



Universidade Federal de Pernambuco  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami  
Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde

GLAUBER MOREIRA LEITÃO

**CÂNCER DE MAMA E NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS:**  
potenciais biomarcadores

Recife  
2018

GLAUBER MOREIRA LEITÃO

**CÂNCER DE MAMA E NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS:**

potenciais biomarcadores

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Leitão, Glauber Moreira

Câncer de mama e novos alvos terapêuticos: potenciais biomarcadores /  
Glauber Moreira Leitão –2018.

183 folhas: il.; fig., tab.

Orientador: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de  
Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife,  
2018.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Câncer de mama. 2. Biomarcadores. 3. Terapia Alvo Molecular. I. Martins,  
Danyelly Bruneska Gondim. (Orient.). II. Título.

616.99449

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2018-458

Elaborado por Claudina Karla Queiroz Ribeiro CRB4/1752

GLAUBER MOREIRA LEITÃO

**CÂNCER DE MAMA E NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS:**  
potenciais biomarcadores

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em: 10/08/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danyelly Bruneska Gondim Martins (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup> Dr José Luiz de Lima Filho (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup> Dr Fabrício Oliveira Souto (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup> Dr Darley de Lima Ferreira Filho (Examinador Externo)  
Hospital Barão de Lucena

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Limeira Barreto (Examinadora Externa)  
Hospital Oswaldo Cruz

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter me oportunizado a concretização de mais um sonho. Pelo cuidado e proteção ao longo da caminhada. Jamais esquecerei de suas promessas! Meu coração está repleto de gratidão!

Ao meu pai, Orlando Roberto Carlos Leitão (*in memoriam*), que no esforço da batalha diária deixou-nos um exemplo de retidão e seriedade com suas obrigações e deveres. Agradeço pelas expressões peculiares de carinho, esforço para indicar a direção certa.

À minha querida mãe, Antonia Moreira Leitão, meu exemplo maior e minha maior incentivadora nas conquistas da vida. Sua dedicação à educação dos filhos, esforço que superou todas as barreiras impostas por nossa origem humilde, devo-lhe cada vitória! Dedico-lhe também esse trabalho, pois sem o seu cuidado e determinação jamais chegaria até aqui.

Ao meu irmão Glauco Moreira Leitão, agradeço pelo apoio e orações. Seus debates e discussões me incentivaram na busca do Conhecimento.

Ao querido Luiz Alberto (*Lula*), meu companheiro, por seu constante incentivo, cuidado e apoio nesses 16 anos de jornada. Minhas conquistas também são suas!

Agradeço à família que a vida me deu: minha tia Socorro e tio Valdo, meus primos-irmãos Rodolfo, Gláucia e Gleice; aos queridos cunhados Miguel e Nataly, aos sobrinhos Matheus e Marina, a minha “*sempre-Pastora*” Alice Santos e minhas queridas irmãs do coração Sâmela e Sâmea Oliveira, e aos amigos queridos: Vera Guedes, Marcos Antonio, Nancy e Darley Ferreira, às queridas Gabriela e Carolina Guedes, Iolanda Matias, Penélope Araújo, Cristiane e Walter Nimir, José Claudio Casali, Junio Fagner, Eugênia Viana, e Ieda Cunha.

À querida orientadora Profa. Danyelly Bruneska, meu exemplo de dedicação e amor à ciência. Seu otimismo e perseverança ao lidar com as dificuldades de fazer ciência são inspiradores. Muito obrigado auxílio em cada etapa do trabalho, pelos conselhos e pelo apoio em momentos tão difíceis.

Ao Prof. Zé Luiz por seus conselhos, observações e contribuições nesse período de convívio durante o doutorado, sempre ampliando nossa visão de mundo e da ciência.

À “mainha” Monica Russo e ao “painho” Henry Najman, pelo carinho e conselhos sinceros desde minha entrada no mundo da oncologia.

Aos queridos amigos que fiz durante esse período no LIKA/UFPE: Amélia Borba, Andriu Catena, Henrique Castelletti, Ana Cecília, Renata Bezerra, Joana Santos, Ananda Aguiar, Renato Pessoa, Fabrício Souto, Rosangela Frade, Júlia Smith, Isabela, Gisnayle, Thaísa e a todos os que integram o PROSPECMOL. Obrigado pelos ensinamentos diários. Agradeço ao Vinícius Tigre pela linda figura de nossa tese. Obrigado pela ajuda e fundamental contribuição!

À querida Ilma Maria Santos (LIKA/UFPE) pelo cuidado conosco, sempre atenta a nos auxiliar. Ao colega Fábio Constantino do PPGBAS/LIKA pelo pronto auxílio em nossas dúvidas e demandas. À professora Maria da Paz pela atenção e carinho de sempre.

Aos colegas de trabalho do Serviço de oncologia do Hospital das Clínicas/UFPE, Centro de Oncologia (CEON) do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/UPE e Centro Pernambucano de Oncologia. Agradeço de forma especial a equipe de enfermagem e administrativa do serviço de Oncologia do HC/UFPE e às enfermeiras Lúcia Reis e Helena Lins.

Aos meus queridos residentes de oncologia clínica do HC/UFPE e CEON/UPE que, durante o período do doutorado, dividiram minha presença e atenção com o PPGBAS/LIKA: Estela Alcântara, Caroline Pinto, Bruno Brito, Sarah Rego, Murilo Araújo, John Maciel, Luana Azevedo, Lara Fonseca, Cestênio Magalhães e Virgínia Costa.

Por fim, agradeço especialmente aos meus queridos pacientes, razão final da busca por maior conhecimento e motivação única de nosso trabalho. Homens e mulheres que nos enriquecem com sua confiança e nos trazem lições de vida em momentos tão difíceis de suas existências. Muito obrigado!

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.  
O amor nunca falha.  
(Apóstolo Paulo. I Coríntios 13:1-2 e 8)

## RESUMO

O câncer de mama representa um problema de saúde pública mundial, que se excluindo os cânceres de pele não melanoma, constitui-se no mais frequente tumor maligno entre as mulheres, com altas taxas de morbidade e mortalidade. Vários progressos têm ocorrido no campo epidemiológico, biológico e no desenvolvimento de novas drogas. Biomarcadores e vias de sinalizações oncogênicas com desenvolvimento de drogas contra alvos moleculares têm tido grande impacto no manejo das pacientes. Apesar de bem descrito na literatura, o processo de acetilação/deacetilação epigenética no câncer de mama, bem como o papel das histonas deacetilases, como as sirtuínas, não está ainda esclarecido. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi identificar os biomarcadores e terapias com foco em alvos moleculares utilizados atualmente e ainda sem aplicabilidade clínica, além de avaliar o papel da expressão de sirtuínas SIRT1 e SIRT7 em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama visando determinar seu potencial prognóstico e terapêutico. Para tanto, foi realizada uma busca pelos genes mais estudados em relação ao câncer de mama e por estudos clínicos em andamento constantes no banco de dados do *National Clinical Trials* (NCI). Em relação à análise dos genes SIRT1 e SIRT7, foram avaliados os níveis de expressão gênica em amostras de tecido tumoral através do uso de PCR em tempo real, e associados com variáveis clínicas de pacientes portadoras de câncer de mama tratadas no Hospital Barão de Lucena (Recife-PE). Nossos resultados demonstram que a análise de estudos clínicos em corrente de alvos terapêuticos em câncer de mama com potencial terapêutico foram aqueles que atuam em vias de sinalização como PI3K/Akt/mTOR, HER2+, JAK/STAT, MAPK, PARP, Resceptores hormonais, Ciclinas CDK4/6 e PDL-1 e PD1. A nível epigenético, a expressão de SIRT 1 esteve associada a um maior comprometimento axilar linfonodal e SIRT7, à prática do etilismo. Concluindo, vários alvos e vias de sinalizações estão em uso e outros em ensaios clínicos com resultados promissores. SIRT1 e SIRT7 pode ter um papel na carcinogênese mamária, sobretudo no que concerne a pacientes com maior envolvimento axilar linfonodal e prática de etilismo. Novos estudos com maior coorte são necessários para confirmarem esses dados e desenvolvimento de potencial alvo terapêutico de controle epigenético.

Palavras-chave: Câncer de mama. Biomarcadores. Terapia alvo molecular. Sirtuínas.

## ABSTRACT

Breast cancer represents a worldwide public health problem that, excluding non-melanoma skin cancers, is the most frequent malignant tumor among women, with high rates of morbidity and mortality. Several advances have been made in the field of epidemiology, biology and the development of new drugs. Biomarkers and pathways of oncogenic signaling with drug development against molecular targets have had a great impact on patient management. Although well described in the literature, the process of epigenetic acetylation / deacetylation in breast cancer, as well as the role of histone deacetylases, such as sirtuins, has not yet been elucidated. To carry out a review of the literature on biomarkers and future therapies focusing on molecular targets still without clinical applicability; the role of nuclear sirtuin SIRT1 and SIRT7 expression in tumor samples and its association with clinical features in breast cancer patients was further evaluated. Search for ongoing clinical trials in the National Clinical Trials (NCI). The expression of SIRT1 and SIRT7 was investigated in tumor tissue samples by RT-PCR, and the association with clinical variables of patients. Our results have demonstrated a series of clinical trials currently, using therapeutic targets in breast cancer with potential therapeutic on signaling pathways such as PI3K/Akt /mTOR, HER2 +, JAK / STAT, MAPK, PARP, hormone receptors, CDK4 / 6 Cyclins and PDL-1 and PD1. In the epigenetic scenario, the expression of SIRT 1 was associated with greater axillary lymph node involvement and SIRT7, to the practice of alcoholism. In conclusion, several targets and signaling pathways are in use, and others in clinical trials with promising results. SIRT1 and SIRT7 may play a role in breast carcinogenesis, especially with regard to patients with greater axillary lymph node involvement and alcoholism. New studies with a larger cohort are needed to obtain data and the development of potential epigenetic control therapeutic vectors.

**Keywords:** Breast cancer. Biological markers. Targeted molecular therapy. Sirtuin

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura

|                 |                                                                                                                            |    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> | Critérios para realização do teste de mutação germinativa BRCA1 e BRCA2 em pacientes já diagnosticados com câncer de mama. | 28 |
| <b>Quadro 2</b> | Características biológicas dos subtipos intrínsecos do câncer de mama                                                      | 36 |
| <b>Quadro 3</b> | Classificação biológica dos subtipos de câncer de mama de acordo com os perfis fenotípicos.                                | 38 |
| <b>Quadro 4</b> | Painéis de assinatura genética no câncer de mama.                                                                          | 39 |
| <b>Quadro 5</b> | Classificação do câncer de mama e opções de tratamento                                                                     | 53 |
| <b>Quadro 6</b> | Sirtuínas: Atividade, localização, função e proteínas-alvo.                                                                | 69 |
| <b>Quadro 7</b> | Sirtuínas e Câncer em humanos.                                                                                             | 75 |

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | Incidência mundial do câncer de mama                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 21 |
| <b>Figura 2</b>  | Estágios dos estudos clínicos em oncologia; fases pelas quais percorre uma nova molécula para aprovação do uso em humanos.                                                                                                                                                                                                                                                | 24 |
| <b>Figura 3</b>  | Compostos em desenvolvimento clínico (estudos fase I-III)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 25 |
| <b>Figura 4</b>  | Perspectiva histórica da terapia do câncer de mama ER-positivo                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 46 |
| <b>Figura 5</b>  | Via de sinalização da família HER2 e terapias direcionadas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 49 |
| <b>Figura 6</b>  | Perspectiva histórica dos agentes para tratamento do câncer de mama                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 51 |
| <b>Figura 7</b>  | Papel da recombinação homóloga e Excisão de bases no reparo do DNA da célula                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 52 |
| <b>Figura 8</b>  | A via PI3K/Akt/mTOR e os seus inibidores avaliados em estudos clínicos de fase I-III em câncer de mama.PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase, PTEN, homólogo da fosfatase e tensina deletados no cromossomo 10; Akt, proteína quinase B; mTORC, alvo de mamífero de complexo de rapamicina; 4EBP1, proteína 1 de ligação ao fator de iniciação eucariota 4E; S6K, s6 quinase | 56 |
| <b>Figura 9</b>  | A via de sinalização MAPK/ERK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 57 |
| <b>Figura 10</b> | A via de sinalização JAK/STAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 58 |
| <b>Figura 11</b> | Terapia alvo em câncer de mama: vias e novas drogas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 62 |
| <b>Figura 12</b> | Estimativa do repertório de neoantígenos em câncer humano.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 63 |
| <b>Figura 13</b> | Via do ponto de verificação imunológico PD-1/PD-L1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 64 |
| <b>Figura 14</b> | Potenciais novos agentes para o tratamento do câncer de mama                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 65 |
| <b>Figura 15</b> | Estrutura da cromatina e controle epigenético.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 66 |
| <b>Figura 16</b> | Histonas deacetilase e possíveis papéis no câncer                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 67 |
| <b>Figura 17</b> | Família das sirtuínas e funções.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 72 |

## Artigo 1

- Figura 1** World map showing the main genes related to breast cancer in each continent. Larger and smaller circles mean, respectively, higher and lower number of gene reports by region. These data were generated using International HapMap Project and MetaCore software. 84
- Figura 2** Receptor tyrosine kinase signaling cascade and intracellular molecules associated with targeted therapy in clinical use for breast cancer. Receptor kinases are shown in the plasma membrane, under monomeric or dimeric formation, along with their respective ligands, downstream signaling pathways, and main cellular response. 87

## Artigo Original 2

- Figura 1** Expressão relativa de SIRT1 e SIRT7 em pacientes com câncer de mama, de acordo com os subtipos biológicos. 114
- Figura 2** Expressão de SIRT1 nos subgrupos de linfonodos, classificados de acordo com o número total de comprometidos segundo os critérios da AJCC. 115
- Figura 3** Expressão de SIRT7 nos subgrupos de pacientes submetidas a tratamentos (neo)adjuvante sistêmicos. 116
- Figura 4** Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) em meses das pacientes portadoras de câncer de mama durante o tempo de seguimento da coorte dessa amostra. 117
- Figura 5** Curva de sobrevivência obtida pelo método de Kaplan-Meier para as covariáveis Subtipo (A), Estágio clínico (B), associadas aos dados dos pacientes com câncer de mama. 118

## LISTA DE TABELAS

### Artigo Original 1

|                 |                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Biological classification of breast cancer subtypes according to the phenotypic profiles.                                                                                                                           | 82 |
| <b>Tabela 2</b> | Main genetic signatures available for research and clinical use.                                                                                                                                                    | 85 |
| <b>Tabela 3</b> | Target therapies for breast cancer approved for clinical use.                                                                                                                                                       | 86 |
| <b>Tabela 4</b> | Main phase I/II clinical trials registered at <a href="http://clinicaltrials.gov">clinicaltrials.gov</a> * evaluating potentials new targeted therapy for breast cancer with focus in Oncogenic Signaling Pathways. | 89 |

### Artigo 2

|                 |                                                                                                                                                       |     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1</b> | Descrição e frequência das variáveis pesquisadas segundo a censura (vivos) e falha (óbito) ocorridas durante o tempo de acompanhamento dos pacientes. | 107 |
| <b>Tabela 2</b> | Descrição e frequência das variáveis pesquisadas para composição da coorte total e coorte da SIRT1 e SIRT7.                                           | 111 |
| <b>Tabela 3</b> | Resultados do teste <i>log-rank</i> associados à covariáveis do estudo de pacientes com câncer de mama.                                               | 119 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |                                             |
|--------|---------------------------------------------|
| AACR   | American Association for Cancer Research    |
| ADP    | Adenosinediphospho (ADP)-ribosiltransferase |
| AJCC   | American Joint Committee on Cancer          |
| Akt    | Protein kinase B                            |
| ASCO   | Sociedade Americana de Oncologia Clínica    |
| BRCA 1 | Breast Cancer Associated Gene 1             |
| BRCA 2 | Breast Cancer Associated Gene 2             |
| CEA    | Antígeno carcinoembrionário                 |
| cDNA   | Ácido desoxirribonucleico complementar      |
| CDIS   | Carcinoma ductal in situ                    |
| CDI    | Carcinoma ductal invasivo                   |
| CDK    | Cyclin-dependent kinases                    |
| CK     | Citoqueratina                               |
| c-kit  | Proto-oncogene                              |
| CTLA-4 | Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 |
| DNA    | Ácido desoxirribonucleico                   |
| DDR    | DNA-damage response                         |
| E2F1   | E2F Transcription Factor 1                  |
| ECOG   | Eastern Cooperative Oncology Group          |
| EGFR   | Receptor do fator de crescimento epidérmico |
| ELISA  | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay           |
| EMA    | European Medicines Agents                   |
| ER     | Receptor(es) de estrógeno                   |
| ESMO   | Sociedade Europeia de Oncologia Médica      |
| et al. | e colaboradores                             |
| FDA    | Food and Drug Administration                |
| FISH   | Fluorescence in situ hybridization          |
| FOXA1  | Forkhead-box protein 1                      |
| FOXO   | Forkhead box class O                        |
| GATA 3 | Globin transcription fator 3                |
| HDAC   | Histona deacetilase                         |

|                  |                                                                              |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| HER              | Receptor do fator de crescimento epidérmico                                  |
| HIV              | Vírus da imunodeficiência humana                                             |
| IA               | Inibidor de aromatase                                                        |
| IHQ              | Imunohistoquímica                                                            |
| Ki-67            | Marcador celular de proliferação                                             |
| LAR              | Luminal androgênico                                                          |
| MAPK             | Mitogen-activated protein kinases                                            |
| MET              | Hepatocyte growth factor receptor                                            |
| mTOR             | Mammalian Target of Rapamycin                                                |
| MUC2             | Mucin 2 gene                                                                 |
| NAD <sup>+</sup> | Dinucleótido de nicotinamida e adenina                                       |
| NHI              | National Institutes of Health                                                |
| NF-κB            | Factor nuclear kappa B                                                       |
| NSABP            | National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project                          |
| p21              | The cyclin-dependent kinase inhibitor p21                                    |
| PAI-1            | Inibidor tipo 1 do plasminogênio tipo uroquinase                             |
| PAM50            | Predictor Analysis of Microarray 50                                          |
| PARP             | Poli(ADP-ribose) polimerase                                                  |
| PD-1             | Programmed cell death protein 1                                              |
| PD-L1            | Programmed death-ligand 1                                                    |
| PFS              | Progression Free Survival (sobrevida livre de progressão)                    |
| PGC1α            | Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma       |
| PI3K             | Phosphoinositide 3-kinase                                                    |
| PR               | Receptor(es) de progesterona                                                 |
| P&D              | Pesquisa e desenvolvimento                                                   |
| RNA              | Ácido ribonucleico                                                           |
| RTK              | Receptor de tirosina-quinase                                                 |
| RT-PCR           | Real-time polymerase chain reaction (quantitative polymerase chain reaction) |
| SERDs            | Selective estrogen receptor down-regulators                                  |
| SERMs            | Selective estrogen receptor modulators                                       |
| SIRT             | Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog (sirtuína)               |
| Src              | Sarcoma quinase                                                              |

|      |                                           |
|------|-------------------------------------------|
| TILs | Tumor-infiltrating lymphocytes            |
| TNBC | Triple Negative Breast Cancer             |
| TP53 | Tumor protein p53 gene                    |
| uPA  | Ativador do plasminogênio tipo uroquinase |

## SUMÁRIO

|          |                                                                          |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                        | <b>19</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS                                                                | 20        |
| 1.1.1    | <b>Geral</b>                                                             | <b>20</b> |
| 1.1.2    | <b>Específicos</b>                                                       | <b>20</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>                                             | <b>21</b> |
| 2.1      | FARMACOGENÔMICA E CÂNCER DE MAMA                                         | 22        |
| 2.2      | ESTUDOS CLÍNICOS EM ONCOLOGIA                                            | 23        |
| 2.3      | MARCADORES MOLECULARES EM CÂNCER DE MAMA                                 | 26        |
| 2.4      | MARCADORES MOLECULARES EM USO CLÍNICO                                    | 26        |
| 2.4.1    | <b>Mutações dos genes BRCA1 e BRCA2</b>                                  | <b>27</b> |
| 2.4.2    | <b>Receptores de Estrógeno e Progesterona</b>                            | <b>28</b> |
| 2.4.3    | <b>Receptor Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano</b>         | <b>29</b> |
| 2.4.4    | <b>Ki-67</b>                                                             | <b>30</b> |
| 2.4.5    | <b>Ativador do plasminogênio uroquinase e PAI-1 (uPA/PAI-1)</b>          | <b>31</b> |
| 2.4.6    | <b>Outros marcadores</b>                                                 | <b>32</b> |
| 2.5      | PERFIL DE EXPRESSÃO GENÉTICA EM CÂNCER DE MAMA                           | 32        |
| 2.5.1    | <b>Padrões de expressão genética e subtipos moleculares intrínsecos</b>  | <b>33</b> |
| 2.5.1.1  | Luminal A                                                                | 33        |
| 2.5.1.2  | Luminal B                                                                | 34        |
| 2.5.1.3  | HER2 enriquecido                                                         | 34        |
| 2.5.1.4  | Subtipo Basal- <i>like</i>                                               | 35        |
| 2.5.1.5  | Subtipo Normal- <i>like</i>                                              | 37        |
| 2.5.1.6  | Subtipos intrínsecos recentemente descritos                              | 37        |
| 2.6      | ASSINATURAS DE EXPRESSÃO GENÉTICA E IMPACTO NA TOMADA DE DECISÃO CLÍNICA | 38        |
| 2.6.1    | <b>Prosigna® (NanoString Technologies)</b>                               | <b>40</b> |
| 2.6.2    | <b>Oncotype DX® (Genomic Health)</b>                                     | <b>40</b> |
| 2.6.3    | <b>MammaPrint® (Agendia)</b>                                             | <b>41</b> |
| 2.6.4    | <b>EndoPredict® (Myriad Genetic Laboratories)</b>                        | <b>43</b> |
| 2.6.5    | <b>Breast Cancer Index® (Biotheranostics)</b>                            | <b>43</b> |
| 2.7      | TERAPIAS ALVO EM USO CLÍNICO                                             | 45        |

|       |                                                                                                                                |            |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.8   | NOVAS TERAPIAS ALVO EM ESTUDOS CLÍNICOS                                                                                        | 54         |
| 2.8.1 | <b>Inibidores da via PI3K/Akt/mTOR</b>                                                                                         | <b>54</b>  |
| 2.8.2 | <b>Inibidores da via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno)</b>                                                          | <b>56</b>  |
| 2.8.3 | <b>Inibidores de JAK/STAT</b>                                                                                                  | <b>58</b>  |
| 2.8.4 | <b>Inibidores de Receptores Tirosina-quinases</b>                                                                              | <b>59</b>  |
| 2.8.5 | <b>Antagonistas do Receptor de Andrógeno</b>                                                                                   | <b>60</b>  |
| 2.8.6 | <b>Imunoterapia no câncer de mama: inibidores do ponto de verificação imunológico PD-1 e PD-L1 e vacinas</b>                   | <b>62</b>  |
| 2.9   | MODULAÇÃO EPIGENÉTICA                                                                                                          | 66         |
| 2.9.1 | <b>Sirtuínas como um tipo de histona deacetilase (HDAC)</b>                                                                    | <b>69</b>  |
| 2.9.2 | <b>Sirtuínas no Câncer de Mama</b>                                                                                             | <b>76</b>  |
| 3     | <b>MÉTODO</b>                                                                                                                  | <b>77</b>  |
| 3.1   | IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES                                                                                        | 77         |
| 3.2   | COLETA DE MATERIAL E DADOS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO SOBRE A EXPRESSÃO DE SIRTUÍNAS SIRT1 E SIRT7 NO CÂNCER DE MAMA | 78         |
| 3.2.1 | <b>Desenho e população do estudo</b>                                                                                           | <b>78</b>  |
| 3.2.2 | <b>Coletas de amostras tumorais</b>                                                                                            | <b>78</b>  |
| 3.2.3 | <b>Extração do material genético</b>                                                                                           | <b>79</b>  |
| 3.2.4 | <b>Análise de expressão gênica</b>                                                                                             | <b>79</b>  |
| 3.2.5 | <b>Análise estatística</b>                                                                                                     | <b>79</b>  |
| 3.2.6 | <b>Coletas de informações clínicas</b>                                                                                         | <b>80</b>  |
| 3.2.7 | <b>Aspectos éticos</b>                                                                                                         | <b>80</b>  |
| 4     | <b>RESULTADOS</b>                                                                                                              | <b>81</b>  |
| 4.1   | ARTIGO ORIGINAL 1 – CLINICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF BREAST CANCER: TARGETS AND THERAPIES                                     | 81         |
| 4.2   | ARTIGO ORIGINAL 2 – EXPRESSÃO DOS GENES SIRT1 E SIRT7 NO CÂNCER DE MAMA                                                        | 102        |
| 5     | <b>CONCLUSÃO</b>                                                                                                               | <b>124</b> |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                                             | <b>125</b> |
|       | <b>APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA PHARMACOGENOMICS</b>                                                               | <b>152</b> |

|                                                                                                 |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>                                  | <b>162</b> |
| <b>APÊNDICE C – FICHA DE DADOS CLÍNICOS PARA O REGISTRO DE INFORMAÇÕES</b>                      | <b>165</b> |
| <b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>                                       | <b>173</b> |
| <b>ANEXO B – ATIVIDADES ACADÊMICAS COMPLEMENTARES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO</b> | <b>181</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa um problema de saúde pública mundial. Excluindo os cânceres de pele não melanoma, constitui-se no mais frequente tumor maligno entre as mulheres, com altas taxas de morbidade e mortalidade, apesar de importantes avanços terem sido alcançados ao longo dos últimos anos (INCA, 2017). Sobretudo após a publicação do projeto genoma humano, importantes conceitos da biologia molecular do câncer de mama têm sido responsáveis por relevantes benefícios no que tange ao controle de doença, mesmo em estágios avançados. Desse fato, desenrolam-se uma série de novos conhecimentos, desde a subclassificação histológica e molecular, passando pelo melhor entendimento de vias de transdução de sinal intracelular, o refinamento de biomarcadores e o advento de fármacos com alvos celulares específicos que conferem a capacidade de customização do tratamento e melhora na sobrevida dos pacientes (VUONG et al., 2014).

O uso de alvos moleculares já constitui hoje uma rotina clínica. A determinação de análises *ômicas*, por exemplo, até o uso de drogas alvo-dirigidas aprovadas por agências reguladoras internacionais como *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), a *European Medicines Agents* (EMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária já fazem parte da prática atual. Um exemplo foi a descoberta do Trastuzumabe, anticorpo monoclonal contra a proteína HER2, que revolucionou o tratamento do câncer de mama num subgrupo de pacientes, com importante impacto positivo na sobrevida global, e modificando a história natural dessa doença (SLAMON et al., 2001a).

Esforços na descoberta de biomarcadores e novos agentes terapêuticos alvo-direcionados no câncer de mama, têm mobilizado grandes investimentos científicos e financeiros, principalmente por parte da indústria farmacêutica internacional. Os custos no desenvolvimento de novas drogas em oncologia superam cerca de 50 bilhões de dólares americanos anualmente (ROSENBLATT, 2017). No entanto, o crescente e constante progresso dos conhecimentos desses alvos ou vias de sinalização fazem parte, dentro de uma perspectiva histórica, do passado. O futuro será resultado de estudos pré-clínicos ou clínicos desenvolvidos no presente. Nesta direção, uma série de drogas têm sido testadas e sinalizam como a doença poderá ser continuamente controlada (PEGRAM et al., 2018).

Outra área em crescente estudo, que vai além de alvos moleculares, concentra-se nos mecanismos epigenéticos de controle celular. A epigenética estuda alterações hereditárias na expressão gênica, transitórias ou reversíveis, sem alterações nas sequências de DNA. Um melhor conhecimento da interação genoma-epigenoma é crucial, considerando as evidências

atuais de que a desregulação do epigenoma poderia promover a carcinogênese (KARSLI-CEPPIOGLU et al., 2014; OH; WANG; MUSCAT, 2016).

Dentro desse contexto, foram avaliados nesta tese os biomarcadores, painéis de assinatura genética e terapias alvo moleculares em uso corrente no manejo do câncer de mama, bem como aqueles constantes em estudos ainda em andamento. Ademais, em estudo original, foi avaliado os níveis de expressão gênica das sirtuínas 1 e 7, deacetilases NAD<sup>+</sup> dependentes, relacionando-as com características clínicas e tumorais de pacientes portadores de câncer de mama inicial atendidos no Hospital Barão de Lucena, na cidade do Recife-PE.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

Identificar os principais biomarcadores em uso corrente e os potenciais alvos terapêuticos no câncer de mama.

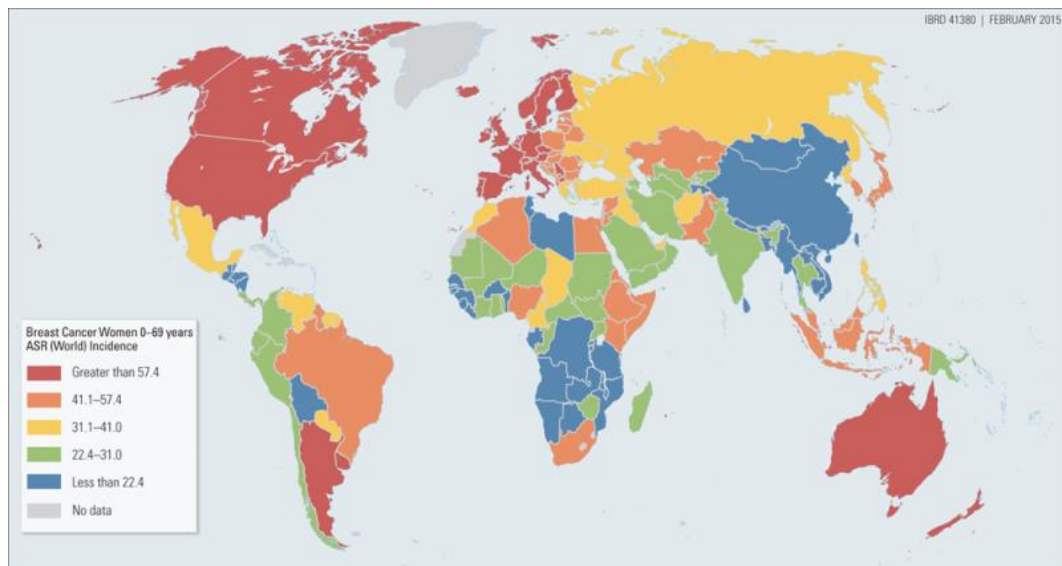
### 1.1.2 Específicos

- Identificar biomarcadores relacionados a terapias alvo em uso corrente e ensaios clínicos com potenciais focos nas vias de sinalização oncogênicas;
- Determinar o potencial de SIRT1 e SIRT7 através da análise dos níveis de expressão gênica destas sirtuínas e a sua associação com características clínicas em pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a tratamento cirúrgico no Hospital Barão de Lucena da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Segundo os dados do projeto GLOBOCAN 2012 que fornece estimativas contemporâneas de incidência, mortalidade e prevalência dos principais tipos de câncer em 184 países, cerca de 1,67 milhões de casos novos de câncer de mama foram estimados para o ano de 2012 em todo o mundo (figura 1). Isso representa 25,2% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres e a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, com aproximadamente 522 mil mortes estimadas, o que reflete em 14,7% de todos os óbitos. Em mulheres, o câncer de mama é a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos (atrás apenas do câncer de pulmão) e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento. Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil (14 óbitos a cada 100 mil mulheres em 2013) (GLOBOCAN 2012; FERLAY et al., 2014). Para o Brasil, estimam-se 59.700 casos novos de câncer de mama para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres de todas as regiões brasileiras, com exceção da região Norte onde o câncer do colo de útero ocupa a primeira posição (INCA, 2017).

**Figura 1.** Incidência mundial do câncer de mama.



Fonte: Adaptado de (FERLAY et al., 2014).

O câncer de mama inicial é, por definição, restrito à mama e os linfonodos locorreionais (no caso de pacientes com linfonodos axilares comprometidos) e pode ser removido cirurgicamente. Componentes micrometastáticos indetectáveis da doença podem permanecer após tratamento cirúrgico, e após anos, evoluir para uma recorrência clinicamente detectável que eventualmente causa a morte. O câncer da mama metastático (CMM) ou estágio IV do câncer de mama conforme *American Joint Committee on Cancer – AJCC* - (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018) conceitualmente incorre no acometimento de órgãos à distância, sendo geralmente incurável e com tratamento de caráter paliativo, apesar da melhoria na sobrevivência ao longo dos anos (DAWOOD et al., 2008) com sobrevida global mediana (SG) de 2 a 3 anos e sobrevida em 5 anos de aproximadamente 25% apenas (CARDOSO et al., 2017). À apresentação, o câncer de mama metastático pode ocorrer numa variedade de diferentes cenários clínicos, que vão desde lesões metastáticas solitárias ao envolvimento de múltiplos órgãos. Os locais mais comuns de metástases de câncer de mama incluem ossos, pulmão, fígado, linfonodos, parede torácica, e cérebro (GENNARI et al., 2005). O tratamento do câncer de mama é multimodal, incluindo como pilar a cirurgia em estágios iniciais, e a quimioterapia em todos os estágios da doença. O conhecimento do sequenciamento gênico através do Projeto Genoma Humano em 2003 (HGP) deflagrou conceitos em biologia molecular e, posteriormente com *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) em 2005, influenciou a visão do tratamento nos estágios iniciais e avançados da doença, e por fim, impulsionou a farmacogenômica na busca de agentes específicos mais eficazes (ELLIS; PEROU, 2013).

## 2.1 FARMACOGENÔMICA E CÂNCER DE MAMA

Farmacogenômica é o ramo da farmacologia que visa entender como as variantes genéticas influenciam na resposta de fármacos em pacientes, correlacionando a expressão de genes ou polimorfismos de nucleotídeo único com a eficácia e/ou toxicidade de uma substância. Esses estudos podem revelar como a variação genética entre os indivíduos afeta a farmacocinética e a farmacodinâmica de um medicamento. Se a associação de genótipos com fenótipos induzidos por drogas são reprodutíveis e têm efeitos relevantes, o uso clínico de tal informação pode ser implementado para benefício do paciente. Isto é particularmente importante na oncologia, pois além da eficácia, os efeitos adversos associados de tais tratamentos podem ser limitantes. A capacidade de prever como um paciente com câncer responderá a um regime de tratamento específico é a meta ambiciosa da oncologia personalizada (WHEELER et al., 2012).

A escolha do tratamento para o câncer pode ser definida de várias maneiras, mas é geralmente aceito que a abordagem remeta a situações em que subcategorias bem identificadas de pacientes com câncer podem obter o maior benefício de algum tipo de tratamento com base em condições pré-definidas específicas, como fatores prognósticos ou preditivos clínicos e/ou características biológicas ou moleculares. Este não é um conceito novo e tem sido aplicado durante décadas no desenvolvimento de todas as modalidades terapêuticas do câncer. Em geral, os medicamentos anticâncer são testados em todos os tipos de tumor e em todas as indicações até que encontraram seus nichos ou a categoria de pacientes para os quais trouxeram a contribuição mais significativa (ZARDAVAS; PUGLIANO; PICCART, 2013). Assim, uma das questões mais desafiadoras da pesquisa farmacogenômica é a identificação de marcadores que podem prever com precisão a resposta de um indivíduo a certos medicamentos; tais marcadores facilitariam grandemente a individualização, ou adequação, do tratamento. Este tipo de abordagem é necessário particularmente na terapia do câncer de mama, onde se persegue maior eficácia dos agentes e minimização dos efeitos colaterais e toxicidade. O câncer de mama metastático é uma neoplasia complexa e heterogênea, com comportamento tumoral e clínico que reflete sua biologia (LOBBEZOO et al., 2015).

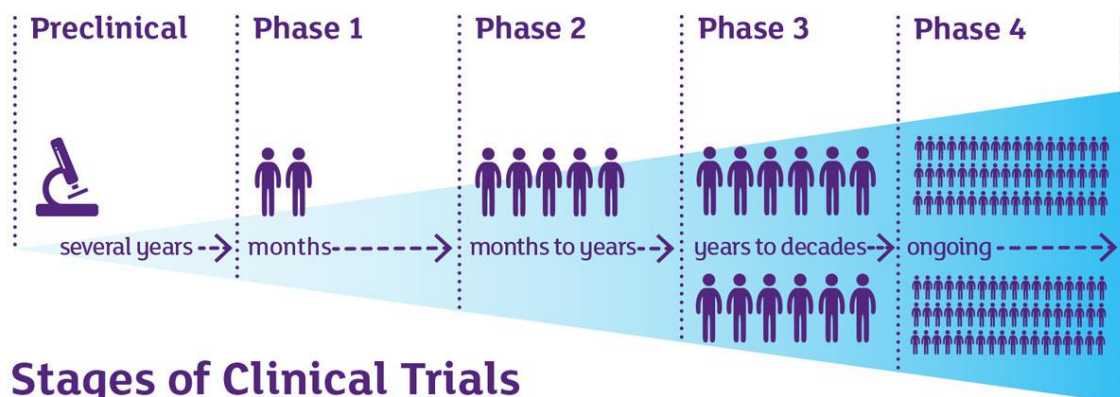
O advento das técnicas para avaliação da expressão genética de alto rendimento não só resultou na classificação molecular do câncer de mama em subtipos moleculares separados, mas também permitiu uma melhoria no prognóstico da doença, além da informação prognóstica fornecida pelos parâmetros clinicopatológicos tradicionais. O uso da farmacogenômica se reveste de grande importância no tratamento do câncer de mama, no entanto, sua validação requer a realização de ensaios pré-clínicos até estudos mais avançados em humanos.

