou de saliva, quando pedidos por um médico. Se estes forem positivos, o paciente deve recorrer à remoção profiláctica dos ovários ou da mama, consoante o tipo de mutação. Se o carcinoma for RE positivo, a sua terapêutica terá que ser hormonal, utilizando fármacos antagonistas dos receptores (tamoxifeno) ou IAs (anastrozol ou letrozol). Mas quando o biomarcador intrínseco é o HER2, a estratégia de tratamento consiste em anticorpos monoclonais como o trastuzumab. No entanto dentro dos próprios biomarcadores, existe heterogeneidade. Por exemplo as duas isoformas ER α e ER β e a perda do terminal carboxilo do HER2. Estas mudanças influenciam o tratamento mas também poderão ser objecto de estudo para novos tratamentos. Quanto ao prognóstico, existem também testes que avaliam, simultaneamente, um conjunto de genes associados à proliferação celular e à tumorigénese pelas técnicas de PCR e microensaios, que avaliam o risco de recorrência do tumor. São eles o OncotypeDX[®] e o MammaPrint[®].

Para finalizar, uma outra valência essencial dos biomarcadores é a capacidade de estes permitirem novas estratégias terapêuticas. A desregulação da via PI3K-AKT-mTOR e a amplificação dos FGFR são alvos importantes, pois o primeiro é uma cascata complexa, com muitas etapas, que por sua vez leva a um acumular de erros, o segundo por ser responsável pela proliferação celular desmesurada e ser um importante factor na tumorigénese.

Abstract

Biomarkers as indicators of biological and pathological processes are a new perspective of diagnosis, therapy and monitoring. In breast cancer, among others biomarkers, the principals are the ER/PR, HER2, BRCA1 and BRCA2 gene mutations. The type of biomarker allows the realization of the diagnosis leads him to a therapy and also is an essential factor on monitoring the pathology, which it's called "personalized therapy".

Nowadays, there are commercialized diagnostic tests, mostly for BRCA genes, that evaluate women predisposition in developing breast cancer. Those tests are realized from peripheral blood or saliva samples and they need to be requested from a doctor. If the test turns positive, the patient should proceed to a prophylactic removal of the breast or of the ovaries, depending on the kind of the mutation. If the cancer is ER positive, the treatment should be hormonal with antagonists of the ER (tamoxifeno) ou AIs (anastrozol or letrozol). But when the intrinsic biomarker is HER2, the treatment strategies consist on monoclonal antibodies such as trastuzumab. However, within the same biomarkers there is some heterogeneity. For instance, the two isoforms RE α and RE β and the loss of the terminal carboxyl of the HER2. These changes influence the treatment but can also be the object of futures studies for new kinds of treatment. Regarding the prognosis, there also tests that simultaneously evaluate a conjunct of genes related to cellular proliferation and tumorigenesis, through techniques such as microarrays and PCR, which assess the recurrence risk of the tumor. They are the OncotypeDX[®] and the Mammaprint[®].

In conclusion, another biomarker's essential capacity is that they have to allow new therapeutically strategies. The dysregulation of the PI3-AKT-mTOR pathway and the FGFR amplification are important targets, because the first one it's a complex downstream with several steps, which can lead to an accumulation of alterations and the second for being responsible for the decontrolled cellular proliferation and an important factor in the tumorigenesis.

Índice

Lista de Abreviaturas	6
1. Introdução.....	8
2. Caracterização Clínica do Cancro da Mama.....	9
2.1. Factores de Risco.....	10
3. Biomarcadores	11
3.1. Biomarcadores no Cancro da Mama	11
3.1.1. Receptores de Estrogénios.....	11
3.1.2. HER2.....	12
3.1.3. BRCA1 e BRCA2.....	13
3.2. Subtipos de cancro	14
3.3. Tumorigénese	15
4. Medicina Personalizada no Cancro da Mama.....	15
4.1. Diagnóstico.....	16
4.2. Tratamento.....	17
4.3. Heterogeneidade nos Biomarcadores	19
4.3.1. Receptores de Estrogénio	19
4.3.2. HER2.....	20
4.4. Prognóstico.....	21
4.4.1. Oncotype DX®	21
4.4.2. Mammaprint®.....	22
5. Novos métodos moleculares de diagnóstico e de terapêutica	22
5.1. Desregulação da via da PI3K	22
5.2. Amplificação do FGFR.....	23
6. Conclusão.....	25
7. Bibliografia.....	26

Lista de Abreviaturas

- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- AKT** - Proteína cinase B
- AP-I**- Fator de transcrição/proteína ativadora-I
- ARN** – Ácido ribonucleio
- CDI**- Carcinoma ductal invasivo
- CDIS**- Carcinoma ductal *in situ*
- CLI** - Carcinoma lobular invasivo
- CLIS**- Carcinoma lobular *in situ*
- DNase** – Desoxirribonuclease
- DMI** - emtasine
- EGFR** – Receptor do factor de crescimento epidérmico
- eIF4E** – Factor eucariótico de iniciação de translação E
- ERE** – Elemento de resposta ao estrogénio
- ERK** - Sinal extracelular regulador das cinases
- FDA** – Food and Drug Administration
- FGFR**- Receptor do factor do crescimento do fibroblasto
- FPET**- Formalin-fixed, paraffin-embedded
- HER2**- Receptor 2 do factor de crescimento epidérmico humano
- HSP90** – Proteína chaperona 90
- IAs**- Inibidores da aromatase
- IGFRI** - Receptor do factor de crescimento tipo insulina I
- Ki67** – Índice de proliferação
- MAPK**- Proteína cinase activada por mitogénio
- mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro
- mTOR**- Molécula alvo da rapamicina
- NF-kB** – Factor nuclear kappa B
- PCR**- Polymerase chain reaction
- PI3K**- Fosfatidilinositol-3 cinase
- PTEN**- Gene supressor de tumor
- RE**- Receptor de estrogénio
- RTK**- Receptor da tirosina cinase
- RT-PCR** Reverse-transcriptase polymerase chain reaction

RP- Receptor de progesterona

SNP's- Single nucleotides polymorphisms

T-DMI- Trastuzumab-emtasine

I. Introdução

O cancro da mama é a neoplasia mais comum na mulher, tanto em países desenvolvidos como em países menos desenvolvidos. É uma das doenças com maior impacto na nossa sociedade, não só por ser muito frequente, e associado a uma imagem de grande gravidade, mas também porque agride um órgão cheio de simbolismo, na maternidade e na feminilidade. As taxas de incidência variam de forma universal, ou seja vai desde 19,3 por 100 000 mulheres na África Oriental até 89,7 por 100 000 mulheres na Europa Ocidental. Em Portugal, anualmente são detectados cerca de 4500 novos casos de cancro da mama, e 1500 mulheres morrem com esta doença ^(1,2).

Embora os países mais desenvolvidos detenham uma maior percentagem de casos de cancro da mama, é certo que as suas taxas de sobrevivência são mais elevadas quando comparadas com países mais pobres. Por exemplo, 80% de sobrevivência na América do Norte, Suécia e Japão em contrapartida com taxas de 40% em países menos desenvolvidos. As baixas taxas de sobrevivência em países menos desenvolvidos podem ser explicadas maioritariamente pela ausência de programas de detecção precoce, resultando numa maior proporção de mulheres diagnosticadas tardiamente, e também devido à falta de recursos de tratamento e diagnóstico. Por oposição, a diminuição da taxa de mortalidade em países desenvolvidos deve-se à detecção precoce da doença e à descoberta de novas estratégias de tratamento. Os avanços das técnicas imagiológicas permitem a detecção de tumores mamários em estados iniciais da doença assim como o uso de esquemas de quimioterapia mais eficazes contribui para um melhor prognóstico, logo o aumento da sobrevivência ⁽²⁾.