## 2.2 ESTUDOS CLÍNICOS EM ONCOLOGIA

Os ensaios clínicos oferecem a base essencial para estudos farmacogenômicos por valorizar o resultado, não apenas o raciocínio biológico, para sustentar conclusões. Ainda podem ratificar que as diferenças no resultado obtido são de fato decorrentes do tratamento. Antes de um novo medicamento ser testado em humanos, uma fase pré-clínica é geralmente executada como teste inicial para o desenvolvimento de drogas utilizando-se modelos animais em laboratório. Os estudos pré-clínicos geralmente levam anos de execução, levando em consideração características químicas para sustentar as intervenções. Assim, quando um novo agente demonstra ser promissor nesta fase, pesquisadores deverão requerer autorização para iniciar estudos em humanos. Os estudos clínicos em humanos compreendem, em ordem

crecente de complexidade, os estudos clínicos de fase I, II, III e IV ou pós-comercialização. Nos Estados Unidos, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos (*U.S. Department of Health and Human Services*) mantém na internet um banco público de dados com registro dos ensaios clínicos com as características dos estudos, *status* do recrutamento de voluntários, resultados dos desfechos e os eventos adversos ocorridos ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Os estudos clínicos de fase I são projetados para determinar a segurança e a dose máxima tolerável de um novo medicamento, contribuindo para o entendimento do mecanismo de ação. Já os ensaios de Fase II estimam a eficácia do agente, que uma vez comprovada, fundamenta a realização de um estudo de fase III. Este por sua vez, compara a abordagem experimental ao tratamento padrão atual ou placebo. Estudos de Fase I e II em oncologia possuem tamanho de amostra frequentemente inferior a 100 indivíduos e duração menor que 2 anos. Ensaios comparativos de fase III envolvem frequentemente centenas a milhares de pacientes, sendo, portanto, fontes de dados úteis também para estudos de associação genômica ampla. O sucesso em estudos de fase III leva a aprovação de uma nova terapia pelas agências reguladoras e determinam o novo padrão de tratamento. Uma vez aprovada e comercializada, pesquisadores podem continuar a investigar os efeitos da nova terapia em outras populações (estudos de fase IV ou pós-comercialização), especificamente para avaliar sobre fatores de risco, benefício, melhores padrões de uso, e eventuais eventos adversos não reportados nas fases anteriores do desenvolvimento da droga (figura 2).

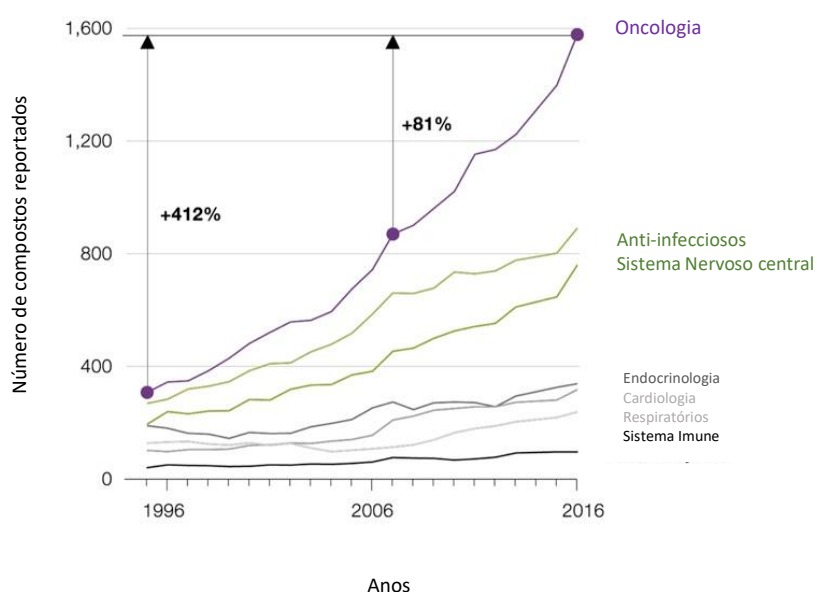
**Figura 2:** Estágios dos estudos clínicos em oncologia; fases pelas quais percorre uma nova molécula para aprovação do uso em humanos.



Fonte: adaptado de <https://www.cancerinstitute.org.au/data-research/clinical-trials/how-do-clinical-trials-progress> (acesso em 29/06/18).

O intervalo de tempo médio entre a descoberta de uma nova molécula para o tratamento do câncer e a concessão de autorização de comercialização do medicamento compreende aproximadamente 10 anos (PANDEY et al., 2010). A taxa de sucesso de aprovação de drogas anticâncer após a fase I foi estimada em 7% e em cerca de 50% após a fase III (VENKATAKRISHNAN et al., 2014). Nos Estados Unidos, dos 71 medicamentos aprovados pelo FDA entre 2002 e 2014, a melhoria da sobrevida global (SG) combinada de todos os tipos de câncer foi de 2,1 meses, e de 2,5 meses para a sobrevida livre de progressão (SLP) (FOJO; MAILANKODY; LO, 2014). Somente em relação aos tumores sólidos, uma revisão da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) mostra uma melhoria na SG de 1,5 meses (LIGHT; LEXCHIN, 2015). O processo de desenvolvimento de medicamentos contra o câncer e o investimento associado vem crescendo substancialmente. Estima-se que atualmente mais de US\$ 50 bilhões de dólares sejam investidos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) oncológico anualmente. Com esse investimento, o número de compostos ativos em P&D oncológico quadruplicou desde 1996 e quase dobrou desde 2008 (ROSENBLATT, 2017) (figura 3). Até 2013, a oncologia representava mais de 75% de todos os estudos clínicos para avaliação de biomarcadores e o câncer de mama constituía 28% de todos os ensaios (DEYATI et al., 2014). Hoje, a oncologia compõe quase 40% de todas as drogas em desenvolvimento clínico global.

**Figura 3.** Compostos em desenvolvimento clínico (estudos fase I-III).



Fonte: PharmaProjects 2017, McKinsey&Company analysis ([www.mckinsey.com](http://www.mckinsey.com)). Acesso em 26/06/18).

### 2.3 MARCADORES MOLECULARES EM CÂNCER DE MAMA

O desenvolvimento do câncer da mama envolve progressão através de processos, começando mormente com a hiperproliferação ductal, seguida da evolução subsequente para carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e finalmente para doença metastática. Dada a variabilidade da progressão clínica da doença, a identificação de marcadores que poderiam prever o comportamento do tumor é particularmente importante no câncer de mama. Além disso, a determinação de marcadores tumorais é uma ferramenta útil para o manejo clínico de pacientes com câncer, auxiliando em procedimentos diagnósticos, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recorrência e metástase à distância e prognóstico, auxiliando no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. De acordo com o Grupo de Trabalho do Instituto Nacional de Saúde (NIH) americano e o Consórcio de Biomarcadores, um marcador molecular é um indicador de processos biológicos patogênicos ou normais, ou ainda um indicador de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (MISHRA; VERMA, 2010). Embora a maioria desses marcadores seja proteína, recentemente, padrões de expressão genética e DNA alterado identificados no tecido tumoral também ganharam destaque como marcadores tumorais (COLEMAN; ANDERS, 2017).

### 2.4 MARCADORES MOLECULARES EM USO CLÍNICO

Na pesquisa do câncer de mama, o objetivo no campo da oncogenômica é responder a questões clínicas relevantes relacionadas a pacientes nos quais os tumores permanecerão inativos por um longo período de tempo, a terapia alvo-direcionada apropriada, e a abordagem mais eficaz para melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Assim, tem havido grande esforço para compreender os mecanismos moleculares da doença, o que levou à classificação do câncer da mama através de técnicas de *microarray* em, pelo menos, cinco subtipos moleculares intrínsecos, denominados: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, basal-*like* e normal-*like* (PEROU et al., 2000). Na prática clínica, contudo, a questão chave não é a separação dos subtipos intrínsecos definidos molecularmente, mas a discriminação entre pacientes que irão ou não se beneficiar de terapias específicas disponíveis.

### 2.4.1 Mutações dos genes BRCA1 e BRCA2

A descoberta do primeiro gene de suscetibilidade ao câncer de mama BRCA1 ocorreu em 1994. Mutações germinativas nos genes BRCA1 ou BRCA2 conferem um risco aumentado bem estabelecido para o desenvolvimento do câncer de ovário seroso de alto grau, do câncer de mama triplo negativo (TNBC) caracterizado pela ausência de expressão de receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona e Receptores Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Tipo 2 (HER2), e do câncer de mama ER positivo/HER2-negativo (especialmente naqueles com mutações no BRCA2); no entanto, todos os subtipos de câncer de mama podem ocorrer em associação com mutação desses genes. Esses genes supressores de tumor estão envolvidos em funções críticas, como resposta a danos no DNA (DDR) e reparo da dupla fita do DNA. As mutações BRCA1 e BRCA2 são responsáveis por cerca de 10% de todos os cânceres de mama e cerca de 30% dos cânceres de mama hereditários (ECONOMOPOULOU; DIMITRIADIS; PSYRRI, 2015). Atualmente, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 estão entre os mais clinicamente relevantes biomarcadores preditivos e estão presentes em até 20% dos pacientes com TNBC representando uma oportunidade para melhorar o tratamento de precisão. Além disso, uma pequena porcentagem (aproximadamente 3%) dos tumores de mama estão relacionadas a mutações somáticas do BRCA, que podem ser detectadas através da análise direta do tecido tumoral ou do DNA livre de células circulantes (TUNG; GARBER, 2018).

O câncer de mama associado a mutação do gene BRCA possui características únicas em comparação ao câncer de mama esporádico, incluindo uma taxa mais alta de fenótipo triplo-negativo e mais tumores de alto grau histológico (grau 3). O papel do teste da mutação do BRCA para orientar a seleção terapêutica em pacientes já diagnosticados com câncer de mama tem sido proposto em consensos médicos (quadro 1). A identificação do câncer de mama associado a mutação de BRCA em pacientes pode servir para seleção de tratamentos, como quimioterapia à base de platina, e ainda o tratamento com inibidores da poli(ADP-ribose) polimerase (PARPi) (LORD; ASHWORTH, 2017). Indivíduos que passam por testes genéticos com sequenciamento do DNA para regiões específicas desses genes e que descobrem que carregam uma mutação do BRCA devem ter a oportunidade de aconselhamento genético, exames de rastreamento, vigilância mais efetiva do câncer (vigilância ativa) e opções potencialmente preventivas, como cirurgia profilática e / ou quimioprevenção. Entre opções preventivas encontra-se a adenomastectomia bilateral profilática que reduz o risco de câncer de mama em mulheres com mutações BRCA1 e BRCA 2 em cerca de 90%, e a ooforectomia bilateral (TUNG; GARBER, 2018).

**Quadro 1.** Critérios para realização do teste de mutação germinativa BRCA1 e BRCA2 em pacientes já diagnosticados com câncer de mama.

- Idade jovem ao diagnóstico (<45 anos)
- Idade <50 anos com história familiar de câncer de mama, ovário / tuba / peritônio, pâncreas ou próstata;
- Câncer da mama triplo negativo (<60 anos)
- Câncer de mama em homens
- Etnia (Judeus Ashkenazi)
- História pessoal de câncer de ovário (em qualquer idade)
- Detecção de mutação somática BRCA1 e BRCA2
- Paciente com câncer de mama metastático HER2-negativo e elegível para tratamento com um inibidor da PARP

Fonte: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology by National Comprehensive Cancer Network – Versão 1.2018 – março de 2018, disponível em [www.nccn.org](http://www.nccn.org) (acesso em 29/06/2018).

## 2.4.2 Receptores de Estrógeno e Progesterona

Aproximadamente 70% dos casos novos de câncer de mama possuem receptores hormonais positivos, a saber, receptores de estrógeno (ER) e receptores de progesterona (PR). Os cânceres de mama classificados pela expressão imunohistoquímica (IHQ) positiva de ER e PR possuem características clínicas, patológicas e moleculares particulares, denominados atualmente como pertencentes ao subtipo luminal-*like*. Postula-se que estes tumores possuem fatores de risco intimamente associados a mecanismos relacionados à exposição ao estrogênio e a progesterona, em oposição ao TNBC. Sua frequência está associada à idade mais avançada do paciente no momento do diagnóstico (aumentando com a idade), com cerca de 75% ocorrendo em mulheres na pós-menopausa em comparação com apenas 50% na pré-menopausa. A expressão de receptores hormonais não serve apenas como um biomarcador preditivo para resposta à terapia endócrina, com uma vantagem de sobrevida em pacientes tratados com terapia endócrina, e que não foi observado com doença ER-negativo, sendo também reconhecido como marcador de melhor prognóstico (BANIN HIRATA et al., 2014).

O estrógeno se liga ao ER com alta afinidade e especificidade e funciona através de dois tipos principais de vias, a via clássica (ou nuclear) e a via alternativa (não nuclear). Ao longo da via clássica, o complexo estrógeno-ER promove dimerização do ligante e interage com proteínas co-reguladoras e sequências específicas de DNA no núcleo. Essas interações promovem a transcrição de vários genes (incluindo o gene do PR) que participam da regulação do ciclo celular, replicação do DNA, diferenciação celular, apoptose e angiogênese (BRUFISKY; DICKLER, 2018). O envolvimento do ER com o estrógeno através de vias não nucleares se origina no citoplasma para desencadear a co-regulação de fatores de crescimento e a sinalização acoplada à proteína G. Co-reguladores das vias não-nucleares incluem

receptores (por exemplo, receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, receptor do fator de crescimento de fibroblastos [FGFR], HER2) e quinases (por exemplo, proteínas quinases ativadas por mitógeno, receptores de tirosina quinase, PI3K, AKT, mTOR, Src e CDK). Como o ER também pode ser ativado por meio de mecanismos independentes do próprio ligante, existem múltiplas oportunidades de comunicação entre o ER, os fatores de crescimento e os receptores de tirosina quinase que podem ativar ou modular a atividade do ER (MILLS; RUTKOVSKY; GIORDANO, 2018).

A expressão de ER e/ou PR, definida pela presença de pelo menos 1% de coloração positiva nos núcleos das células tumorais por meio da IHQ, determina a recomendação de iniciar terapia endócrina padrão como tratamento inicial na doença metastática conforme as diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia (ASCO), Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO) e do Consenso Internacional de Especialistas de St. Gallen, e deve ser usada a menos que haja uma doença com risco de vida imediato (crise visceral), onde a quimioterapia deve ser considerada. Atualmente, o *status* ER / PR provavelmente representa o melhor marcador preditivo atualmente em uso. Embora a terapia hormonal tenha revolucionado o tratamento do câncer de mama e os resultados tenham melhorado substancialmente nesses pacientes, o manejo ideal continua sendo um desafio significativo, principalmente devido aos mecanismos tumorais de resistência hormonal (NASRAZADANI et al., 2018).

#### **2.4.3 Receptor Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano**

Conhecido por vários nomes como c-erb-2, cerbB-2, C-erbB-2, HER-2, HER-2/Neu, ERBB2, erbB2, e, erbB-2, este oncogênese tem sido extensivamente estudado no câncer de mama (SLAMON et al., 1987). HER2 é um membro da família dos receptores de tirosina quinase que também inclui o receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico humano ou EGFR (HER1, ErbB1), HER3 (ErbB3), e o HER4 (ErbB4). A união do ligante aos domínios extracelulares dos receptores EGFR, HER3 ou HER4 induz homo e heterodimerização e ativação de quinases. A proteína HER2 existe em uma conformação fechada e não possui ligante conhecido, mas é o parceiro preferido para a dimerização com HER1, -3 e -4 (heterodimerização) ou ainda com outra proteína HER2 (homodimerização). A nível molecular, a amplificação de HER2 está associada à desregulação do controle do ciclo celular em fase G1/S através da regulação positiva das ciclinas D1, E e CDK6, bem como da degradação do p27. O HER2 também interage com importantes segundos mensageiros, incluindo proteínas contendo o domínio SH2 (por exemplo, Src quinases). A amplificação de HER2 ou

hiperexpressão de proteínas HER2 (encontrada em cerca de 15-20% dos tumores de mama invasivos) está claramente associada ao crescimento e proliferação celular acelerados, pior prognóstico e resposta ao anticorpo monoclonal anti-HER2 (SLAMON et al., 2001a). Essa amplificação do HER2 pode ser determinada por IHQ pela análise usando coloração de anticorpo anti-HER2 que admite resultados com categoria 0 ou 1+ como negativo, 2+ como indeterminado e 3+ como positivo. A hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) classifica os tumores como positivos para HER2 quando a proporção de cópias do gene HER2 para a porção centromérica do cromossomo 17 (razão HER2: CEP17) é maior ou igual a 2,0. Até 24% dos cânceres de mama que são HER2-positivo (2+) por IHQ têm amplificação gênica e se beneficiam da terapia alvo anti-HER2; portanto, a análise por FISH deve ser realizada em todos os espécimes que são 2+ por IHQ (WOLFF et al., 2013). A hiperexpressão ou amplificação do HER2 é um forte fator preditivo para resposta a terapias sistêmicas específicas. O *status* positivo para HER2 é preditivo de maior eficácia para vários agentes quimioterápicos, como antraciclinas (GENNARI et al., 2008) e taxanos (HAYES et al., 2007), e também um marcador de resistência relativa à terapia endócrina (HOUSTON et al., 1999).

#### 2.4.4 Ki-67

O antígeno Ki-67, descrito pela primeira vez em 1983, é uma proteína nuclear não-histona que está intimamente ligada às fases do ciclo celular com células em proliferação (G1, S, G2 e M), exceto G0 com células em repouso e sua expressão tem sido correlacionada com a taxa de proliferação de células tumorais (PETRELLI et al., 2015).

Muitos estudos têm investigado a expressão por IHQ do Ki-67 como um marcador prognóstico e preditivo para o câncer de mama. O valor prognóstico e preditivo do Ki-67 foi avaliado em uma revisão sistemática realizada por Luporsi et al. e concluiu que esse biomarcador pode ser considerado como fator prognóstico para decisão terapêutica; no entanto, a padronização de técnicas e métodos de medição pela IHQ são necessários para a integração do Ki-67 na prática clínica cotidiana (LUPORSI et al., 2011). Uma metanálise envolvendo mais de 12 mil pacientes sugere que a positividade do Ki-67 avaliada por IHQ com ponto de corte maior que 10% (valor arbitrário) suporta o papel prognóstico em câncer de mama, mostrando uma associação significativa entre a sua expressão e o risco de recorrência e morte em todas as populações consideradas e para ambos os desfechos (SLD e SG) (DE AZAMBUJA et al., 2007). Em 2013, um importante consenso de oncologistas reunidos na cidade suíça *St Gallen* (*St Gallen International Expert Consensus*) incorporou o ponto de corte de 14% para definir

entre valor "alto" e "baixo" do Ki-67, utilizando essa definição para separar tumores que expressam ER/PR entre *luminal-like A* e *luminal-like B* (GOLDHIRSCH et al., 2013). Em 2015, a grande dificuldade de padronização da medição do Ki-67 (por IHQ) entre laboratórios, fez com que este mesmo painel de especialistas abandonasse a definição de um único ponto de corte para a definição entre Ki-67 alto ou baixo (COATES et al., 2015). Finalmente, a definição de valores claramente altos ou claramente baixos do Ki-67, ou ainda, o grau histológico, são recomendados como índices de proliferação na definição entre os subgrupos biológicos *luminal-like A* e *luminal-like B* (CURIGLIANO et al., 2017).

#### **2.4.5 Ativador do plasminogênio uroquinase e PAI-1 (uPA/PAI-1)**

Fatores proteolíticos associados ao tumor uPA (ativador do plasminogênio tipo uroquinase) e seu inibidor tipo 1 (PAI-1) são fatores-chave na invasão e metástase tumoral. O uPA e/ou o PAI-1 também estão envolvidos na sinalização celular e podem afetar a adesão, a migração, a quimiotaxia, o crescimento celular e a sobrevivência. Além disso, eles desempenham papel em processos fisiológicos, como fibrinólise e coagulação sanguínea, cicatrização de feridas, gravidez e remodelação tecidual. A quantificação tecidual pode ser determinada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) em extratos tumorais frescos congelados (DUFFY et al., 2014).

Embora não seja amplamente utilizado, o uPA e seu inibidor, o PAI-1, estão atualmente entre os biomarcadores prognósticos mais bem validados para o câncer de mama. Vários estudos retrospectivos e prospectivos têm demonstrado que altas concentrações das proteínas uPA e PAI-1 constituem preditores independentes do prognóstico em pacientes com câncer de mama invasivo precoce, onde níveis baixos de ambos os fatores estão associados com excelente prognóstico, enquanto altos níveis de um ou ambos estão associados a um desfecho ruim (pior prognóstico). O valor clínico de uPA/PAI-1 para prever resultados em câncer de mama inicial sem comprometimento de linfonodos axilares (doença linfonodo-negativa) foi validado em estudo clínico randomizado prospectivo independente (nível I de evidência) (JANICKE et al., 2001) (HARBECK et al., 2013). Existem, no entanto, limitações importantes para o uso de uPA/PAI-1 na prática clínica de rotina, e talvez a maior delas esteja no método de quantificação por teste ELISA validado, dificultado em pacientes com tumores pequenos, e ainda pela incapacidade dos centros em armazenar amostras frescas congeladas.

### 2.4.6 Outros marcadores

Outros marcadores podem ainda ter interesse biológico como biomarcadores, como exemplo, ciclina E (com níveis tumorais determinados por *Western blot* ou por IHQ), alguns tipos de microRNAs circulantes, a expressão de *Forkhead Box Protein 3* (FOXP3), dentre outros. Entretanto, a falta de reprodutibilidade, a baixa magnitude do efeito e a interdependência de outros fatores prognósticos estabelecidos tornam tais marcadores sem uso clínico definido (DUFFY et al., 2017).

Embora o antígeno carcinoembrionário (CEA), o antígeno de câncer (CA) 15-3 e o CA 27-29 possam ser usados para contribuir nas decisões relativas ao monitoramento do tratamento oncológico no cenário metastático, os dados são insuficientes para recomendar o uso isoladamente na tomada de decisões, conforme recomendação atual da ASCO (VAN POZNAK et al., 2015).

## 2.5 PERFIL DE EXPRESSÃO GENÉTICA EM CÂNCER DE MAMA

O perfil de expressão genética do câncer de mama demonstra uma heterogeneidade molecular significativa, mesmo entre tumores com as mesmas características morfológicas. O esforço para compreender tal variabilidade tumoral, levou ao desenvolvimento de ferramentas moleculares de classificação com a finalidade de estratificar os tumores em diversos subtipos moleculares que traduzissem relevância clínica. Dois dos primeiros relatos sobre a viabilidade de testes moleculares para classificar tumores de câncer de mama foram publicados por Perou (PEROU et al., 2000) e Sørli (SORLIE et al., 2001). Esses autores propuseram que a diversidade fenotípica dos tumores de mama poderia ser acompanhada por uma diversidade correspondente nos padrões de expressão genética, capturados usando microarranjos de DNA (*microarrays*). O primeiro estudo realizou a análise inicial de padrões de expressão genética em tecidos mamários humanos normais ou malignos, grosseiramente dissecados de 42 indivíduos (36 carcinomas ductais infiltrantes, 2 carcinomas lobulares, 1 carcinoma ductal *in situ*, 1 fibroadenoma e 3 amostras normais de mama) por agrupamento hierárquico usando genes cujos níveis de expressão diferiam da mediana e revelou os subtipos moleculares intrínsecos, denominados: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, basal-*like* e normal-*like* (PEROU et al., 2000). Em adição a este primeiro estudo, uma publicação subsequente relatou 78 cânceres de mama de diferentes estágios e tipos histológicos, investigados com um arranjo de cDNA contendo 8.102 elementos genéticos. Sorlie et al., (2001) demonstraram que a

positividade de *erbB2* parecia estar associada a um grupo de expressão distinto de tumores ER-negativo. Eles também identificaram o subgrupo luminal (subgrupo A) de tumores ER-positivo que foi associado com o melhor prognóstico. Além disso, os tumores ER-positivo puderam ser separados em grupos de expressão que, em última análise, se correlacionam com a frequência de mutações de TP53.

Esses dados, juntamente com as numerosas contribuições subsequentes de diferentes autores, mudaram a forma como os pesquisadores entendem, classificam e estudam o câncer de mama. Eles levaram pesquisadores e médicos a reconsiderar a maneira de diagnosticar e tratar pacientes e, em última análise, como procurar novas alternativas terapêuticas (EROLE et al., 2012).

### **2.5.1 Padrões de expressão genética e subtipos moleculares intrínsecos**

Como anteriormente assinalado, o grupo de Perou foi o primeiro a fornecer uma classificação molecular para o câncer de mama que definia uma lista de genes "intrínsecos" e classificava o câncer de mama em subtipos moleculares. Essa classificação, validada por outros grupos independentes (SOTIRIOU et al., 2003), foi baseada em uma análise não supervisionada agrupando os tumores de acordo com suas características biológicas, independentemente de suas variáveis clínicas ou prognósticas (quadro 2).

#### **2.5.1.1 Luminal A**

O câncer de mama luminal A é o subtipo mais frequente, correspondendo aproximadamente a 60% do total. É caracterizado pela expressão de genes ativados pelo fator de transcrição do ER, tipicamente expressos no epitélio luminal que reveste os ductos mamários. Esses padrões incluem a expressão de citoqueratinas luminais 8/18, ER e genes associados à ativação de ER, como *LIV1* e *CCND1* (DAI et al., 2015). Na maioria das vezes apresenta-se diploide com poucas mudanças no número de cópias, baixa expressão de genes relacionados à proliferação celular e baixa expressão do gene *HER2*. Genes recorrentemente mutados (>5%): *PIK3CA*, *CDH1*, *MAP3K1*, *GATA3*, *MAP2K4*, *FOXA1*, *TP53*, *RUNX1*, *CBFB*, *NBL1*, *CTCF*, *NCOR1*, *PTEN*, *CDKN1B*, *AKT1*, *TBX3*, *ARID1A* e *NF1* (KROEMER et al., 2015). Em geral, o subtipo luminal A têm bom prognóstico, respondem bem à terapia hormonal, mas pobremente à quimioterapia convencional (CHEANG et al., 2012). O perfil IHQ é caracterizado pela expressão de ER, PR, Bcl-2 e citoqueratina CK8/18, ausência de expressão

de HER2, baixa taxa de proliferação medida por Ki-67 (claramente baixo) e baixo grau histológico. Luminais A apresentam um padrão distinto de recidiva, com maior incidência de metástases ósseas em relação a outras localizações, como sistema nervoso central, fígado e pulmão, que representam menos de 10% (EROLES et al., 2012).

#### 2.5.1.2 Luminal B

Os tumores de mama do subtipo Luminal B têm uma expressão menor de genes relacionados ao ER, uma expressão variável do gene HER2 e uma expressão relativamente maior de genes relacionados à proliferação. Representam cerca de 20% dos cânceres de mama. Comumente aneuplóide, com muitas amplificações focais de alto nível (11q13 [Ciclina D1, 56%]; 8p11–12 [FGFR1, 23%]). Os tumores luminais B também mostraram ter maior instabilidade genômica. Genes recorrentemente mutados (>5%): PIK3CA, GATA3, PTEN e TP53. Em comparação com o luminal A, apresentam um fenótipo mais agressivo, maior grau histológico e maior índice proliferativo, com pior prognóstico (KROEMER et al., 2015). O padrão de recidiva à distância também difere e, embora os ossos ainda sejam o local mais comum de recidiva (30%), esse subtipo apresenta uma maior taxa de recidiva em locais como o fígado (13,8%). São menos sensíveis à quimioterapia citotóxica (como evidenciado pelas baixas taxas de resposta completa patológica após a quimioterapia neoadjuvante). O perfil IHQ do subtipo luminal B expressa ER-positivo/HER2-negativo e Ki-67 claramente alto ou ER-positivo/HER2-positivo (TRAN; BEDARD, 2011; ADES et al., 2014).

#### 2.5.1.3 HER2 enriquecido

O subtipo HER2 enriquecido é caracterizado pela alta expressão de genes e proteínas relacionados a HER2 (localizado no cromossomo 17q12) e proliferação (por exemplo, ERBB2, GRB7 e PGAP3), expressão intermediária de genes e proteínas relacionados ao epitélio luminal (por exemplo ESR1 e PGR) e baixa expressão de genes e proteínas basais (por exemplo, queratina 5 e FOXC1). Esses tumores mostram o maior número de mutações no genoma, com 72% mutados em TP53 e 39% mutados em PIK3CA. É possível esperar a identificação deste subtipo molecular dentro do fenótipo triplo-negativo uma vez que 70% dos tumores HER2 enriquecidos (por *microarray*) têm a proteína hiperexpressa pela IHQ, com outros 30% negativos por IHQ (PRAT; PASCUAL; ADAMO, 2017). O pior prognóstico associado a esse subtipo, semelhante ao do subtipo basal-like, deriva-se de um maior risco de recidiva precoce

entre aqueles que não alcançam erradicação completa das micrometástases após quimioterapia nos cenários adjuvante e neoadjuvante, como demonstrado em pacientes que são submetidos a quimioterapia neoadjuvante e não atingem resposta patológica completa (CEJALVO et al., 2018). Comparados ao subtipo luminal, são mais sensíveis à quimioterapia baseada em antraciclinas (CHEANG et al., 2012) e taxanos (HAYES et al., 2007), sendo tipicamente responsivos ao trastuzumabe (terapia anti-HER2) adjuvante e neoadjuvante em combinação com quimioterapia (PARKER et al., 2009a).

#### 2.5.1.4 Subtipo Basal-*like*

O subtipo basal-*like* representa 10 a 20% de todos os carcinomas de mama (RAKHA et al., 2007) e inclui 70-80% dos TNBC (KROEMER et al., 2015). O termo foi cunhado porque eles expressam genes usualmente presentes em células mioepiteliais de mama normais, incluindo citoqueratinas de alto peso molecular CK 5/6, CK14, CK17, além de EGFR, c-KIT, FOXC1, mutações frequentes de TP53 e um alto índice de proliferação (KREIKE et al., 2007; EROLES et al., 2012). Clinicamente caracterizam-se pela sua aparição em idade mais jovem, predominantemente em mulheres de etnia negra, maior tamanho tumoral ao diagnóstico, alto grau histológico e alta frequência de acometimento linfonodal axilar. Possui padrão agressivo de recidiva metastática, com predomínio de órgãos viscerais, principalmente pulmão, sistema nervoso central e linfonodos (KENNECKE et al., 2010).

**Quadro 2.** Características biológicas dos subtipos intrínsecos do câncer de mama.

|                                   | Luminal A                                                                                   | Luminal B                                                                                            | Her-2/neu                                                                                | Basal-like                                                                                                                                 |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Padrão de expressão gênica</b> | Expressão:<br>Citoqueratinas<br>luminais;<br>Elevada para o gene<br>ER e genes associados   | Expressão:<br>Citoqueratinas<br>luminais;<br>Moderada a fraca para<br>gene ER e genes<br>associados. | Alta expressão de Her-<br>2/neu.<br>Baixa expressão de<br>gene ER e genes<br>associados. | Alta expressão de<br>genes epiteliais<br>basais, citoqueratinas<br>basais.<br>Baixa expressão de<br>genes associados ao<br>ER e Her-2/neu. |
| <b>Carcinoma Invasivo</b>         | ~ 50%                                                                                       | ~ 20%                                                                                                | ~ 15%                                                                                    | ~ 15%                                                                                                                                      |
| <b>ER/PR status</b>               | ER/PR-positivo                                                                              | ER/PR-positivo                                                                                       | ER/PR-negativo                                                                           | Maioria ER/PR-<br>negativos                                                                                                                |
| <b>Her-2/neu status</b>           | Her2-negativo                                                                               | Expressão variável do<br>Her2 (+/-)                                                                  | Amplificação do<br>HER2/ HER2+                                                           | Her2-negativo<br>("triplo-negativo")                                                                                                       |
| <b>Características biológicas</b> | Baixo grau<br>histológico, baixo<br>índice de proliferação                                  | Mais alto índice de<br>proliferação que<br>luminal A                                                 | Alta proliferação                                                                        | Alta proliferação                                                                                                                          |
|                                   |                                                                                             | Tende a ter maior grau<br>histológico que o<br>luminal A                                             | Mutação TP53 comum<br>É mais provável que<br>seja de alto grau e LN<br>positivo.         | Mutação TP53<br>comum; Disfunção<br>de BRCA-1<br>(linhagem<br>germinativa<br>esporádica)                                                   |
| <b>Correlação histológica</b>     | Carcinoma tubular;<br>Carcinoma<br>cribriforme;<br>CDI de baixo grau;<br>carcinoma lobular. | CDI;<br>Carcinoma<br>Micropapilar.                                                                   | CDI de alto grau                                                                         | IDC de alto grau;<br>Carcinoma<br>metaplásicos;<br>Carcinoma medular.                                                                      |
| <b>Tratamento</b>                 | Responde a terapia<br>endócrina                                                             | Responde a terapia<br>endócrina<br>(inibidores de<br>aromatase e<br>tamoxifeno)                      | Responde ao<br>trastuzumabe                                                              | Nenhuma resposta à<br>terapia endócrina e<br>trastuzumabe                                                                                  |
| <b>Resposta a quimioterapia</b>   | Variável                                                                                    | Variável<br>(maior que em<br>luminal A)                                                              | Bom (quimioterapia<br>baseada em<br>antraciclina)                                        | Bom (quimioterapia à<br>base de platina)                                                                                                   |
| <b>Prognóstico</b>                | Melhor prognóstico                                                                          | Prognóstico não tão<br>bom quanto para o<br>luminal A                                                | Geralmente mau<br>prognóstico                                                            | Geralmente mau<br>prognóstico                                                                                                              |

#### 2.5.1.5 Subtipo Normal-like

Responsáveis por cerca de 5-10% de todos os carcinomas de mama, são pouco caracterizados na literatura e acredita-se terem sido agrupados na classificação de subtipos intrínsecos por fibroadenomas e amostras normais de mama no experimento de Perou et al, publicado em 2000. Apresentam expressão de genes associados ao tecido adiposo e outros tipos de células do estroma mamário e prognóstico intermediário entre o subtipo luminal e o basal-like. Geralmente não respondem à quimioterapia neoadjuvante (LAVASANI; MOINFAR, 2012). Este é um grupo controverso e é considerado por alguns autores uma contaminação celular normal das amostras, em vez de um subtipo intrínseco real. Fenotipicamente, não expressam ER, PR e HER2 e por isso podem ser classificados como TNBC, todavia são negativos para expressão de CK5 e EGFR. O significado clínico destes tumores ainda está por ser determinado e devido à sua raridade, existem poucos estudos sobre este subtipo (VUONG et al., 2014).

#### 2.5.1.6 Subtipos intrínsecos recentemente descritos

O Subtipo molecular intrínseco com baixos níveis de claudina (*Claudin-low*) foi identificado em 2007 (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Caracteriza-se por uma baixa expressão de genes envolvidos em junção e adesão intercelular, incluindo claudina-3, -4, -7 e E-caderina, de onde vem a denominação de baixo níveis de claudina. Este subtipo está localizado no agrupamento hierárquico próximo aos tumores do subtipo basal-like, sugerindo que ambos os subtipos compartilham expressão gênica característica, como a baixa expressão de HER2, ER e PR e pior prognóstico clínico (PRAT et al., 2010). A maioria dos tumores com baixos níveis de claudina são carcinomas ductais invasivos triplo-negativos, com maior frequência de carcinomas metaplásicos e diferenciação medular. Possuem uma taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante intermediária entre os tumores basais e luminais (VUONG et al., 2014).

O grupo subtipo molecular apócrino representa tumores ER-negativo, receptores de andrógeno (AR) positivos e possuem características histológicas apócrinas, como citoplasma eosinofílico abundante e nucléolos proeminentes (FARMER et al., 2005). Eles também podem mostrar hiperexpressão ou amplificação de HER2. Enquanto esses tumores estão associados à recorrência precoce, clinicamente, eles mostram uma boa resposta à quimioterapia neoadjuvante (GUEDJ et al., 2011). A alta expressão de genes regulados por interferon,

incluindo STAT1, caracteriza o subtipo relacionado ao interferon (HU et al., 2006). O significado total dos tumores pertencentes a essas classes recém-descritas ainda precisa ser determinado (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010; LEHMANN-CHE et al., 2013).

A classificação do câncer de mama pelo perfil de expressão genética possui atualmente utilidade limitada na prática clínica diária, em parte devido à natureza onerosa e ainda demorada dos testes. Oncologistas têm utilizado a combinação de fenótipos avaliados por IHQ (ER, PR e HER2) como substituta mais acessível aos painéis comerciais de assinatura genética. A associação é estabelecida com os subtipos intrínsecos baseados em perfis de expressão, com o Ki-67 sendo utilizado como discriminador dos subtipos luminais-*like* (CURIGLIANO et al., 2017) (quadro 3).

**Quadro 3.** Classificação biológica dos subtipos de câncer de mama de acordo com os perfis fenotípicos.

| Subtipos Biológicos             | Fenótipo                                                                                 |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Luminal A- <i>like</i>          | ER+ / PR+ / HER2- / Ki-67 claramente baixo                                               |
| Luminal B- <i>like</i>          | ER+ / PR+ ou PR- / HER2-or + / Ki-67 claramente alto                                     |
| HER2-hiperexpresso <sup>a</sup> | ER- / PR- / HER2+ (+++/3+ por IHQ e/ou ISH positivo)                                     |
| Triplo-negativo                 | ER- / PR- / HER2-                                                                        |
| Basal- <i>like</i> <sup>a</sup> | ER- / PR- / CK5+ / CK6+ / CK14+ / CK17+ / EGFR+                                          |
| Claudina-baixo                  | Baixa expressão de Claudina 3, 4 e 7 / baixa expressão de e-caderina / ER- / PR- / HER2- |
| Normal- <i>like</i>             | Sem definição homogênea na literatura                                                    |

Abreviações: HER2, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR, receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico humano; ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona; CK, citoqueratina; IHQ, Imunohistoquímica; ISH, hibridização *in situ*.

<sup>a</sup>Verdadeiro subtipo molecular basal-*like* e HER2-enriquecido pode ser definido exclusivamente por painel genético. Adaptado de (GOLDHIRSCH et al., 2013) e (COATES et al., 2015).

## 2.6 ASSINATURAS DE EXPRESSÃO GENÉTICA E IMPACTO NA TOMADA DE DECISÃO CLÍNICA

Por definição, um fator prognóstico é capaz de fornecer informações sobre o desfecho clínico no momento do diagnóstico, independente de terapia(s) realizada(s). Geralmente esses marcadores são indicadores de crescimento, invasão e potencial metastático (MCGUIRE; CLARK, 1992) (GASPARINI; POZZA; HARRIS, 1993). Por outro lado, um fator preditivo é capaz de fornecer informações sobre a probabilidade de resposta a uma dada modalidade terapêutica. Embora possam ser classificados separadamente, vários fatores no câncer de mama são prognósticos e preditivos, por exemplo, a presença de hiperexpressão do HER2; pacientes

com este fenótipo apresentam maior taxa de recidiva e respondem a terapias anti-HER2 com trastuzumabe, sendo, portanto, fator prognóstico e preditivo, respectivamente (LOIBL; GIANNI, 2017a). O surgimento de técnicas de genômica e transcriptômica e a capacidade de medir simultaneamente a expressão de milhares de genes levou à identificação de painéis de assinatura genética com perfis prognósticos baseados na biologia tumoral, vários dos quais foram validados e estão em uso clínico, com papéis preditivos e prognósticos.

De forma ampla, os objetivos dos painéis de assinatura genética em câncer de mama são: (1) classificar os tumores com base em características moleculares para entender melhor sua biologia, (2) avaliar o prognóstico, (3) selecionar pacientes com alto risco de recidiva da doença e, portanto, com potencial de se beneficiar de tratamento sistêmico e terapia adjuvante, (4) identificar indivíduos em risco de desenvolver doença visando instituir estratégias preventivas eficazes, (6) identificar aqueles com risco de toxicidade grave às terapias oncológicas, e (7) prever resposta ao tratamento: selecionar pacientes que provavelmente responderão a terapias específicas. Desta forma, buscam tornar-se cruciais tanto para a avaliação de risco, quanto para a tomada de decisão de tratamento. Espera-se que tais testes levem a uma melhor eficácia, segurança e custo-efetividade das terapias atuais e futuras, além de melhorar as taxas de cura e a qualidade de vida dos pacientes (LAL et al., 2017). Atualmente, por exemplo, testes como MammaPrint®, Oncotype DX®, Prosigna® (PAM50), EndoPredict®, e Breast Cancer Index® são os mais reconhecidos para tomada de decisões no manejo de pacientes com câncer de mama (HARRIS et al., 2016a), como sumarizado no quadro 4.

**Quadro 4.** Painéis de assinatura genética no câncer de mama.

|                        | <b>Oncotype DX</b>                              | <b>MammaPrint</b>                               | <b>PAM50-risk of recurrence score</b>                                                                                     | <b>Breast Cancer Index</b>                              | <b>EndoPredict</b>                                                                                                                                                            |
|------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Manufacturer           | Genomic Health (Redwood City, CA)               | Agendia (Irvine, CA)                            | NanoString Technologies (Seattle, WA)                                                                                     | bioTheranostics                                         | Myriad/ Sividon Diagnostics                                                                                                                                                   |
| Tissue Sample          | FFPE                                            | Fresh, frozen, or FFPE                          | FFPE                                                                                                                      | FFPE                                                    | FFPE                                                                                                                                                                          |
| No of genes            | 16 cancer<br>5 control                          | 70                                              | 50 cancer<br>22 control/ housekeeping<br>+ tumor size                                                                     | MGI-5 cell cycle genes;<br>H/I-Gene<br>expression ratio | 8 cancer<br>3 control                                                                                                                                                         |
| Technology             | Quantitative RT-PCR                             | Microarrays                                     | Quantitative RT-PCR                                                                                                       | Quantitative RT-PCR                                     | Quantitative-RT-PCR                                                                                                                                                           |
| Predictive             | +                                               | -                                               | -                                                                                                                         | +                                                       | -                                                                                                                                                                             |
| Prognostic             | +                                               | +                                               | +                                                                                                                         | +                                                       | +                                                                                                                                                                             |
| Eligible patients      | ER+ and HER2-, T1/2<br>0-3 nodes<br>f           | Stage I-and<br>II breast cancer                 | ER+, stage I/II<br>0-3 nodes                                                                                              | ER+<br>HER2-<br>Node-                                   | ER+<br>HER2-                                                                                                                                                                  |
| Measure/<br>Categories | RS<br>Low <18<br>Intermediate 18-31<br>High >31 | Good risk and<br>poor risk intrinsic<br>subtype | ROR:Ten year<br>probability of distant<br>recurrence<br>Low <10%<br>Intermediate 10-20%<br>High >20%<br>Intrinsic subtype | Low, intermediate<br>and high risk                      | The test result is<br>composed of the 'molecular<br>fingerprint' of a tumor in<br>combination with the<br>established prognostic<br>parameters nodal status<br>and tumor size |

Fonte: Adaptado de (GULER, 2017).

### 2.6.1 Prosigna® (NanoString Technologies)

Nome comercial do PAM50 (the Predictor Analysis of Microarray 50) aprovado pelo FDA em 2013, Prosigna® é um teste de 50 genes pré-especificados que caracteriza os tumores de mama por subtipo intrínseco (luminal A, luminal B, HER2 enriquecido e Basal-*like*) e que objetiva prever o benefício da quimioterapia adjuvante. O teste é feito a partir de material tumoral parafinado com alto grau de validação analítica. O PAM50 foi desenvolvido usando dados de técnicas de *microarray* e transcrição de reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) de uma série de quase 190 amostras pré-especificadas (WALLDEN et al., 2015). Os resultados do subtipo intrínseco determinado pelo PAM50 em combinação com parâmetros clinicopatológicos (como o tamanho e grau histológico) são usados para gerar um escore de risco de recorrência (ROR) que estratifica os pacientes com positividade para ER em risco alto, médio e baixo. O ROR foi especialmente prognóstico entre pacientes sem comprometimento de linfonodos axilares (PARKER et al., 2009b).

A utilidade prognóstica do teste foi demonstrada em dois grandes estudos clínicos baseada no escore ROR. Na análise retrospectiva do estudo ATAC (*Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination [ATAC] trial*) com 1017 pacientes na pós-menopausa, o aumento do escore ROR teve uma relação direta com o risco de recidiva à distância em 10 anos independente do comprometimento linfonodal axilar, e adicionou informação prognóstica em todos os subgrupos analisados (FILIPITS et al., 2014). Em outro grande estudo com 1478 pacientes na pré-menopausa com câncer de mama inicial, positivas para ER e que receberam terapia endócrina (estudo ABCSG-8), o PAM50 também foi validado como ferramenta prognóstica da sobrevida livre de recorrência à distância (em 10 anos) (DOWSETT et al., 2013). Desta forma, além de classificar o subtipo intrínseco, o PAM50 é útil na avaliação dos pacientes quanto a indicação de quimioterapia adjuvante, que deve ser reservada ao subgrupo com risco intermediário/alto pelo escore do ROR (HARRIS et al., 2016a).

### 2.6.2 Oncotype DX® (Genomic Health)

O *Oncotype Dx* é o um teste prognóstico bem validado e que pode identificar os pacientes com maior ou menor probabilidade de obter benefícios da quimioterapia adjuvante. Atualmente é indicado para mulheres com câncer de mama com receptor de estrogênio positivo e negativo para receptor de fator de crescimento epidérmico humano (ER-positivo/HER2-

negativo) para determinar o prognóstico em pacientes com recomendação para uso de terapia endócrina por pelo menos cinco anos. O *Oncotype Dx* foi desenvolvido pela identificação inicial de 250 genes candidatos mais promissores em prognóstico descritos na literatura (GLUZ et al., 2016). Os pesquisadores então usaram o método baseado em RT-PCR para gerar dados de níveis quantitativos de expressão desses genes em tecido fixado de 447 pacientes. Uma fórmula matemática que inclui 16 genes (mais outros 5 genes de referência) foi então gerada para otimizar a previsão de recidiva à distância em pacientes com tamoxifeno adjuvante. O resultado desse cálculo é conhecido como escore de recorrência (RS) e classifica os pacientes ER-positivo/HER2-negativo sem comprometimento linfonodal axilar em subgrupos de baixo, intermediário e alto risco de recidiva (PAIK et al., 2004).

O mais importante estudo clínico de validação deste teste é chamado TAILORx (*Trial Assigning Individualized Options for Treatment*), um estudo prospectivo, patrocinado pelo Instituto Nacional de Câncer americano (NCI), onde mais de 10 mil pacientes tiveram determinação do escore de recorrência (RS) pelo *Oncotype Dx* e foram divididos em subgrupos baseados na faixa de valor do RS. Pacientes com uma pontuação de 0 a 10 foram designados para receber apenas terapia endócrina (RS de baixo risco), e aqueles com uma pontuação de 26 ou superior foram designados para receber quimioterapia mais terapia endócrina (RS de alto risco). Os pacientes com RS pontuados entre 11 e 26 foram aleatoriamente designados para receber quimioterapia mais terapia endócrina, ou terapia endócrina isoladamente (pois os benefícios da quimioterapia eram incertos neste subgrupo intermediário). O estudo demonstrou correlação prognóstica no subgrupo de baixo risco, sem necessidade de quimioterapia (SPARANO et al., 2015). Este ano, os dados dos pacientes do subgrupo intermediário foram apresentados no encontro anual da ASCO, e demonstraram que a terapia endócrina adjuvante e quimioterapia tiveram eficácia semelhante em mulheres com câncer de mama ER-positivo/HER2-negativo sem comprometimento axilar, embora alguns benefícios da quimioterapia tenham sido encontrados em algumas mulheres com faixa etária inferior aos 50 anos (SPARANO et al., 2018). O estudo RxPONDER já em andamento tentará esclarecer o papel prognóstico do *Oncotype Dx* em pacientes com comprometimento linfonodal axilar (SUN et al., 2015).

### **2.6.3. MammaPrint® (Agendia)**

O perfil de expressão tumoral genético denominado *MammaPrint®* foi inicialmente estabelecido como um preditor de desfechos no câncer de mama na pré-menopausa pelo grupo

do Instituto do Câncer da Holanda. O conjunto de 70 genes foi originalmente derivado usando 98 pacientes, 34 dos quais desenvolveram doença metastática e 44 estavam livres de metástase após 5 anos de acompanhamento (VAN 'T VEER et al., 2002). Contém genes relacionados ao risco precoce de metástases, incluindo invasão tumoral, metástase, invasão intersticial e genes relacionados à angiogênese. Um total de 295 pacientes não metastáticas com menos de 53 anos de idade foram incluídos no estudo de validação retrospectivo (VAN DE VIJVER et al., 2002). A partir da expressão genética, os pacientes foram divididos em dois grupos e acompanhados por período de pelo menos 5 anos: um grupo com assinatura de bom prognóstico e outro com assinatura de mau prognóstico. Os resultados demonstraram que o risco de metástase em 10 anos para pacientes com assinatura de pior prognóstico foi significativamente maior que o verificado no grupo com assinaturas de bom prognóstico (85% versus 51%,  $P < 0,001$ ) e a sobrevida global em 10 anos diferiu de 95% contra 55% nesses grupos. Comparado ao grau histológico, tamanho do tumor, invasão vascular, ao *status* do receptor hormonal e outros fatores adversos, o painel de 70 genes foi o mais forte preditor da recidiva da doença. Além disso, os pacientes do grupo de pior prognóstico que receberam quimioterapia sistêmica adjuvante tiveram uma taxa de metástase à distância em 10 anos significativamente reduzida (HR 0,37;  $p < 0,001$ ). Por isso recomenda-se que pacientes com assinatura de pior prognóstico recebam quimioterapia adjuvante citotóxica a fim de reduzir o risco de metástase à distância.

O estudo clínico internacional, prospectivo, controlado, e randomizado de fase III MINDACT (*The Microarray In Node negative and 1–3 positive lymph node Disease may Avoid ChemoTherapy*) foi realizado para fornecer evidências, em larga escala, sobre o valor da integração do *MammaPrint* na prática clínica (CARDOSO et al., 2016). Dos 6.693 pacientes incluídos neste estudo, 23,2% foram classificados como alto risco clínico e baixo risco genético (assinatura de bom prognóstico). Com base nos fatores de risco clínicos tais pacientes normalmente receberiam quimioterapia (braço padrão), mas como também eram classificados como portadores de assinatura genética de bom prognóstico, não receberam quimioterapia (braço experimental). A taxa de sobrevida livre de metástases em 5 anos foi de 94,7% no grupo de risco discordante (alto risco clínico e baixo risco genético) que não recebeu quimioterapia e de 95,9% no braço de pacientes que receberam quimioterapia. Esse resultado sugere que o uso do preditor de risco genético pode ser clinicamente útil no reconhecimento de uma população alvo que tenha um bom prognóstico sem quimioterapia, apesar de ter indicadores clínicos contrários (critérios clínicos de alto risco). Publicações de consenso de especialistas da ASCO, ESMO, e do Grupo Europeu de Marcadores Tumorais (EGTM) sugerem que o *Mammaprint*® pode ser usado para determinar o prognóstico em pacientes com câncer de mama ER-

positivo/HER2-negativo sem comprometimento linfonodal axilar ou limitado a até 3 linfonodos e alto risco clínico nas decisões referentes à retenção quimioterapia (DUFFY et al., 2017; KROP et al., 2017; SENKUS et al., 2015).

#### **2.6.4 EndoPredict® (Myriad Genetic Laboratories)**

É um teste prognóstico baseado na quantificação de RNA por RT-PCR em cortes de tecido tumoral parafinado de 11 genes (incluindo quatro genes de referência) que, associado a dois fatores clínicos (tamanho do tumor e comprometimento linfonodal axilar), determina um escore de recidiva em 10 anos, denominado EPclin (MARTÍN et al., 2014). Esse teste divide os pacientes em subgrupos de baixo risco, quando escore EP é menor que 5 (e escore EPclin <3,3) e de alto risco, quando escore EP for maior ou igual a 5 (escore EPclin ≥3,3). Esse teste foi validado utilizando os dados de dois estudos clínicos prospectivos ABCSG-6 e ABCSG-8 (Austrian Breast Cancer Study Group) (FILIPITS et al., 2011) com pacientes na pós-menopausa ER-positivo/HER2-negativo, independente do *status* linfonodal axilar ou outros fatores prognósticos clinicopatológicos convencionais, e submetidos a terapia endócrina. Desta forma, parece ser útil na identificação de um subgrupo de pacientes com tumores ER-positivo, HER2-negativo, que apresentam um risco muito baixo de recorrência sem quimioterapia adjuvante e parece identificar pacientes com baixo risco de recorrência tardia (até 10 anos). O EndoPredict® foi desenhado para ser executado com segurança em laboratórios de patologia molecular de rotina (cenário descentralizado) utilizando amostras tumorais fixadas em formol e embebidas em parafina (proveniente de *core biopsy* ou espécimes cirúrgicos finais) (DUBSKY et al., 2013).

#### **2.6.5 Breast Cancer Index® (Biotheranostics)**

O Índice de Câncer de Mama (BCI®) é um biomarcador baseado na expressão genética desenvolvido com a utilização de uma coorte de pacientes tratados com tamoxifeno do estudo prospectivo randomizado de Estocolmo (JEREVALL et al., 2011) e que demonstrou fornecer um risco individual de recidiva à distância do câncer de mama com base em um modelo contínuo de risco. O BCI foi desenvolvido por meio da combinação algorítmica de 2 biomarcadores previamente descritos, a relação HOXB13: IL17BR (H/I) e o Índice de Grau Molecular (MGI), e proporcionou desempenho prognóstico superior a qualquer biomarcador

isolado (MA et al., 2008). Utilizando a análise genômica por *microarray*, três genes expressos foram associados com um aumento do risco de progressão entre pacientes com ER tratados com tamoxifeno: o homeobox antiapoptótico B13 (HOXB13, hiperexpresso em casos recorrentes de tamoxifeno) e o receptor de interleucina 17B (IL17BR) e EST AI240933 (ambos hiperexpressos em casos não recorrentes de tamoxifeno) (MA et al., 2004). BCI demonstrou prever significativamente 0 a 10 anos de risco de recorrência além dos clássicos fatores clinicopatológicos (por exemplo, idade, tamanho do tumor, grau do tumor e estado dos linfonodos).

Estudos subsequentes validaram o BCI como um preditor acurado de responsividade endócrina entre pacientes com câncer de mama ER-positivo/HER2-negativo e sem comprometimento linfonodal axilar (JANSEN et al., 2007; SGROI et al., 2013b). Há ainda um estudo de caso-controle que sugere poder identificar aqueles pacientes que se beneficiariam da terapia endócrina estendida (ou seja, mais 5 anos de terapia endócrina adjuvante, somados aos 5 anos já estabelecidos, num total de 10 anos) (SGROI et al., 2013a). Desta forma, sugere-se que o BCI é uma ferramenta útil naqueles na decisão da seleção de pacientes de deverão realizar a terapia endócrina adjuvante por 10 anos (HARRIS et al., 2016b).

É importante notar que cada painel genético tem sua finalidade e benefícios e sua escolha precisa ser avaliada corretamente. A recomendação é que os médicos envolvidos no tratamento do câncer de mama escolham apenas um teste por paciente em vez de usar testes em combinação, uma vez que podem levar a resultados discordantes para um paciente individual (BARTLETT et al., 2016). No Brasil, a incorporação dos painéis de expressão genética na tomada de decisão de tratamento não se concretizou de forma efetiva, parte pelo custo (principalmente no contexto do Sistema Único de Saúde – SUS), parte pela dificuldade de acesso logístico visto que vários comercializadores ou representações dos testes ainda não se estabeleceram em nosso País (LIEDKE et al., 2014). Infelizmente, os pacientes com TNBC têm benefício limitado a esses painéis, uma vez que a maioria deles avaliou pacientes com ER-positivo.

Existe ainda muito espaço para o desenvolvimento de painéis de assinatura genética validados com vistas a melhorar a decisão clínica, prognóstico e eficiência do tratamento do câncer de mama, com foco principalmente em alvos moleculares potenciais e que já possuem drogas em ensaios clínicos. Um exemplo é o painel de assinatura genética denominado *Theraprint*<sup>®</sup>, que mede a expressão de 56 genes-alvo, como mutações específicas em KRAS, BRAF, PIK3CA e EGFR, na predição sensibilidade e resistência a quimioterapia (BENDER et al., 2011). Sequenciamento abrangente de nova geração realizado no tecido tumoral

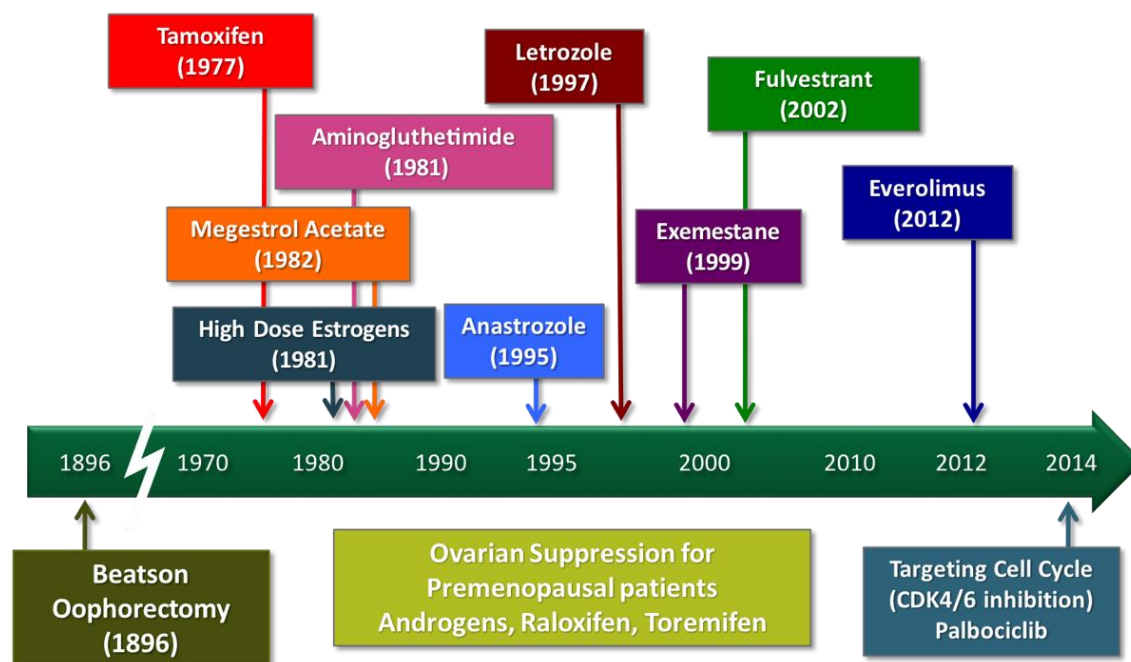
empregados na busca de possíveis mutações condutoras ainda tem papel limitado e não podem ser empregados para decisões terapêuticas, pois carecem de estudos clínicos validados (CHIA, 2018; ROSS et al., 2015).

## 2.7 TERAPIAS ALVO EM USO CLÍNICO

Avanços consideráveis foram feitos no tratamento de certos subtipos de câncer de mama, por exemplo, na doença HER2-positivo (figura 1). Neste subtipo, terapias direcionadas contra HER2 mudaram o resultado clínico para pacientes com doença metastática, fornecendo-lhes várias terapias efetivas que podem prolongar a sobrevida por muitos anos (LOIBL; GIANNI, 2017a). O subtipo ER-positivo também possui várias terapias disponíveis usando terapias endócrinas (DALMAU et al., 2014); Entretanto, na doença metastática, todos os pacientes acabam desenvolvendo resistência endócrina e, eventualmente, necessitam de quimioterapia citotóxica. Pacientes com TNBC tendem biologicamente a exibir um fenótipo agressivo, e atualmente não têm opções de terapia-alvo e têm uma quantidade limitada de agentes citotóxicos disponíveis para tratar sua doença.

O ER foi a primeira molécula usada como alvo para a terapia do câncer de mama. É um fator de transcrição que regula a expressão de muitos genes. Como receptor nuclear, o ER possui um domínio de ligação ao DNA (DBD) que permite regular os eventos de expressão gênica quando ligado ao estrogênio. Fatores associados ao ER, como FOXA1, GATA3, PBX1, auxiliam na fixação de ER ao DNA, permitindo a regulação transcricional (CARROLL, 2016). As observações históricas de Beatson sobre a regressão do câncer de mama após ooforectomia há mais de 100 anos forneceram a primeira percepção da natureza hormônio-dependente do câncer de mama (STOCKWELL, 1983). Várias classes de terapia endócrina são aprovadas para pacientes com câncer de mama inicial, localmente avançado ou metastático (figura 4), que incluem moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), inibidores da aromatase (AI) e reguladores seletivos do receptor de estrógeno (SERD).

**Figura 4.** Perspectiva histórica da terapia do câncer de mama ER-positivo.



Fonte: Adaptado de (DIXON, 2014) e (REINERT; BARRIOS, 2015).

O tamoxifeno foi a primeira terapia-alvo aprovada para o câncer de mama em 1977 pelo FDA. Ele demonstrou redução nas taxas de recidiva da doença e aumento da sobrevida global no câncer de mama em cinco anos (RUGO et al., 2016). O tamoxifeno é o representante dos moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs), inibidores competitivos da ligação do estrógeno aos receptores estrogênicos, com atividade agonista e antagonista, dependendo do tecido alvo (BRUFISKY; DICKLER, 2018). Um estudo do NSABP (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*) demonstrou que os efeitos agonistas e antagonistas do tamoxifeno exercia efeito em tecidos ósseos e uterinos. Mulheres em tratamento adjuvante com tamoxifeno diminuam as chances de recidiva da doença em 45%, mas também apresentavam uma chance maior de câncer endometrial, e uma redução nas fraturas ósseas (SHIAU et al., 1998; RIGGS; HARTMANN, 2003).

O fulvestranto é um antagonista do receptor de estrogênio que bloqueia a dimerização do RE e a ligação ao DNA, aumenta a renovação do ER e inibe a captação nuclear do receptor. Como bloqueia a função do ER antes que o estrogênio possa se ligar ao receptor, o fulvestranto pode, teoricamente, superar a resistência que é impulsionada pelas propriedades agonistas do tamoxifeno (CIRUELOS et al., 2014). É considerado o único antagonista puro do receptor de estrogênio (ER) da classe dos SERDs (*selective estrogen receptor downregulators*) que se liga competitivamente ao ER, levando à sua regulação negativa e não tem atividade agonista, ao contrário do tamoxifeno. O Fulvestranto demonstrou ser ativo em pacientes com câncer de

mama previamente tratados com tamoxifeno, ou com um IA, como o anastrozol. Sua via de administração é intramuscular, diferente do tamoxifeno e demais inibidores de aromatase que têm administração oral. Indicado em mulheres na pós-menopausa ou com castração medicamentosa (INGLE et al., 2006; CHIA et al., 2008; ROBERTSON et al., 2016).

Aromatase é uma enzima do citocromo P450 envolvida na síntese de estrógeno. Os inibidores de aromatase (IAs) atuam como antiestrogênicos, diminuindo a biossíntese de estrógeno advinda dos andrógenos, a via primária de biossíntese em mulheres na pós-menopausa. A eficácia de AIs como tratamento de primeira linha para câncer de mama metastático em mulheres na pós-menopausa foi demonstrado em uma metanálise de 2006 de 23 estudos aleatorizados com 8.504 pacientes (MAURI et al., 2006). Existem duas categorias de IAs de terceira geração usados: o inibidor de aromatase esteroideal (exemestano) e os inibidores de aromatase não-esteroidais, como o anastrozol e o letrozol. Em geral, são contraindicados em mulheres na pré-menopausa, a menos que a função ovariana seja suprimida. São também utilizados no tratamento adjuvante do câncer de mama inicial, sendo a terapia de escolha em pacientes na pós-menopausa, tendo demonstrado eficácia superior ao tamoxifeno neste cenário (BREAST INTERNATIONAL GROUP 1998; BAUM et al., 2002; COLLABORATIVE GROUP et al., 2005). Os dados clínicos relativos aos efeitos adversos dos IA na densidade mineral óssea demonstram que podem aumentar reversivelmente a reabsorção óssea; portanto, esses agentes podem aumentar o risco de fraturas ósseas. Outros potenciais eventos adversos (EAs) clinicamente significativos desses agentes podem incluir dislipidemia, dor e rigidez articular (KAKLAMANI; GRADISHAR, 2017).

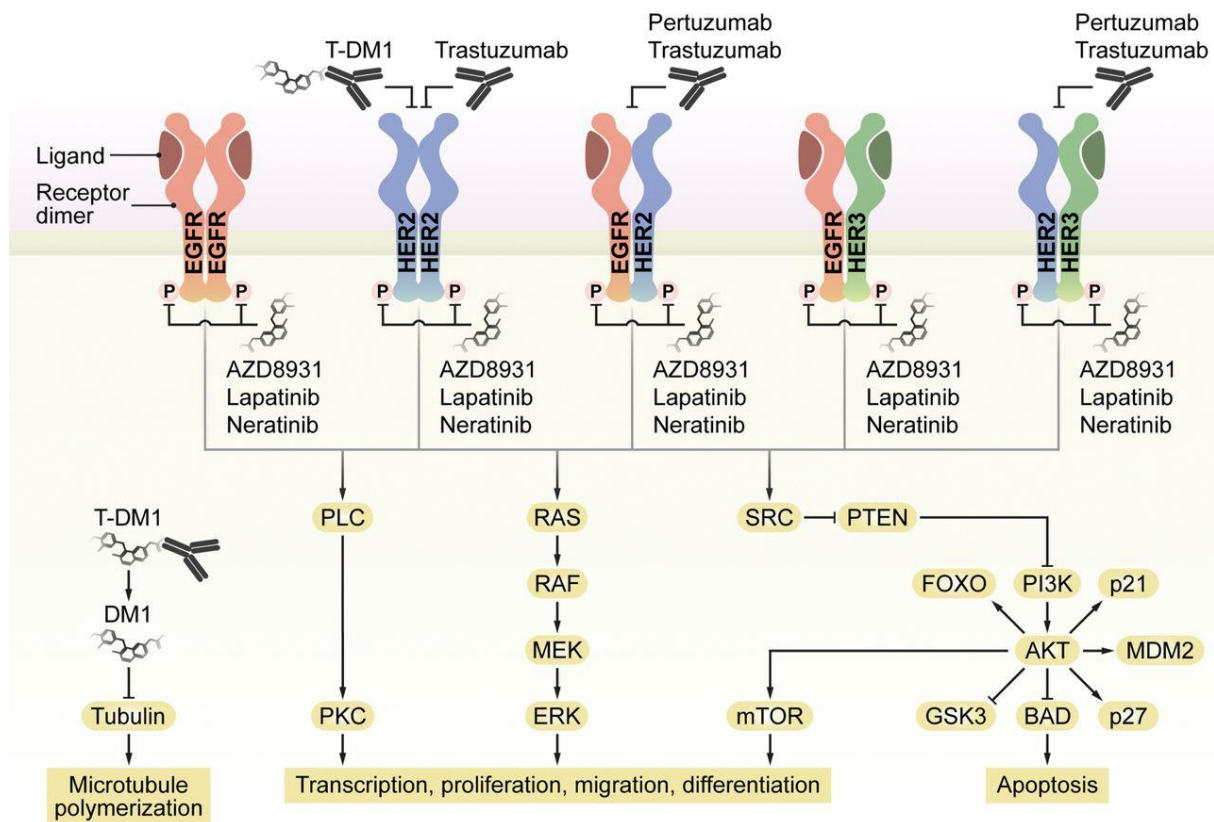
A via mTOR também é um alvo no tratamento do câncer de mama. Um mecanismo emergente de resistência endócrina é a sinalização aberrante através da via de sinalização PI3K-Akt-mTOR (JOHNSTON, 2006). Evidências crescentes demonstram que há uma interação próxima entre a via mTOR e a sinalização do ER. Um substrato do complexo mTOR 1 (mTORC1), chamado S6 quinase 1, fosforila o domínio 1 da função de ativação do ER, que é responsável pela ativação do receptor independente do ligante (BRUFISKY; DICKLER, 2018; YAMNIK; HOLZ, 2010). Everolimo é um inibidor oral de mTOR aprovado para uso clínico pelo FDA após resultados de estudo randomizado de fase III chamado BOLERO-2 (*The Breast Cancer Trials of Oral Everolimus-2*) (BASELGA et al., 2012b). É indicado em mulheres na pós-menopausa com câncer de mama metastático com ER positivo que tiveram uma recidiva ou progrediram em uso de AI não-esteroidal. A adição de everolimo ao exemestano melhorou a sobrevida livre de progressão (PFS) por revisão central de 10,6 meses em comparação com 4,1 meses do exemestano em monoterapia ( $p < 0,0001$ ), e a PFS na revisão local para 6,9 vs. 2,8

meses ( $p < 0,0001$ ). O everolimo esteve associado a eventos adversos graves (grau 3/4), incluindo estomatite (8%), dispneia (4%), pneumonite não-infecciosa (3%) e elevação das enzimas hepáticas (3%). Estomatite ou mucosite em qualquer grau acometeu 56% dos pacientes em uso da combinação. A combinação de everolimo com tamoxifeno também é uma opção para pacientes previamente tratados com um AI (BACHELOT et al., 2012).

Em relação aos tumores HER2-positivo, a terapia-alvo está disponível para a prática clínica, no cenário inicial (tratamento adjuvante) e avançado (LOIBL; GIANNI, 2017b) (figura 5). O trastuzumabe, um anticorpo monoclonal humanizado contra o domínio extracelular do HER2 (HUDIS, 2007), inibe a via intracelular que leva ao crescimento e diferenciação celular. O principal estudo clínico aleatorizado que mostrou a atividade do trastuzumabe em combinação com a quimioterapia no cenário metastático envolveu 469 pacientes com câncer de mama avançado HER2-positivo (SLAMON et al., 2001b). Os pacientes receberam quimioterapia de primeira linha isoladamente ou em combinação com o anticorpo. O desfecho primário deste estudo foi tempo para a progressão da doença, que aumentou de 4,6 meses nos pacientes que receberam quimioterapia apenas para 7,4 meses para aqueles que receberam trastuzumabe além de quimioterapia ( $p < 0,001$ ). Trastuzumabe também foi associado com um aumento na taxa de resposta objetiva (50% contra 32%,  $p < 0,001$ ) e uma maior duração da resposta (9,1 contra 6,1 meses,  $p < 0,001$ ). Pacientes que receberam trastuzumabe com quimioterapia de primeira linha para doença metastática neste estudo tiveram uma menor taxa de mortalidade em 1 ano (22% contra 33%,  $p = 0,008$ ), e sobrevida global mediana mais longa (25,1 meses contra 20,3 meses,  $p = 0,046$ ). Após a publicação deste estudo e aprovação pelo FDA, o trastuzumabe foi incorporado como terapia padrão em associação com outras terapias sistêmicas em pacientes HER2-positivo. Uma metanálise de oito ensaios clínicos aleatorizados envolvendo quase 12.000 pacientes com câncer de mama inicial HER2-positivo mostrou que regimes contendo trastuzumabe resultaram em melhorias na sobrevida livre de doença (DFS) e sobrevida global (OS) (MOJA et al., 2012).

**Figura 5.** Via de sinalização da família HER2 e terapias direcionadas.

Os receptores da família HER2 formam homodímeros e heterodímeros na superfície celular, que podem ser induzidos de forma dependente ou independente do ligante. A dimerização desencadeia a transfosforilação de resíduos de tirosina (P) e a sinalização em cadeia. Trastuzumabe e pertuzumabe são anticorpos monoclonais anti-HER2 que têm como alvo domínios extracelulares de HER2, inibindo a dimerização do receptor. Trastuzumabe conjugado a emtansina (T-DM1) que se liga ao HER2 e juntos são internalizados. A degradação dos lisossomos libera DM1 intracelularmente, permitindo que ele se ligue à tubulina, interrompendo assim a polimerização dos microtúbulos. O Neratinibe o lapatinibe são TKIs que apresentam atividade contra o EGFR e o HER2 *in vitro*.



Fonte: Adaptado de (CREEDON et al., 2014).

Primeiro agente de uma nova classe de terapias anti-HER2 denominada inibidores da dimerização de HER, o pertuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra o domínio II extracelular da proteína HER2, necessário para a heterodimerização de HER2 com outros receptores HER, mecanismo que conduz à ativação de vias de sinalização intracelular (MALENFANT; ECKMANN; BARNETT, 2014). No estudo de fase III *CLEOPATRA*, o bloqueio duplo de HER2 com trastuzumabe e pertuzumabe como tratamento de primeira linha para câncer de mama metastático (além do quimioterápico docetaxel) levou a uma sobrevida global mediana de 56,5 meses, enquanto o grupo controle, que recebeu trastuzumabe e placebo (além do docetaxel), mostrou sobrevida global mediana de 40 meses (BASELGA et al., 2012a). Outras terapias anti-HER2 disponíveis para uso clínico incluem os conjugados anticorpo-droga

com alvo no HER2 (Ado-trastuzumabe emtansina) (BAROK; JOENSUU; ISOLA, 2014) e inibidores de HER2 de pequenas moléculas (lapatinibe e neratinibe) (BASELGA et al., 2017). Como terapia sistêmica neoadjuvante (pré-operatória), o tratamento com duplo bloqueio de HER2 apresenta taxas de resposta patológica completa significativamente melhores do que os de outros braços de tratamento, e a combinação de dois agentes anti-HER2 com quimioterapia tem se mostrado como a modalidade de tratamento mais eficaz cenário neoadjuvante para o câncer de mama HER2-positivo, conforme metanálise recentemente publicada (NAKASHOJI et al., 2018). A figura 6 coloca em perspectiva histórica a evolução do tratamento do câncer de mama, desde a utilização da doxorrubicina (1974), droga que ainda hoje é base de grande parte dos esquemas quimioterápicos de tratamento. Os inibidores de quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4/6) são uma nova classe de fármacos direcionados a pequenas moléculas que inibem seletivamente a quinase dependente de ciclina 4 e 6, principais reguladores que ativam o ciclo celular da fase G1 para a fase S. Rigorosamente, CDK4 e CDK6 se associam com a ciclina D1 para formar um complexo ciclina D1-CDK4/6 e fosforilam a proteína do Retinoblastoma (pRb), liberando o fator de transcrição E2F, o que leva à transcrição de genes específicos da fase S e à progressão do ciclo celular. Ao bloquear esta via, os inibidores de CDK4/6 podem interromper a proliferação de células tumorais (DICKSON, 2014). Dados pré-clínicos e estudos clínicos demonstraram o promissor efeito anti-tumoral dos inibidores de CDK4/6 quando combinados com a terapia hormonal (KWAPISZ, 2017). Os inibidores de CDK4/6, Palbociclibe (FINN et al., 2016), ribociclibe (HORTOBAGYI et al., 2016) e abemaciclibe (GOETZ et al., 2017) são drogas avaliadas em estudos de fase III e aprovadas em combinação com terapia endócrina (AI ou fulvestranto) para pacientes com câncer de mama com ER-positivo e HER2-negativo no cenário metastático já em uso clínico. Uma metanálise de estudos clínicos aleatorizados que incluiu 3.854 pacientes com câncer de mama metastático ER-positivo/HER2-negativo demonstrou que os inibidores de CDK4/6 (palbociclibe, ribociclibe e abemaciclibe) associados a terapia endócrina podem prolongar significativamente a PFS de pacientes com câncer de mama avançado HR-positivo/HER2-negativo e ainda melhorar a taxa de resposta objetiva em comparação com a terapia endócrina convencional isolada (DENG et al., 2018).