Historicamente, o cancro da mama foi a primeira doença maligna para a qual a determinação de tratamento molecular foi introduzida. Em particular, a análise da expressão do receptor hormonal com terapia endócrina e a análise de terapia alvo com anticorpos específicos como o trastuzumab para o HER2, têm um impacto imediato nas decisões de tratamento. Por outro lado, a indicação de quimioterapia tem sido, tradicionalmente baseada em factores de prognóstico, como a histopatologia e características clínicas do tumor, abordagens combinadas, resultados de prognósticos e algoritmos clínicos como o St.Gallen Consensus ⁽³⁾.

Actualmente não é sustentável considerar o cancro da mama como uma única doença. Os seus subtipos podem ser definidos por testes genéticos ou aproximações a esta

classificação por imuno-histoquímica. Estes subtipos, têm diferentes factores de risco epidemiológico, histórias naturais diferentes e diferentes respostas para terapias sistémicas e locais. Logo, estas diferenças implicam que os clínicos devam considerar os casos de cancro da mama, tendo em conta os vários distintos subtipos, na medida em que, correctamente avaliem as evidências relevantes e que atinjam um estratagema terapêutico apropriado ⁽⁴⁾.

2. Caracterização Clínica do Cancro da Mama

Antes de caracterizar a patologia, é necessário elucidar sucintamente, a estrutura mamária. As mamas são glândulas secretoras e estão situadas diante dos músculos peitorais que, por sua vez, cobrem as costelas. Esta é constituída por lóbulos, ductos e estroma. Cada mama encontra-se dividida em 15 a 20 secções, os chamados lobos. Por sua vez, os lobos são constituídos por muitos lóbulos, mais pequenos e é aqui que se encontram as células produtoras do leite. O leite flui dos lóbulos, até ao mamilo, através de canais finos, os ductos – galactóforos. Entre os lóbulos e separando a glândula da pele e da parede torácica está o estroma, 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, habitualmente mais escura que o resto da pele da mama ⁽⁵⁾.

A grande maioria dos tumores malignos da mama tem origem nos ductos ou nos lóbulos da mama, que são tecidos glandulares; como tal, são denominados adenocarcinomas. Os dois tipos mais frequentes são o carcinoma ductal e o carcinoma lobular. O termo *in-situ* define o cancro da mama precoce, quando se encontra limitado aos ductos ou aos lóbulos, sem que haja invasão dos tecidos mamários vizinhos ou de outros órgãos. O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é um tumor da mama não invasivo mais frequente. Carcinoma lobular *in situ* (CLIS) embora não seja um verdadeiro cancro é, por vezes, classificado como um cancro da mama não invasivo. O carcinoma ductal invasor (CDI) é o cancro da mama mais frequente com origem nos ductos e com capacidade de invadir os tecidos vizinhos. Nesta fase, pode disseminar-se através dos vasos linfáticos ou do sangue, atingindo outros órgãos. Cerca de 80% dos cancros da mama invasores (ou invasivos) são carcinomas ductais. O carcinoma lobular invasor (CLI) tem origem nas unidades produtoras de leite, ou seja, nos lóbulos. À semelhança do CDI, pode disseminar-se para outras partes do corpo. Cerca de dez 10% dos cancros da mama invasores são carcinomas lobulares. E por fim, o carcinoma inflamatório da mama que é um cancro muito raro (cerca de 1 a 3%) agressivo, com maior probabilidade de

metastização, que se caracteriza por vermelhidão da pele da mama, prurido e com o mamilo invertido. Relativamente à progressão do cancro, este está dividido em 5 estadios: **Estadio 0**, estão situados os carcinomas não invasivos, CDIS ou CLIS, não existe crescimento tumoral nos gânglios, ou noutros órgãos distantes; **Estadio I**, quando o tumor tem no máximo 2 cm, sem qualquer evidência nos gânglios linfáticos próximos; **Estadio II**, inclui tumores até 5 cm, mas já com envolvimento dos gânglios linfáticos, ou então um tumor primário com mais de 5 cm, sem metástases nos gânglios; **Estadio III** quando o tumor tem mais de 5 cm e há envolvimento dos gânglios linfáticos da axila do lado da mama afectada e o **Estadio IV**, quando já existem metástases distantes, como no fígado, ossos, pulmão, pele ou outras partes do corpo^(6,5).

2.1. Factores de Risco

O factor de risco mais perigoso para o cancro da mama é a herança de uma mutação inactiva em algum dos genes pertencentes à família de genes: BRCA1, BRCA2, pois alterações nestes genes, estão relacionadas com 85% de risco de cancro da mama e 44% no ovário. O segundo factor de risco mais elevado é a idade: três quartos desta patologia estão presentes em mulheres pós-menopausa, em mulheres com menos de 40 anos a probabilidade de incidência é de 5% e em mulheres com menos de 30 anos é muito raro⁽⁷⁾. A maioria de outros factores de risco é explicada pela exposição aos estrogénios. Os estrogénios são necessários para o normal crescimento dos tecidos, mas também são responsáveis pela promoção de certos tumores, como o cancro da próstata, do endométrio e especialmente o cancro da mama. De facto, 30 a 50% dos cancros mamários são considerados estrogénios-dependentes. Já referido anteriormente, a maior incidência de cancro mamário, ocorre em mulheres pós menopausa, cuja função ovárica e o controlo hipofisiário de produção de estrogénios cessaram⁽⁸⁾. Assim, a menarca precoce, menopausa tardia, a nuliparidade, ausência de lactação, terapêutica hormonal de substituição, contracepção oral aumentam o tempo de exposição aos estrogénios. A obesidade também está associada a um aumento de risco de cancro da mama em mulheres pós menopausa. Os motivos pelo qual pessoas com maior gordura corporal são mais susceptíveis de desenvolver cancro da mama ainda são debatidos, mas é inegável que os adipócitos expressam a aromatase, enzima que converte androgénios em estrogénios, e também a *17 β -hydroxysteroid dehydrogenase*, que converte a estrona em *17 β -estradiol* mais activo. Como o tecido adiposo

se acumula no corpo, as concentrações séricas e locais destas hormonas vão tornar-se elevadas ⁽⁷⁾.

3. Biomarcadores

Biomarcadores são indicadores de processos biológicos e patogénicos, que uma vez validados, têm um papel crucial na pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Podem ser utilizados no diagnóstico da doença, na previsão da progressão da patologia, na avaliação dos benefícios ou toxicidade resultante de uma intervenção terapêutica e também na monitorização do tratamento. Consideram-se biomarcadores tradicionais, a pressão arterial, glicemia, volume pulmonar e o volume urinário. Actualmente tem-se vindo a desenvolver o conceito de “**personalized therapy**” através de biomarcadores moleculares como proteínas (enzimas), epigenéticos (DNA metilado ou histonas modificadas) e biomarcadores baseados em DNA (SNP's, inserções e deleções no DNA) ⁽⁹⁾.

3.1. Biomarcadores no Cancro da Mama

O primeiro estudo que levou ao surgimento de uma nova classificação do cancro da mama, veio dos laboratórios Perou and Sorlie, há cerca de 10 anos atrás. Através da tecnologia de microensaios de DNA, estes investigadores identificaram distintos subgrupos moleculares de cancro da mama com um prognóstico diferente, denominados de *luminal A*, *luminal B*, HER2 positivo (ou *non-luminal*) e *basal-like* (triplo negativo). Esta foi a primeira demonstração de que o cancro da mama não é uma doença única com distintas morfologias, mas antes um grupo heterogéneo de patologias definidas por vias moleculares diferentes ⁽¹⁰⁾.

Na neoplasia da mama distinguem-se vários tipos de biomarcadores, em que a sua presença determinará o subtipo de cancro que, por sua vez, possibilitará um diagnóstico discriminatório e uma terapêutica direccionada. De forma sucinta destacarei aqueles que se assemelham mais pertinentes.