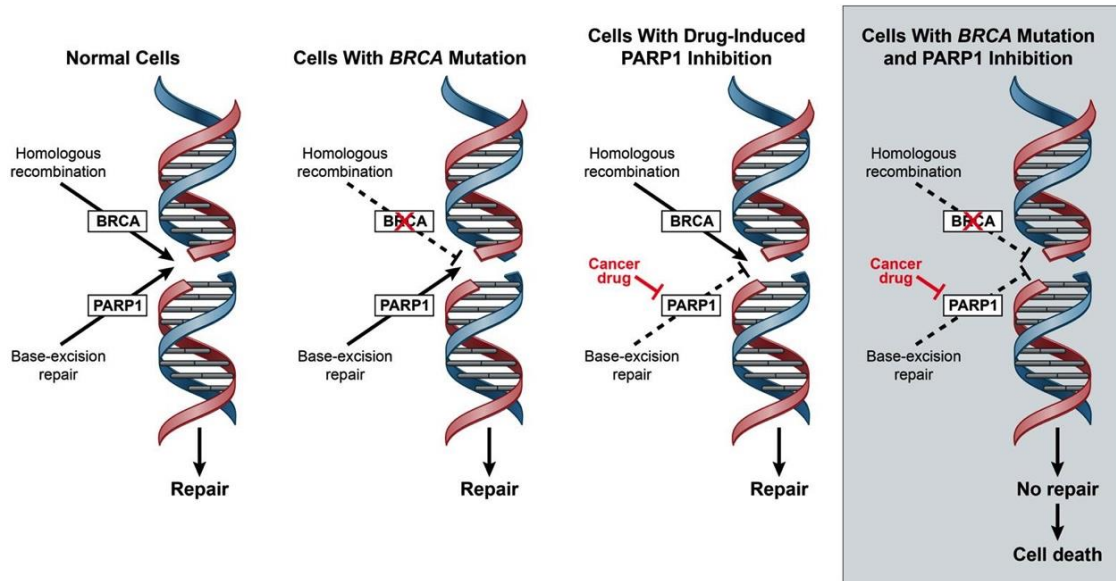
**Figura 6.** Perspectiva histórica dos agentes para tratamento do câncer de mama.



Fonte: Adaptado de figura apresentada por Virginia Kaklamani (ASCO Annual Meeting, 2018).

A descoberta da família das enzimas nucleares poli-ADP-ribose polimerases (PARPs) e seu papel nas vias de reparo do dano ao DNA abriu a possibilidade de desenvolver uma nova classe de drogas antineoplásicas com a capacidade de interferir no sistema de reparo do dano ao DNA de células neoplásicas. PARPs são uma família de nucleoproteínas altamente envolvidas em alguns processos celulares, incluindo regulação gênica, remodelação da cromatina, reparo de DNA (desencadeado por erros no processo de replicação, produção de espécies reativas de oxigênio e radiações ultravioleta) e apoptose (JUBIN et al., 2016). No entanto, distúrbios genéticos, como as mutações BRCA1 e BRCA2, impedem o mecanismo de reparo do DNA e aumentam o risco de malignidades. A inibição do processo de reparo do DNA pode levar à morte celular, e isso faz da PARP um alvo para a terapia anticâncer (LORD; ASHWORTH, 2017; TURK; WISINSKI, 2018). Cerca de 70% dos cânceres de mama em indivíduos portadores de mutação germinativa do BRCA 1 e 20% em portadores de mutação BRCA2 são TNBC, o que abre uma janela de oportunidade de terapias alvo-específicas nesta classe de tumores (LIVRAGHI; GARBER, 2015) (figura 7).

**Figura 7.** Papel da recombinação homóloga e Excisão de bases no reparo do DNA da célula.



Fonte: Adaptado de (IGLEHART; SILVER, 2009).

Olaparibe foi o primeiro inibidor de PARP a receber aprovação do FDA para o tratamento de câncer de ovário avançado com mutação germinativa de BRCA (LEDERMANN et al., 2012) e o primeiro inibidor de PARP a demonstrar resultados positivos em estudo clínico de fase III no câncer de mama metastático HER2-negativo e com mutação germinativa do BRCA (GRIGUOLO et al., 2018). O estudo incluiu 302 pacientes aleatorizados para quimioterapia (braço padrão de tratamento) ou olaparibe e demonstrou melhora estatisticamente significativa da PFS a favor do braço experimental (7,0 meses contra 4,2 meses), atingindo o objetivo primário (ROBSON et al., 2017).

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal dirigido contra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aprovado para uso em vários tipos de câncer, incluindo câncer colorretal e pulmão (KÜMLER; CHRISTIANSEN; NIELSEN, 2014). Considerando que as neoplasias são altamente vascularizadas e dependem de um suprimento sanguíneo robusto para manter a viabilidade e o crescimento tumoral, o objetivo desse anticorpo antiangiogênico seria retardar o crescimento do tumor limitando a formação de novos vasos sanguíneos, por redução do suprimento sanguíneo (VARELLA; ABRAHAM; KRUSE, 2017). Em 2008, o FDA concedeu aprovação acelerada ao bevacizumabe, após estudo clínico de fase III que avaliou a combinação com paclitaxel semanal para o tratamento de primeira linha do câncer de mama metastático HER2-negativo e demonstrou aumento do PFS frente a quimioterapia isolada (MILLER et al., 2007). Em meio a muitas controvérsias, essa aprovação foi posteriormente

retirada em 2010 e justificada por preocupações com segurança no contexto da falta de ganho em sobrevida global demonstrada em metanálise com avaliação de 2.447 pacientes (MILES et al., 2013; SINI et al., 2018). No Brasil e na Europa, o bevacizumabe permanece aprovado nesta indicação, como terapia de primeira linha associado a quimioterapia (paclitaxel ou capecitabina) em pacientes metastáticas HER2-negativo (Quadro 5).

**Quadro 5.** Classificação do câncer de mama e opções de tratamento.

| Subtipo <sup>a</sup><br>Intrínseco | Fenótipo <sup>a</sup><br>(IHQ)  | Tratamento<br>(não-metastático) <sup>b</sup>                                                                                                   | Tratamento<br>(metastático) <sup>b</sup>                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Luminal A                          | 90% ER+<br>89% PR+<br>14% HER2+ | Terapia endócrina com inibidores de aromatase e/ou antagonistas de ER+<br>Quimioterapia com taxanos, antraciclinas ou ciclofosfamida           | Primeira linha: terapia endócrina com inibidores de aromatase e/ou antagonistas de RE, isolados ou combinados com inibidores de CDK4/6;<br>Segunda linha: inibidores de MTOR, geralmente em combinação com terapia endócrina. Outros: quimioterapia com taxanos, antraciclinas ou ciclofosfamida. |
| Luminal B                          | 98% ER+<br>82% PR+<br>24% HER2+ | Quimioterapia mais terapia endócrina com inibidores de aromatase e/ou antagonistas de ER                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| HER2-enriquecido                   | 38% ER+<br>20% PR+<br>72% HER2+ | Quimioterapia+ trastuzumabe + Pertuzumabe+ em doentes com doença localmente avançada, isoladamente ou em associação com taxanos e trastuzumabe | Primeira linha: quimioterapia com taxanos mais trastuzumabe e pertuzumabe<br>Segunda linha: trastuzumabe emtansina (conjugado droga-anticorpo)<br>Outros: quimioterapia                                                                                                                           |
| Basal-like <sup>c</sup>            | 8% ER+<br>7% PR+<br>7% HER2+    | Quimioterapia (incluindo carboplatina em pacientes com mutações no BRCA1)                                                                      | Quimioterapia (incluindo carboplatina em pacientes com mutações no BRCA1)<br>Inibidores da PARP                                                                                                                                                                                                   |

BRCA1, Breast Cancer Associated Gene 1; CDK4/6, quinase dependente de ciclina 4/6; ER, receptor de estrogênio; HER2, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; HR, hazard ratio (hazard ratio); LPBC, câncer de mama com predomínio linfocitário (neste estudo, definido como > 50% de infiltração linfocítica estromal ou intratumoral); MTOR, alvo mecanicista da rapamicina; PR, receptor de progesterona;

<sup>a</sup>Fonte: [http://www.nature.com/nrclinonc/posters/breastcancer/nrclinonc\\_breastcancer\\_poster\\_web.pdf](http://www.nature.com/nrclinonc/posters/breastcancer/nrclinonc_breastcancer_poster_web.pdf). Acesso em 29/06/18.

<sup>b</sup>Fonte: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/> e <http://www.ema.europa.eu/ema/>. Acesso em 29/06/18.

Adaptado de (KROEMER et al., 2015)

## 2.8 NOVAS TERAPIAS ALVO EM ESTUDOS CLÍNICOS

Extensas pesquisas têm sido realizadas para entender melhor as características moleculares do câncer de mama. O bloqueio das vias de sinalização oncogênicas, dos pontos de controle regulatórios do ciclo celular ou dos moduladores epigenéticos, tornou-se uma estratégia de maior interesse, na expectativa de superar ou retardar o surgimento da resistência aos regimes padrão atuais, e até novos padrões de tratamento, com maior eficácia e que se traduza no melhor controle clínico do câncer de mama. Nesta seção, serão revistos os esforços recentes no desenvolvimento de fármacos em pesquisa clínica (estudos de fase I/II) e em estágios avançados com foco em novos alvos moleculares para vias de sinalização oncogênicas que ainda não possuem drogas aprovadas para uso clínico. Desta forma, não fará parte do escopo desta revisão a inclusão de alvos moleculares já estudados e com impacto na prática clínica atual, como por exemplo, terapias anti-HER2, inibidores de CDK4/6 e terapias endócrinas.

### 2.8.1 Inibidores da via PI3K/Akt/mTOR

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é uma das principais vias envolvidas na regulação da sobrevivência celular e proliferação, e é a via mais frequentemente alterada no câncer de mama. PIK3CA, AKT1, AKT2 e PTEN são os genes essenciais dessa via, com taxas de mutação aumentadas em casos de câncer que levam a uma regulação aberrante (COURTNEY; CORCORAN; ENGELMAN, 2010). Estima-se que 70% dos cânceres de mama apresentem hiperatividade da via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). A amplificação e/ou a mutação do gene PIK3CA ocorre de 20 a 40% dos cânceres de mama, levando a um aumento da atividade da enzima.

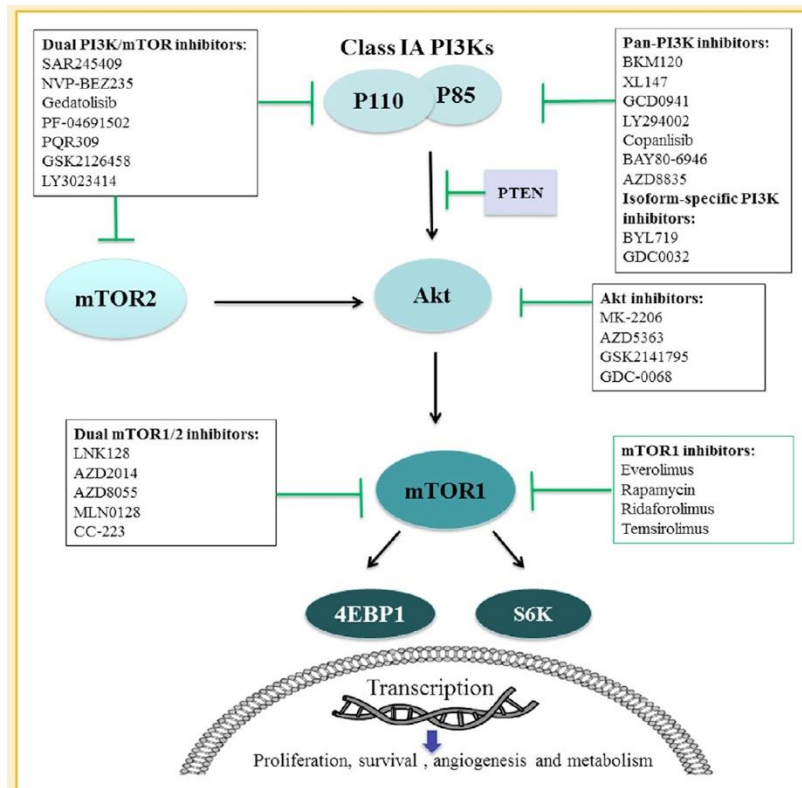
Mecanismos adicionais de hiperativação da via PI3K/Akt/mTOR incluem perda de função do homólogo da fosfatase e tensina (PTEN) (30% dos cânceres de mama) e a amplificação ou mutação da AKT (LEE; LOH; YAP, 2015; TSERGA et al., 2016). A proteína mTOR possui dois complexos funcionais distintos (mTORC1 e mTORC2), um dos quais (mTORC1) é um elemento chave no crescimento celular e pode ser ativado por sinalização da via PI3K/AKT ou ainda por outras vias de sinalização. A mutação em AKT1 e AKT2 ativa a sinalização de Akt no câncer de mama ER-positivo (luminais). Em modelos pré-clínicos de câncer de mama, a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR tem sido implicada na resistência endócrina e ao trastuzumabe em cânceres de mama com hiperexpressão de HER2, indicando

que os inibidores desta via podem agir sinergicamente com o trastuzumabe em células resistentes. Em contraste, a hiperativação da via de sinalização PI3K (através da baixa expressão de PTEN, mutação do PI3K ou AKT1) parece induzir sensibilidade do tumor aos inibidores de mTOR (por exemplo, everolimo) e inibidores de PI3K/Akt (BAHRAMI et al., 2017; BRUFISKY; DICKLER, 2018).

Vários inibidores da via PI3K foram desenvolvidos e estão sendo avaliados em estudos pré-clínicos e em estudos clínicos. Em particular, o estudo de fase Ib do inibidor oral de pan-PI3K BKM120 (buparlisibe) usado juntamente com letrozol em pacientes com câncer metastático na pós-menopausa ER-positivo foi o primeiro ensaio clínico de um inibidor de PI3K associado a terapia endócrina (MAYER et al., 2014). Dois pacientes tiveram uma resposta objetiva (OR) ao tratamento e quase 30% dos pacientes tiveram sobrevida livre de progressão durante período maior que 6 meses. Importante destacar que o *status* de mutação do PI3K não pareceu ser preditivo de responsividade clínica. Em um outro estudo de fase I/II, pacientes com câncer de mama localmente avançado ou metastático HER2-positivo que eram resistentes ao trastuzumabe foram tratados com BKM120 e trastuzumabe. Dois (17%) pacientes apresentaram respostas parciais, e sete (58%) pacientes apresentaram doença estável por 6 semanas (SAURA et al., 2014). Atualmente, dois estudos de fase III estão em andamento e avaliam o BKM120 em combinação com fulvestranto em pacientes com câncer de mama metastático ER-positivo/HER2-negativo); um estudo com pacientes resistentes aos IA (NCT01610284) e o outro, em pacientes que progrediram a IA associado ao everolimo (NCT01633060). O taselisibe (GDC-0032) é outro inibidor da PI3K que, apesar de mais estudado nos tumores ER-positivo, tem sido avaliado em pacientes com TNBC em combinação com antagonistas do receptor de andrógenos, como a enzalutamida (MDV-3100). Atualmente o taselisibe também é avaliado em estudo clínico de fase III, duplo-cego, controlado por placebo, com pacientes portadores de câncer de mama metastático ER-positivo resistente a um IA, portadores de mutação do PI3K e combinado ao fulvestranto (SANDPIPER; NTC02340221). Dados preliminares desse estudo foram apresentados no encontro anual da ASCO 2018 demonstrando que a combinação melhorou a PFS de forma significativa [HR=0,70]. Os eventos adversos graves mais comuns foram diarreia (12%), hiperglicemia (10%), colite (3%) e estomatite (2%) (Baselga J. et al., 2018). Pictilisibe (GDC0941), Alpelisibe (BYL719), Gedatolisibe (PF-05212384), Vistusertibe (AZD2014) e Capivasertibe (AZD5363) são outros exemplos de inibidores da via PI3K/Akt/mTOR que estão sendo avaliados em estudos clínicos de fase I/II (LI et al., 2018; SCHETTINI et al., 2017) (LEE; LOH; YAP, 2015). Com o amadurecimento dos dados ao longo

do tempo, será possível determinar a presença de representantes dessa classe de drogas no armamento terapêutico (figura 8).

**Figura 8.** A via PI3K/Akt/mTOR e os seus inibidores avaliados em estudos clínicos de fase I-III em câncer de mama. PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase, PTEN, homólogo da fosfatase e tensina deletados no cromossomo 10; Akt, proteína quinase B; mTORC, alvo de mamífero de complexo de rapamicina; 4EBP1, proteína 1 de ligação ao fator de iniciação eucariota 4E; S6K, s6 quinase.



Fonte: Adaptado de (BAHRAMI et al., 2018).

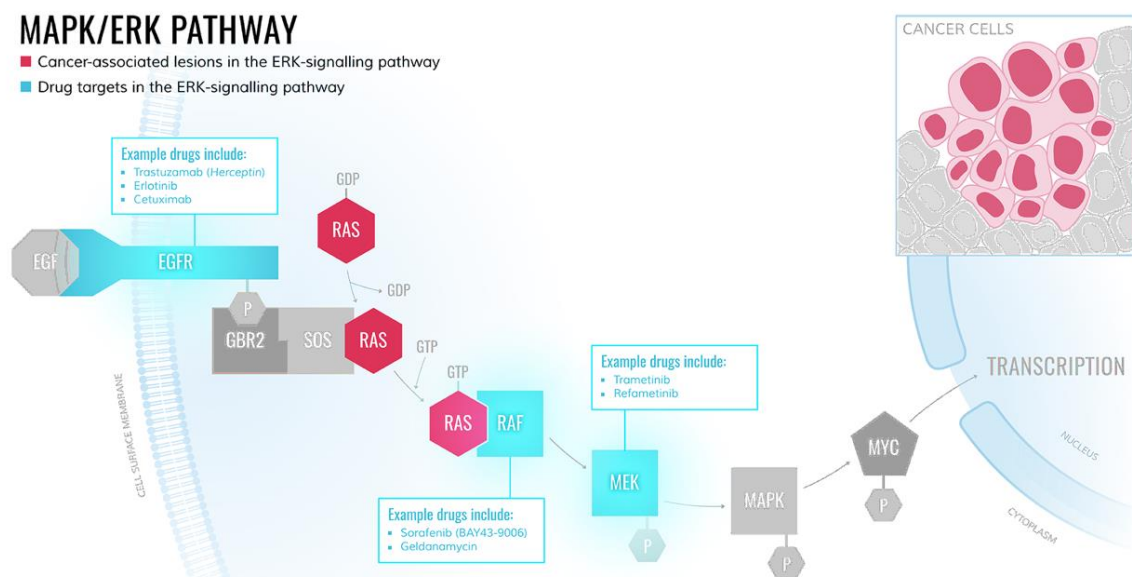
### 2.8.2 Inibidores da via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno)

Sob condições fisiológicas normais, a via MAPK regula o crescimento, sobrevivência e migração celular através da transdução dos sinais da superfície celular para o núcleo através de eventos de fosforilação. Os sinais extracelulares iniciam a via sinalização da MAPK através da ligação dos RTKs, e subsequente ativação da RAS (derivado do inglês: **RA**t **Sar**coma **ví**rus, ou vírus do sarcoma de rato), quando ligada a guanosina trifosfato (GTP) na membrana celular (figura 9). Os RTKs que interagem com o RAS, ou outros membros da superfamília RAS, incluem: receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), c-KIT (ou CD117), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) e o

tirosina-quinase 3 Fms-relacionado (FLT-3). As proteínas propagadoras da cascata de sinalização incluem a RAF quinase e também a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (FECHER; AMARAVADI; FLAHERTY, 2008). Assim, a via MAPK funciona através de uma cascata de fosforilação que envolve RAS, RAF, MEK e ERK, que como um fator de transcrição induz a proliferação celular no núcleo celular. A inibição da via quinase da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) continua sendo uma estratégia para aumentar a sensibilidade à quimioterapia. O mecanismo preciso de como a cascata RAS-ERK ativada causa uma menor resposta a quimioterapia é desconhecido (MIRZOEVA et al., 2009). No entanto, sugere-se que a dupla especificidade da fosfatase 4 (DUSP4) promove menor taxa de resposta patológica completa (maior chance de doença residual) após a quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama basal-like (BALKO et al., 2012). A resistência aos IAs ocorre por adaptação celular a um fenótipo de hipersensibilidade ao estrogênio, que envolve a ativação da via ERK 1/2-MAPK (MASAMURA et al., 1995; FROGNE et al., 2009;).

Selumetinibe (AZD6244) é um inibidor MEK1 e MEK2 avaliado em estudos clínicos. O primeiro estudo clínico publicado com selumetinibe avaliou o efeito da inibição da via MAPK em associação com terapia endócrina (fulvestranto) em câncer de mama metastático ER-positivo resistentes a IA (ZAMAN et al., 2015). O recrutamento do estudo foi interrompido após a inclusão de 46 pacientes (23 em cada braço) porque o braço selumetinibe-fulvestranto não atingiu a taxa de controle da doença pré-especificada. São aguardados resultados de outros estudos clínicos com essa droga, ainda não reportados.

**Figura 9.** A via de sinalização MAPK/ERK.

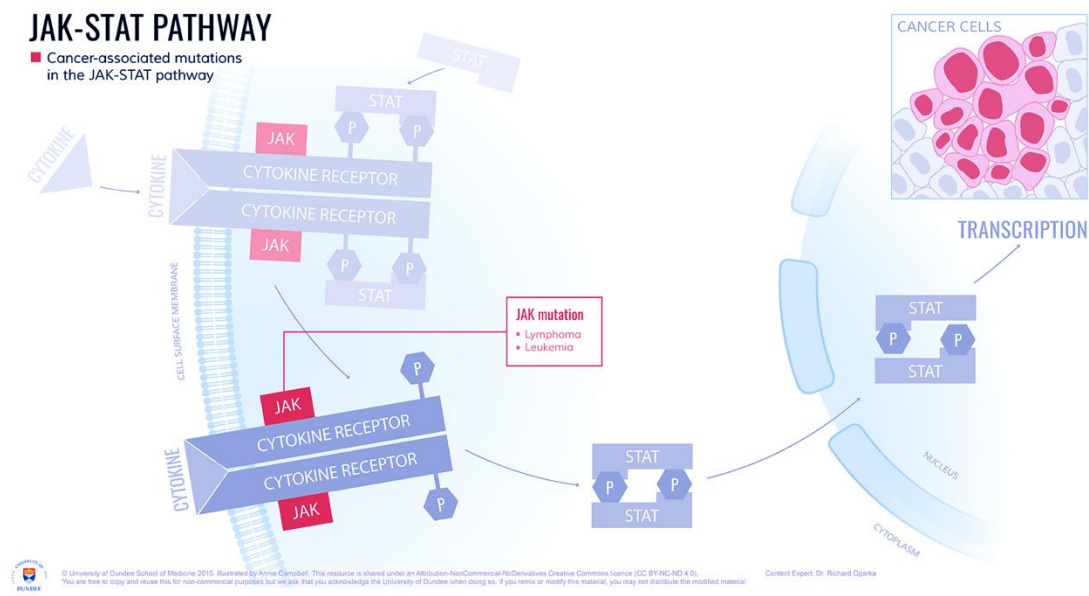


Fonte: Adaptado de MAPK-ERK Pathway - Cancer Targets Highlighted | © University of Dundee School of Medicine 2015. (<https://www.flickr.com/photos/dundeetilt/23520396132>).

### 2.8.3 Inibidores de JAK/STAT

As moléculas de Janus quinase (JAK) estão envolvidas na transdução intracelular de sinais de múltiplos receptores, ligando-se à cauda citoplasmática dos receptores de citocinas transmembrana, e ativando os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) que estimulam a expressão de vários reguladores do ciclo celular, incluindo ciclinas D1, D2 e E (QUINTÁS-CARDAMA; VERSTOVSEK, 2013) (figura 10). A ativação de JAK2/STAT5 foi implicada na resistência à inibição de PI3K/mTOR em linhagens celulares do TNBC (BRITSCHGI et al., 2012) enquanto a via IL6/JAK2/STAT3 desempenha um papel importante na proliferação e disseminação metastática de células de câncer de mama tipo CD44+/CD24+, uma população celular predominante no câncer de mama inflamatório (MAROTTA et al., 2011). Além disso, a ativação da via JAK/STAT foi correlacionada com a resistência à quimioterapia (JHAVERI et al., 2016).

**Figura 10.** A via de sinalização JAK/STAT.



Fonte: Adaptado de MAPK-ERK Pathway - Cancer Targets Highlighted | © University of Dundee School of Medicine 2015. (<https://www.flickr.com/photos/dundeetilt/23520396132>).

Ruxolitinibe é um inibidor de JAK1 e JAK2 que demonstrou atividade antitumoral promissora no câncer de mama metastático HER2-negativo quando combinado a capecitabina (O'SHAUGHNESSY et al., 2018). O ruxolitinibe está atualmente sendo avaliado em outros subtipos, como TNBC (STOVER et al., 2018) e tumores HER2-positivo, associado a outros agentes, como paclitaxel. Ruxolitinibe é aprovado nos Estados Unidos, Europa e em outros países para o tratamento de adultos com mielofibrose e para pacientes com policitemia vera (QUINTÁS-CARDAMA et al., 2010; VERSTOVSEK et al., 2012). As toxicidades mais comumente observadas são anemia, leucopenia, trombocitopenia, hematomas, tonturas e cefaleia (MESA; CORTES, 2013).

#### 2.8.4 Inibidores de Receptores Tirosina-quinases

Os receptores tirosina-quinases é um grande e heterogêneo grupo de receptores de membrana que apresentam um domínio extracelular de ligação ao ligante conectado a um domínio intracelular por uma hélice única transmembrana. O domínio intracelular é de natureza enzimática, e o contato entre o ligante (FC) e seu receptor resulta num processo de dimerização, com fosforilação do domínio intracelular, através da reação entre ATP e resíduos de tirosina. A fosforilação intracelular dá início a uma cascata de reações citoplasmáticas que culmina em diversas respostas celulares (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010). São descritos cerca de 58 receptores tirosina-quinase (RTK) humanos, divididos em 20 subfamílias. A mais conhecida é a família HER, uma classe ErbB de RTKs consistindo de quatro proteínas homólogas: HER1 (EGFR/ErbB1), HER2 (ErbB2/Neu), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4). O símbolo do gene, ErbB, deriva do nome de um oncogene viral ao qual estes receptores são homólogos: oncogene viral da leucemia eritroblástica (do inglês *erythroblastic leukemia viral oncogene*) (MONTOR; SALAS; MELO, 2018).

Embora muitas drogas em uso clínico tenham como alvo proteínas da família HER, ênfase tem sido direcionada a inibidores de tirosina quinase (TKI) de amplo espectro direcionados a várias famílias de receptores de fatores de crescimento, incluindo o receptor de VEGF (VEGFR) e o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). Cabozantinibe, um TKI oral com atividade contra o VEGFR2, MET e AXL, produziu uma taxa de resposta objetiva de 13,6% e taxa de benefício clínico de 46,7%, em pacientes ER-positivo (TOLANEY et al., 2016). Lucitanibe (E3810), um multi-TKI dirigido para FGFR1, VEGFR1-3 e o receptor de fator-1 estimulador de colônias de macrófagos (CSF1R), alcançou uma PFS superior a 9 meses e 6 de 12 pacientes com amplificação do fator de crescimento de fibroblastos

(FGF) tiveram respostas parciais em estudo de fase I/II (SORIA et al., 2014). Outros inibidores de VEGFR, PDGFR e c-Kit, como sunitinibe, sorafenibe e axitinibe, não conseguiram melhorar a sobrevida nos estudos clínicos quando associados a taxanos em pacientes com câncer de mama metastático HER2-negativo (BERGH et al., 2012; GRADISHAR et al., 2013; RUGO et al., 2011). Parece claro que alguns pacientes, mas não todos, podem se beneficiar de terapias antiangiogênicas, destacando a necessidade de identificar biomarcadores que possam guiar a seleção do paciente (AALDERS et al., 2017).

A família do FGFR compreende quatro TKIs (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4). A sinalização do FGFR está envolvida na proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, migração e apoptose durante o desenvolvimento embrionário e na homeostase do tecido adulto (HAUGSTEN et al., 2010). A amplificação dos genes FGFR, presente em aproximadamente 10% dos cânceres de mama, está associada a um mau prognóstico, e promove resistência à terapia endócrina através da ativação persistente da via MAPK (ELBAUOMY ELSHEIKH et al., 2007; TURNER et al., 2010). Além disso, o ligante FGF2 media o crescimento de câncer de mama basal-*like*, e as linhagens de células TNBC demonstraram sensibilidade aos inibidores de FGFR na presença de FGF2 (SHARPE et al., 2011). Os inibidores de FGFR não-seletivos erdafitinibe (JNJ-42756493) e AZD4547 estão sendo avaliados em estudos clínicos de fase Ib/II mais direcionados ao subgrupo de pacientes metastáticas ER-positivo e seus resultados são aguardados (JOHNSTON, 2015).

Outro potencial alvo molecular é o receptor do fator de crescimento de hepatócito (MET). Em todos os subtipos de câncer de mama, o MET é hiperexpresso em pelo menos 20 a 30% dos casos (principalmente em TNBC), e associado a pior sobrevida. A desregulação do receptor MET também desempenha um papel crítico no desenvolvimento de resistência adquirida a terapias alvo, principalmente aos anti-HER2, sugerindo que HER2 e MET podem ter um efeito sinérgico na promoção do crescimento e agressividade tumoral (MINUTI; LANDI, 2015). Infelizmente, inibidores seletivos do MET como o tivantinibe (ARQ197) e o crizotinibe, avaliados em estudos clínicos de fase I/II (NCT01575522; NCT02074878), não têm demonstrado atividade clínica neste cenário (figuras 11 e 14).

### **2.8.5 Antagonistas do Receptor de Andrógeno**

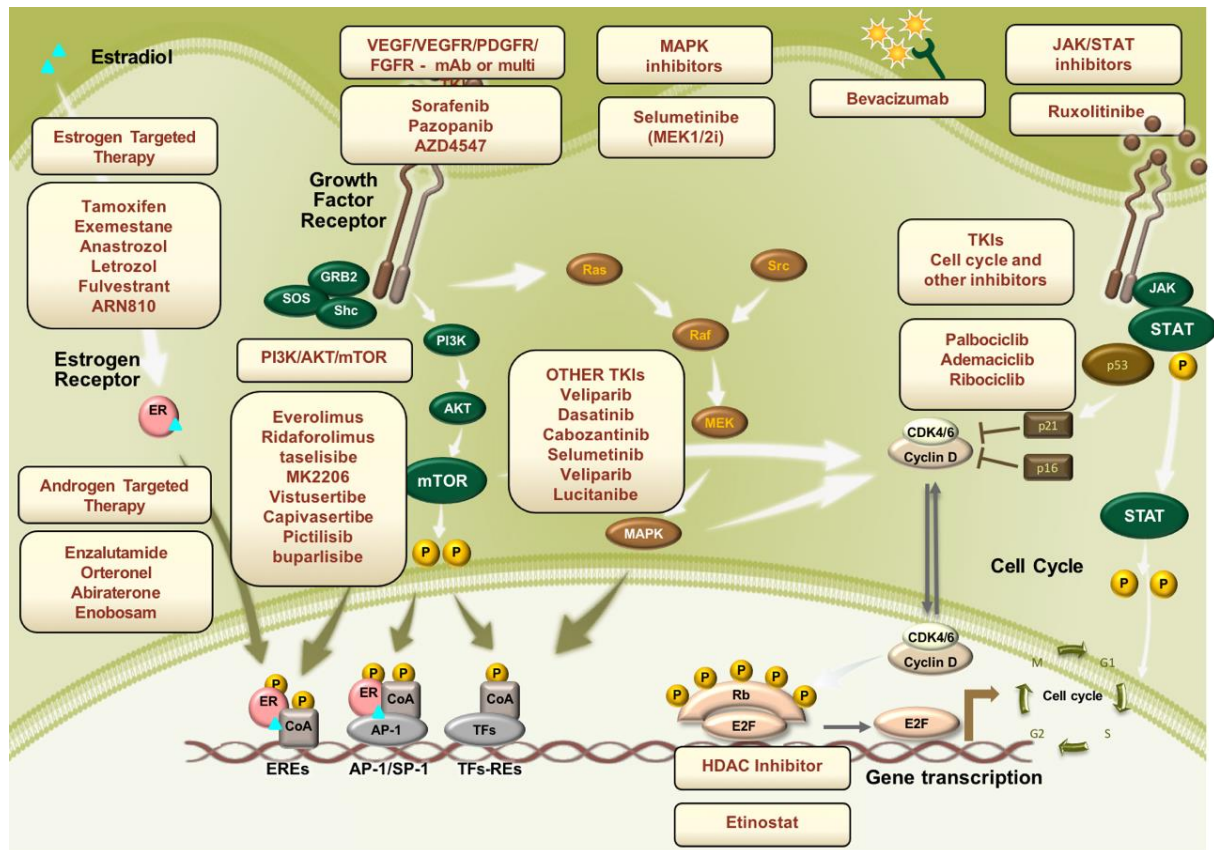
O receptor de andrógeno é um fator de transcrição ativado por hormônio esteroide pertencente à superfamília de receptores nucleares, grupo que também inclui o receptor de estrógeno (ER) ou o receptor progesterona (PR). Após sua ligação com andrógeno, é

translocado para o núcleo e estimula a transcrição de genes responsivos a andrógenos. Em câncer de mama, o receptor de andrógeno (AR) é mais amplamente expresso do que o receptor de estrógeno (ER) ou o receptor progesterona (PR), e têm emergido nos últimos anos como um marcador útil no refinamento da classificação dos subtipos de câncer de mama. Dos 2.171 tumores de mama invasivos das mulheres inscritas no *Nurses' Health Study*, 77% foram positivos para AR por IHQ. Entre os subtipos biológico classificados por IHQ, 88% dos casos foram ER-positivo, 59% com HER2-positivo e ainda, 32% dos TNBC foram positivos para expressão de AR (COLLINS et al., 2011). Semelhante aos tumores ER-positivo/PR-positivo, a expressão de AR está associada a um grau histológico bem diferenciado e com apresenta característica clínica indolente (LEHMANN et al., 2011). A hiperexpressão de AR aumenta a resistência ao tamoxifeno em modelos de câncer de mama in vitro e in vivo. Assim, a resistência às terapias endócrinas atuais pode resultar da adaptação das células tumorais da dependência de estrogénios à dependência de andrógenos (DE AMICIS et al., 2010). Estudos também têm mostrado que o complexo AR/FOXA1/ $\beta$ -catenina se liga a regiões reguladoras do gene ERBB3 e induz crescimento em células de câncer de mama ER-positivo/HER2-positivo. A via AR também se comunica com as vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR e MAPK (COCHRANE et al., 2014). No entanto, em câncer de mama HER2-positivo, os estudos não mostram nenhum efeito ou associação com pior sobrevida. No TNBC, todavia, o subgrupo luminal-AR apresentou a maior taxa de sobrevida global, além de apresentar uma menor taxa de resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante (KONO et al., 2017; RAHIM; O'REGAN, 2017).

Um estudo clínico multicêntrico de fase II que incluiu 424 pacientes com TNBC metastático e AR-positivo (IHQ>10%) avaliou o uso da bicalutamida, um antagonista de AR administrado por via oral, e demonstrou uma taxa de benefício clínico (definida como o número total de pacientes que apresentam uma resposta completa, resposta parcial ou doença estável maior que 6 meses) de 19% [intervalo de confiança de 95% (IC), 7% a 39%] para a bicalutamida. A PFS mediana foi de 12 semanas (IC 95%, 11-22 semanas) (GUCALP et al., 2013).

A enzalutamida é outro antagonista do AR aprovado pelo FDA para tratamento de pacientes com câncer de próstata (assim como a bicalutamida), e também tem sido avaliado em estudos clínicos. Em um estudo clínico de fase II recentemente reportado, 118 pacientes com TNBC metastático e AR-positivo (IHQ>0%), a enzalutamida demonstrou atividade clínica com taxa de benefício clínico em 16 semanas de 25% (TRAINA et al., 2018). Outros subgrupos de pacientes com câncer de mama metastático, especialmente ER-positivo, estão sendo alvo de estudos clínicos.

**Figura 11.** Terapia alvo em câncer de mama: vias e novas drogas.



Fonte: Adaptado de (YAMNIK; HOLZ, 2010; ZARDAVAS; PUGLIANO; PICCART, 2013)

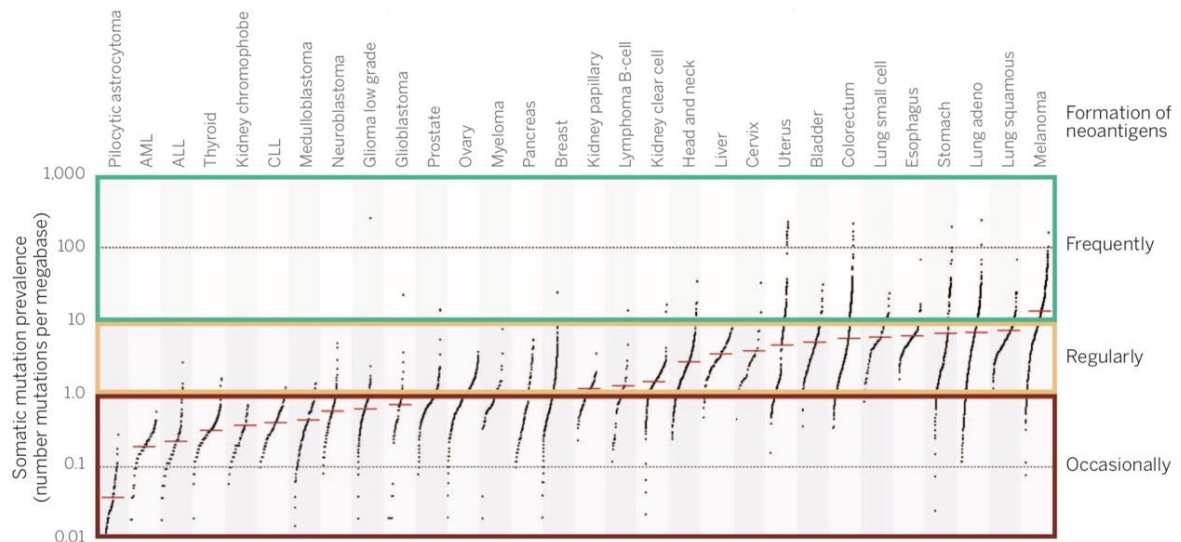
## 2.8.6 Imunoterapia no câncer de mama: inibidores do ponto de verificação imunológico PD-1 e PD-L1 e vacinas

A interação entre imunidade e câncer tem sido assunto de grande interesse nas últimas décadas. O microambiente tumoral inclui muitas células imunes diferentes, cada uma desempenhando seu próprio papel na interação entre a ativação imune/morte por tumor e anergia imune/sobrevivência tumoral. O desafio de aproveitar o sistema imunológico para atingir o câncer e, em particular, o câncer de mama, tem sido reconhecer quais características celulares estimulam uma resposta imune. Grande parte da imunogenicidade dos tumores é atribuída à carga mutacional presente (CHEN; MELLMAN, 2013). Tradicionalmente, o câncer de mama não tem sido considerado um tumor imunogênico típico, diferentemente de outros tumores como o melanoma, o câncer de células renais e o câncer de pulmão (figura 12). Os neoantígenos são peptídeos que surgem de mutações específicas dos tumores, são processados por células dendríticas e são apresentados (células apresentadoras de antígenos) através de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) às células T. Tumores com mais mutações expressam mais neo-antígenos e aparecem “quentes” para o sistema

imunológico, enquanto tumores com menos mutações são ditos “frios” (SCHUMACHER; SCHREIBER, 2015).

**Figura 12.** Estimativa do repertório de neoantígenos em câncer humano.

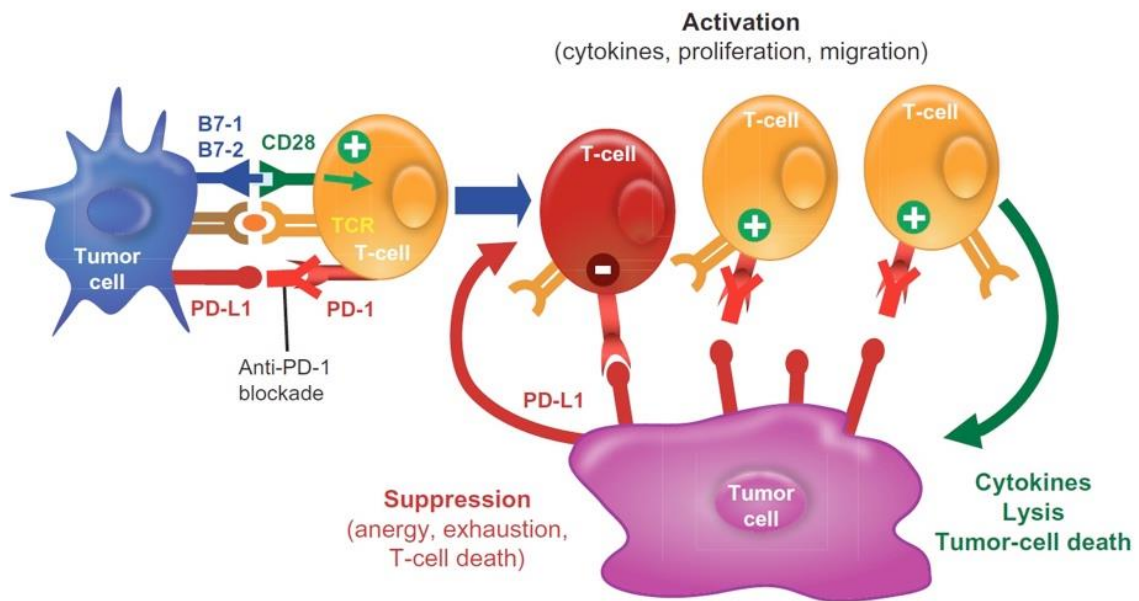
Os dados mostram o número de mutações somáticas em tumores individuais. As categorias à direita indicam estimativas atuais da probabilidade de formação de neoantígenos em diferentes tipos de tumores. Um valor de 10 mutações somáticas por Mb de DNA codificador corresponde a cerca de 150 mutações não sinônimas dentro dos genes expressos.



Fonte: Adaptado de (ALEXANDROV et al., 2013).

A ativação de respostas efectoras de célula T contra neoantígenos requer o estabelecimento de uma sinapse imunológica na qual dois sinais devem estar presentes: (1) a interação entre o complexo antígeno-MHC e o receptor de célula T (TCR) e (2) a presença da molécula co-estimuladora, CD28, que se liga aos ligantes B7-1 (também conhecido como CD80) e B7-2 (CD86) que são expressos por células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas ou macrófagos. Ambas as interações irão estimular a sinalização de TCR através das vias PI3K-AKT, Ras-Raf-MAPK e NF- $\kappa$ B, causando a liberação de citocinas e promovendo a proliferação de células T ativadas que se infiltram nos leitos tumorais, reconhecem e destroem as células cancerígenas. No entanto, a ligação de moléculas inibidoras do ponto de verificação (do inglês, *checkpoint inhibitors*) de células T, PD-1 e CTLA-4, aos seus respectivos ligantes, PD-L1/PD-L2 e CD80/CD86, induz o recrutamento de fosfatases que bloqueiam a sinalização de TCR e interrompem a propagação da reação imune efectora (figura 13). Além disso, a presença de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) é um fator prognóstico em câncer de mama inicial, nos subgrupos HER2-positivo e TNBC (SAVAS et al., 2016).

**Figura 13.** Via do ponto de verificação imunológico PD-1/PD-L1. A PD-L1 é expressa em células apresentadoras de antígeno, enquanto a PD-1 é expressa em linfócitos-T. As células tumorais expressam a PD-L1 e ligam-se a PD-1 nos linfócitos T, suprimindo assim a capacidade dos linfócitos T para reconhecer e destruir as células tumorais. Este mecanismo de evasão do sistema imune inato é explorado por vários tipos de células tumorais. Abreviação: APC, células apresentadoras de antígenos.



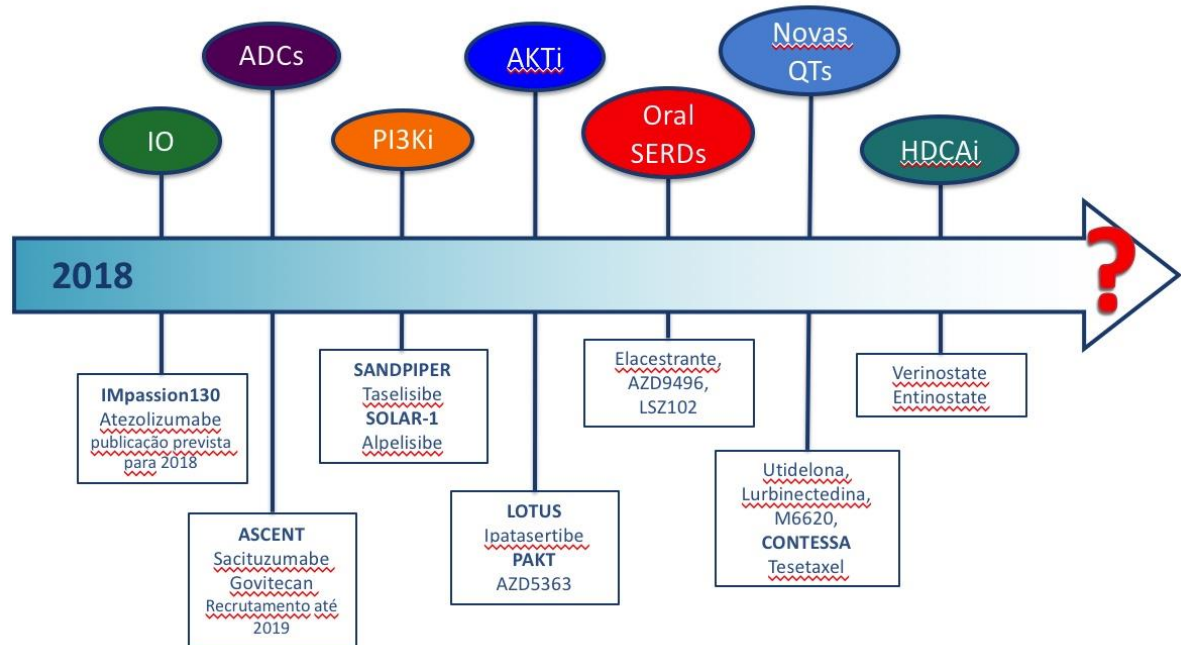
Fonte: Adaptado de (MCDERMOTT; SRIVASTAVA, 2014).

Estudos clínicos com drogas alvo contra PD-1 e PD-L1 resultaram na aprovação por agências reguladoras de 5 agentes para tratamento de vários tipos de câncer (por exemplo, câncer de pulmão, câncer de bexiga, melanoma, dentre outros). Alguns destes anticorpos monoclonais antagonistas de PD-1 e PD-L1 foram também avaliados em câncer de mama, como o pembrolizumabe (NANDA et al., 2016; RUGO et al., 2018), atezolizumabe (BASILE et al., 2018), durvalumabe (SANTA-MARIA et al., 2018) e avelumabe (DIRIX et al., 2018). A eficácia clínica observada até o momento a partir desses agentes varia consideravelmente, dependendo do subtipo biológico do câncer de mama estudado, todavia o TNBC metastático têm demonstrado as melhores respostas frente a essa classe de inibidores do ponto de verificação (KATZ; ALSHAREDI, 2017).

**Figura 14.** Potenciais novos agentes para o tratamento do câncer de mama.

IO: immuno-oncology; ADCs: Antibody-drug conjugates; PI3Ki: Phosphoinositide 3-kinase inhibitors; SERDs: Oral Selective Estrogen Receptor Downregulators; QTs: Chemotherapies; HDCAi: histone deacetylase inhibitors; Fonte: Adaptado de Virginia Kaklamani (ASCO Annual Meeting, 2018).

## O FUTURO DOS AGENTES PARA CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO



Dentro das estratégias da imunoterapia no câncer de mama, resultados promissores têm sido obtidos pela vacinologia. Essa abordagem imunoterapêutica explora a alta especificidade da resposta imune adaptativa, bem como, a memória imunológica. Muitos tipos diferentes de vacinas contra o câncer foram construídas a partir de fontes imunogênicas distintas, representadas por lisados tumorais, peptídeos antigênicos tumorais, DNA, RNA e vírus (JOCHEMS; SCHLOM, 2011). Além disso, elas podem ser combinadas com imunoadjuvantes, que contribuem para aumentar a estimulação imunológica. *NeuVax* é uma vacina amplamente estudada contra a proteína HER2. Sua composição compreende o peptídeo E75 derivado do HER2 (nelipepimut-S) combinado com o fator estimulante de colônia de macrófagos granulócitos como imunoadjuvante (GM-CSF). Os estudos clínicos de fase I envolveram pacientes com câncer de mama metastáticos com diferentes graus de expressão do HER2 por IHQ. Resultados promissores em estudos clínicos de fase II, fazem com que *NeuVax* seja atualmente a única vacina em câncer de mama inicial avaliada em estudo clínico de fase III (BENEDETTI et al., 2017). Nos estudos reportados, a *NeuVax* foi bem tolerada, com toxicidades geralmente limitadas, que incluiu eritema e prurido no local da injeção, sintomas

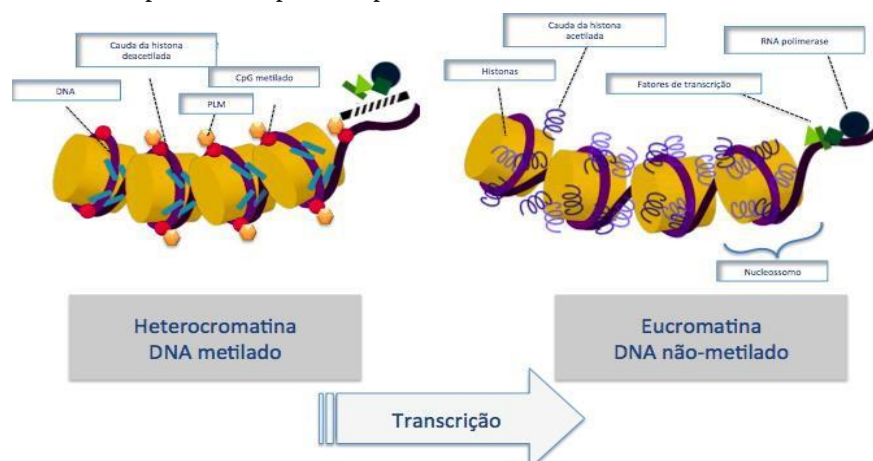
leves de influenza, fadiga e dores ósseas. Outras vacinas antígeno-específicas contra o câncer de mama HER2-positivo estão em investigação, como exemplo, a vacina AVX901 (CLIFTON; MITTENDORF; PEOPLES, 2015). No subgrupo com TNBC, apesar do maior potencial imunogênico, vacinas contra peptídeos específicos do câncer encontram-se principalmente em fases pré-clínicas e estudos clínicos de fase I/II e resultados são aguardados (HUTCHINS et al., 2017; LIU et al., 2018; OVERHOLSER et al., 2015).

## 2.9 MODULAÇÃO EPIGENÉTICA

Alterações epigenéticas são alterações hereditárias na expressão gênica, transitórias ou reversíveis, que ocorrem sem causar qualquer alteração na sequência do DNA. Eles são importantes fatores-chave para o desenvolvimento e prognóstico do câncer. O câncer de mama é induzido pelo acúmulo de regulação gênica alterada. Além de mutações gênicas, os mecanismos epigenéticos têm um papel importante na tumorigênese do câncer de mama. Investigações relacionadas a regulações epigenéticas aberrantes no câncer de mama enfocam o início de mecanismos moleculares no desenvolvimento do câncer, a identificação de novos biomarcadores para prever a agressividade do câncer de mama e o potencial da terapia epigenética (KARSLI-CEPPIOGLU et al., 2014). As duas principais e mais conhecidas modificações epigenéticas são a acetilação de histonas e a metilação do DNA (figura 15).

**Figura 15.** Estrutura da cromatina e controle epigenético.

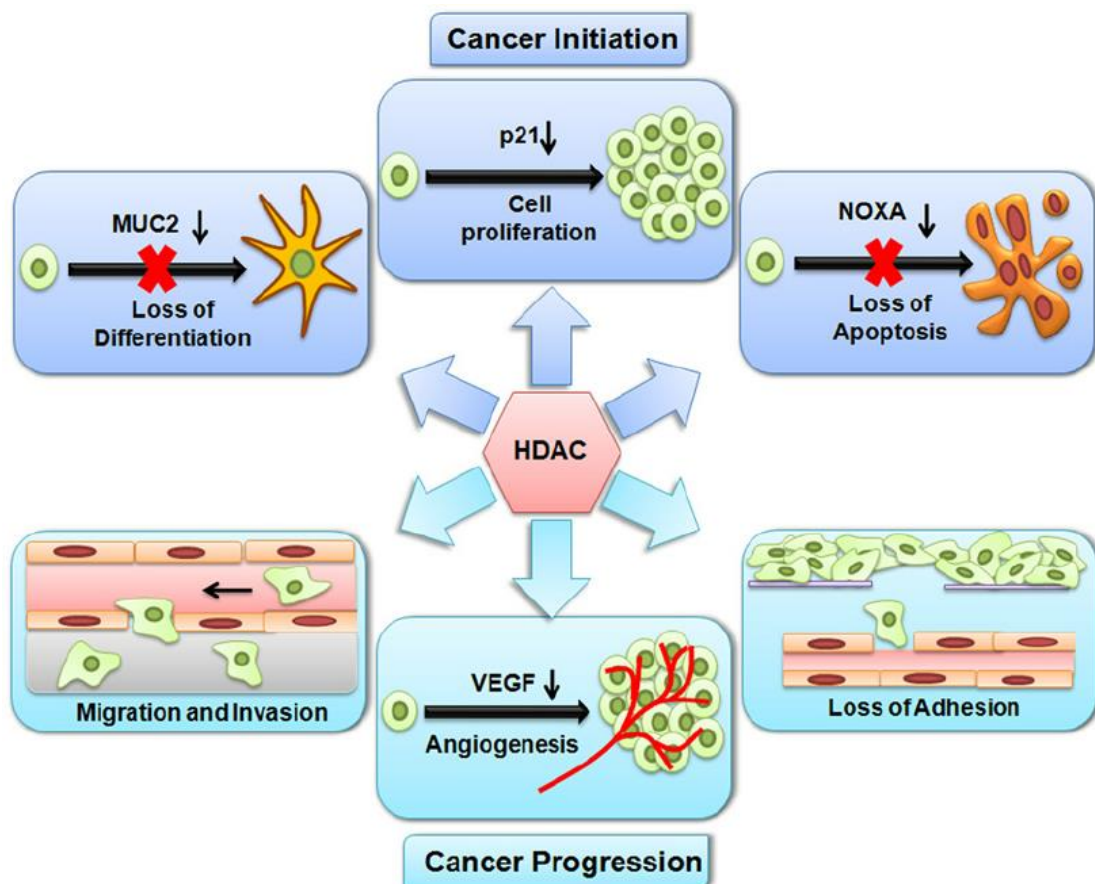
A heterocromatina, forma mais presente da cromatina, encontra-se mais condensada, dificultando acesso de fatores de transcrição e consequentemente expressão gênica. Com o DNA, envolto às estruturas das histonas, e metilado na região CpG através de proteínas ligantes do grupo metil (PLM), a heterocromatina mantém o estado de silenciamento gênico. Com a acetilação da cromatina, na topografia da cauda da histona, e o DNA não metilado, a cromatina, agora chamada eucromatina, encontra-se mais “frouxa” permitindo o acesso de fatores de transcrição e da RNA polimerase, por exemplo.



FONTE: Sítio <http://www.bioindians.org/tutorials/biology/genegenome.html>, box structure of DNA. Acesso em 03/06/2017.

Esses dois fatores têm grande impacto na estrutura da cromatina; portanto, influenciam a transcrição gênica e a constituição genética de um organismo. A acetilação de histona é um método usado para transcrição em eucariontes. As histonas acetiltransferase (HATs) produzem um esqueleto de cromatina que pode ditar o processo de transcrição por acetilação das histonas H3 e H4. Quando as histonas desacetilase (HDACs) terminam os grupos acetila, a repercussão tem impacto nocivo à transcrição (figura 16). Estudos têm demonstrado amplamente que altos graus de acetilação de histonas promovem atividade transcricional, e baixos graus favorecem a repressão. Outras formas de remodelação das histonas são a fosforilação, a ribosilação de ADP e a ubiquitinação (YANG et al., 2013).

**Figura 16.** Histonas deacetilase e possíveis papéis no câncer.



Fonte: Adaptado de (PARBIN et al., 2014).

Um terceiro mecanismo epigenético se relaciona a regulação através de microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes, cuja principal função é estabelecer e manter o estado diferenciado dos diversos tipos celulares. Estão ainda envolvidos na regulação de genes relacionados à proliferação celular e apoptose. Sua localização no

genoma é variada, podendo estar em regiões intergênicas ou ainda em regiões intrônicas (BYLER et al., 2014). A regulação positiva das histonas desacetilase (HDAC) altera o equilíbrio entre a acetilação e a desacetilação das histonas, levando à repressão epigenética dos genes supressores de tumor e, em última instância, à oncogênese (SURAWEERA; O'BYRNE; RICHARD, 2018). Estudos pré-clínicos demonstram que a adição de inibidores de HDAC a antiestrogênicos podem aumentar o efeito antiproliferativo do agente anti-hormonal isolado e reverte a resistência induzida por tamoxifeno e IAs (HODGES-GALLAGHER et al., 2007; SABNIS et al., 2013).

Um inibidor de HDAC de classe I específico denominado *Entinostat* (MS-275), foi avaliado em um estudo clínico de fase 2 (ENCORE 301) combinado ao exemestano no tratamento de câncer de mama metastático ER-positivo na pós-menopausa em pacientes que haviam progredido ao tratamento com um inibidor de aromatase (IA) não-esteroidal. Os resultados evidenciaram a atividade da combinação, com ganho de PFS (HR = 0,73,  $p = 0,055$ ) e OS (aumento mediano de 8,29 meses) (YARDLEY et al., 2013). Dessa forma, recebeu em 2013 a designação de terapia inovadora pelo FDA, com base nestes resultados. Além disso, uma análise farmacodinâmica do estudo ENCORE 301 mostrou um papel preditivo para o perfil de hiperacetilação do DNA em linfócitos circulantes de amostras das biópsias líquidas: pacientes “alto-acetiladores” tiveram uma PFS melhor (HR = 0,32-0,50) (TRAPANI et al., 2017). Os eventos adversos graves mais frequentes com essa droga são hematológicos, como trombocitopenia (63%), anemia (47%), neutropenia (41%), leucopenia (10%), e, não-hematológicos, como hipocalemia (8%) e hipofosfatemia (6%) não relacionada à nefrotoxicidade. E2112 é um estudo clínico aleatorizado de fase III em andamento que busca confirmar esses resultados em uma população maior (NCT02115282). Os inibidores de HDAC regulam positivamente a expressão de PD-L1 agindo em sinergia com o bloqueio de PD-1 em modelos de melanoma murino (WOODS et al., 2015) e induz apoptose em células de câncer de mama que hiperexpressam HER2 (HUANG et al., 2009). Por esses motivos, também tem sido estudado combinações do *entinostat* com imunoterapias em todos os subtipos do câncer de mama, incluindo TNBC e doença HER2-positivo (NCT02708680, NCT02453620).

### 2.9.1 Sirtuínas como um tipo de histona deacetilase (HDAC)

Nas últimas décadas, classes de proteínas com atividade enzimática têm sido estudada na oncogênese de algumas neoplasias. A família das sirtuínas é uma delas. O primeiro membro dessa família, o Sir2p de leveduras, foi originalmente identificado em *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, estão presentes desde bactérias até em humanos. Compreendem sete isoformas com localização, atividade e funções distintas (BOSCH-PRESEGUÉ; VAQUERO, 2011) (quadro 6).

**Quadro 6.** Sirtuínas: Atividade, localização, função e proteínas-alvo.

ACECS, acetyl-CoA synthetase, cytoplasmic; ACLY, ATP citrate lyase; APC/C, anaphase-promoting complex/cyclosome; ATG, autophagy protein; BUBR1, BUB1-related kinase; CDC20, cell division cycle 20; CDK9, cyclin-dependent kinase 9; CPS1, carbamoyl-phosphate synthase 1; CRCT, cysteine-rich carboxy-terminal; CREB, cyclic AMP-responsive element-binding; CtIP, carboxy-terminal-binding protein (CtBP)-interacting protein; CUL4B, cullin 4B; CYPD, cyclophilin D; DCAF1, DDB1- and CUL4-associated factor 1; DDB1, DNA damage-binding protein 1; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; FOX, forkhead box; FXR, farnesoid X receptor; G3BP, RasGAP SH3 domain-binding protein; G6PD, glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase; GABPβ1, GA-binding protein subunit β1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GDH, glutamate dehydrogenase; GOT2, glutamate oxaloacetate transaminase 2; H1K26, histone H1 Lys26; H3K, histone H3 Lys; H4K16, histone H4 Lys16; HDAC1, histone deacetylase 1; HIF, hypoxia-inducible factor; \_HMGCS2, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2; HNF4α, hepatocyte nuclear factor 4α; IDE, insulin-degrading enzyme; IDH2, isocitrate dehydrogenase 2; ITPK1, inositol-tetrakisphosphate 1-kinase; LCAD, long-chain-specific acyl-CoA dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; LKB1, liver kinase B1; LXR, liver X receptor; MCD, malonyl-CoA decarboxylase; MRPL10, mitochondrial ribosomal protein L10; MYBBP1A, MYB-binding protein 1a; MYOD, myoblast determination protein; NBS1, Nijmegen breakage syndrome 1; NDUFA9, NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1α \_subcomplex subunit 9; NF-κB, nuclear factor-κB; NHLH2, nescient helix-loop-helix 2; NKX2-1, NK2 homeobox 1; OPA1, optic atrophy 1; OTC, ornithine carbamoyltransferase; PAF53, RNA Pol I-associated factor 53; PAR3, partitioning defective 3 homologue; PARP1, poly-ADP-ribose polymerase 1; PCAF, P300/CBP-associated factor; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDP1, PDH phosphatase 1; PEPCK1, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGC1α, PPARγ \_co-activator 1α; \_POL I, polymerase I; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; \_PRLR, prolactin receptor; PTP1B, protein-tyrosine phosphatase 1B; RARβ, retinoic acid receptor-β; RB, retinoblastoma; S6K1, S6 kinase 1; SDH, succinate dehydrogenase; SIRT, sirtuin; SKP2, S-phase kinase-associated protein 2; SLC25A5, solute carrier family 25 member 5; SNF2H, SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5; SOD, superoxide dismutase; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; SUV39H1, suppressor of variegation 3-9 homologue 1; TFAM, transcription factor A, mitochondrial; TFIIC2, general transcription factor IIIC polypeptide 2; TNF, tumour necrosis factor; TOPBP1, DNA topoisomerase 2-binding protein 1; TSC2, tuberous sclerosis 2; UCP2, mitochondrial uncoupling protein 2; USP10, ubiquitin-specific processing protease 10; VLCAD, very long-chain-specific acyl-CoA dehydrogenase; WRN, Werner syndrome ATP-dependent helicase; XPA, xeroderma pigmentosum complementation group A.

| Sirtuin | Activity                                                                                                         | Localization | Substrates and/or targets                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Function                               |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| SIRT1   | Deacetylase                                                                                                      | Nucleus      | H3K9, H3K56, H4K16, H1K26, SUV39H1, p300 and PCAF                                                                                                                                                                                                                                                                         | Chromatin regulation and transcription |
|         |                                                                                                                  |              | HDAC1, PARP1, p53, KU70, NBS1, E2F1, RB, XPA, WRN, survivin, $\beta$ -catenin, MYC, NF- $\kappa$ B and TOPBP1                                                                                                                                                                                                             | DNA repair and cell survival           |
|         |                                                                                                                  |              | PGC1 $\alpha$ , FOXO1, FOXO3A, FOXA2, CRCT1, CRCT2, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXR, FXR, RAR $\beta$ , SREBP1C, SREBP2, HNF4 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , CREB, NKX2-1, STAT3, TFAM, MYOD, NHLH2, UCP2, TSC2, eNOS, LKB1, SMAD7, AKT, ATG5, ATG7, ATG8, 14-3-3 $\zeta$ , PGAM1, ACECS1, PTP1B and S6K1 | Metabolism                             |
| SIRT2   | Deacetylase                                                                                                      | Cytoplasm    | Tubulin, keratin 8, PAR3 and PRLR                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Differentiation                        |
|         |                                                                                                                  |              | G6PD, LDH, PEPCK1, ACLY, MEK1, ITPK1, S6K1 and PGAM                                                                                                                                                                                                                                                                       | Metabolism                             |
|         |                                                                                                                  | Nucleus      | H4K16, H3K56, H3K18, CDC20, APC/C, CDK9 and BUBR1                                                                                                                                                                                                                                                                         | Cell cycle                             |
|         |                                                                                                                  |              | FOXO1, FOXO3A, p300, NF- $\kappa$ B and HIF1 $\alpha$                                                                                                                                                                                                                                                                     | Metabolism                             |
| SIRT3   | Deacetylase                                                                                                      | Mitochondria | LCAD, VLCAD, HMGCS2, NDUFA9, SKP2, SDHA, ACECS2, GDH, IDH2, MRPL10, PDP1, SOD2, OTC, CYPD, OPA1, PDH, FOXO3 and GOT2                                                                                                                                                                                                      | Metabolism                             |
| SIRT4   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ADP-ribosylase</li> <li>• Lipoamidase</li> <li>• Deacetylase</li> </ul> | Mitochondria | GDH, IDE, SLC25A5, PDH and MCD                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Metabolism                             |
| SIRT5   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Deacylase</li> <li>• Deacetylase</li> </ul>                             | Mitochondria | CPS1, HMGCS2, PDH, SDH, SOD1 and GAPDH                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Metabolism                             |
| SIRT6   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Deacylase</li> <li>• Deacetylase</li> <li>• ADP-ribosylase</li> </ul>   | Nucleus      | H3K9, H3K56, CtIP, GCN5, SNF2H, G3BP, FOXO3 and PARP1                                                                                                                                                                                                                                                                     | Chromatin and DNA repair               |
|         |                                                                                                                  |              | MYC, HIF1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, TNF, SREBP1, SREBP2 and USP10                                                                                                                                                                                                                                                        | Metabolism                             |
| SIRT7   | Deacetylase                                                                                                      | Nucleus      | MYC, H3K18, PAF53, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , ELK4, RNA Pol I, MYBBP1A, TFIIIC2 and p53                                                                                                                                                                                                                              | Transcription                          |
|         |                                                                                                                  |              | mTOR, DCAF1, DDB1, CUL4B and GABP $\beta$ 1                                                                                                                                                                                                                                                                               | Metabolism                             |

Fonte: Adaptado de (CHALKIADAKI; GUARENTE, 2015).

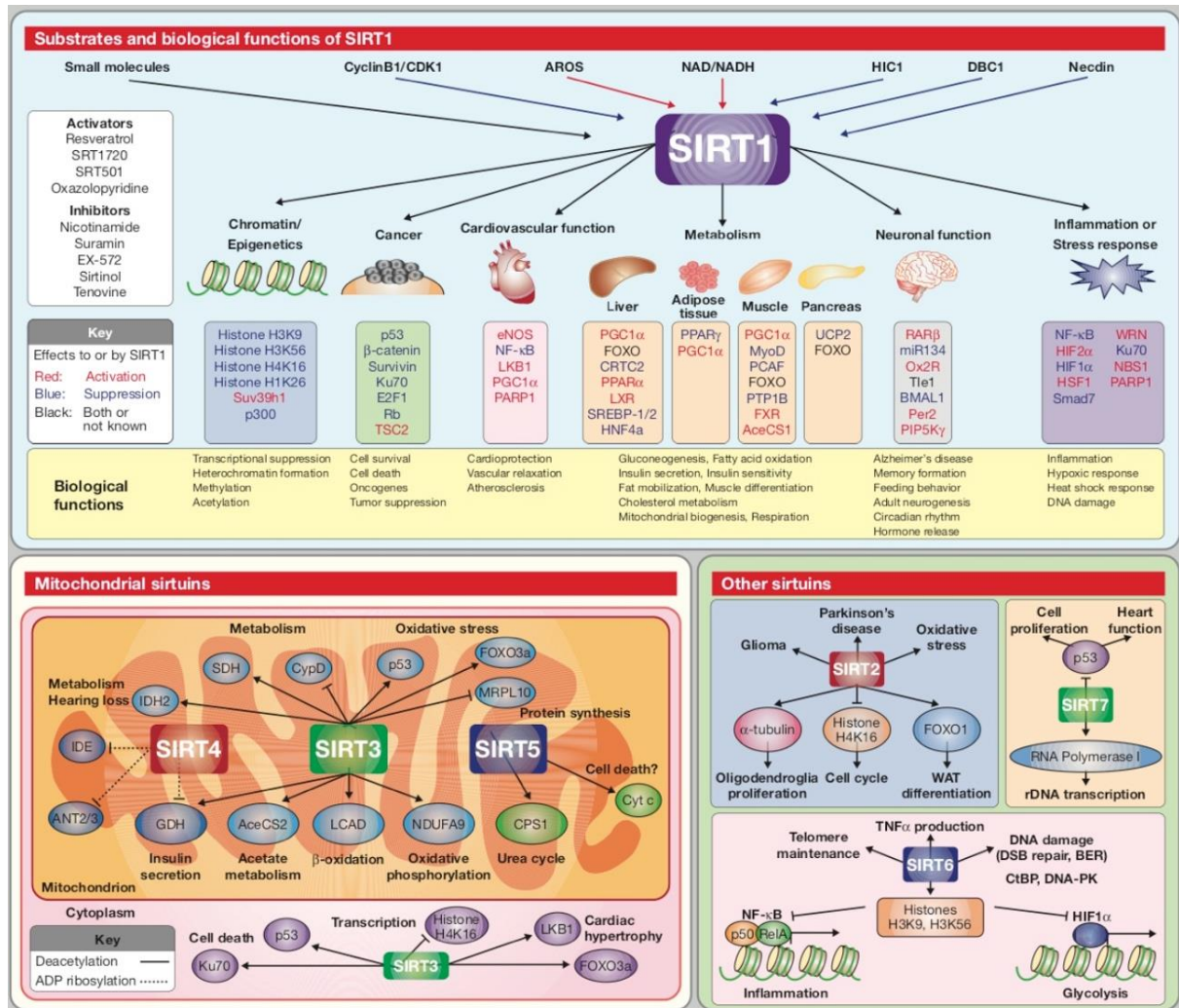
Sirtuínas diferem ainda em suas especificidade e atividade catalítica. Os sete membros das sirtuínas (SIRT1-7) compartilham um domínio do núcleo catalítico conservado. Apesar desta homologia, as sirtuínas têm atividades enzimáticas divergentes com SIRT1-3 e SIRT7 atuando principalmente como lisina deacetilases, SIRT4 como adeno-sinediphospho (ADP)-ribosiltransferase e deacetilase, SIRT5 como deacetilase e desacilase e SIRT6 como ADP-ribosiltransferase, deacetilase e desacilase. Além disso, a localização primária destas proteínas na célula varia significativamente, refletindo a distinção funcional dos membros das sirtuínas (GROTH et al., 2007).

Algumas sirtuínas, como SIRT2 e SIRT6, parecem funcionar como supressores de tumor, mas outros, como SIRT1, são aparentemente bifuncionais: operam ora como supressores

tumorais e ora oncogênicos, dependendo do contexto e das condições de estudo. Os mecanismos subjacentes a essas atividades, aparentemente contraditórios, não são bem compreendidos, mas descobertas recentes sugerem que eles podem realmente apresentar esse dualismo funcional. Embora algumas apresentem um amplo espectro de substratos proteicos sobre histonas e não histonas, algumas delas apresentam estritamente atividade de histona deacetilase, enquanto outras parecem ter como alvo proteínas não histonas (BOSCH-PRESEGUÉ; VAQUERO, 2011; YUAN; SU; CHEN, 2013; CHALKIADAKI; GUARENTE, 2015).

Ao longo da última década, as sirtuínas, têm sido descritas como um dos principais atores na resposta metabólica ao stress ao atuarem como verdadeiros sensores da percepção e coordenação de resposta ao estresse. Detectam alterações do metabolismo (restrição calórica, jejum), regulando-os. Estudos iniciais em leveduras descrevem a isoforma 1 da sirtuína (SIRT1) como um agente promotor da estabilidade genômica e do aumento da sobrevivência celular. Por outro lado, a SIRT1 tem sido associada ao processo de envelhecimento, à plasticidade neural, memória, assim como a síndromes metabólicas, a processos inflamatórios, neurodegenerativos e a câncer (figura 17).

**Figura 17.** Família das sirtuínas e funções. SIRT1 a SIRT 7, regulam a expressão de uma série de moléculas que participa de atividades em diversos órgãos, como coração, fígado, tecido adiposo, músculo, pâncreas e ainda resposta ao estresse, processos inflamatórios e câncer, como a SIRT 1. Além disso participa ativamente do processo de ativação ou desativação da cromatina atuando como uma histona deacetilase, permitindo assim a exposição do DNA a fatores de transcrição e consequentemente expressão ou silenciamento gênico. Nesse sentido, alguns ativadores ou inibidores das sirtuínas são descritos (parte superior da figura). Outras sirtuínas SIRT4, SIRT3 e SIRT5, de localização mitocondrial, da mesma forma da regulação de síntese de proteínas, estresse oxidativo, morte celular (parte inferior a esquerda). E, finalmente, as SIRT2, SIRT7 e SIRT6 têm implicações em processos inflamatórios, neurodegenerativos (doença de Parkinson), glicólise com a coparticipação do HIF1- alfa, e gênese tumoral como o dos gliomas (parte inferior a direita).



Fonte: Adaptado de (NAKAGAWA; GUARENTE, 2011).

Evidências da literatura têm imputado as sirtuínas dos mamíferos no processo de carcinogênese, embora os mecanismos envolvidos parecem ser mais diversificados e complexos do que anteriormente previsto (NOGUCHI et al., 2014).