3.1.1. Receptores de Estrogénios

Os RE pertencem a uma família de receptores hormonais nucleares, que engloba também os receptores de progesterona (RP), hormonas tiróideas, vitamina D e ácido retinóico. Funcionalmente representam factores de transcrição quando activados pelo respectivo ligando. Será importante referir que existem duas isoformas de RE, RE- α e RE- β , sendo que a expressão destas não é uniforme nos vários tecidos. A actividade hormonal

depende destes receptores, isto porque os estrogénios têm a capacidade de estimular a divisão células e, desta forma, possuem um papel bem estabelecido na carcinogénese mamária, onde actuam como iniciadores e como promotores do processo neoplásico ^(11,12).

A activação destes receptores pode ser por múltiplas vias, no entanto existem duas vias distintas mais estudadas, a genómica (iniciada no núcleo) e a não genómica (iniciada na membrana plasmática). A genómica pode ocorrer segundo duas formas: clássica e não clássica. A via clássica é um mecanismo que explica que depois da ligação do estrogénio ao RE, este dissocia-se da proteína HSP90 (inactivadora), activa-se e sofre uma alteração conformacional, promovendo a sua ligação a locais do DNA com alta afinidade, localizada na região do promotor. Consequentemente ocorre a transcrição de genes e consoante o tipo de célula, o local/promotor, varia a resposta. Relativamente ao RE da membrana encontra-se perto ou ligado à face interna da membrana plasmática através de moléculas lipídicas como a caveolina-1, associado a receptores de membrana (EGFR, IGFRI, HER2). Com a ligação do estrogénio ao receptor, este liga-se na forma de dímero a proteínas incluindo proteínas adaptadoras, Proteína G, Src, interagindo com receptores de factores de crescimento, cinases citoplasmáticas (MAPKs, PI3K, AKT) e outras enzimas. As cinases fosforilam o RE o que resulta na activação da transcrição nuclear. Na via não clássica, o RE pode influenciar genes de transcrição sem a sequência ERE, regulados por outros factores que se ligam a sequências alternativas de DNA ^{13, 14)}.

3.1.2. HER2

O receptor 2 do factor de crescimento epidérmico humano é um oncogene, localizado no cromossoma 17q e codifica um receptor transmembranar da tirosina cinase que é um membro da família EGFR. Esta família de receptores está envolvida em comunicações celulares, primariamente através de ligação de factores externos de crescimento (ligandos) que afectam a transcrição de vários genes, fosforilando ou desfosforilando uma série de proteínas transmembranares e intermediários intracelulares, muitos dos quais possuem actividade enzimática. A activação do receptor requer três variáveis: o ligando, o receptor e o parceiro para dimerizar. Após a ligação com o receptor, este deve interagir com outro receptor idêntico ou relacionado estruturalmente – este processo denomina-se dimerização e activa a fosforilação que por sua vez desencadeia a cascata de sinalização ^(15,16). Portanto após a ligação entre ligando e um membro da família EGFR, o receptor consegue dimerizar com vários membros da família (HER2, HER3 ou

HER4). Este processo desencadeia a cascata de sinalização, que inicia a actividade enzimática de uma proteína que conseqüentemente iniciará a actividade enzimática de outra proteína. A maioria das cascatas envolvidas são a da MAP cinase, a da P13 cinase/AKT e o NF-κB, proteína que controla a transcrição do ADN, que ultimam a o controlo da proliferação, sobrevivência, adesão e motilidade celular. A amplificação do gene HER2 foi identificada em 10-34% dos cancros da mama e está uniformemente associada com a sobre-expressão da proteína HER2 (p185neu) sendo que a incidência de uma única cópia amplificada é muito rara. A sua amplificação condiciona a cascata de sinalização, que em contrapartida com as condições fisiológicas normais, preconiza a proliferação celular descontrolada, a capacidade invasiva do tumor, a angiogénese acelerada, a metastização e a apoptose reduzida ^(17,18).

3.1.3. BRCA1 e BRCA2

Os genes BRCA1 e BRCA2 são produtores de proteínas supressoras de tumores. O BRCA1 encontra-se no cromossoma 17 enquanto o BRCA2 localiza-se no cromossoma 13. Em particular o BRCA1, é uma fosfoproteína que desempenha um papel importante actuando como um factor de vigilância do genoma e formando numerosos complexos diferentes que estão envolvidos em processos celulares, como o reparo do ADN, regulação da apoptose e regulação da transcrição do ADN. A alteração neste gene está associada a mais de metade do cancro da mama hereditário, que pode ser uma mutação no gene ou devido à sua hipermetilação ^(19, 20, 21). Está provado que a maior parte de portadores da mutação do BRCA1 possuem um alelo normal e funcional do gene, pois a deleção do gene em ratos resulta na morte do embrião. Os portadores desta mutação têm maior probabilidade de desenvolver cancro em tecidos com resposta hormonal, como na mama e nos ovários. Mas, curiosamente, a terapia hormonal não é suficiente para tratar neoplasias associadas a esta mutação porque geralmente apresenta características *basal-like*. Este fenómeno é explicado pela interacção entre o BRCA1 e o RE. O BRCA1 actua como inibidor da sinalização E-RE, inibindo o RE ou inibindo a cascata de sinalização deste. A interacção funcional entre ambos promove a qualidade da replicação do ADN quando o complexo E-RE activa a proliferação celular. Quando o BRCA1 está ausente ou insuficiente, o equilíbrio é afectado e as células acumulam mutações genómicas, contribuindo para a transformação oncogénica das células epiteliais mamárias. Há diferentes formas para que haja esta interacção, exemplificando, o BRCA1 é capaz de reprimir a activação da sinalização do ER, formando directamente um

complexo com este ou, demonstrado por outros estudos que regula directamente o p300 (componente do complexo activador do RE), através de inúmeros mecanismos ^(21, 22).

3.2. Subtipos de cancro

A classificação do cancro da mama segue os parâmetros que **A. Goldhirsch** e seus colaboradores estabeleceram de forma esquemática, de maneira a uniformizar a sua etiologia, classificando-os em subtipos, *luminal A*, *luminal B*, sobre-expressão de HER2 e o *basal-like* ou triplo negativo, representados na tabela I. Os cancros luminais estão caracterizados pela presença de RE ou RP enquanto os cancros *basal-like*, são classificados como triplo negativo, pois não apresentam RP ou RR nem HER2 e ainda o *non-luminal*. Note-se a distinção entre *luminal A* e *luminal B* sendo devido à presença de HER2, sendo que o *luminal B* HER2- está associado a uma alta proliferação pela presença do Ki67 ⁽⁴⁾. O ki-67, denominado de índice de proliferação, é um antigénio presente em células em divisão, mas que está ausente no resto do crescimento celular, é um biomarcador em vários cancros.

Relativamente à sua prevalência, a maioria dos cancros é de origem luminal, em que a prevalência do *luminal A* é de 40% e a de *luminal B* é de 20%. O *basal-like*, que se considera triplo negativo, devido à ausência de HER2, RE ou RP, tem uma prevalência de 15 a 20%, e estão associados a uma disfunção da via BCRA1. O *non-luminal*, HER2 positivo, com prevalência de 10 a 15%. O *luminal A* e B têm um melhor prognóstico e uma taxa de sobrevivência que o *basal-like*, que é um tumor mais agressivo e com um pior prognóstico. Relativamente ao HER2 positivo, embora seja menos prevalente, é o que está associado a uma maior taxa de recidiva e metástases, ou seja, é o tipo de cancro com pior prognóstico ^(4, 23).

Tabela I - Definições substitutas dos subtipos intrínsecos do cancro da mama. Classificação do cancro da mama mediante o biomarcador ⁽⁴⁾.