A deflagração e progressão do câncer em sentido amplo é um processo resultante de um acúmulo de alterações moleculares no genoma de células somáticas. As células tumorais possuem algumas características peculiares que incluem autossuficiência para crescimento e insensibilidade à sinalização anticrescimento, evasão do mecanismo de apoptose, angiogênese sustentada, potencial de replicação ilimitado, invasão tecidual e metástases. Outras características relatadas incluem desregulação da energia celular, instabilidade genômica e inflamação (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Estudos têm revelado que as sirtuínas devem desempenhar um papel importante nesses processos. Porém, essas proteínas exibem uma dualidade de funções também na carcinogênese. O entendimento desses mecanismos é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de drogas antineoplásicas com alvo nas sirtuínas. No entanto, os estudos que avaliam a função da SIRT1 no câncer são escassos e contraditórios, alguns sugerindo um papel ora promotor ora de supressor tumoral (YUAN; SU; CHEN, 2013). A expressão de SIRT1 é variável e está elevada em certos tumores (próstata, carcinoma hepatocelular, mama, ovário, gástrico, colorretal e melanoma) e de diminuída em outros (bexiga, cólon, glioblastoma, ovário e próstata (HIRATSUKA et al., 2003). *In vivo*, a presença ou ausência de certas mutações no tecido tumoral pode participar da determinação da função da SIRT1. Além disso, a SIRT1 pode proteger a célula de uma transformação oncogênica ou, por outro lado, a via de sinalização da SIRT1 pode participar da promoção do crescimento tumoral. Dessa forma, infere-se que a função da SIRT1 é contexto dependente (NOGUCHI et al., 2014). Da mesma forma, evidências também sugerem que a SIRT2 tem funções supressoras e promotoras de tumor. Particularmente, a expressão de SIRT2 mostrou-se reduzida em gliomas, adenocarcinomas esofágicos, adenocarcinomas gástricos e em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (HIRATSUKA et al., 2003; PETERS et al., 2010). Em contraste, o silenciamento da SIRT2 mostrou desencadear a apoptose em células de glioma HeLa e C6 (LI et al., 2011; HE et al., 2012). SIRT3 é conhecida como supressora de tumor mitocondrial e sua expressão foi encontrada como diminuída em carcinoma de mama e cólon (FINLEY et al., 2011), carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (LAI et al., 2013), hepatocarcinoma e osteossarcoma (ZHANG et al., 2012; ZHANG; ZHOU, 2012). Além disso, o papel preciso da SIRT4 na formação do câncer ainda não está claro e permanece indefinido. Entretanto, há poucos relatos

que mostraram a SIRT4 como um possível supressor de tumor (CSIBI et al., 2013; JEONG et al., 2013). SIRT5 facilita o crescimento de células tumorais e está envolvida no processo de resistência a drogas em câncer de pulmão de não pequenas células (LU et al., 2014). Evidências crescentes indicam a SIRT6 como supressora de tumor e com expressão diminuída em vários tipos de neoplasias, incluindo câncer de pâncreas, câncer colorretal e carcinoma hepatocelular. Por outro lado, algumas evidências divergem, indicando que a SIRT6 poderia também ter funções promotoras de tumor (KHONGKOW et al., 2013a). A SIRT7 tem níveis de expressão elevados nos cânceres de mama e tireoide (DE NIGRIS et al., 2002) (quadro 7).

**Quadro 7.** Sirtuínas e Câncer em humanos. pc, adenomatous polyposis coli; CML, chronic myelogenous leukaemia; DEN, N,N-diethylnitrosamine; DMBA, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene; KD, knockdown; KO, knockout; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; OE, overexpression; SCID, severe combined immunodeficiency; sh, short hairpin RNA; SIRT, sirtuin; Tg, transgenic; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; WT, wild type.

| Sirtuin | Mouse model                                                                                                                 | Cancer-associated phenotypes                                            | Role of sirtuin   |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| SIRT1   | <i>Sirt1<sup>+/-</sup>Trp53<sup>+/-</sup></i>                                                                               | Sarcomas, lymphomas, ovarian and testicle teratomas, mammary carcinomas | Tumour suppressor |
|         | <i>Sirt1<sup>ASTOP</sup>;Villin-Cre;Apc<sup>min/+</sup></i> (conditional OE of SIRT1 in intestine)                          | Fewer intestinal and colon tumours than <i>Apc<sup>min/+</sup></i> mice | Tumour suppressor |
|         | <i>Sirt1<sup>ASTOP</sup>;Mx-Cre;Trp53<sup>+/-</sup></i> (conditional OE of SIRT1 in lymphocytes)                            | Fewer mice develop thymic lymphomas, leukaemia, sarcoma                 | Tumour suppressor |
|         | <i>Sirt1-Tg</i>                                                                                                             | Fewer mice develop sarcomas and carcinomas                              | Tumour suppressor |
|         | <i>Sirt1-Tg</i> mice treated with DEN (liver carcinogen) followed by high-fat diet                                          | Fewer liver carcinomas                                                  | Tumour suppressor |
|         | <i>Sirt1-Tg;Pten<sup>+/-</sup></i>                                                                                          | Prostate cancer, thyroid cancer with lung metastases                    | Oncogene          |
|         | <i>Sirt1<sup>lox/lox</sup>;Villin-Cre;Apc<sup>min/+</sup></i> (conditional KO of <i>Sirt1</i> in intestine)                 | Fewer intestinal tumours                                                | Oncogene          |
|         | Lethally irradiated mice transplanted with <i>Sirt1<sup>+/-</sup></i> bone marrow cells transduced with BCR-ABL (CML model) | Delayed development of CML-like phenotypes                              | Oncogene          |
|         | SCID mice implanted with SIRT1-KD human breast cancer cells (HMLER)                                                         | Liver, lung, spleen and bone metastases                                 | Tumour suppressor |
|         | Nude mice implanted with sh- <i>SIRT1</i> human colon cancer cells (SW620)                                                  | Smaller ectopic tumours than cells without sh- <i>SIRT1</i>             | Oncogene          |
|         | Endothelial <i>Sirt1-Tg</i> mice implanted with lung cancer cells                                                           | Larger and more vascularized ectopic tumours                            | Oncogene          |
|         | Nude mice implanted with SIRT1-KD prostate cancer cells (PC3)                                                               | Larger ectopic tumours                                                  | Oncogene          |
| SIRT2   | <i>Sirt2<sup>-/-</sup></i>                                                                                                  | Mammary tumours (females), hepatocellular carcinomas (males)            | Tumour suppressor |
|         | <i>Sirt2<sup>-/-</sup></i> mice treated with DMBA-TPA skin carcinogens                                                      | Larger and more aggressive skin tumours                                 | Tumour suppressor |
| SIRT3   | <i>Sirt3<sup>-/-</sup></i>                                                                                                  | Mammary tumours                                                         | Tumour suppressor |
|         | Nude mice implanted with <i>Sirt3<sup>-/-</sup>;Myc;Ras</i> MEFs                                                            | Ectopic tumours                                                         | Tumour suppressor |
|         | Nude mice implanted with <i>Sirt3<sup>-/-</sup>;E1a;Ras</i> MEFs                                                            | Larger ectopic tumours                                                  | Tumour suppressor |
|         | Nude mice implanted with SIRT3-KD human colon cancer cells (HCT116)                                                         | Larger ectopic tumours                                                  | Tumour suppressor |
|         | Nude mice implanted with SIRT3 OE human colon cancer cells (HCT116)                                                         | Smaller ectopic tumours                                                 | Tumour suppressor |
|         | Nude mice implanted with SIRT3-KD human oral squamous cell carcinoma cell line (UM-SCC-17B)                                 | Smaller ectopic tumours                                                 | Oncogene          |
| SIRT4   | <i>Sirt4<sup>-/-</sup></i>                                                                                                  | Lung tumours                                                            | Tumour suppressor |
|         | Nude mice implanted with <i>Sirt4<sup>-/-</sup></i> MEFs                                                                    | Larger ectopic tumours                                                  | Tumour suppressor |
|         | <i>Eμ-Myc;Sirt4<sup>-/-</sup></i>                                                                                           | Accelerated formation of B cell lymphomas                               | Tumour suppressor |
| SIRT5   | Nude mice implanted with SIRT5-KD human lung cancer cell line (A549)                                                        | Smaller ectopic tumours                                                 | Oncogene          |
| SIRT6   | SCID mice implanted with immortalized <i>Sirt6<sup>-/-</sup></i> MEFs                                                       | Larger ectopic tumours                                                  | Tumour suppressor |
|         | SCID mice implanted with <i>Sirt6<sup>-/-</sup>;sh-Trp53;Hras<sup>G12V</sup></i> MEFs                                       | Larger ectopic tumours                                                  | Tumour suppressor |
|         | <i>Sirt6<sup>lox/lox</sup>;Villin-Cre;Apc<sup>min/+</sup></i>                                                               | Larger intestinal tumours                                               | Tumour suppressor |
|         | WT mice injected with Adeno- <i>SIRT6</i> (OE) and followed by DEN treatment (liver carcinogen)                             | Fewer liver tumours                                                     | Tumour suppressor |
|         | Nude mice implanted with <i>TP53<sup>-/-</sup>;sh-SIRT6</i> human colon cancer cells (HCT116)                               | Larger ectopic tumours                                                  | Tumour suppressor |
| SIRT7   | <i>Rag-KO</i> mice implanted with SIRT7-KD human glioblastoma cells (U251)                                                  | Smaller ectopic tumours                                                 | Oncogene          |

Adaptado de (CHALKIADAKI; GUARENTE, 2015).

### 2.9.2 Sirtuínas no Câncer de Mama

Devido a possibilidade de sirtuínas funcionarem como supressoras de tumor, com particular regulação de processos associados ao estresse oxidativo celular ou ainda a depender de fatores pouco esclarecidos, participar da promoção do crescimento tumoral, é natural o interesse no potencial prognóstico e preditivo da expressão dessas proteínas na evolução do câncer de mama.

Evidências do papel prognóstico SIRT1 têm se acumulado com associação de alta expressão desta sirtuína ao pior desfecho, disseminação linfonodal e menor sobrevida livre de doença (CAO et al., 2014; KUO et al., 2013; WU et al., 2012). Especialmente, SIRT1 parece ser um potencial biomarcador em pacientes com TNBC (CHUNG et al., 2015; JIN et al., 2015). Outras sirtuínas tem seu papel prognóstico avaliado, como a SIRT2 (MCGLYNN et al., 2014), SIRT3 (DESOUKI et al., 2014; HE et al., 2014a; YU et al., 2016) e SIRT7 (GENG et al., 2015; TANG et al., 2017b).

Estudo de Igci et al. (2016) demonstrou que as sirtuínas são diferencialmente expressas em tecidos de câncer de mama e linhas celulares de câncer (IGCI et al., 2016). Particularmente, as expressões de SIRT1 e SIRT4 foram significativamente diminuídas em tecidos de câncer de mama e células de câncer de mama SKBR3 e parecem desempenhar papel-chave como supressor tumoral no câncer de mama, enquanto os genes SIRT2, SIRT3 e SIRT5 mostraram-se regulados positivamente. Em direção oposta, Elangovan et al. demonstraram que a inativação da SIRT1 eliminou o crescimento celular induzido por estrogênio e o desenvolvimento do tumor ER-positivo, sugerindo que a SIRT1 é necessária para o crescimento do câncer de mama induzido por estrógeno (ELANGO VAN et al., 2011). Os níveis de proteína SIRT6 estão elevados em células MCF-7 resistentes a paclitaxel e epirrubicina em comparação com as células sensíveis parentais, inferindo sua participação na resistência a esses quimioterápicos (KHONGKOW et al., 2013b), sugerindo papel preditivo da expressão dessa sirtuína. Apesar disso, o exato papel das sirtuínas na carcinogênese dos tumores de mama não é totalmente entendido. Estudos poderão auxiliar na avaliação de estratégias para utilização desse potencial alvo no desenvolvimento de novas drogas (YUAN; SU; CHEN, 2013).

### 3 MÉTODO

#### 3.1 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES

Inicialmente foi realizada revisão da literatura com foco nos principais biomarcadores moleculares, painéis de assinatura genética e atuais terapias alvo-molecular aprovadas para uso clínico no câncer de mama pelas principais agências reguladoras responsáveis pela aprovação e registro de medicamentos nos Estados Unidos (FDA - *Food and Drug Administration*), Europa (EMA - *European Medicines Agency*) e no Japão (PMDA - *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*). Sequencialmente, realizou-se uma pesquisa dos estudos clínicos de fase I e II com novas terapias alvo em câncer de mama registrados no banco de dados do *U.S. National Library of Medicine*, constante no sítio [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) até maio de 2018, utilizando os seguintes critérios de inclusão:

- Estudos que incluíram exclusivamente pacientes portadores de câncer de mama no cenário avançado ou inicial, independente do subtipo biológico ou da presença de marcadores moleculares reconhecidos ou ainda em avaliação;
- Estudos com terapias ainda não aprovadas para uso clínico, seja como medicação utilizada de forma isolada (monoterapia) ou em combinação de drogas;
- Novas terapias com foco em vias moleculares de sinalização oncogênica.

Foram excluídos da análise os estudos que apresentavam avaliações ou intervenções em pacientes que não eram portadores de câncer de mama, por exemplo, estudos que também incluíam pacientes com câncer de ovário, estômago, etc. Foram excluídos também os estudos não iniciados com recrutamento suspenso pelo investigador ou patrocinador.

O Metacore™ (Thomson Reuters, USA) foi utilizado para determinar os genes mais avaliados em diferentes regiões do mundo e estabelecer os genes de potencial prognóstico, preditivo que ainda não foram avaliados como alvos terapêuticos. O Metacore™ é um sistema de processamento de dados para análise funcional de dados experimentais, baseado em um banco de dados curado de proteínas humanas, interações proteína-DNA, fatores de transcrição, vias de sinalização e metabólicas, doenças e toxicidade, e os efeitos de moléculas bioativas.

## 3.2 COLETA DE MATERIAL E DADOS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO SOBRE A EXPRESSÃO DE SIRTUÍNAS SIRT1 E SIRT7 NO CÂNCER DE MAMA

### 3.2.1 Desenho e população do estudo

Trata-se de um estudo de coorte, transversal e prospectivo, realizado com amostras tumorais frescas oriundas de coletas realizadas em pacientes portadoras de câncer de mama atendidas no serviço de mastologia do Hospital Barão de Lucena da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco com idade superior a 18 anos no período de agosto/2011 a outubro/2017. O estudo incluiu amostras de pacientes com diagnóstico histológico confirmado de câncer de mama e que consentiram participar da pesquisa através da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os pacientes foram incluídos de forma sequencial e obedeceram aos seguintes critérios de elegibilidade: (1) Pacientes do sexo feminino na pré ou pós-menopausa, portadoras de câncer de mama (invasivo) em qualquer estágio, conforme estadiamento proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC – 7ª edição), exceto estágio IV; (2) Pacientes com qualquer subtipo biológico ou qualquer *status* de receptor hormonal e HER2 por estudo imunohistoquímico; (3) Paciente com estágios I a III que eram candidatas a tratamento sistêmico adjuvante ou neoadjuvante, com performance funcional entre 0 e 1 (ECOG), com expectativa de vida superior a 3 meses, com indicação de tratamento estabelecido pelo médico assistente do serviço de oncologia e mastologia do Hospital Barão de Lucena – Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco. Os critérios de exclusão utilizados foram: (1) Foram excluídas do estudo pacientes grávidas ou em estado puerperal; (2) Pacientes sem resultado do estudo imunohistoquímico avaliado na amostra tumoral; (3) Pacientes portadores de tumores primários simultâneos ou com antecedente de outra neoplasia maligna; (4) Pacientes portadoras de doenças autoimunes, imunodeprimidas ou infectadas pelo HIV ou sob tratamento imunoterápico.

### 3.2.2 Coletas de amostras tumorais

Fragmentos de tecido tumoral foram obtidos através de biópsias de tecidos frescos durante procedimentos cirúrgicos diagnósticos ou curativos realizados dentro das indicações previamente estabelecidas pela rotina médica do serviço de mastologia do Hospital Barão de Lucena. O fornecimento do fragmento foi realizado sob supervisão do médico patologista e

acondicionado em frasco contendo reagente preservante RNAlater® indicado para as análises laboratoriais. As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas, transportadas em reservatório e depositadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE) para análises.

### 3.2.3 Extração do material genético

O RNA foi extraído através do kit comercial RNeasy Mini Kit-QIAGEN (Hilden, Alemanha) e em seguida realizada a síntese de cDNA por transcriptase reversa com o QuantiTect Reverse Transcription Kit-QIAGEN (Hilden, Alemanha). Os materiais extraídos foram armazenados a -80°C até a análise. O ácido nucléico eluído foi quantificado em NanoDrop ND-2000 Nanodroptecnologias- Thermo Fisher Scientific (Delaware, EUA) antes de ser utilizado nos testes moleculares.

### 3.2.4 Análise de expressão gênica

Foi realizada análise da expressão dos genes SIRT1 e 7 com os seguintes *primers*: Hs.PT.58.40382601 (NM\_012238), e Hs.PT.58.223299 (NM\_016538), respectivamente, fabricados pela IDT (Integrated DNA Technologies). O StepOnePlus™ Real-Time PCR System-Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EUA) foi utilizado para a quantificação da expressão gênica.  $\beta$ -actina foi utilizado como gene de referência para obtenção dos valores e  $\Delta C_t$ . Para verificar possíveis variações na expressão relativa dos genes alvo foi aplicado o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando os valores obtidos em pacientes portadores de CDIS como calibrador.

### 3.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se o software IBM SPSS Statistics versão 23. As variáveis estatísticas significantes foram calculadas pelo teste da razão de Verossimilhança, por conta que o teste Qui-quadrado de Pearson na maioria dos casos não pode ser computado por conter mais de 20% das células com valores esperados menores que 5, para determinar diferenças nas variáveis clínico-patológicas, subtipos biológicos e expressão gênica. A sobrevida global e a sobrevida livre de doença foram estimadas usando o método de Kaplan-Meier. A diferença entre curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença obtida na avaliação de fatores prognósticos foi calculada pelo método *log-rank*. Em todos os testes

realizados considerou-se como estatisticamente significativo um valor de  $p \leq 0,05$  e marginalmente significativo um valor de  $p \leq 0,10$ . Não foi possível realizar a análise multivariada, pois apenas uma variável (etilismo) foi estatisticamente significativa. Os intervalos de confiança foram de 95%. A sobrevida global foi definida como o tempo transcorrido desde o diagnóstico da neoplasia até a última consulta realizada ou data do óbito.

### **3.2.6 Coletas de informações clínicas**

As informações sobre tipo tumoral, estadiamento patológico e grau histológico foram obtidas diretamente do laudo anatomopatológico registrado em prontuário. O registro de recidiva tumoral (recidiva de doença) obedeceu ao critério clínico-radiológico obedecido pelo médico assistente do paciente, com auxílio de quaisquer métodos radiológico disponíveis e por este interpretado. As informações sobre etnia ou raça, histórico familiar de câncer, etilismo, tabagismo, comorbidades (hipertensão ou diabetes) seguiu o registro em prontuário médico. Considerou-se obesidade o registro da informação em prontuário médico ou índice de massa corporal superior a 30 Kg/m<sup>2</sup>.

### **3.2.7 Aspectos éticos**

O estudo seguiu a resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, de modo que os pacientes que participaram da pesquisa concordaram com sua participação assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido onde foi garantida a confidencialidade dos voluntários, além de garantir que as amostras biológicas coletadas foram única e exclusivamente utilizadas para a execução deste projeto de pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS/UFPE) conforme Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 47869315.0.0000.5208 / Parecer número 1.215.006 e 1.514.112.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ARTIGO ORIGINAL 1 – CLINICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF BREAST CANCER: TARGETS AND THERAPIES

Biomedicine & Pharmacotherapy 106 (2018) 14–34



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

**Biomedicine & Pharmacotherapy**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioph](http://www.elsevier.com/locate/bioph)



Review

**Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies**

R.L.N. Godone<sup>a,1</sup>, G.M. Leitão<sup>a,b,1</sup>, N.B. Araújo<sup>a</sup>, C.H.M. Castelletti<sup>a,c</sup>, J.L. Lima-Filho<sup>d,e</sup>,  
D.B.G. Martins<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Prospection and Bioinformatics Group, Laboratory Keizo Asami of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil  
<sup>b</sup> Clinical Hospital of Pernambuco – Professor Romero Marques, Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil  
<sup>c</sup> Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), Recife, Pernambuco, Brazil  
<sup>d</sup> Laboratory Keizo Asami of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil  
<sup>e</sup> Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil



**ARTICLE INFO**

**Keywords:**  
 Biological markers  
 Molecular targeted therapy  
 Breast cancer

**ABSTRACT**

Breast Cancer is a complex disease characterized by the occurrence of multiple molecular alterations. Currently, some molecular markers are in use for breast cancer diagnostic, prognostic, and predictive purposes. Thus, genetic signatures are available for improving the decision-making. The biomarkers are also essential as therapeutic approaches, but many questions remain due to the lack of efficacy on breast cancer treatment, mainly for triple-negative breast cancer subtype. Since the genetic profile of breast cancer can also be related to different ethnic groups and geographic areas, the reference populations of the genetic assays and clinical trials need to include a broader population beyond the European and North American patients. In this review, we analyzed the current and potential molecular markers that could help to improve the strategies for breast cancer therapy.

**1. Introduction**

Cancer is a multifactorial disease with a striking heterogeneity due to genetic, epigenetic and transcriptional changes involving a myriad of genes and proteins. While these factors are relevant to clinical prognosis and medical treatment, a broad approach is needed to unravel the complexities underlying carcinogenesis mechanisms [1]. The breast cancer is the second most common cancer in the world and, by far, the most frequent cancer among women. It is the most frequent cause of cancer death in women in less developed regions (324,000), and the second in more developed ones (198,000) [2], but more equally distributed compared to other cancers across regions [3].

Nowadays, we are tackling the precision oncology era whose patients can be treated according to their genetic profile [4]. In breast cancer research, the goal in the field of oncogenomics is to respond to relevant clinical issues related to patients whose tumors will remain inactive for a long time, the appropriate targeted therapy according to the adjuvant scenario, and the most effective approach to improve the life quality of these patients [5]. Despite advances in innovative clinical trial designs, intratumoral and intertumoral heterogeneity persist as challenges [6].

An overview in breast cancer genomes demonstrated remarkable

genomic complexity and variability. Individual tumors often carry aberrations that deregulate hundreds or even thousands of genes, which can occur at various levels such as chromosomal, gene replication, transcription, and epigenetics [7]. Although genetic variants in breast cancer can be related to either geographic areas or ethnic groups, the reference populations of the leading commercial tests are European and North American. It is undeniable that development of molecular panels of genetic mutations and gene expression is helping the therapeutic decision, but it is not taking into account all the genetic variability of this neoplasm across the globe. This review summarizes the main molecules studied in prognostic and predictive assays, discusses the molecules used for targeted therapy in breast cancer and underlines new potential biomarkers.

**2. Molecular markers in breast cancer**

The discovery of the first significant breast cancer susceptibility gene *BRCA1* occurred in 1994, highlighting the inheritance of a mutation in *BRCA1* and *BRCA2* as a risk factor. These tumor suppressors genes are involved in critical functions, like DNA damage response (DDR) and DNA repair [8]. The identification of women at high risk of breast and ovarian cancer is not easy since the loss of one copy of

\* Corresponding author at: Av. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária – CEP: 50690-701, Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Setor de Prospecção Molecular, Brazil.  
 E-mail address: [bruneska@prospecmol.org](mailto:bruneska@prospecmol.org) (D.B.G. Martins).  
<sup>1</sup> These authors contributed equally to the study.

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.06.066>  
 Received 20 January 2018; Received in revised form 1 June 2018; Accepted 13 June 2018

functioning *BRCA1/2* is not clinically evident [9]. Therefore, the genomic analysis became a predictor tool and most centers developed strategies to reduce cancer risk, morbidity, and mortality in women who carry pathogenic *BRCA1* and *BRCA2* mutations. Then, women should undergo regular screening by imaging to detect tumors at an early stage, risk-reducing mastectomy and/or risk-reducing salpingo-oophorectomy, and chemoprevention strategies [10]. By another side, only 5% of breast cancer development is related to the germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* and few other rare variants [11].

Gene expression profiling is improving the identification of genes whose activity within tumors can provide information on how to assess the prognosis of disease and guide therapy. These gene expression profiles are applicable not only as a prognostic tool but also as a predictor of chemo- and hormone-sensitivity, identifying patients with poor or favorable prognosis, and determining the risk and benefits of adjuvant chemotherapy [12,13].

In 2005, The Cancer Genome Atlas (TCGA) was launched as one of the leading projects of the genetics of cancer, using genome analysis technologies to generate new cancer therapies, diagnostic methods, and preventive strategies, accelerating the comprehensive understanding of cancer [14]. After a decade, more than 11,000 human tumors across 33 different cancer types were available. A standardized dataset called the TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource was developed to ensure proper use of this vast clinical dataset associated with genomic features [14,15]. Since 2016, the data from TCGA project resides in the Genomic Data Commons (GDC), as a research program of the National Cancer Institute (NCI) that provides to the cancer research community the unified data repository, enabling data sharing across cancer genomic studies in support of precision medicine. It is an interconnected database from TCGA, TARGET (Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments), International Cancer Genome Consortium, NCI clinical trials, and user-submitted data [16].

Next-generation sequencing (NGS) has made the genomic mutation treatment accessible for breast cancer patients (potentially responsive to targeted therapies), especially in the metastatic setting [17,18]. Several studies have shown advances in the characterization of mutational profiles of breast cancer, as well as demonstrated the importance of inter- and intra-tumor heterogeneity [19]. Large-scale studies on mutation profiles in breast cancer revealed genomic alterations and mutational signatures that can contribute to the comprehension of the mutational landscape, resistance to therapy and strategies for developing better treatments [18–21].

The first study to reveal a molecular classification for breast cancer using molecular taxonomy came from the laboratories of Perou and Sorlie [22]. The authors identified five distinct molecular subgroups of breast cancer using microarrays data: Luminal A, Luminal B; the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-Enriched, Basal-Like, and Normal-like. They expanded the first classification to include Claudin-low subtype, characterized by low expression of cellular adhesion genes [23] (Table 1).

Clinical oncologists extrapolate Perou's molecular classification of breast cancer subtypes for a more accessible evaluation, aiming to overcome the challenges in applying the molecular finding in clinical routine. In 2011, the St. Gallen Consensus Conference adopted molecular markers estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER2 for treatment decision-making in early breast cancer for all patients; reinforced years later [24,25].

The high expression of Ki-67 by immunohistochemical (IHC) was also indicated as a marker in breast cancer with good response to neoadjuvant chemotherapy. However, the Ki-67 staining lacks analytical validity, so its performance as a biomarker for prognostic purposes remained weak, with no reliable evidence of chemotherapy efficacy [26]. Therefore, Ki-67 scores should be interpreted in the light of local laboratory values. If a laboratory has 20% median Ki-67 score in receptor-positive disease, values of 30% or above could be considered 'clearly high'; those of 10% or less 'clearly low' [27,28]. As

**Table 1**  
Biological classification of breast cancer subtypes according to the phenotypic profiles.

| Biological Subtypes             | Phenotype                                                         |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Luminal A-like                  | ER + ve / PR + ve / HER2-ve / clearly low Ki-67                   |
| Luminal B-like                  | ER + ve / PR + ve or PR-ve / HER2-ve or + ve / clearly high Ki-67 |
| HER2-overexpressed <sup>a</sup> | ER-ve / PR-ve / HER2+ve (++)/3+ by IHC and/or ISH positive)       |
| Triple-negative                 | ER-ve / PR-ve / HER2-ve                                           |
| Basal-like <sup>a</sup>         | ER-ve / PR-ve / CK5+ve / CK6+ve / CK14+ve / CK17+ve / EGFR + ve   |
| Claudin-low                     | Claudin 3, 4 and 7 low / e-cadherin low/ ER-ve / PR-ve / HER2-ve  |
| Normal-like                     | Without homogeneous identification                                |

Abbreviations: HER2, type 2 receptor of human epidermal growth factor; EGFR, receptor type 1 epidermal growth factor; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; CK, cytokeratin; IHC, Immunohistochemistry; ISH, in situ hybridization.

<sup>a</sup>True molecular basal like breast cancer and HER2-enriched subtype can be defined by genomic assay only.

consequence, in broad clinical terms, four subtypes call for distinct treatment approaches: HER2-positive (HER2+ve) tumors regardless of ER status; TNBC; and two types of ER-positive (ER+ve) breast cancer (Luminal A-like and Luminal B-like) mainly differentiated by expression level Ki-67 protein [26,28,29].

Regarding the molecular classification of the Luminal subtype, a distinguishable gene expression signature includes: estrogen receptor 1 (*ESR1*); GATA-binding protein 3 (*GATA3*); Forkhead box protein A1 (*FOXA1*); B-cell chronic lymphocytic leukemia (*CLL*)/lymphoma 2 (*BCL2*); X-box binding protein 1 (*XBP1*); and the myeloblastosis gene (*MYB*). However, these genes show different profile according to the luminal subtype, as also observed for the mutation profile. Luminal A subtype shows high frequency of mutation in the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) gene; multiple significantly mutated genes, including mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (*MAP3K1*), *GATA3*, cadherin 1 (*CDH1*), and mitogen-activated protein kinase kinase 4 (*MAP2K4*); and a low frequency of *TP53* mutation. By another side, high rate of *TP53* mutation was associated with Luminal B subtype together with a slightly lower rate of *PIK3CA* mutation [30].

Overexpression of HER2 occurs in 15%–20% of all breast cancers, associated with aggressive tumor behavior, reduced responses to traditional therapies, and decreased survival [31,32]. However, since 1980, the development of the anti-HER2 class of drugs has improved the outcomes. These agents have notably improved the 5-year survival rate and the overall survival (OS). Therefore, the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists proposed several recommendations for HER2 test standardization by IHC or *in situ* hybridization (ISH) [24,33].

By another hand, Triple Negative Breast Cancer (TNBC) is more aggressive than other breast tumors and reduces the survival rate of these patients, most often premenopausal women under 50 years [13]. In Mexican patients, ten genes were assigned as associated to TNBC. Nine genes were overexpressed, as follow: protein kinase X-linked (*PRKX*) and protein kinase Y-linked (*PRKY*); UDP-glycosyltransferase 8 (*UGT8*); high mobility group AT-hook 1 (*HMGAT1*); lipin 1 (*LPIN1*); hyaluronan and proteoglycan link protein 3 (*HAPLN3*); family with sequence similarity 171 member A1 (*FAM171A1*); B cell CLL/lymphoma 11 A (*BCL11A*); forkhead box C1 (*FOXC1*); and ankyrin repeat domain 11 (*ANKRD11*). Only one gene, Annexin 9 (*ANX9*), was underexpressed in TNBC samples [34].

However, a molecular stratification of TNBC intends to make easier the development of targeted therapy and the improvement of the patients' quality of life. Applying whole-genome gene-expression profiling

(GEP), different research groups proposed different classifications. Lehmann et al. [35] found six TNBC subtypes: Basal-like 1 (BL1); Basal-like 2 (BL2); Immunomodulatory (IM); Mesenchymal (M); Mesenchymal stem-like (MSL); and Luminal androgen receptor (LAR). Burstein et al. [36] described four stable TNBC subtypes: Luminal AR (LAR); Mesenchymal (MES); Basal-like immunosuppressed (BLIS); and Basal-like immune-activated (BLIA). Le Du et al. [37], overlapping these previous classifications, proposed five potential clinically actionable groups of TNBC: Basal-like with a DNA-repair deficiency or growth factor pathways; Mesenchymal-like with epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cell features; Immune-associated; Luminal/apocrine with androgen-receptor overexpression; and HER2-enriched.

It is important to note that the claudin-low subtype is also commonly TNBC by IHC [23]. It is a rare subtype of breast cancer characterized by low to absent expression of luminal differentiation markers, high enrichment for epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers, immune response genes, and cancer stem cell-like features. The claudin-low subtype has a pattern of response to therapy that is intermediate between the basal-like and luminal breast cancer subtypes, with a high frequency of metaplastic and medullary differentiation [38,39].

Despite all efforts to determine the genetic profile for the TNBC subtype, it is still challenging to establish a pool of genes involved in its development and progression. Maybe, it is necessary to look beyond and understand the contribution of other factors like ethnicity, habits and epigenetic modifications.

### 3. Molecular markers in different ethnic groups

The correlation of several genes may determine the susceptibility to breast cancer in different populations, as well as prevalence and mortality incidence [40]. Multiple studies have confirmed the value of individual breast tumor characteristics, like tumor stage, tumor size, lymph node involvement, and hormone receptor status as prognostic indicators. However, the differences in breast cancer incidence and survival rates among black and white populations are not clearly understood. It demonstrates that social and ethnic factors may contribute to biomedical and clinical factors for contrasting outcomes among populations [41,42].

Hispanic, Asian and Native American women show a lower incidence of breast cancer compared with non-Hispanic women of European descent [43]. African-American women are more likely than Caucasian to have hormone receptor negative (HR-ve) primary tumors, positive axillary nodes, and positive nodes associated with smaller tumors. They show a higher incidence of breast cancer, occurring at a younger age. These women are also more likely to have poorer overall survival and disease-free survival, with significantly increased the risk of death, regardless the effects of other predictor variables, including tumor stage [42,44–48]. The cause of these disparities may be related to the genetic variation. However, the economic, racial, cultural and environmental diversity in different geographical regions could play a role in these discrepancies [40,49,50].

The use of social classifications as a proxy for biological heterogeneity can be problematic, once concepts of race and ethnicity are among the most controversial, contentious, and misunderstood classifications in our social and scientific landscapes [51]. Moreover, most of the genetic signatures for breast tumors are based on American and European populations studies since most of the studies are only facing geographical demands.

Bioinformatics analysis reveals some genes studied in isolated populations, like forkhead box A1 (*FOXA1*) and zinc finger protein 217 (*ZNF217*) in North America; fibroblast growth factor receptor 4 (*FGFR4*) in South America; snail family transcriptional repressor (*SNAIL*) and exonuclease 1 (*EXO1*) in Europe; myosin heavy chain 9 (*MYH9*) in Africa; caspase 8 (*CASP8*) and tox high mobility group box family member 3 (*TOX3*) in Asia; among others (Fig. 1).

Different molecular subtypes need further evaluations under the light of the racial/ethnic differences among populations to warranty access to treatment benefits for every woman. It is crucial to implement strategies that address the detection of breast cancer, not only by region but also by the ethnic distinction. Then, multicenter studies would be helpful for identifying genes expressed in different ethnic populations, allowing the improvement of the actual molecular signatures for breast cancer.

### 4. Genetic signature panels for breast cancer

There are many molecular-based breast cancer tests, for both prognostic and predictive application, like: Blueprint [52], Targetprint [53], MapQuant Dx [54], Theraprint [55], THEROS Breast Cancer Index [56], Mammostrat [57] and EndoPredict assay [58]. However, MammaPrint [59], Prosigna (PAM50) [60,61] and Oncotype Dx [62] assays are the most recognized for clinical use (Table 2).

MammaPrint (Agendia, Irvine, CA, USA) was the first molecular assay approved by the US Food and Drug Administration in 2007 and also approved by European Union regulators in 2018. It is a microarray-based analysis of 70 genes that stratifies patients into low and high-risk of relapse. It is indicated as an adjunct prognostic assay for patients in stage I/II, not only lymph node-negative but also one to three lymph node-positive status [63,64]. Two clinical trials were performed based on MammaPrint assay. The RASTER study (microarray-prognostics-in-breast-cancer) showed 98.9% efficiency for 5-year metastasis-free survival in patients that were clinically high-risk but chose not to receive adjuvant chemotherapy based on low-risk status [65]. The MINDACT (Microarray In Node-negative Disease may Avoid Chemotherapy) was an international phase III trial that used MammaPrint classifier together with clinicopathological criteria (Adjuvant!Online - AOL) to select patients for adjuvant chemotherapy. This trial evaluated a non-anthracycline-based adjuvant chemotherapy regimen and compared the switching and upfront strategies of adjuvant endocrine therapy. The results showed that around 46% of women at high clinical risk might not require chemotherapy, confirming the benefit of genomic profiling in this scenario [66–69].

The MammaPrint is marketed as part of the SYMPHONY profile, which includes: (i) the Blueprint assay, based on 80 genes for that classifies breast cancer patients into Basal-type, Luminal-type, and HER2-type subgroups [52]; (ii) the Targetprint assay that determines gene expression levels of ER, PR and HER2 in breast cancer tumors [53] and; (iii) the Theraprint that measures the expression of 56 target genes, and specific mutations in *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and *EGFR*, all important for antineoplastic treatment in relapsed patients [55]. This last one has potential to improve the clinical decision and the efficiency in metastatic cancer treatment, once it includes most of the targeted molecules for breast cancer therapy, and others under evaluation in clinical trials.

Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay is based on the PAM50 gene expression signature that measures the expression levels of 50 genes. It was approved by FDA in 2013 and classifies a tumor as Luminal A, Luminal B, HER2-enriched or Basal-like. This assay includes ER, PR, HER2 and Ki-67 expressions analysis together with biomarkers related to cell cycle regulation and tumor proliferation; some are also present on Oncotype Dx and MammaPrint [61,70]. Also, it generates an individualized score for estimating the probability of disease recurrence by weighting the molecular subtype correlations, a subset of proliferation genes, and pathologic tumor size [60,61,71]. In a cohort of postmenopausal patients with endocrine-responsive status, PAM50 could differentiate on their risk for late distant recurrence beyond what can be achieved with established clinicopathologic risk factors, in both node-positive and node-negative disease [72].