Intrinsic Subtype (1)	Clinico-pathologic definition	Notes
Luminal A	'Luminal A' ER and/or PgR positive(76) HER2 negative (77) Ki-67 low (<14%)'	This cut-point for Ki-67 labelling index was established by comparison with PAM50 intrinsic subtyping (7). Local quality control of Ki-67 staining is important.
Luminal B*	'Luminal B (HER2 negative)' ER and/or PgR positive HER2 negative Ki-67 high 'Luminal B (HER2 positive)' ER and/or PgR positive Any Ki-67 HER2 over-expressed or amplified	Genes indicative of higher proliferation are markers of poor prognosis in multiple genetic assays (78). If reliable Ki-67 measurement is not available, some alternative assessment of tumor proliferation such as grade may be used to distinguish between 'Luminal A' and 'Luminal B (HER2 negative)'. Both endocrine and anti-HER2 therapy may be indicated.
Erb-B2 overexpression	'HER2 positive (non luminal)' HER2 over-expressed or amplified ER and PgR absent	
'Basal-like'	'Triple negative (ductal)' ER and PgR absent HER2 negative	Approximately 80% overlap between 'triple negative' and intrinsic 'basal-like' subtype but 'triple negative' also includes some special histological types such as (typical) medullary and adenoid cystic carcinoma with low risks of distant recurrence. Staining for basal keratins (79) although shown to aid selection of true basal-like tumors, is considered insufficiently reproducible for general use.

3.3. Tumorigénese

Para além da existência de biomarcadores, e da sua importância no processo de desenvolvimento da neoplasia e entre outros já referido anteriormente, o desenrolar do carcinoma é processo muito mais complexo. É globalmente aceite que a tumorigénese se trate de um processo com várias fases, que advém da acumulação sucessiva de mutações nos tecidos celulares, ainda que só um número restrito de mutações seja conhecido e relevante ⁽²⁴⁾. Em contrapartida o processo químico do cancro é bem dividido por etapas: iniciação, desenvolvimento e progressão, elucidadas na Figura 1. A iniciação envolve a alteração irreversível de uma célula e normalmente está sempre associada a uma mutação genética, podendo ocorrer em vários tecidos. O desenvolvimento é quando a célula alterada se expande para um tumor visível e indubitavelmente ocorrem factores epigenéticos. Os produtos finais do desenvolvimento são geralmente células pré-malignas, subsequentemente a acumulação de alterações genéticas ocorre em uma (ou algumas) células pré-malignas e estas convertem-se em malignas originando o tumor primário. No entanto, numa primeira instância as células do tumor primário não são invasivas. Uma nova acumulação de mutações genéticas nas células do tumor primário levam a que estas ganhem capacidades invasivas iniciando-se a progressão, que se caracteriza pelo crescimento do tumor ^(25; 26). Realço a importância das mutações no BRCA1, que tendo em conta o descrito anteriormente, é um pertinente biomarcador no processo de tumorigénese, isto porque, é o gene melhor estudado no carcinoma mamário.

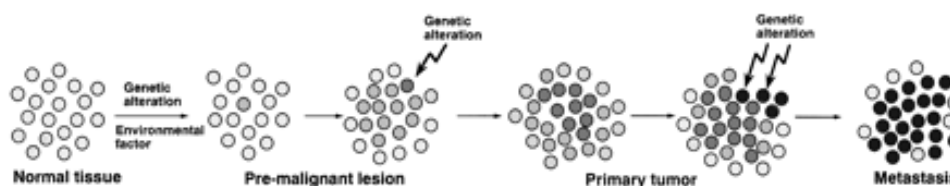


Figura 1 - Etapas da progressão maligna do cancro humano em associação com a acumulação de alterações genéticas nas células. Processo químico da formação do tumor, desde o tecido normal, célula pré-maligna, tumor primário a metastatização. ⁽²⁶⁾

4. Medicina Personalizada no Cancro da Mama

Portanto, o prognóstico clássico e os critérios preditivos não são suficientemente específicos para que seja feita a decisão relativamente a uma quimioterapia adjuvante. Na última década, surge uma nova abordagem conceptual na fisiologia do cancro da mama, que nos proporcionou uma nova esperança para se melhor entender a biologia da doença e a

monitorização da terapia. Esta aproximação foi inicialmente baseada em testes de expressão genética e posteriormente modificada para a técnica quantitativa de *Real-Time polymerase chain reaction* (gRT-PCR) e outros métodos moleculares⁽³⁾.

4.1. Diagnóstico

Os métodos tradicionais mais utilizados para a detecção do cancro da mama são a mamografia e a análise de tecidos obtidos por biópsia. O diagnóstico diferenciado do cancro da mama é importante, pois direcciona o paciente para o tratamento adequado. Assim todas as mulheres, uma vez diagnosticadas com cancro da mama terão que fazer o teste dos receptores hormonais usando a técnica de imuno-histoquímica. Actualmente, o método utilizado mais frequentemente para a detecção de receptores hormonais (RE/RP) é a imuno-histoquímica, utilizando anticorpos monoclonais. Assim, consoante a percentagem de células que expressam RE opta-se pela terapia mais adequada. A marcação de mais de 50% das células é sinal de positividade e indicação para terapêutica hormonal. A baixa percentagem pode ser um factor indicador da necessidade de quimioterapia, além da terapêutica hormonal⁽²⁷⁾. Na amostra do tecido mamário deverá, também, ser analisado o aumento (ou sobre-expressão) HER2. Relativamente à mamografia como ferramenta de diagnóstico precoce esta apresenta várias limitações. Por exemplo, esta pode não detectar pequenos tumores e é pouco útil para mulheres mais novas, uma vez que, estas têm o tecido mamário mais denso⁽²⁸⁾. Se uma paciente tiver uma mamografia suspeita, terá que ser feita uma biópsia para concluir o diagnóstico. No entanto, a biópsia também apresenta uma série de dificuldades, como o tamanho do tumor a ser reduzido e a relutância do paciente a submeter-se a um procedimento invasivo. Daí, a evolução para uma nova área de diagnóstico: o diagnóstico molecular. Porém, é preciso salientar que os métodos de diagnósticos tradicionais e o diagnóstico molecular actuam em diferentes planos. Isto é, a mamografia é uma ferramenta utilizada para o público em geral, economicamente acessível enquanto o teste genético é direccionado para indivíduos em risco e é muito dispendioso. Além disso, uma mamografia com resultado positivo indica que um tumor está presente, em contrapartida, o mapeamento genético apenas determina o risco da pessoa vir a desenvolver uma neoplasia. Já discutido anteriormente, os genes BRCA-1 e BRCA-2 estão associados a um cancro muito agressivo e hereditário. Os testes que irei discutir envolvem estes genes, pois são estes que se encontram mais estudados. Para mulheres que tenham um historial vasto de neoplasia da mama e ovário na família já existem testes genéticos que podem

confirmar a presença de mutações nestes genes. Por exemplo, se uma mulher tem um familiar directo (como a mãe) com uma mutação confirmada no gene BCRA-1, é aconselhado proceder ao teste. No entanto, se não existir essa confirmação, mas se já vários familiares padeceram desta neoplasia mas com causa desconhecida, o teste também é aconselhado. No entanto, o mais fiável é fazer o teste no familiar doente e se este for BCRA positivo, os familiares directos deverão realizar o teste⁽²⁹⁾. Nos Estados Unidos já existem laboratórios que comercializam estes testes: Myriad Genetics, Ambry GeneticsTM e GeneDx^(30, 31, 32) baseados em tecnologias de PCR, microensaios e cromatografia. São realizados a partir de amostras de saliva ou sangue periférico e têm de ser requisitados por um médico. Os resultados demoram entre 2 a 4 semanas e os preços rondam entre os 300 e os 5000 dólares⁽³³⁾.

4.2. Tratamento

O cancro da mama é uma doença complexa e o seu tratamento é multiaxial, englobando a terapêutica local (tratamento que remove ou “destrói” as células cancerígenas) como a cirurgia e radioterapia, e a sistémica (tratamento que “entra” na corrente sanguínea, com o objectivo de “destruir” ou controlar o cancro em todo o organismo) como a hormonoterapia, a quimioterapia, a imunoterapia, e mais recentemente as terapêuticas-alvo^(5, 34). Quando se apura o biomarcador intrínseco à doença, a terapêutica é seleccionada de acordo com este. Começamos pelo paciente que apresenta cancro da mama ER positivo. A primeira terapia direccionada foi realizada com o tamoxifeno, antagonista dos receptores de estrogénio, que actua ligando-se competitivamente aos receptores de estrogénios, inibindo a proliferação de células tumorais, que ocorre quando as hormonas se ligam a estes receptores. Está indicado em todas as mulheres que sejam RE positivo, como terapia adjuvante e deve ser feita a toma de 10 mg do fármaco duas vezes por dia durante 5 anos. Outra classe de tratamento é representada pelos inibidores da enzima aromatase, que bloqueiam a conversão de androgénios em estrogénios. Anastrozol e letrozol foram os primeiros agentes não esteróides registados como inibidores não covalentes e reversíveis da enzima aromatase. Após o seu registo, foi demonstrado a sua superioridade em relação ao tamoxifeno no tratamento em mulheres pós menopausa. O terceiro a ser desenvolvido é o exemestane, um agente esteróide covalente e irreversível quando se liga à enzima alvo. Recentemente, descobriu-se que os metabolitos do tamoxifeno inibem a aromatase *in vitro*. Estes dados podem abrir novas perspectivas, na identificação de uma nova molécula IAs com

um melhor perfil tolerável. O último tratamento endócrino registado trata-se do fulvestrant, um antagonista puro do ER, que foi primeiramente aprovado para o tratamento de mulheres pós menopausa com metástases. Quanto à terapêutica contra o HER2 são utilizados, anticorpos monoclonais, como o trastuzumab ou pequenas moléculas inibidoras da tirosina cinase como o lapatinib⁽¹⁷⁾. O trastuzumab foi o primeiro anticorpo monoclonal humanizado, aprovado pela FDA, dirigido ao IV domínio extracelular do HER2, com bons resultados mas muitos pacientes continuam a ter a recidivas e com metástases incuráveis⁽³⁵⁾. Estudos mais recentes apresentam dois novos agentes, aprovados pela FDA, para o tratamento de cancro da mama HER2 positivo avançado: o anticorpo monoclonal pertuzumab e o conjugado anticorpo-toxina trastuzumab-emtansine⁽¹⁷⁾. Enquanto o trastuzumab é direccionado para o domínio IV, o anticorpo monoclonal pertuzumab para o domínio extracelular II, inibindo a homo e heterodimerização (mediada por um ligando), logo, proíbe o início da cascata de sinalização intracelular⁽³⁵⁾. O T-DMI (trastuzumab-emtansine) é uma agente que conjuga as capacidades anti-tumorais anti-HER2 do trastuzumab com as propriedades citotóxicas do agente inibitório dos microtúbulos (DMI - derivado do maytansine). Embora se encontre em Fase III dos ensaios clínicos o T-DMI apresenta elevadas taxas de remissão em cancros HER2+⁽³⁶⁾. De forma esquemática, as terapêuticas de acordo com os biomarcadores intrínsecos estão representados na Figura 2.

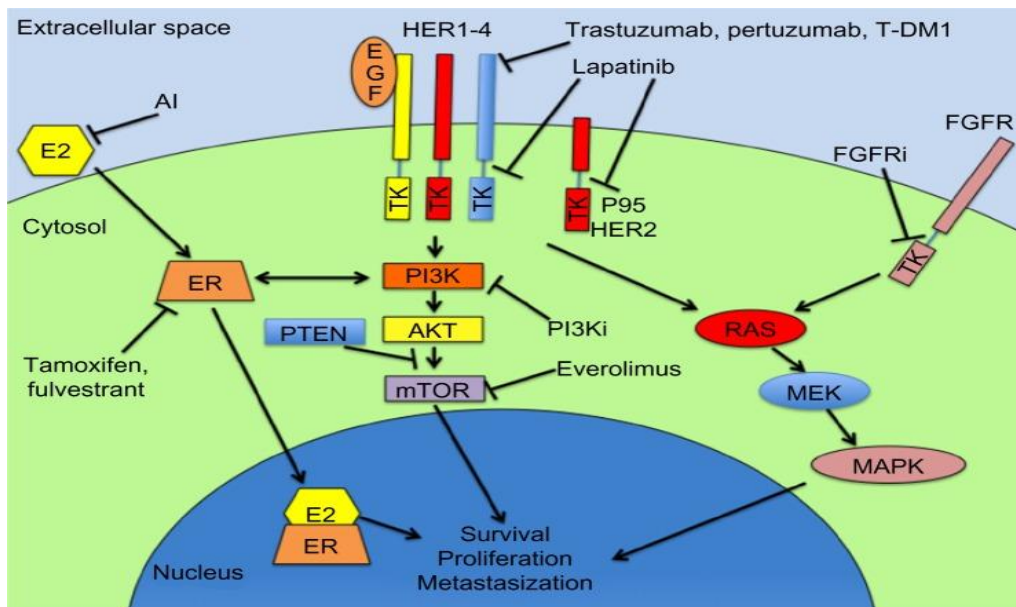


Figura 2 - Representação esquemática dos principais biomarcadores alvo e os seus fármacos inibitórios no tratamento do cancro da mama. Esquema baseado no conhecimento de alterações genéticas e das consequências de alterações nas cascatas de sinalização⁽¹⁰⁾.

Já referido anteriormente, o tipo de cancro mais agressivo é o triplo negativo, que é causado por mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, genes supressores de tumores, que detêm papel essencial de reparo do ADN e no controlo do ciclo celular. Para as mulheres com os genes mutantes, o risco de cancro da mama é de 40% a 85% e para cancro do ovário é de 16% a 60%^(37, 38, 39). Como medidas profiláticas mediante o caso, a paciente pode optar por mastectomia (remoção de ambas as mamas) ou pela ooforectomia profilática (remoção de ambos os ovários). Estas medidas dependerão consoante o gene mutante pois se a mutação for no BRCA2, o cancro da mama poderá ser candidato a tratamento com hormonoterapia, ao invés do BRCA1 que está relacionado com RE negativo. Começando pelo BRCA2, a paciente deve ser aconselhada a realizar a ooforectomia, que reduz o risco em 72% de cancro da mama, quando realizada antes da menopausa, uma vez que o ovário produz estrogénios^(33, 40). Por conseguinte, os portadores de mutação no BRCA1, a remoção dos ovários reduz o risco de cancro ovárico em 85%, mas não reduz significativamente o risco de cancro da mama. Isto porque, mulheres com mutações no gene BRCA1 estão mais predispostas a desenvolver cancro da mama RE negativo. Nos finais da década de 90, um ensaio clínico denominado *Breast Cancer Prevention Trial*, foi realizado com o principal objectivo de determinar se a administração de tamoxifeno, durante pelo menos 5 anos na prevenção no cancro da mama invasivo em mulheres de risco elevado⁽⁴¹⁾. De início, este ensaio clínico demonstrou uma redução de risco de cancro da mama entre 45% a 50%, no entanto, resultados tardios revelaram que a redução de risco através do tamoxifeno, figura-se ser mais significativa em mulheres portadores de mutações no BRCA2, pois tendem a desenvolver cancro da mama RE positivo⁽³³⁾.

4.3. Heterogeneidade nos Biomarcadores

Identificado o biomarcador correctamente, seria expectável que não ocorresse qualquer problemática com o tratamento. No entanto, por vezes, o tratamento não é o mais eficaz, devido a haver heterogeneidade dentro dos biomarcadores.