Oncotype Dx (Genomic Health, Inc., CA) evaluates the expression of 16 cancer-related genes. The output is a 'recurrence score' (RS), which has a monotonic relation to the risk of distant recurrence (low,



Fig. 1. World map showing the main genes related to breast cancer in each continent. Larger and smaller circles mean, respectively, higher and lower number of gene reports by region. These data were generated using International HapMap Project and MetaCore software.

intermediate, and high-risk) at ten years following tamoxifen treatment of ER + ve node-negative breast cancer [62]. The impact of the Oncotype Dx assay on clinical decision-making lead to changes in chemotherapy decisions in about one-third of patients [73,74]. Two phase-III clinical trials used Oncotype Dx to identify patients for whom adjuvant endocrine therapy alone would be a sufficient treatment [75]. The TAILORx (Trial Assigning Individualized Options for Treatment [Rx]) recruited node-negative patients with the aim of reducing chemotherapy overtreatment by integrating molecular diagnostic testing into the clinical decision-making process [76]. Otherwise, RxPONDER was designed for patients with one to three positive nodes [77].

MapQuant Dx assay evaluates the expression of 97 genes, classifying the tumor in low and high-grade risk for relapse. It also categorizes ER + ve tumors into two subtypes with distinct clinical outcomes. It helps the clinical decision for targeted treatment once it resolves “grade 2” tumors that are associated with an intermediate risk of recurrence and not informative for clinical decision making [13,54]. The THEROS Breast Cancer Index (BCI) is a seven-gene tumor grade signature that combines *HOXB13:IL17BR* (H/I) ratio with a 5-gene Molecular Grade Index (MGI), improving the prediction of risk stratification and treatment outcome in patients with ER + ve, lymph node-negative [56]. Mammostrat, a five-biomarker assay prognostic tool for ER + ve treated with endocrine therapy, stratifies patients regarding the recurrence risk [57]. The EndoPredict assay is a breast cancer prognostic test that predicts the 10-year distant recurrence rate, taking into account tumor size and nodal status in patients with ER + ve, HER2-ve breast cancer treated with endocrine therapy alone [78].

Some online predictive models are also available to help estimate the survival for individual patients. Recurrence Online ([www.recurrenceonline.com](http://www.recurrenceonline.com)) is an online analysis tool to compute ER and HER2 status, Oncotype Dx 21-gene recurrence score, and an independent recurrence risk classification using gene expression data obtained by microarray assays. It can classify the patients into a low and high-risk of recurrence, regardless of lymph node and ER status [79]. PREDICT Tool ([www.predict.nhs.uk](http://www.predict.nhs.uk)) is another online platform for predicting breast cancer prognostic and treatment benefits. It was the first mathematical model to include HER2 and Ki-67 status using a Cox proportional hazards model. It enables the incorporation of additional prognostic factors and provides five and ten-years survival

estimates [80]. This tool can also aid decision-making in HER2 + ve early-stage breast cancer by identifying patients at risk of under-treatment with chemotherapy/trastuzumab, and by reducing the overtreatment of patients with little predicted benefit [81].

The American Society of Clinical Oncology (ASCO) supports the use of Oncotype Dx, EndoPredict, Prosigna, THEROS Breast Cancer Index [82] and Mammaprint (suggested as useful in patients with high clinical risk) [83]. It is important to note that each genetic panel has its purpose and benefits and need to be correctly addressed. The recommendation is that oncologists choose one assay for any given patient rather than using these tests in combination, once they may lead to discordant results for an individual patient [84]. Unfortunately, TNBC patients have limited access to these panels, once most of them are restricted to HR + ve status.

## 5. Molecular targeted therapy in clinical use

The application of molecular signatures to assess multiple markers is catching up to replace the single biomarker testing in guiding clinical practice. These signatures have been commercialized faster than ever, also improving the selection of patients who will benefit from adjuvant systemic chemotherapy [12,85]. However, the heterogeneity of some breast cancer tumors makes difficult the implementation of targeted therapies, reinforcing the requirement of new biomarkers to improve personalized therapy in these tumors [86]. There are some targeted therapies in clinical use for breast cancer patients (Table 3), which transmembrane and intracellular molecules are targets for inhibiting the following pathways that lead to cell growth, differentiation and survival, angiogenesis, and cell migration (Fig. 2).

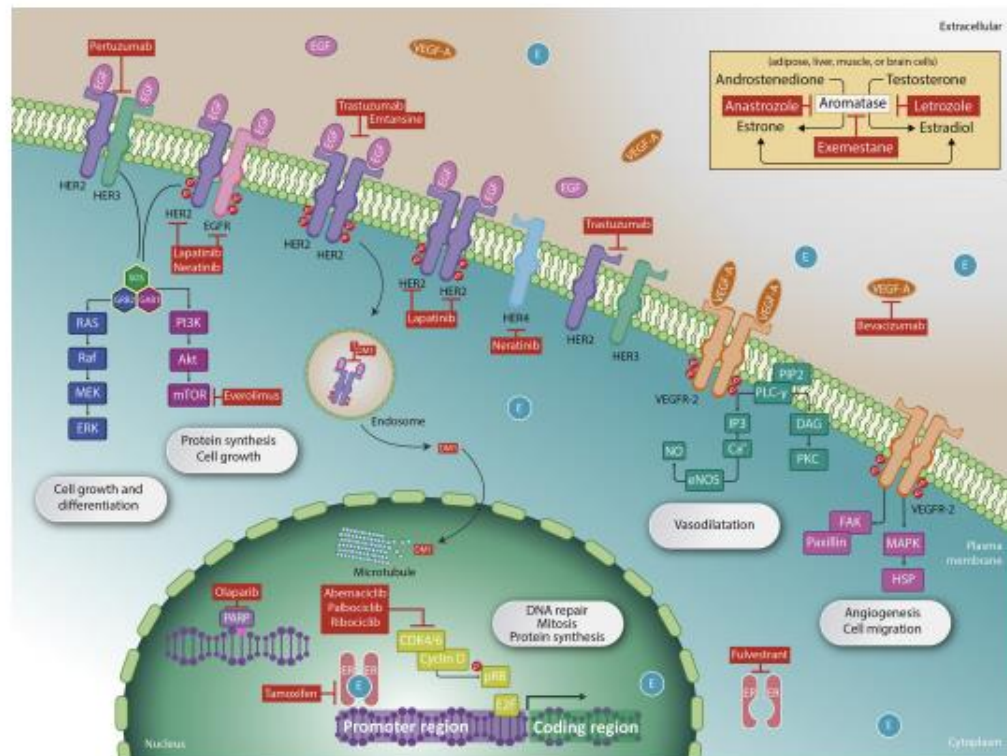
The ER was the first molecule used as a target for breast cancer therapy. It is a transcription factor that regulates the expression of many genes. As a nuclear receptor, ER has a DNA binding domain (DBD) that enables it to regulate gene expression events when bound to estrogen. ER-associated co-factors like FOXA1, GATA3, PBX1 assist in tethering ER to DNA, allowing transcriptional regulation [87]. Tamoxifen was the first targeted therapy approved for breast cancer, in 1977. It has demonstrated reduced recurrence rates in ER + ve early breast cancer treatment for five years and reduces breast cancer mortality [88]. Tamoxifen is representative of the selective estrogen



**Table 3**  
Target therapies for breast cancer approved for clinical use.

| Drug (Brand name)                 | Approved by*                                       | Mechanism of action                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Approved use (setting)                      | Combined Therapy                                                                                             |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Trastuzumab (Herceptin®)          | FDA/1998 EMA/2000<br>PMDA/2001                     | Recombinant humanized monoclonal antibody that inhibits ligand-independent HER2 and HER3 signaling, avoiding the shedding from the extracellular domain                                                                                                                                                                                                                                    | Neoadjuvant, adjuvant and metastatic        | Monotherapy; in combination with Pertuzumab; with chemotherapeutic agents (e.g., taxanes, vinca's alkaloids) |
| Pertuzumab (Perjeta®)             | FDA/2012 EMA/2013<br>PMDA/2013                     | Antibody that targets the domain II of HER2, inhibiting HER dimerization                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Neoadjuvant, adjuvant, and metastatic       | In combination with Trastuzumab and taxanes                                                                  |
| Trastuzumab-emtansine (Kadcyla®)  | FDA/2013<br>EMA/2013 PMDA/2013                     | Humanized antibody-drug conjugate consisting of Trastuzumab linked to a chemotherapeutic agent DM-1. The Ab targets HER2 while the cytotoxic anti-microtubule drug enters the cells, inhibits the microtubule assembly, avoiding mitosis and leading to impaired cellular trafficking and apoptosis                                                                                        | Metastatic                                  | Monotherapy                                                                                                  |
| Lapatinib (Tykerb®, Tyverb®)      | FDA/2007<br>EMA/2008 PMDA/2009                     | Oral small-molecule that inhibits, reversibly, both EGFR and HER2 by binding to the ATP-binding pocket of the RTK, avoiding the phosphorylation cascade                                                                                                                                                                                                                                    | Metastatic                                  | In combination with Capecitabine or Letrozole                                                                |
| Neratinib (Nerlynx®)              | FDA/2017                                           | Antibody against EGFR, HER2 and HER4 inhibiting the pathway through irreversibly binding to the intracellular signaling domain of these receptors                                                                                                                                                                                                                                          | Adjuvant                                    | Monotherapy                                                                                                  |
| Brevacizumab (Avastin®)           | FDA/2008 (withdrawn in 2010)<br>EMA/2005 PMDA/2007 | Humanized anti-VEGF monoclonal antibody, that targets the circulating molecule and avoid its binding with VEGFR                                                                                                                                                                                                                                                                            | Metastatic                                  | In combination with chemotherapeutics                                                                        |
| Everolimus (Afinitor®, Certican®) | FDA/2009<br>EMA/2009 PMDA/2007                     | An oral drug, mTOR inhibitor, that binds to FKBP12 molecule, more selective for the mTORC1 protein complex, rather than mTORC2                                                                                                                                                                                                                                                             | Metastatic                                  | In combination with Exemestane                                                                               |
| Palbociclib (Branco®)             | FDA/2015<br>EMA/2016 PMDA/2017                     | An oral drug, selective inhibitor of CDK4 and CDK6, that avoids the CyclinD-CDK4/6 complex to phosphorylate pRb and pass through restriction point "R" to G1 phase of cell division                                                                                                                                                                                                        | Metastatic                                  | In combination with an AI or Fulvestrant                                                                     |
| Ribociclib (Kisqali®)             | FDA/2017<br>EMA/2017                               | An oral and small-molecule that inhibits CDK4/6 at nanomolar concentration binding to the ATP cleft of CDK4 and CDK6 (causes G1 arrest). This drug appears to bind more readily to the ATP cleft and forms a hydrogen bond with a catalytic residue (Y43) that is conserved among kinases.                                                                                                 | Metastatic                                  | In combination with an AI                                                                                    |
| Abemaciclib (Verzenio®)           | FDA/2017                                           | Drug targeting PARP1/2 isoforms, indicated to mutant BRCA patients, whose LOH leads to nonfunctional BRCA, and repair of homologous recombination do not occur by inhibition of olaparib-induced PARP, resulting in cell cycle arrest and apoptosis. Competitive drug inhibitor of estrogen that binds to ER showing both agonist and antagonist activity, depending on the target tissue. | Metastatic                                  | Monotherapy; in combination with Fulvestrant                                                                 |
| Olaparib (Lynparza®)              | FDA/2014<br>EMA/2014 PMDA/2018                     | Drug targeting PARP1/2 isoforms, indicated to mutant BRCA patients, whose LOH leads to nonfunctional BRCA, and repair of homologous recombination do not occur by inhibition of olaparib-induced PARP, resulting in cell cycle arrest and apoptosis. Competitive drug inhibitor of estrogen that binds to ER showing both agonist and antagonist activity, depending on the target tissue. | Metastatic                                  | Monotherapy                                                                                                  |
| Tamoxifen (Nolvadex®)             | FDA/1977                                           | Competitive antagonist of estrogen, that binds to the ER, but without agonistic activity                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Adjuvant, Metastatic                        | Monotherapy                                                                                                  |
| Fulvestrant (Faslodex®)           | FDA/2002<br>EMA/2004 PMDA/2011                     | Non-steroidal-type agent, highly potent and selective AI. It blocks the production of estrogen without exerting effects on other steroidogenic pathways.                                                                                                                                                                                                                                   | Metastatic                                  | Monotherapy; in combination with Abemaciclib or Palbociclib                                                  |
| Anastrozole (Arimidex®)           | FDA/1995<br>EMA/1995(UK)<br>PMDA/2000              | Non-steroidal-type agent, third-generation AI that produces almost complete inhibition of aromatase in peripheral tissues, associated with suppression of estrogen.                                                                                                                                                                                                                        | Adjuvant and Metastatic                     | Monotherapy                                                                                                  |
| Letrozole (Femara®)               | FDA/1997<br>EMA/1996 (France)<br>PMDA/2006         | Non-steroidal-type agent, third-generation AI that produces almost complete inhibition of aromatase in peripheral tissues, associated with suppression of estrogen.                                                                                                                                                                                                                        | Adjuvant and locally advanced or metastatic | Monotherapy; in combination with Palbociclib or Ribociclib                                                   |
| Exemestane (Aromasin®)            | FDA/1999<br>EMA/1999<br>PMDA/2002                  | Steroidal-type inhibitor that suppresses the synthesis of estrogen by blocking the activity of aromatase (responsible for estrogen production in post-menopausal women).                                                                                                                                                                                                                   | Adjuvant and Metastatic                     | Monotherapy; in combination with Everolimus                                                                  |

**Abbreviations:** FDA, U.S. Food and Drug Administration - USA; EMA, European Medicines Agency - EC; PMDA, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency - Japan; Ab, antibody; AI, aromatase inhibitor; ER, estrogen receptor; LOH, loss of heterozygosity; RTK, receptor tyrosine kinase.



**Fig. 2.** Receptor tyrosine kinase signaling cascade and intracellular molecules associated with targeted therapy in clinical use for breast cancer. Receptor kinases are shown in the plasma membrane, under monomeric or dimeric formation, along with their respective ligands, downstream signaling pathways, and main cellular response. The pharmacological inhibitors are highlighted in red in cell compartments and also in the extracellular region. Note that Trastuzumab-emtansine inhibits HER2 dimerization, and after internalization and degradation of trastuzumab (T) inside endosome the emtansine (DM1) is released to act as an inhibitor of microtubule assembly in the nucleus. Aromatase inhibitors are shown outside the cell since they are produced in other tissues.

receptor modulators (SERMs) group, competitive inhibitors of estrogen binding to estrogen receptors, with mixed agonist and antagonist activity, depending on the target tissue [89]. By another side, there are competitive antagonists of estrogen that bind to the estrogen receptor, the selective estrogen receptor down-regulators (SERDs). Fulvestrant is the only drug approved for the treatment of breast cancer that acts as an ER down-regulator. In contrast to the SERMs, fulvestrant is a "pure" ER antagonist with no agonistic activity, approved in metastatic setting to ER + ve tumors [90]. Aromatase inhibitors (AIs) represent another class of medicines targeted to endocrine treatment [91–93] that prevent the conversion of androgens to estrogens in peripheral tissues. It is suggested for postmenopausal women in adjuvant and metastatic setting [94,95].

The mTOR pathways is also a target for breast cancer treatment. Everolimus is an oral mTOR inhibitor approved in a randomized phase III trial (BOLERO-2). It is indicated for use in post-menopausal women with ER + ve advanced breast cancer that had relapsed or progressed on a nonsteroidal aromatase inhibitor (AI)-based therapy. The addition of exemestane to everolimus improved the progression-free survival (PFS) at the central review to 10.6 months compared to 4.1 months with exemestane alone ( $p < 0.0001$ ), and the PFS at the local review to 6.9 vs. 2.8 months ( $p < 0.0001$ ) [96].

Regarding HER2 subtype, targeted therapy is available for clinical practice, in early and advanced disease [97]. Trastuzumab, a humanized monoclonal antibody against the extracellular domain of HER2 [98,99], inhibits the intracellular pathway that leads to cell growth and

differentiation. A meta-analysis of eight randomized controlled trials [100] involving almost 12,000 patients with HER2 + ve early breast cancer showed trastuzumab-containing regimens resulted in improvements in disease-free survival (DFS) and overall survival (OS). This treatment is the standard of care for these patients, although other anti-HER2 therapies are in current use, like HER dimerization inhibitor (Pertuzumab), antibody-drug conjugates targeting HER2 (Ado-trastuzumab emtansine) [101], and small molecule inhibitors of HER2 (lapatinib and neratinib) [102].

Palbociclib [103], ribociclib [104,105], and abemaciclib [106] are approved for ER + ve and HER2 + ve advanced breast cancer. They are CDK4/6 inhibitors able to overcome or delay resistance to endocrine therapy. These molecules are involved in cell cycle regulation. In this cascade, cyclin D associates with and activates the protein kinases CDK4 and CDK6. These complexes phosphorylate the Rb protein and avoid its interaction with E2F, which becomes active and able to drive the expression of genes necessary for entry into S phase [107]. This pathway is hyperactive in breast cancer, so its inhibition could lead to activation of the tumor suppressor Rb, and cell cycle arrest. Additionally, the inhibition of CDK4/6 could stimulate the production of type III interferons, also promoting cytotoxic T-cell-mediated clearance of tumor cells [108]. These therapies showed improved PFS when added to endocrine therapy as first-line or subsequent therapies, being incorporated in clinical practice as standard treatment [109–111].

Bevacizumab is a humanized monoclonal antibody that targets the main isoforms of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF),

resulting in the inhibition of angiogenesis, cell tumor growth, and cell survival. It received initial FDA approval in combination with chemotherapy based on PFS improvement as first-line treatment for HER2-ve advanced breast cancer. However, the lack of OS benefit led to withdrawal its indication in breast cancer in the USA [112]. Therefore, other antiangiogenic targeted therapies need to be developed to avoid the advance of the breast cancer to metastatic sites like lungs and bones.

The development of the Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) inhibitors has been one of the promising breakthroughs for ovarian and breast cancer in germinative BRCA1/2 mutations carriers [113]. PARPs are a family of nucleoproteins highly involved in some cellular processes including gene regulation, chromatin remodeling, DNA repair (triggered by errors in the replication process, production of ROS and UV radiations) and apoptosis. However, genetic disorders, such as BRCA1 and BRCA2 mutations, prevent DNA repair mechanism and increase the risk of malignancies. Inhibition of DNA repair process may lead to cell death, and this brings PARP as a perfect target for anti-cancer therapy [114]. Olaparib, an oral PARP inhibitor, shows efficacy in the metastatic setting. In the phase III OlympiAD trial, olaparib demonstrated an improved in PFS compared to chemotherapy in patients with HER2-ve metastatic breast cancer and germline BRCA mutation (hazard ratio [HR] for progression or death) [115].

## 6. Clinical trials in breast cancer

ClinicalTrials.gov database clearly shows that the molecular biomarker trend catches both industrial and academic clinical research with oncology being in the forefront of the personalized medicine. Until 2013, oncology represented more than 75% of all the trials with stratified biomarker program and breast cancer constituted 28% of all trials [116]. Table 4 summarizes the main phase I/II clinical trials for breast cancer only. Most of them target the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and different RTKs, but other targets are under evaluation.

### 6.1. PI3K/Akt/mTOR inhibitors

PI3K/Akt/mTOR is a major pathway involved in the regulation of cell survival and proliferation, and it is the most frequently altered pathway in breast cancer. *PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2*, and *PTEN* are the essential genes of the PI3K/Akt pathway, with increased mutation rates in cancer cases that lead to aberrant regulation of the pathway. Hyperactivation of the PI3K pathway occurs in 70% of breast cancers and near 30% have mutations in *PIK3CA* [117]. Mutation in *AKT1* and *AKT2* activates Akt signaling in HR + ve/luminal breast cancer. In preclinical breast cancer models, PI3K/Akt/mTOR signaling pathway has been implicated in endocrine and trastuzumab resistance in HER2 overexpressing breast cancers. It indicates that inhibitors of this pathway could act synergistically with trastuzumab in resistant cells. In contrast, hyperactivation of the PI3K signaling pathway (through low *PTEN* expression, *PIK3CA* or *AKT1* mutation) seem to induce sensitivity of the tumor to mTOR and PI3K/Akt inhibitors [118,119].

However, different strategies targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway involves the inhibition of upstream targets such as PI3K and Akt. A class I PI3K inhibitor, pictilisib (GDC0941) is under evaluation, combined with fulvestrant, for women with ER + ve advanced breast cancer who progressed on prior AI therapy [118]. Buparlisib, or BKM120, is a PI3K inhibitor evaluated in postmenopausal women with advanced HR + ve breast cancer, showing a high chance of practical applicability in the future [120]. These trials concentrate in ER + ve tumors, mainly for metastatic setting and using combined therapy.

Taselisib (GDC-0032) is another PI3K inhibitor, most focused in ER + ve tumors. It also shows a one phase Ib/II trial dedicated to TNBC patients, but in combination with enzalutamide (MDV-3100), an AR antagonist in phase II trial for breast cancer. As Akt inhibitors, Capivasertib (AZD5363) has one phase II trial dedicated to TNBC

patients, and MK2206 has one phase Ib for any metastatic patients, both in combination with paclitaxel. Bimimalisib (PQR309) is a PI3K/mTOR inhibitor with a phase Ib/II trial recruiting TNBC patients. Gedatolisib (PF-05212384) show most clinical trial for TNBC patients, as also observed for Vistusertib (AZD2014). It shows that regardless the absence of a genetic signature for TNBC, the pharmaceutical companies are investing in PI3K/Akt/mTOR pathway to give some benefit for a group of patients with an aggressive subtype of breast cancer.

### 6.2. MAPK inhibitors

Other molecules that play a role in pathways related to cell growth and proliferation. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway inhibition remains a hopeful strategy to increase chemotherapy sensitivity. The precise mechanism of how the activated RAS-ERK cascade causes poor drug response is unknown. However, it seems that the Dual Specificity Phosphatase 4 (DUSP4) leads to residual breast cancer after neoadjuvant chemotherapy in basal-like breast cancer [121]. So, there is a hope that MEK inhibition could slow down the growth of residual breast cancer cells after chemotherapy and provide additional time for patients with metastatic disease [122]. Selumetinib (AZD6244) inhibitor has most clinical trials already completed but without results posted.

### 6.3. JAK/STAT inhibitors

The Janus kinase (JAK) and the signal transducers and activators of transcription (STAT) participate in pathways involved in cell proliferation. JAKs are non-RTKs that bind to the cytoplasmic tail of activates STAT transcription factors, stimulating the expression of cell-cycle regulators such as cyclins D1, D2, and E. Activation of JAK2/STAT5 was implicated in resistance to PI3K/mTOR inhibition in breast cancer cell lines [123], while IL6/JAK2/STAT3 pathway plays a role in the proliferation and metastatic spread of breast cancer cells [124]. Some JAK inhibitors are in clinical trials, like Ruxolitinib. It is an oral inhibitor of JAK1/2 that showed promising antitumoral activity combined with capecitabine in metastatic HER2-ve breast cancer [125]. However, it is also under evaluation in HER2 + ve and TNBC patients.

### 6.4. Receptor tyrosine kinase inhibitors

Another strategy relies on the inhibition of many RTKs at once, based on the receptor family or the following signaling pathway. The most known is the HER family, an ErbB class of RTKs consisting of four homologous proteins: HER1 (EGFR/ErbB1), HER2 (ErbB2/Neu), HER3 (ErbB3), and HER4 (ErbB4) [126]. Although many therapies in clinical use target HER, there are still some agents under evaluation like sapitinib (AZD8931). However, only the afatinib (BIBW2992) is dedicated to TNBC as neoadjuvant therapy in combination with paclitaxel.

The FGFR family comprises four transmembranes RTKs used as targets. The FGFR signaling is involved in cell proliferation, survival, differentiation, migration, and apoptosis during embryonic development and adult tissue homeostasis [127]. In ER + ve breast cancer, an aberrant *FGFR1* expression increases the poor prognosis rate [128]. The association of *FGFR1* and Cyclin D1 (*CCND1*) genes is related to shorter patient survival and possible endocrine resistance [129]. By another side, *FGFR2* seems to be the one preferentially amplified in TNBC [128]. AZD4547 is an inhibitor of FGFR1-3 applied to phase II trials for patients with ER + ve or HER2-ve tumors and metastatic settings of breast cancer. It has been evaluated as monotherapy or in combination with AI or fulvestrant. Another trial for FGFR1-4 inhibition in combination with fulvestrant and palbociclib is ongoing as phase I.

Other studies demonstrated the potential of the mesenchymal-epithelial transition (MET) receptor as a target in breast cancer. It is another RTK critical for physiologic functions, including angiogenesis and cell growth. Across all breast cancer subtypes, MET is overexpressed in

**Table 4**  
Main phase I/II clinical trials registered at [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)<sup>a</sup> evaluating potentials new targeted therapy for breast cancer with focus in Oncogenic Signaling Pathways.

| Agents                                                        | Mechanism of action | Phase; Status (NCT identifier)                       | Patients characteristics and disease setting                                | Combination therapy                                                                                               | Results                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PI3K/Akt/mTOR inhibitors</b><br><i>Picilisib (GDC0941)</i> | PI3K inhibitor      | Phase Ib; Completed (NCT00960960)                    | ER + ve; locally recurrent or metastatic                                    | Paclitaxel; Paclitaxel plus Bevacizumab or plus Trastuzumab; Letrozole                                            | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase II; Completed (NCT01740336)                    | ER + ve; locally recurrent or metastatic                                    | Paclitaxel                                                                                                        | In patients with PIK3CA mutated tumors, the median PFS was 7.3 months for picilisib (n = 32) versus 5.8 months with placebo (n = 30; HR = 1.06) [95% CI: 0.52 to 2.12; p = 0.88]. |
|                                                               |                     | Phase II; Completed (NCT01437566)                    | ER + ve; metastatic                                                         | Fulvestrant                                                                                                       | The addition of Picilisib to Fulvestrant did not significantly improve PFS. The Picilisib dosing was limited by toxicity, potentially limiting its efficacy. No results posted.   |
|                                                               |                     | Phase Ib; Completed (NCT00928330)                    | HER2+ve; metastatic                                                         | Trastuzumab; T-DMI                                                                                                | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase Ib; Unknown (NCT02389842)                      | ER + ve, HER2+ve, PIK3CA mutant; metastatic                                 | Palbociclib; Palbociclib plus Tascelisib <sup>b</sup> (w/o Picilisib) <sup>b</sup>                                | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               | PI3K inhibitor      | Phase II; Completed (NCT02404844)                    | ER + ve, HER2+ve; locally advanced or metastatic                            | Tamoxifen                                                                                                         | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase I; Completed (NCT01513356)                     | ER + ve, HER2+ve; early BC, neoadjuvant treatment                           | No combination                                                                                                    | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase I; Completed (NCT01514776)                     | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                | Letrozole plus Ribociclib                                                                                         | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase II; Completed (NCT01572727)                    | HER2+ve; locally advanced or metastatic                                     | Paclitaxel                                                                                                        | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase II; Completed (NCT01923168)                    | ER + ve, HER2+ve; neoadjuvant treatment of postmenopausal patient           | Letrozole; Letrozole plus Alpelisib <sup>b</sup>                                                                  | The DMG recommended stopping the study during the interim, as it met the protocol pre-specified futility criteria.                                                                |
| <b>Alpelisib (BVL719)</b>                                     | PI3K inhibitor      | Phase I/II; Active but not recruiting (NCT02792477)  | HER2+ve; locally recurrent or metastatic                                    | Nab-paclitaxel                                                                                                    | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase I; Recruiting (NCT02167854)                    | HER2 + ve; metastatic                                                       | Trastuzumab plus LM716 <sup>b</sup>                                                                               | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase Ib/II; Recruiting (NCT01872260)                | ER + ve; metastatic                                                         | Ribociclib                                                                                                        | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase Ib/II; Active but not recruiting (NCT02088684) | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                | Fulvestrant plus Ribociclib; Fulvestrant plus Ribociclib and Buparlisib <sup>b</sup> , w/o Alpelisib <sup>b</sup> | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase I; Active but not recruiting (NCT01870505)     | ER + ve; locally advanced unresectable or metastatic                        | Letrozole; Everestine                                                                                             | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase I/II; Recruiting (NCT02734615)                 | ER + ve; metastatic                                                         | LSZ102 <sup>b</sup>                                                                                               | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase II; Recruiting (NCT02506556)                   | HER2+ve; 2 <sup>nd</sup> line therapy for locally recurrent or metastatic   | No combination                                                                                                    | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase I; Active but not recruiting (NCT01300962)     | HER2 + ve; metastatic                                                       | Capcitabine; Capcitabine plus Trastuzumab or Lapatinib                                                            | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase II; Completed (NCT01923168)                    | ER + ve, HER2+ve; postmenopausal patients, neoadjuvant treatment            | Letrozole; Buparlisib <sup>b</sup>                                                                                | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase Ib; Not yet recruiting (NCT03207529)           | AR + ve, PTEN + ve; metastatic                                              | Enzalutamide <sup>b</sup>                                                                                         | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase Ib; Active but not recruiting (NCT02058381)    | HR + ve, HER2+ve; premenopausal patients, locally advanced or metastatic    | Tamoxifen plus Goserelin acetate                                                                                  | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase I; Active but not recruiting (NCT01791478)     | HR+ve; postmenopausal patients, metastatic                                  | Letrozole                                                                                                         | No results posted.                                                                                                                                                                |
|                                                               |                     | Phase I; Active but not recruiting (NCT02038010)     | HER2 + ve; metastatic patients who progress on prior Trastuzumab and Taxane | T-DMI                                                                                                             | No results posted.                                                                                                                                                                |

(continued on next page)

Table 4 (continued)

| Agents                    | Mechanism of action | Phase; Status (NCT identifier)                         | Patients characteristics and disease setting                                                                            | Combination therapy                                                                                                                                                                                  | Results                                                                          |
|---------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Tosolab<br>(GDC-0032)     | PI3K inhibitor      | Phase II; Recruiting<br>(NCT0066755)                   | HR + ve, HER2-ve, metastatic, PIK3CA mutations; disease progression on/after CDK4/6 treatment with an AI or Fulvestrant | Fulvestrant;<br>Letrozole                                                                                                                                                                            | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Completed<br>(NCT02273973)                   | ER + ve; postmenopausal patients; neoadjuvant treatment                                                                 | Letrozole                                                                                                                                                                                            | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Recruiting<br>(NCT02590427)                  | HER2 + ve; metastatic                                                                                                   | T-DMI; Trastuzumab plus Pertuzumab                                                                                                                                                                   | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Recruiting<br>(NCT02457910)                  | TNBC; AR + ve; metastatic                                                                                               | Erlotinamide <sup>§</sup>                                                                                                                                                                            | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase I/II; Recruiting<br>(NCT02285179)                | ER and/or PR + ve, HER2-ve; recurrent or metastatic                                                                     | Tamoxifen                                                                                                                                                                                            | No results posted.                                                               |
| Capromab<br>(RAY 80-6946) | PI3K inhibitor      | Phase II; Recruiting<br>(NCT02703859)                  | HER2 + ve; metastatic                                                                                                   | Trastuzumab                                                                                                                                                                                          | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Not yet recruiting<br>(NCT03377101)          | ER + ve, HER-ve; metastatic                                                                                             | Fulvestrant plus Palbociclib                                                                                                                                                                         | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase I/II; Recruiting<br>(NCT03128619)                | ER + ve, HER2-ve; all stages                                                                                            | Letrozole plus Palbociclib                                                                                                                                                                           | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase I/II; Completed<br>(NCT01082068)                 | ER + ve; recurrent or metastatic; refractory to a nonsteroidal AI                                                       | Letrozole                                                                                                                                                                                            | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase I/II; Completed<br>(NCT01042925)                 | HER2 + ve; metastatic; progressed on a previous Trastuzumab-based therapy                                               | Trastuzumab;<br>Trastuzumab plus Paclitaxel                                                                                                                                                          | No results posted.                                                               |
| Caprosarab (AZD5363)      | Akt inhibitor       | Phase II; Completed<br>(NCT02077569)                   | ER + ve; all stages                                                                                                     | No combination                                                                                                                                                                                       | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Active but not recruiting<br>(NCT02423603)   | TNBC; metastatic                                                                                                        | Paclitaxel                                                                                                                                                                                           | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase I/II; Active but not recruiting<br>(NCT01625286) | ER + ve, HER2-ve; metastatic                                                                                            | Paclitaxel                                                                                                                                                                                           | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Active but not recruiting<br>(NCT01992952)   | ER + ve; postmenopausal patient; metastatic                                                                             | Fulvestrant                                                                                                                                                                                          | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Recruiting<br>(NCT03182634)                  | ER + ve, HER2 + ve; allowed; metastatic or locally recurrent                                                            | Fulvestrant                                                                                                                                                                                          | No results posted.                                                               |
| MK2206                    | AKT inhibitor       | Phase II; Recruiting<br>(NCT02299999)                  | HER2-ve; stage IV; metastatic; personalized medicine based on genetic analysis as therapeutic decision tool             | Targeted maintenance; no combination                                                                                                                                                                 | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Completed<br>(NCT01263145)                   | N.A.; metastatic                                                                                                        | Paclitaxel                                                                                                                                                                                           | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Completed<br>(NCT01495247)                   | HER2-ve; locally advanced or metastatic                                                                                 | Paclitaxel                                                                                                                                                                                           | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Completed<br>(NCT01471847)                   | HER2 + ve; failed prior to Trastuzumab therapy                                                                          | Trastuzumab                                                                                                                                                                                          | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Completed<br>(NCT01248494)                   | ER + ve; postmenopausal patients; metastatic                                                                            | Letrozole;<br>Letrozole plus Buparlisib <sup>§</sup> , w/o Dactolisib <sup>§</sup>                                                                                                                   | No results posted.                                                               |
| Dactolisib (NCT235)       | PI3K/mTOR inhibitor | Phase II; Completed<br>(NCT01285466)                   | HER2 + ve; locally advanced or metastatic                                                                               | Paclitaxel; Paclitaxel plus Trastuzumab; Buparlisib <sup>§</sup> plus Paclitaxel, w/o Dactolisib <sup>§</sup> ; Buparlisib <sup>§</sup> plus Paclitaxel and Trastuzumab, w/o Dactolisib <sup>§</sup> | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase I/II; Completed<br>(NCT01082068)                 | HER2 + ve; locally advanced or metastatic                                                                               | Trastuzumab;<br>Letrozole                                                                                                                                                                            | No results posted.                                                               |
|                           |                     | Phase II; Terminated<br>(NCT01430585)                  | ER + ve, HER2-ve; early BC                                                                                              | Letrozole                                                                                                                                                                                            | 14 participants analyzed (SARs = 7; AEs = 14). No statistical analysis provided. |
|                           |                     | Phase I/II; Recruiting<br>(NCT02723877)                | TNBC; HER2-ve; locally advanced or metastatic                                                                           | Erlotinib                                                                                                                                                                                            | No results posted.                                                               |
|                           |                     |                                                        |                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                      | (continued on next page)                                                         |

Table 4 (continued)

| Agents                                  | Mechanism of action | Phase; Status (NCT identifier)                                                  | Patients characteristics and disease setting                                                                | Combination therapy                                      | Results                                                                               |
|-----------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Gedolimab (P005 212384)                 | PI3K/mTOR inhibitor | Phase I: Recruiting (NCT03243331)                                               | TNBC; metastatic                                                                                            | PTK7-AUC <sup>8</sup>                                    | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase Ib/II: Not yet recruiting (NCT03400254)                                   | All patients; prevention of recurrent BC                                                                    | Hydroxychloroquine                                       | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase Ib: Recruiting (NCT02684032)                                              | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | Palbociclib plus Letrozole; Palbociclib plus Fulvestrant | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase Ib: Recruiting (NCT01920061)                                              | TNBC; metastatic                                                                                            | Docetaxel; Cisplatin; Docomifinib <sup>9</sup>           | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase Ib/IIa: Recruiting (NCT02583542)                                          | TNBC; metastatic                                                                                            | Selumetinib <sup>5</sup>                                 | No results posted.                                                                    |
| Vismotinib (AZD5363)                    | mTORC1/2 inhibitor  | Phase Ib: Active but not recruiting (NCT02208575)                               | TNBC; metastatic                                                                                            | Olaparib                                                 | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase I: Active but not recruiting (NCT01597388)                                | ER + ve; metastatic                                                                                         | Fulvestrant                                              | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase I/II: Active but not recruiting (NCT02599714)                             | ER + ve; metastatic                                                                                         | Palbociclib plus Fulvestrant                             | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase II: Active but not recruiting (NCT02216786)                               | ER + ve; metastatic                                                                                         | Fulvestrant                                              | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase I: Recruiting (NCT01884285)                                               | TNBC; metastatic                                                                                            | No combination                                           | No results posted.                                                                    |
| Sapanisertib (INK128, ML30128, TAK228)  | mTORC1/2 inhibitor  | Phase II: Recruiting (NCT02583986)                                              | HER2+ve, stage IV; metastatic, personalized medicine based on genetic analysis as therapeutic decision tool | Targeted maintenance; no combination                     | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase I: Recruiting (NCT02619669)                                               | ER + ve, HER2+ve, Stage II-III; adjuvant therapy                                                            | Tamoxifen                                                | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase Ib/II: Recruiting (NCT02049957)                                           | ER + ve, HER2+ve; neoadjuvant therapy                                                                       | Letrozole                                                | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase II: Recruiting (NCT03193853)                                              | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | Exemestane; Fulvestrant                                  | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase II: Recruiting (NCT02756364)                                              | TNBC; metastatic                                                                                            | TAK-117                                                  | No results posted.                                                                    |
| MAPK inhibitor<br>Selumetinib (AZD5363) | MEK1/2 inhibitor    | Phase I: Completed (NCT01313039)                                                | ≤ 10% ER expression; stage I-III                                                                            | No combination                                           | Only 4 patients were enrolled and of these 4 only 1 patient had evaluable study data. |
|                                         |                     | Phase II: Completed (NCT01160718)                                               | ER + ve and/or PR + ve, HER2 + ve allowed; metastatic                                                       | Fulvestrant                                              | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase II: Unknown (NCT02685657)                                                 | TNBC; early and locally advanced                                                                            | Docetaxel                                                | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase II: Terminated (NCT00780076)                                              | All patients based on predictive gene signature; metastatic                                                 | No combination                                           | No CBR reported.                                                                      |
|                                         |                     | Phase II: Recruiting (NCT02299999)                                              | HER2+ve, stage IV; metastatic, personalized medicine based on genetic analysis as therapeutic decision tool | Targeted maintenance; no combination                     | No results posted.                                                                    |
| JAK inhibitors<br>Ruxofitinib           | JAK1/2 inhibitor    | Phase II: Terminated (NCT02120417)                                              | HER2+ve; metastatic                                                                                         | Capcitabine                                              | Overall Survival (OS): HR = 0.932; p = 0.762; [80% CI: 0.694–1.252].                  |
|                                         |                     | Phase II: Recruiting (NCT02876302)                                              | Inflammatory TNBC; preoperative                                                                             | Pedixaxel; followed by Doxorubicin plus Cyclophosphamide | No results posted.                                                                    |
|                                         |                     | Phase II: Terminated (not enough responses to continue treatment) (NCT01562873) | All patients; metastatic or unresectable locally advanced with pT4c3 + ve                                   | No combination                                           | No Clinical Benefit Rate.                                                             |
|                                         |                     |                                                                                 |                                                                                                             |                                                          |                                                                                       |
|                                         |                     |                                                                                 |                                                                                                             |                                                          |                                                                                       |