4.3.1. Receptores de Estrogénio

Exemplificando, os receptores de estrogénios têm duas isoformas o RE α e o RE β , que são codificados por dois genes diferentes o ESR1 e o ESR2, respectivamente. O ambiente celular em que o cancro se desenvolver, geralmente, apresenta elevados níveis de RE α e baixos de RE β e sua homologia é de 47%. O RE α promove a proliferação celular e a sua sobrevivência, e o RE β parece ter um efeito protector contra a actividade dos estrogénios em lesões pré-

malignas. Por outro lado, o RE β é mais expresso no tecido ósseo. Este facto, torna-se interessante na medida em que, os inibidores da aromatase (IAs) disponíveis no mercado, têm um efeito secundário a longo prazo sobre a massa óssea e o desenvolvimento de osteoporose. Assim, o uso de um agonista do RE β pode resultar em benefícios posteriores, quando combinado com antagonistas dos RE α ^(17, 42). Mesmo que a expressão do RE α esteja associado a uma sensibilidade à terapêutica hormonal com o tamoxifeno, muitas alterações pré ou pós-translacionais do receptor pode influenciar negativamente, a resposta em tratamentos alvo. Por exemplo, a fosforilação do RE α , ou a variante RE α -36, estão associados a uma baixa resposta ao tratamento com tamoxifeno. O papel do RE α está bem estabelecido quanto à progressão e tumorigénese no cancro da mama mas o mesmo não se pode dizer relativamente ao RE β . Há diversas isoformas deste receptor nuclear RE β 1, RE β 2 e RE β 5 que estão mais envolvidos na neoplasia da mama. Há evidências de que a expressão nuclear do RE β 1 está relacionada com um melhor resultado, enquanto a expressão citoplasmática do RE β 2 aparenta ser um marcador de um pobre prognóstico. Vários estudos têm sido feitos com o intuito de avaliar a correlação entre o RE α e o RE β na resposta à terapia endócrina, mas os resultados revelam-se discordantes, portanto não existe ainda um consenso sobre a utilidade clínica em diagnóstico diferenciado para o RE β ⁽¹⁰⁾.

4.3.2. HER2

Relativamente ao HER2, evidências têm revelado a existência de aberrações na proteína de HER2 podendo afectar a sensibilidade do tumor às suas terapias alvo. A alteração mais estudada e da qual se possui mais informação é a forma da proteína truncada p95-HER2. Esta isoforma é resultante da perda do grupo terminal carboxilo do HER2, que consiste na impossibilidade de ligação do epítipo do trastuzumab à proteína o que consequentemente activará a cascata de sinalização. Como consequência, o subgrupo de tumores HER2- p95 positivo demonstraram-se muito agressivos e com fraco prognóstico. Outros dados, usando ensaios de imunofluorescência provaram que os pacientes positivos a esta isoforma do HER2 são resistentes ao tratamento com o trastuzumab e sensíveis ao lapatinib ^(43, 44, 45). Portanto, o p95-HER2, é não só, um marcador de mau prognóstico, mas também um possível biomarcador de resposta a terapêuticas biológicas. Actualmente, também decorrem estudos que avaliam outra alteração da proteína HER2 que consiste na falta do exão 16, que foi descoberto em pacientes com cancro da mama e, que é responsável por conferir resistência ao trastuzumab.

4.4. Prognóstico

A rápida evolução do paradigma genómico oferece uma nova abordagem na previsão no prognóstico individual do paciente pela interpretação de um padrão de genes específicos relacionados com a tumorigénese. A expressão génica específica pode identificar tumores de biologia mais agressiva pois quantifica o risco de recorrência com maior precisão que os métodos tradicionais⁽⁴⁶⁾.

Actualmente existem testes multigenes que ajudam na elaboração do prognóstico. Estes podem ser divididos naqueles que foram validados através de estudos *cohort*, que permitem a avaliação do prognóstico (como o Endopredict[®]) e em testes que avaliam o benefício da quimioterapia adjuvante ou ambos (como o Oncotype DX[®]).

Os testes multigenes mais recentes incluem genes de funções relacionadas, como a proliferação das células ou sinalização dos receptores estrogénio, mas que são específicos para o tipo de gene medido. O denominador comum para todos os tipos de testes são os genes de proliferação, pois assume-se que este é o mais importante na medida de prognóstico. De realçar que estes testes são maioritariamente, se não, exclusivamente aplicáveis em cancro classificados como tipo luminal⁽³⁾.

4.4.1. Oncotype DX[®]

O Oncotype DX[®] avalia um conjunto de 21 genes entre os quais genes relacionados com os RE, com a proliferação celular, com o HER2 e relacionados com a invasão celular^(47, 3). O Oncotype DX[®] permite guiar a decisão do tratamento na mulher com carcinoma ductal *in situ*, tratado com ou sem tamoxifeno.

O Oncotype DX[®] é realizado pelo laboratório Genomic Health[®], grupo responsável pelo seu desenvolvimento. A sua execução obriga à extração e purificação do ARN de uma amostra de tumor mamário seguida de análise pela técnica de *real time* RT-PCR. Esta técnica de alto rendimento foi desenvolvida para analisar a expressão de vários genes seleccionados simultaneamente, é sensível, específica e altamente reprodutível. De forma sucinta, o ARN é extraído de tecido tumoral em FPET (*formalin-fixed, paraffin-embedded*) e submetido à acção de DNase I. É medido o total de ARN e a ausência de ADN contaminado é verificado. As reacções acontecem em 384 placas e a expressão de 16 genes é medida em triplicado e, posteriormente normalizada relativamente a um conjunto de 5 genes referência. O resultado (*The Oncotype DX Assay Recurrence Score*) é apresentado numa escala de 0 a 100, que depois

é tratado por um algoritmo matemático. Cada resultado é calculado com base nos resultados do perfil de expressão genética do paciente⁽⁴⁷⁾. Os resultados podem ser classificados, como “Low Risk”, “Intermediate Risk” e “High Risk”, que apresentam um risco de recorrência em 10 anos após o diagnóstico, de 6,8%, 14,3% e 30,5%, respectivamente.

4.4.2. MammaPrint®

O MammaPrint® avalia a expressão de 70 genes através da técnica de microensaio para determinar o risco de recorrência em 10 anos após o diagnóstico. As funções biológicas dos 70 genes estão associados aos passos essenciais necessários para a progressão do tumor e metastização⁽⁴⁶⁾. Estão indicados para este teste, pacientes diagnosticados com carcinoma da mama invasivo em **Estadio I e 2** ^(48, 49). O MammaPrint® mede o nível de expressão de cada um dos 70 genes a partir de uma amostra de tumor de cancro da mama cirurgicamente recolhido da paciente. A técnica de microensaio consiste em colocar um único fragmento de ADN de sequência conhecida em cada poço da placa de vidro. Para se ter acesso à expressão de genes do tumor, é retirada amostra de mARN da paciente com carcinoma e mARN de tecido não infectado sendo posteriormente marcados com corante fluorescente. Juntos são colocados na placa de mARN para que aconteça a hibridização. ⁽⁴⁹⁾ Os resultados são interpretados e são divididos em “Low Risk” e em “High Risk”. O primeiro significa que a paciente tem uma média de 10% do seu cancro seja recorrente em 10 anos, sem o auxílio de terapia adjuvante, quer hormonal ou quimioterapia. O segundo resultado significa que a paciente possui 29% de probabilidade de recorrência em 10 anos, sem qualquer terapia adjuvante⁽⁴⁸⁾.

5. Novos métodos moleculares de diagnóstico e de terapêutica

5.1. Desregulação da via da PI3K

Várias evidências têm vindo a indicar que diferentes subtipos de cancro da mama apresentam alterações na cascata do PI3K, fazendo com que seja essencial um diagnóstico e terapêutica específica caso a caso. A via do PI3K-AKT-mTOR desempenha um papel fulcral na oncogénese, progressão e resistência das terapias direccionadas em cancros tanto positivos a RE como a HER2 positivos. O mTOR é conhecido por desempenhar um papel central na regulação celular e proliferação e, a actividade deste está ligada a vários fenómenos celulares, incluindo a transição G0/G1-S do ciclo celular, a translação, a transcrição e a reorganização da actina. Uma função conhecida do mTOR é a regulação do

início da translação. Após a recepção de sinais, o mTOR aumenta a fosforilação de reguladores translacionais, p70 S6cinase I (p70^{S6K}) a proteína de ligação eIF4E pois actua inactivando o repressor translacional, o que resulta no início da translação proteica. A fosforilação destes reguladores translacionais também é induzida pela PI3k mediante sinalização a partir da estimulação das células por factores de crescimento ou nutrientes ^(10, 50, 51). A complexidade desta cascata permite a possibilidade de acumulação de alterações em várias etapas, fazendo com que seja um alvo terapêutico muito ambicioso.

A primeira geração de inibidores de PI3k nunca ultrapassou a fase pré clínica devido à sua pobre farmacocinética e alta toxicidade. Mas vários inibidores de segunda geração já se encontram em desenvolvimento clínico encontrando-se o BKM120 em fase mais avançadas, o inibidor pan-PI3K está em Fase III de ensaio clínico que avalia a associação deste fármaco com fulvestrant em mulheres pós menopausa, HER2 positivo/HER2 negativo refractário a IAs. Outro ensaio clínico em Fase I investiga a combinação do BKM120 com trastuzumab, em pacientes resistentes a este ⁽⁵²⁾. No entanto, actualmente não existem dados clínicos disponíveis sobre o efeito de mutações no PI3K na sensibilidade dos inibidores de PI3K. No entanto, é necessário salientar que dada a complexidade da cascata de sinalização PI3K-AKT-MTOR, outros passos na cascata, incluindo o *crossstalk*, podem afectar a susceptibilidade do tumor, por exemplo o sinal da inibição desta via pode resultar na activação da cascata MAPK/ERK ^(10; 53).

5.2. Amplificação do FGFR

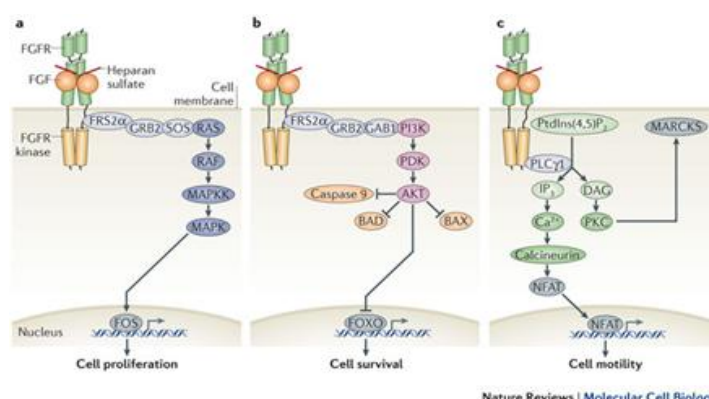


Figura 3- Cascata de Sinalização dos FGFR. O papel da cascata de sinalização nos processos de motilidade, sobrevivência e proliferação⁽⁵⁵⁾

A família FGFR inclui quatro receptores tirosina-cinase (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4) que estão profundamente envolvidos em processos de tumorigénese. Só em casos esporádicos é que está identificado envolvimento de mutações nos FGRs enquanto a sua

amplificação é prevalente. Em condições normais, a activação do FGFR1 pode levar à transactivação da proteína cinase do mitogénio activo e o da AKT, que em conjunto são essenciais para o desenvolvimento da mama, incluindo o crescimento e a diferenciação das células epiteliais do lúmen (Fig. 3). No entanto, a actividade aumentada de FGFR1, que ocorre devido à amplificação do gene, resulta na proliferação celular que eventualmente evolui para carcinomas mamários *in situ* e invasivos^(10, 54). O impacto dos FGFRs tem sido especulado, especialmente para o FGFR1 que está relacionado com a sensibilidade a quimioterapia, resistência aos tratamentos hormonais e a fracas prognósticos. Apesar de se tratar de um biomarcador relativamente novo, têm sido feitas algumas abordagens terapêuticas. As mais avançadas em ensaios clínicos são os inibidores da tirosina-cinase. Os de primeira geração são representados por inibidores competitivos, enquanto que a segunda geração por terapia direccionada e selectiva aos FGFR que são caracterizadas por uma maior potência. Os mais avançados da primeira geração destacam-se o dovitinib, intedanib e brivanib. Outra possibilidade para inibir a cascata de sinalização do FGFR é a terapêutica com anticorpos monoclonais direccionados ao FGFR, mas estes ainda se encontram em fase muito prematura de desenvolvimento. Estas considerações, avaliadas conjuntamente, sugerem que a amplificação dos FGFRs pode não só ser um marcador preditivo e de prognóstico, mas também um potencial alvo anti tumor e a inibição do FGFR pode ser uma válida aproximação para uma subpopulação seleccionada de paciente com cancro da mama, provavelmente com associação a outras terapias.⁽¹⁰⁾

6. Conclusão

O conceito de “personalized therapy” muito deve aos biomarcadores associados às novas tecnologias laboratoriais. Actualmente, este conjunto está a aumentar significativamente o nosso conhecimento sobre o cancro da mama, em termos de diagnóstico, monitorização e novas estratégias terapêuticas. Brevemente, inúmeras novas terapêuticas estarão em processo de experimentação, mas realce-se que apresentam a desvantagem de exigirem estudos enormes para identificar a amostra de pacientes que irão tirar vantagem desses tratamentos. Além de que, estas investigações também irão providenciar dados aos profissionais de saúde, que os permitirá prever a possibilidade de evitar a quimioterapia padronizada para pacientes específicos. O acompanhamento farmacêutico nesta temática, insere-se na parte de investigação/descoberta de novos biomarcadores, e em tudo que concerne ao fármaco. Ou seja, o farmacêutico pode contribuir para a distinção dos subtipos de cancro, para o desenvolvimento de novos fármacos adequados e participar em ensaios clínicos. Deste modo, a aplicação dos conhecimentos deste profissional de saúde em condições experimentais juntamente com médicos, bioquímicos, químicos, entre outros, promove a interligação entre profissionais de saúde.

Em conclusão, esta monografia teve como principal contributo rever a contribuição dos biomarcadores no cancro da mama como uma doença heterogénea, permitindo uma nova percepção por parte dos clínicos e um tratamento individualizado, evitando em muitos casos que o paciente seja submetido a todos os efeitos tóxicos associados aos tratamentos convencionais anticancerígenos.

7. Bibliografia

1. World Health Organization, acessado no dia 20/04/2014. Disponível em <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html>.
2. Liga Portuguesa Contra o Cancro, acessado no dia 20/04/2014. Disponível em <http://www.ligacontracancro.pt/gca/index.php?id=182>.
3. SINN, P. (et al.) - **Multigene Assays for Classification, Prognosis, and Prediction in Breast Cancer: a Critical Review on the Background and Clinical Utility**. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 73 8 (2013) 932–940.
4. GOLDHIRSCH, A. (et al.) - **Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011**. *Annals of oncology*, 22 (2011) 1736-1747.
5. POP- Portugal de Oncologia Português, acessado no dia 27/04/2014. Disponível em <http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/estadiamento-fases-mama.html>.
6. Roche, acessado no dia 25/04/2014. Disponível em <http://www.roche.pt/sites-tematicos/infocancro/index.cfm/tipos/cancro-da-mama/cdm-escolha-do-tratamento/>.
7. MAY, F. - **Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer**. *Cancer Manager Management Research*, 6 (2014) 225-252.
8. CEPA, MM. (et al.) - **Structure-Activity Relationships of New A,D-Ring Modified Steroids as Aromatase Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Activity Evaluation**. *J. Med. Chem*, 48 (2005) 6379-6385.
9. ANDERSON, D.C., KODUKULA, K. - **Biomarkers in pharmacology and drug discovery**. *Biochemical Pharmacology*, 87 (2014) 172-188.
10. TESSARI, A. (et al.)- **Overview of diagnostic/targeted treatment combinations in personalized medicine for breast cancer patients**. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 74 (2014) 1-19.

11. SUBRAMANIAN, A., (et al.) - **Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis: a review.** Breast Cancer Res Treat, 111 (2008) 191-202.
12. KEY, T. (et al.) - **Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies.** JNCI Journal of the National Cancer Institute, 94 (2002) 606-616.
13. ALEXANDER, S.P. MATHIE, A. PETERS, J.A. **Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. British Journal of Pharmacology.** 164 (2011) S1-S324.
14. THOMAS, P. (et.al) - **Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish.** Steroids,75 (2010) 595-602.
15. ROSSA, S.J. (et al.) - **The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine.** The Oncologist. 14 (2009) 320-368.
16. SCHECHTER, L.A (et al.) - **The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen.** Nature, 312 (1995) 513-516.
17. GIULIANO, M. (et al.) - **Bidirectional Crosstalk between the Estrogen and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling Pathways in Breast Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications.** Breast Care, 8 (2013) 256-262.
18. MOASSER, M.(et al) - **The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis.** Oncogene, 26 (2007) 6469-6487.
19. WebMD, acessado no dia 10/02/2014. Disponível em <http://www.webmd.com/breast-cancer/breast-cancer-types-er-positive-her2-positive>.
20. About.com Breast Cancer, acessado no dia 6/02/2014. Disponível em <http://breastcancer.about.com/od/tumormarkers/f/ki67.htm>.
21. WANG, L., DI, L.J. - **BRCA1 And Estrogen/Estrogen Receptor In Breast Cancer: Where They Interact?.** International Journal of Biological Sciences, 10 (2014) 566-575.

22. HANSTEIN, B. (et al) - **p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex.** *Biochemistry*, 93 (1996) 11540-11545.
23. PARISE, A., CAGGIANO, V - **Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers.** *Journal Cancer Epidemiology*, 2014 (2014) 11.
24. ASHKENAZ, R. (et al). **Pathways to Tumorigenesis—Modeling Mutation Acquisition in Stem Cells and Their Progeny.** *Neoplasia Press*, 10 (2008) 1170–1182.
25. BARRET, J. - **Mechanisms of Multistep Carcinogenesis and Carcinogen Risk Assessment.** *Environmental Health Perspectives*, 100 (1993) 9-20.
26. YOKOTA, J. - **Tumor Progression and Metastasis.** *Carcinogenesis*, 21 (2000) 497-500.
27. MILLER, W.R. (et.al) - **Hormonal therapy for postmenopausal breast cancer: the science of sequencing.** *Breast Cancer Res. Treat. Breast Cancer Res Treat*, 103 (2007) 149-160.
28. LIENART,V. (et al.) - **Effect of Preventive Hormonal Therapy on Breast Density: A Systematic Qualitative Review.** *The Scientific World Journal*, 2014 (2014) 1-24.
29. BREASTCANCER.ORG acedido no dia 18/04/2014. Disponível em http://www.breastcancer.org/symptoms/testing/genetic/pros_cons.
30. MYRIAD, acedido no dia 18/04/2014. Disponível em <https://www.myriad.com/products/braanalysis/>.
31. GeneDX , acedido no dia 19/04/2014. Disponível em <http://www.genedx.com/test-catalog/available-tests/brca12-sequencing-and-deldup-analysis/>.
32. AmbryGenetics, acedido no dia 18/04/2014. Disponível em <http://www.ambrygen.com/genomic-services/brca1-and-brca2-test-offerings-clinical-trials-and-research>.

33. BREASTCANCER.ORG, acessado dia 19/04/2014. Disponível em http://www.breastcancer.org/symptoms/testing/genetic/facility_cost.
34. GIORDANIO, S. (et al.) - **Is breast cancer survival improving?** Cancer, 100 (2004) 44-52.
35. LAMOND, N., YOUNIS, T. - **Pertuzumab in human epidermal growth-factor receptor 2-positive breast cancer: clinical and economic considerations.** Int J Womens Health, 6 (2014) 509-521
36. LIANOS, GD. (et al.) - **Potential of antibody–drug conjugates and novel therapeutics in breast cancer management .** Onco Targets Ther, 24 (2014) 491-500
37. Stanford Medicine , acessado no dia 16/06/2014. Disponível em <http://cancer.stanford.edu/information/geneticsAndCancer/types/herbocs.html>.
38. YOSHIO, M. (et al.) - **A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1.** American Association for the Advancement of Science, 266 (1994) 66-71.
39. Ambrygenetics, acessado em 3/06/2014. Disponível em <http://www.ambrygen.com/tests/brca1-and-brca2>.
40. FINCH, A. (et al.) - **BRCA carriers, prophylactic salpingo-oophorectomy and menopause: clinical management considerations and recommendations.** Women's Health, 8 (2012) 543-555.
41. FISHER, B. (et al.) - **Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study.** J Natl Cancer Inst, 90 (1998) 1371-1388.
42. GARCÍA-BECERRA, R. (et al.) - **Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance.** Int. J. Mol. Sci, 14 (2014) 108-145.
43. ARRIBAS, J. (et al.) - **p95HER2 and breast cancer.** Cancer Res. 71(5) (2011) 1515–1519.

44. PEDERSEN, K. (et al.) - **A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis.** Mol Cell Biol. 29, (2009) 3319–3331.
45. SAÉZ, R. (et al). **p95HER-2 Predicts Worse Outcome in Patients with HER-2-Positive Breast Cancer.** Clin Cancer Res. 2006, Vol. 12(2), pp. 424–431.
46. MUIAD,K.(et.al) - **Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review.** Biomarkers in Cancer, 5 (2013) 61-70.
47. oncotype DX Breast Cancer Assay, acido no dia 2/06/2014. Disponível em <http://breast-cancer.oncotypedx.com/en-GB/Professional-Invasive/WhatIsTheOncotypeDXBreastCancerTest/Underlying%20Technology.aspx>.
48. Agendia, acedido no dia 5/06/2014. Disponível em <http://www.agendia.com/physicians/symphony-targeted-therapy-for-breast-cancer/mammaprint-best-breast-cancer-treatment/>.
49. Medgadget, acedido em 5/06/2014. Disponível em http://www.medgadget.com/2007/02/mammaprint_a_br.html.
50. BISHOP, J. (et al.) - **Prolactin activates mammalian target-of-rapamycin through phosphatidylinositol 3-kinase and stimulates phosphorylation of p70S6K and 4E-binding protein-1 in lymphoma cells.** J Endocrinol. 109 (2006) 307-312.
51. KAM,Y., EXTON, J.H. - **Role of phospholipase D1 in the regulation of mTOR activity by lysophosphatidic acid.** 18 (2004) 311-319.
52. MAIRA, SM. (et al.). - **Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor.** Mol Cancer Ther. 11, (2012) 317–328.
53. SERRA, V. (et al.) - **PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer.** Oncogene. 10 (2011) 2547–2557.

54. GRU, A., CRAIG, A. - **FGFR1 amplification and the progression of non-invasive to invasive breast cancer.** Breast Cancer Research, 14 (2012) 114- 116.
55. GOETZ, R.; MOHAMMADI, M. - **Exploring mechanisms of FGF signalling pathways through the lens of structural biology.** Nature Reviews Molecular, 14 (2013) 166-180.