(continued on next page)

Table 4 (continued)

| Agents                                                                              | Mechanism of action                            | Phase; Status (NCT identifier)                     | Patients characteristics and disease setting                                                                | Combination therapy                       | Results                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>HER2 inhibitors</b><br><i>Alectinib</i> (ZU052592)<br><i>Sapitinib</i> (AZD8931) | EGFR, HER2-4 inhibitor                         | Phase I/II: Recruiting (NCT02066532)               | HER2 + ve; metastatic                                                                                       | Trastuzumab (on for patients in phase II) | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     | EGFR, HER2-3 inhibitor                         | Phase II: Active but not recruiting (NCT02041429)  | Inflammatory TNBC; Preoperative                                                                             | Paclitaxel                                | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     |                                                | Phase II: Active but not recruiting (NCT01594216)  | ER + ve; metastatic                                                                                         | Exemestane                                | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     |                                                | Phase I: Recruiting (NCT03012230)                  | TNBC; metastatic                                                                                            | Pembrolizumab                             | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     |                                                | Phase II: Unknown (NCT02511847)                    | TNBC; neoadjuvant therapy                                                                                   | Paclitaxel                                | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
| <b>EGFR inhibitors</b><br><i>Trastuzumab</i> (Herceptin)                            | EGFR, HER2-3 inhibitor                         | Phase I: Terminated (NCT01596030)                  | HER2 + ve; early BC ineligible for Trastuzumab treatment                                                    | No combination                            | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     |                                                | Phase I/II: Completed (NCT00900627)                | Low HER2 expression; locally recurrent and/or metastatic                                                    | Paclitaxel                                | The primary statistical analysis of PFS was performed, but the planned analyses of OS at 50% maturity, and of PFS at 50% OS maturity were not performed.                                               |
|                                                                                     |                                                | Phase II: Terminated (Purity) (NCT01151215)        | ER + ve; locally advanced or metastatic                                                                     | Anastrozole                               | Did not found primary endpoint (PFS). An interim analysis with futility boundary was introduced based on an IDMC recommendation.                                                                       |
|                                                                                     |                                                | Phase I: Completed (NCT01003158)                   | All patients who are not eligible for hormonal and anti-cytotoxic therapy; metastatic                       | Paclitaxel                                | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     |                                                | Phase II: Recruiting (NCT02299999)                 | HER2-ve, stage IV; metastatic; personalized medicine based on genetic analysis as therapeutic decision tool | Targeted maintenance; no combination      | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
| <b>FGFR inhibitors</b><br><i>AZD4547</i>                                            | FGFR1-3 inhibitor                              | Phase II: Completed (NCT00958971)                  | HER2-ve; metastatic                                                                                         | No combination                            | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     |                                                | Phase IIa: Active but not recruiting (NCT01791985) | ER + ve; metastatic                                                                                         | Anastrozole; Letrozole                    | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     |                                                | Phase IIa: Completed (NCT01202591)                 | ER + ve; metastatic                                                                                         | Fulvestrant                               | Slow recruitment led to concerns that enrollment would not be completed in a realistic timeframe. This led to a business decision to terminate the enrollment.                                         |
| <b>Proteinase inhibitors</b><br><i>JAK42756493</i>                                  | FGFR1-4 inhibitor                              | Phase II: Recruiting (NCT02299999)                 | HER2-ve, stage IV; metastatic; personalized medicine based on genetic analysis as therapeutic decision tool | Targeted maintenance; no combination      | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                     |                                                | Phase IIb: Recruiting (NCT03238196)                | ER + ve; HER2-ve; FGFR amplified; metastatic                                                                | Fulvestrant plus Palbociclib              | No results posted.                                                                                                                                                                                     |
| <b>MET inhibitor</b><br><i>Thrombin</i> (ARQ197)                                    | MET inhibitor                                  | Phase II: Completed (NCT01575522)                  | TNBC; metastatic                                                                                            | No combination                            | 22 patients were enrolled. The overall response rate was 5% [95% CI: 0 to 25] and the 6-month progression-free survival (PFS) was 5% [95% CI: 0 to 25], with one patient achieving a partial response. |
| <b>Cytokines</b>                                                                    | MET inhibitor                                  | Phase IIb: Terminated (NCT03074878)                | HER2-ve; metastatic                                                                                         | Sunitinib                                 | Poor accrual so the study was halted.                                                                                                                                                                  |
|                                                                                     | MET, RET, VEGFR1-3, RET, FLT3, TIE2, TRAX, AXL | Phase II: Completed (NCT01738438)                  | TNBC; metastatic                                                                                            | No combination                            | Objective response rate: 9% [95% CI: 2, 26%].                                                                                                                                                          |
| <b>Pan-RTK inhibitor</b><br><i>Cobimetinib</i> (XL184)                              |                                                | Phase II: Recruiting (NCT02260531)                 | HER2 + ve; metastatic                                                                                       | Trastuzumab                               | No results posted.                                                                                                                                                                                     |

(continued on next page)

Table 4 (continued)

| Agents                                               | Mechanism of action                                         | Phase; Status (NCT identifier)                      | Patients characteristics and disease setting                                                                | Combination therapy                                         | Results                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dovitinib (TKI258)                                   | FGFR1-3, VEGFR, and PDGFR inhibitor                         | Phase II; Active but not recruiting (NCT01441947)   | ER + ve and/or PR + ve; HER2+ve; metastatic                                                                 | Fulvestrant                                                 | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Recruiting (NCT03316586)                  | TNBC, metastatic                                                                                            | Nivolumab                                                   | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase I/II; Terminated (NCT01484041)                | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | A1                                                          | Terminated (decision by company to cease development of dovitinib). No statistical analysis provided for Clinical Benefit Rate.                                                                                                                                                          |
|                                                      |                                                             | Phase II; Active but not recruiting (NCT01262027)   | HER2+ve, IBC, stage IV; local or distant relapse                                                            | No combination                                              | No statistical analysis provided for overall response, or safety analysis.                                                                                                                                                                                                               |
| Lactosmab                                            | FGFR1-3, VEGFR1-3, and PDGFR $\alpha$ and $\beta$ inhibitor | Phase II; Terminated (NCT01528345)                  | HER2+ve, HR + ve; locally advanced or metastatic                                                            | Fulvestrant                                                 | For the IGF pathway-amplified subgroup (n = 31), the median PFS was 10.9 [95% CI: 3.5 to 16.5] months vs 5.5 [95% CI: 3.5 to 16.4] months in the Dovitinib vs placebo arms, respectively (HR = 0.64; met the predefined superiority criteria). The population was smaller than expected. |
|                                                      |                                                             | Phase II; Active but not recruiting (NCT02202746)   | FGFR1 and 11q amplification status; 2 <sup>nd</sup> line therapy for metastatic                             | No combination                                              | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Nintedanib (BIBW1120)                                | FGFR1-3, VEGFR1-3, and PDGFR $\alpha$ and $\beta$ inhibitor | Phase II; Completed (NCT02053636)                   | ER + ve; metastatic                                                                                         | No combination                                              | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase I; Recruiting (NCT02619162)                   | ER + ve, HER2+ve; adjuvant therapy                                                                          | Letrozole                                                   | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Active but not recruiting (NCT02389764)   | HER2+ve, IBC; metastatic                                                                                    | Monotherapy                                                 | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Active but not recruiting (NCT01658462)   | HER+ve, locally recurrent or metastatic                                                                     | Doxetaxel                                                   | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Vandetanib (AZD6474)                                 | VEGFR2, EGFR and RET inhibitor                              | Phase I/II; Active but not recruiting (NCT01484080) | HER2+ve; early BC, neoadjuvant therapy                                                                      | Paclitaxel                                                  | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase I; Completed (NCT00496665)                    | All patients, stage IV; up to four prior chemotherapeutic regimens for metastatic disease                   | Metronomic chemotherapy (Cyclophosphamide and methotrexate) | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Terminated (NCT00481845)                  | ER + ve and/or PR + ve, stage I-III; neoadjuvant therapy                                                    | Anastrozole                                                 | Low accrual.                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                      |                                                             | Phase II; Completed (NCT00034918)                   | All patients; metastatic, previously treated with anthracycline and taxane with or w/o epirubicin           | No combination                                              | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Completed (NCT00494481)                   | All patients; metastatic, 2nd line treatment for advanced BC                                                | Doxetaxel                                                   | No statistical analysis provided.                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                      |                                                             | Phase II; Recruiting (NCT01934335)                  | All patients; early BC, neoadjuvant therapy                                                                 | No combination                                              | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Terminated (NCT00752986)                  | ER + ve; postmenopausal patient, metastatic                                                                 | Fulvestrant                                                 | No statistical analysis provided for Event Free Survival (primary endpoint).                                                                                                                                                                                                             |
|                                                      |                                                             | Phase II; Recruiting (NCT02530411)                  | ER + ve, HER2+ve; locally advanced or metastatic                                                            | Fulvestrant                                                 | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Recruiting (NCT02299999)                  | HER2+ve, stage IV; metastatic, personalized medicine based on genetic analysis as therapeutic decision tool | Targeted maintenance, no combination                        | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Recruiting (NCT02553860)                  | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | Fulvestrant                                                 | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Androgen Receptor Antagonist Enzalutamide (MDV-3100) | Androgen Receptor Antagonist                                | Phase II; Recruiting (NCT02553860)                  | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | Fulvestrant                                                 | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                      |                                                             | Phase II; Recruiting (NCT02553860)                  | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | Fulvestrant                                                 | No results posted.                                                                                                                                                                                                                                                                       |

(continued on next page)

Table 4 (continued)

| Agents                       | Mechanism of action                   | Phase; Status (NCT identifier)                        | Patients characteristics and disease setting                                                                | Combination therapy                                  | Results                                                                                                |
|------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Abiraterone</b>           | Androgen Receptor Antagonist          | Phase I: Completed (NCT01597193)                      | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | Anastrozole, or exemestane, or fulvestrant           | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase IIB: Recruiting (NCT02689427)                   | TNBC; AR + ve; neoadjuvant therapy                                                                          | Paclitaxel                                           | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Active but not recruiting (NCT02007512)     | ER + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | Exemestane                                           | PPS Enzalutamide vs. placebo: HR = 0.820 ( $p = 0.3631$ ).                                             |
|                              |                                       | Phase II: Active but not recruiting (NCT01889228)     | AR + ve, TNBC; metastatic                                                                                   | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Recruiting (NCT01889228)                    | TNBC/ER + ve, AR + ve; postmenopausal patient, neoadjuvant therapy                                          | Exemestane                                           | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Recruiting (NCT02676966)                    | AR + ve, TNBC; early BC                                                                                     | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Recruiting (NCT02750358)                    | AR + ve, HER2+ve; progressed on anti-HER2 therapy; metastatic                                               | Trastuzumab                                          | CBR = 23.6 [95% CI: 15.2 to 33.8].                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Active but not recruiting (NCT01889228)     | AR + ve, TNBC; metastatic                                                                                   | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Terminated (NCT02348281)                    | ER + ve, AR + ve, HER2+ve; metastatic or unresectable locally advanced disease                              | AI                                                   | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Recruiting (NCT02910050)                    | ER+ve, AR + ve, HER2+ve allowed if received prior trastuzumab; metastatic                                   | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Active but not recruiting (NCT00468715)     | AR + ve, TNBC; metastatic                                                                                   | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Recruiting (NCT03055312)                    | AR + ve, TNBC; metastatic                                                                                   | Palbociclib                                          | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase I/II: Recruiting (NCT02605486)                  | AR + ve, HER2+ve; metastatic                                                                                | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
| <b>Enzalutamide (OTx-24)</b> | Selective Androgen Receptor Modulator | Phase I/II: Recruiting (NCT03090165)                  | AR + ve, TNBC; metastatic                                                                                   | Ribociclib                                           | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase I/II: Unknown (NCT02353988)                     | AR + ve, TNBC; metastatic                                                                                   | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Recruiting (NCT02297999)                    | HER2+ve, stage IV; metastatic, personalized medicine based on genetic analysis as therapeutic decision tool | Targeted maintenance; no combination                 | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Terminated (NCT02368691)                    | AR + ve, TNBC; metastatic                                                                                   | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Recruiting (NCT02971761)                    | AR + ve, TNBC; metastatic                                                                                   | Pembrolizumab                                        | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Active but not recruiting (NCT02463032)     | ER + ve, AR + ve; locally advanced or metastatic                                                            | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Active but not recruiting (NCT01074970)     | TNBC; BRCA1/2 germline mutations; early BC, neoadjuvant therapy                                             | Cisplatin                                            | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Completed (NCT00664781)                     | BRCA1/2 germline mutations; locally advanced or metastatic                                                  | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase I: Active but not recruiting (NCT01623349)      | TNBC; metastatic                                                                                            | Buparlisib <sup>a</sup> , Alpelisib <sup>b</sup>     | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II/III: Recruiting (NCT03150576)                | TNBC and/or BRCA1/2 germline mutations; early BC, neoadjuvant therapy                                       | Paclitaxel and Carboplatin                           | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II/III: Active but not recruiting (NCT02208579) | TNBC; BRCA1/2 germline mutations; metastatic                                                                | Vistusertib <sup>c</sup> , Capivasertib <sup>d</sup> | No results posted.                                                                                     |
|                              |                                       | Phase II: Active but not recruiting (NCT00494234)     | BRCA1/2 germline mutations; metastatic                                                                      | No combination                                       | No statistical analysis provided for Confirmed Objective Tumor Response (According to RECIST Criteria) |
|                              |                                       |                                                       |                                                                                                             |                                                      | (continued on next page)                                                                               |
| <b>PARP inhibitors</b>       |                                       |                                                       |                                                                                                             |                                                      |                                                                                                        |
| <b>Rucaparib</b>             | PARP inhibitor                        | Phase II: Active but not recruiting (NCT01074970)     | TNBC; BRCA1/2 germline mutations; early BC, neoadjuvant therapy                                             | Cisplatin                                            | No results posted.                                                                                     |
| <b>Olaparib</b>              | PARP inhibitor                        | Phase II: Completed (NCT00664781)                     | BRCA1/2 germline mutations; locally advanced or metastatic                                                  | No combination                                       | No results posted.                                                                                     |
|                              | PARP inhibitor                        | Phase I: Active but not recruiting (NCT01623349)      | TNBC; metastatic                                                                                            | Buparlisib <sup>a</sup> , Alpelisib <sup>b</sup>     | No results posted.                                                                                     |

Table 4 (continued)

| Agents      | Mechanism of action | Phase; Status (NCT identifier)                      | Patients characteristics and disease setting                                   | Combination therapy                           | Results                                                         |
|-------------|---------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Niraparib   | PARP inhibitor      | Phase I; Completed (NCT01465418)                    | TNBC; BRCA1/2 germline mutations; locally advanced or metastatic               | Carboplatin                                   | No results posted.                                              |
|             |                     | Phase II; Recruiting (NCT02898007)                  | TNBC; metastatic                                                               | Oralispib <sup>b</sup>                        | No results posted.                                              |
|             |                     | Phase II; Not yet recruiting (NCT03167619)          | TNBC; locally advanced or metastatic                                           | Durvalumab                                    | No results posted.                                              |
|             |                     | Phase I; Active but not recruiting (NCT01945775)    | TNBC; locally advanced or metastatic                                           | Carboplatin; Paclitaxel                       | No results posted.                                              |
|             |                     | Phase I/II; Not yet recruiting (NCT03368729)        | HER2 +ve; progressed on at least one prior HER2-targeted therapies; metastatic | Trastuzumab                                   | No results posted.                                              |
| Tolazaparin | PARP inhibitor      | Phase I/II; Active but not recruiting (NCT02657889) | TNBC; locally advanced or metastatic                                           | Pembrolizumab                                 | No results posted.                                              |
|             |                     | Phase II; Recruiting (NCT02401347)                  | TNBC; HR deficiency or Mutation in HR Pathway. Genes; metastatic               | No combination                                | No results posted.                                              |
| Veliparib   | PARP inhibitor      | Phase II; Active but not recruiting (NCT02049116)   | BRCA1/2 germline mutations; locally advanced or metastatic                     | No combination                                | Objective Response Rate (ORR) = 37.1% [95% CI: 21.47 to 55.00]. |
|             |                     | Phase I; Completed (NCT01145430)                    | TNBC; metastatic                                                               | Pegylated liposomal Doxorubicin hydrochloride | No results posted.                                              |
|             |                     | Phase II; Active but not recruiting (NCT01506609)   | BRCA1/2 germline mutations; locally advanced or metastatic                     | Temozolomide; Carboplatin and Paclitaxel      | No results posted.                                              |
| Flasparib   | PARP inhibitor      | Phase I; Recruiting (NCT03075462)                   | TNBC; metastatic                                                               | Apatinib                                      | No results posted.                                              |

<sup>a</sup> Available at [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) until May/2018. <sup>b</sup> Agents under evaluation in clinical trial. **Abbreviation:** AE, adverse events; AI, aromatase inhibitor; AR-ve, androgen receptor negative; AR + ve, androgen receptor positive; BC, breast cancer; CBR, clinical benefit rate; DMAC, data monitoring committee; HR-ve, hormone receptor negative; HR + ve, hormone receptor positive; HR, homologous recombination; IBC, inflammatory breast cancer; MTB, molecular tumor board; PFS, progression-free survival; SAE, serious adverse events; RTK, receptor tyrosine kinase; N.A., not available.

at least 20–30% of cases, associated with worse survival. It is also preferential, but not exclusive, expressed in the basal-like subgroup, mostly represented by TNBC. Deregulation of MET receptor also plays a critical role in the development of acquired resistance to targeted agents, mainly HER2 family inhibitors, suggesting that HER2 and MET could have a synergistic effect in promoting tumor growth and aggressiveness. Therefore, MET seems a potential therapeutic target in TNBC; and the combined therapy targeting both MET and EGFR could give benefits for basal-like and TNBC patients [130–132]. However, the two clinical trial targeting MET in metastatic patients showed no effect.

Some therapies target a broad-spectrum of receptors tyrosine kinase (RTK). These pan-RTK inhibitors use multiple RTKs as targets to avoid the cell proliferation and differentiation, angiogenesis and survival, like Cabozantinib (XL184) that targets until ten molecules. It is under phase II trial recruiting ER + ve patients, as well as HER2-ve and TNBC patients. This experimental therapy showed an objective response rate (ORR) of 13.6% and clinical benefit rate (CBR) of 46.7% in ER + ve disease [133]. In another clinical trial, the Dovitinib (TKI258), a pan-inhibitor of FGFR1–3, VEGFR, and PDGFR presented antitumor activity in FGFR-amplified breast cancers. In a phase II trial, dovitinib was well tolerated in the heavily pretreated patients, but with an unconfirmed partial response or disease stabilization in patients with ER + ve and FGFR1-amplified breast cancer [134]. In another phase II clinical trial, dovitinib in combination with fulvestrant increased PFS in postmenopausal patients with HER2-ve, HR + ve breast cancer. The same molecules were targets for at least other two clinical trials, Lucitanib [135], and Nintedanib [136]. Vandetanib (AZD6474) agent targets VEGFR2, EGFR and RET during Transfection (RET). Most of its phase II clinical trials evaluate the efficiency in all patients, although showed negative results for metastatic breast cancer [137]. Sunitinib, sorafenib, and axitinib (VEGFR, PDGFR, and c-Kit inhibitors) have failed to improve outcomes in breast cancer [138].

It is notable one large trial (NCT02299999) that uses personalized medicine to determine the best therapy for each patient based on genetic analysis. They use the results as a therapeutic decision tool to be discussed and deliberated by a Molecular Tumor Board (MTB). Next, the patient forwards to one of the therapies with Akt, mTORC1/2, MEK1/2, EGFR/HER2-3, FGFR1-3, VEGFR2/EGFR/RET inhibitors or androgen receptor antagonist therapy, according to the specialists' decision.

Anyhow, some clinical trials evaluate many experimental drugs at once before they can assure the effectiveness of each one as standard treatment. It could cause some confusion about the contribution of each drug to the clinical outcome, lacking the possibility of understanding their role in the tumor regression and oncogenic cell regulation.

#### 6.5. Androgen receptor inhibitors

Androgen receptor (AR) signaling has become increasingly important as both a prognostic marker and potential therapeutic target in breast cancer. AR is a steroid-hormone activated transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily, a group that also includes the ER and PR. The AR binds mainly to androgens, is translocated to the nucleus, and stimulates transcription of androgen-responsive genes. Studies show that an AR/FOXA1/β-catenin complex binds to regulatory regions of the *ERBB3* gene and induces growth in ER-ve/HER2 + ve breast cancer cells. AR pathway shows a cross-talk with PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways. The majority of ER + ve tumors express the AR, as well as a moderate number of HER2 + ve tumors and nearly one-third of TNBC. AR expression seems associated with better outcomes in ER + ve early-stage disease. However, in HER2-amplified breast cancer, the studies show either no effect or association with poorer survival. In TNBC, the luminal AR subgroup showed the highest overall survival rate despite having the lowest rate of complete pathological response to neoadjuvant chemotherapy [139,140]. It suggests that AR-targeted therapy could be

useful in both ER + ve and ER-ve, also bringing some benefit for TNBC.

Bicalutamide and enzalutamide are non-steroidal peripherally selective anti-androgens that bind AR. Preliminary trials have demonstrated activity in patients with metastatic TNBC, and some phase I/II clinical trials evaluate bicalutamide, enzalutamide, and Enobosarm (GTx-24) for the treatment of metastatic AR + ve tumors. A phase II trial has reported 6-month Clinical Benefit Rate (CBR) of 19% with bicalutamide in AR + ve patients [141].

#### 6.6. PARP inhibitors

Some PARP inhibitors are already in clinical use but there also clinical trials for BRCA mutation targets. Olaparib, already approved for clinical use in breast cancer, is in phase I and phase II trials in combination with either approved drugs for other cancer types or other experimental drugs for TNBC tumor. Some trials are in combination with carboplatin and paclitaxel, after showing to be tolerable in phase I trials [142,143].

Rucaparib and Niraparib are PARP inhibitors already approved for other cancers, including ovarian cancer [144,145]. Veliparib showed good results in previous analysis. A phase 2 randomized trial was performed to screen the veliparib in combination with carboplatin in women in stage II/III breast cancer. Biomarkers assessments were in Mammprint and Targetprint assay, together with other molecular analysis. Veliparib-carboplatin plus standard therapy showed higher rates of complete pathological response compared to standard therapy alone in HER2-ve tumors, but specifically in TNBC [146].

PARP inhibitors are the agents that focus most on TNBC than other subtypes. Although there is a lack of a genetic profile for this subtype, the regulation of cell cycle can be a hopeful strategy to induce DFS and OS rates.

#### 6.7. Immunotherapy and cancer vaccines

Most recently, immunotherapeutic approaches have been exploiting both the high specificity of adaptive immune response and the immunological memory. The immune checkpoints can be seen, in physiological conditions, as an essential mechanism which regulates the proliferation, survival, and activity of cytotoxic cells, therefore avoiding host self-damage [147]. Morphological evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer is gaining evidence and clinical relevance, uncovering biomarkers for HER2 + ve and TNBC subtypes [148]. Antibodies against programmed cell death (PD-1), nivolumab, and pembrolizumab are approved for some cancers, but many others are under evaluation. PD-1 is a receptor expressed on many immune cells and belongs to the CD28 family of proteins. The PD-L1 ligand is broadly expressed, found not only on antigen presenting cells (APCs) and activated lymphocytes but also on non-lymphoid cells in the periphery [149]. The interactions between PD-1/PD-L1 suppress T-cell response via different mechanisms, like impairment of T-cell activation, induction of apoptosis in activated T-cells, or enhancement of regulatory T-cell functions. In both luminal and non-luminal cancers, the PD-L1 expression is positively associated with AKT phosphorylation, indicating a cross-talk with PI3K/Akt pathway [147,150]. The potential of the immunotherapy based on PD-1/PD-L1 inhibition in breast cancer is discussed in some reviews [151–154], but the real role of PD-1/PD-L1 in each subtype remains controversial and needs further analysis.

The whole immunotherapy field in breast cancer is still at a very early stage, but vaccines are the new pharmacologic strategy. Many different types of cancer vaccines are under development using distinct immunogenic sources represented by whole tumor lysates, tumor antigenic peptides, DNA, RNA, and viruses. Moreover, they can be combined with immunoadjuvants, which contribute to the immune stimulation [155]. Many clinical trials are based on autologous dendritic cells (DCs) or use the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for inducing immune responses by promoting antigen display

on DCs. These clinical trials recruit all subtypes of breast cancer types, but TNBC subtype is less covered. One phase II clinical trial (NCT02593227) proposes a vaccine for TNBC patients to prevent recurrence in the adjuvant setting. The vaccine strategy uses GM-CSF as adjuvant and targets the Folate Receptor Alpha (FRA), which shows limited expression in the healthy tissues but high expression in 86% of TNBCs.

Other strategies are under evaluation in TNBC patients. PVX-410 is a tetra-peptide vaccine against X-box binding protein 1 (XBP1), Syndecan-1 (CD138), and signaling lymphocytic activation molecule F7 (SLAMF7, also known as CD319, CRACC, and CS1). Since XBP1 and CD138 are over-expressed in TNBC tumors, this vaccine is in phase I clinical trial recruiting this group of patients (NCT02826434; NCT03362060). P10s-PADRE uses a strategy based on the tumor-associated carbohydrate antigens, conjugating carbohydrate-mimetic peptides of the Lewis Y (LeY) and the ganglioside GD2 (referred to as P10 s) with a Pan-T-cell epitope (PADRE). A phase I dose-escalation trial of P10s-PADRE plus adjuvant MONTANIDE ISA 51 V G evaluated patients with metastatic breast cancer. It was well-tolerated and induced functional antibodies, suggesting potential clinical benefit [156]. So, it is under phase II trial in TNBC patients (NCT02938442).

A promising phase I trial evaluates the CD105/Yb-1/SOX2/CDH3/MDM2-polyepitope plasmid DNA vaccine in patients with HER2-ve advanced stage breast cancer (NCT02157051). This plasmid DNA vaccine contains the expression vector pUMVC3 (pNGVL3) encoding epitopes of Endoglin (CD105), Y-box binding protein 1 (Yb-1), SRY-box 2 (SOX2), cadherin 3 (CDH3), and mouse double minute 2 (MDM2) proteins. It should generate a specific memory Th1 (T-helper) cell immune response, stimulates secretion of cytokines by the T cells and leads to a cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response against CD105/Yb-1/SOX2/CDH3/MDM2-expressing tumor cells. MDM2 is a negative regulator of p53 and regulates cell cycle progression, and it is over-expressed in about 20% of breast cancer [157]. Sox2 levels are higher in patients who developed tamoxifen resistance, which seems to be driven by Sox2-dependent activation of Wnt signaling in cancer stem/progenitor cells [158]. Regarding CDH3/P-cadherin, there is a link between the P-cadherin expression and the lack of ER- $\alpha$  signaling in breast cancer cells, strongly associated with tumor aggressiveness and a good indicator of clinical outcome [159].

Immunogenic molecules can be a great solution for stimulating the patients' system response against the oncogenic cells. It could be the most 'natural' way of reestablishing the control of the damaged tissue. However, we are far beyond the full comprehension of the immune system regulation and performance, mainly in different cancer settings.

## 7. Potential biomarkers for targeted therapy

Although some targets are under evaluation in clinical trials, some other molecules can be underlined for further analyses, aiming to overcome therapy resistance and the lack of TNBC targeted treatment. *FOXA1*, *ZNF217*, *SNAIL*, and *GRB7* genes emerge as potential biomarkers in breast cancer, not only as prognostic but also as targets for therapy.

*FOXA1* is a member of the Forkhead box (Fox) family of transcription factors able to bind to the chromatin and the promoter of more than 100 genes associated with metabolic processes, like regulation of cell cycle and signaling pathways [160,161]. It is an ER transcriptional modulator, playing a role in DNA interactions [162,163]. *FOXA1* overexpression can block the metastatic progression by inhibiting the expression of *P27* and *BRCA1* but promoting E-cadherin expression [164], becoming an excellent prognostic marker [163]. It is also predictive for chemosensitivity in ER + ve breast cancer [165], with the positivity of both *FOXA1* and *FOXP1* associated with a favorable prognosis in patients treated with tamoxifen [166,167]. Additionally, *FOXA1* is present in both Blueprint and Prosigna genetics panels, but not probed as a target for therapeutic approaches yet.

The *ZNF217* gene also encodes a transcription factor that interferes in survival pathways and deregulates apoptotic signals [168,169]. *ZNF217*-bound regions may be co-occupied with ER $\alpha$  and *FOXA1* at multiple ER $\alpha$  gene targets, including *ERBB3* [170], an RTK that mediates the PI3K/Akt, MEK/MAPK, and JAK/STAT signaling cascades. *ZNF217* is overexpressed in all breast tumors, related to poor prognostic [171], and implicated in resistance to Tamoxifen, Trastuzumab, and Paclitaxel therapies [169,172,173]. It does not take part of any genetic panel like the *ZNF533*, a transcription factor associated with longer disease-free survival [174] and included in Mammaprint assay, but have potential as a biomarker in targeted therapy for TNBC tumors.

A third transcription factor with potential as a biomarker in breast cancer is the *SNAIL*. It induces changes in the repertoire of expressed genes participating in cell differentiation, adhesion, cytoskeleton, apoptosis or metabolism in human breast carcinoma cells [175]. Its activation occurs through the RTK signaling triggered by FGF or EGF, which activates RAS-MAPK pathway and results in the phosphorylation of ERK and activation of *SNAIL*, stimulating cell migration in breast cancer [176]. Also, the absence of ER also results in aberrant expression of *SNAIL* and loss of expression of E-cadherin. High expression of *SNAIL* gene results in unfavorable clinic-pathological parameters and prognosis, together with worse outcome in ER + ve tumors [177], since activated *SNAIL* diminishes the ER activity maintaining the cell resistance to tamoxifen [178]. Therefore, *SNAIL* molecule could be a second-line targeted therapy in combination with RKT inhibitors or endocrine therapies.

The growth factor receptor-bound protein 7 (*Grb7*) is an adaptor protein, which participates in RTK signals to propagate downstream events. *Grb7* is encoded alongside and is co-amplified with *HER2* protein in both TNBC and *HER2*-overexpressed breast cancer subtypes [179,180]. It is associated with cell invasion and survival, elevated risk of recurrence, and poor outcomes [181,182]. Remarkably, *Grb7* takes part in many genetic signature assays (Blueprint, Theraprint, Oncotype Dx and Prosigna), which reinforces its potential as a therapeutic target in TNBC cancer.

Although these molecules are not yet used as biomarkers, they are involved in key points of cell regulation and contributes to the cancer development and maintenance. It is necessary to be aware that they are tricky molecules, affecting many pathways once most of them are transcription factors that regulate different genes involved in a complex network. The use of these molecules requires further analysis to understand how to modulate them tightly, aiming to reestablish the cell control and give benefits to the breast cancer patients.

## 8. Conclusion

The evolution of the molecular technology allowed the identification of different genetic profile in breast cancer and contributed to the era of precision medicine. It is undeniable all the benefits intricated in this evolution, but much more we look forward being personalized more we realize the complex network that sustains the body balance.

Comprehensive genomic profiling is revealing targetable molecules and stratifying tumors by their potential sensitivity to targeted therapies and immunotherapies. However, the heterogeneity of the breast cancer makes difficult the identification of a perfect genetic signature for each subtype. By another side, the breast cancer therapies target to one or more molecules that participate in many pathways, trying to reestablish the cell control. Thus, it is not uncommon to have approved chemotherapy drugs and combination regimens that show clinical responses, but the mechanism of action is not entirely understood.

It is necessary to look beyond and develop strategies for understanding the influence of the race, ethnicity, and other clinical aspects that can influence the development and maintenance of different breast cancer subtypes. It could help to improve our knowledge about the biology of this cancer, and also support the medical decisions for every patient.

### Authors' contributions

RLNG and GML reviewed and discussed all literature. NBA contributed to the discussion of the biomarkers. JLLF, CHMC and DBGM conceived the study, analyzed and critically reviewed the data. All authors contributed substantially to the present manuscript.

### Conflict of interest

None.

### Acknowledgments

This study was supported by Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE). Authors thank to Vinicius Tigre for the figure design.

### References

- [1] A. Mora, M. Taranta, N. Zaki, E. Badidi, C. Clinti, E. Capobianco, Ensemble inference by integrative cancer networks, *Front. Genet.* 5 (2014), <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00059> 446–5.
- [2] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, et al., GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 v1.0 - IARC CancerBase No. 11, (2012).
- [3] A. Jemal, M.M. Center, C. DeSantis, E.M. Ward, Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19 (2010) 1893–1907, <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0437>.
- [4] L.A. Renfro, M.-W. An, S.J. Mandrekar, Precision oncology: a new era of cancer clinical trials, *Cancer Lett.* 387 (2017) 121–126, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.015>.
- [5] P. Eroles, A. Bosch, J.A. Pérez-Fidalgo, A. Lluch, Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways, *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 698–707, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>.
- [6] A. Bettaieb, C. Paul, S. Planchette, J. Shan, L. Chouchane, F. Ghiringhelli, Precision medicine in breast cancer: reality or utopia, *J. Transl. Med.* 15 (2017) 139, <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-017-1239-z>.
- [7] J. Korkola, J.W. Gray, Breast cancer genomes - form and function, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20 (2010) 4–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgd.2009.11.005>.
- [8] R. Roy, J. Chun, S.N. Powell, BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection, *Nat. Rev. Immunol.* 12 (2011) 68–78, <http://dx.doi.org/10.1038/nri3181>.
- [9] W.D. Foulkes, A.Y. Shuen, In brief: BRCA1 and BRCA2, *J. Pathol.* 230 (2013) 347–349, <http://dx.doi.org/10.1002/path.4205>.
- [10] F.J. Couch, K.L. Nathanson, K. Offit, Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention, *Science* 343 (2014) 1466–1470, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1251827>.
- [11] K.L. Nathanson, R. Wooster, B.L. Weber, K.N. Nathanson, Breast cancer genetics: what we know and what we need, *Nat. Med.* 7 (2001) 552–556, <http://dx.doi.org/10.1038/87876>.
- [12] L.J. Van't Veer, H. Dai, M.J. van de Vijver, Y.D. He, A.A.M. Hart, M. Mao, et al., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature* 415 (2002) 530–536, <http://dx.doi.org/10.1038/415530a>.
- [13] C. Sotiriou, P. Wotipati, S. Loi, A. Harris, S. Fox, J. Smeets, et al., Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 262–272, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djj052>.
- [14] K. Tomczak, P. Czerwikowska, M. Wizerowicz, The cancer genome atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge, *Contemp. Oncol. (Pozn)* 19 (2015) A68–77, <http://dx.doi.org/10.5114/wo.2014.47136>.
- [15] J. Liu, T. Lichtenberg, L.M. Poisson, C.C. Benz, D.A. Levine, A.V. Lee, et al., An integrated TCGA Pan-cancer clinical data Resource to Drive High-quality survival outcome analytics, *Cell* 173 (2018) 400–416, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.052> e11.
- [16] R.L. Grossman, A.P. Heath, V. Ferretti, H.E. Varmus, D.R. Lowy, W.A. Kibbe, et al., Toward a shared vision for cancer genomic data, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1109–1112, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp1607591>.
- [17] J.S. Ross, L.M. Gay, Comprehensive genomic sequencing and the molecular profiles of clinically advanced breast cancer, *Pathology* 49 (2017) 120–132, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathol.2016.11.005>.
- [18] Y. Yuan, S.E. Yost, Y.-C. Yuan, N.M. Solomon, I. Mambetsariev, S. Pal, et al., Genomic mutation-driven metastatic breast cancer therapy: a single center experience, *Oncotarget* 8 (2017) 26414–26423, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.14476>.
- [19] B. Pereira, S.-F. Chin, O.M. Rueda, H.-K.M. Volland, E. Provenzano, H.A. Bardwell, et al., The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes, *Nat. Commun.* 7 (2016) 11479, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11479>.
- [20] C. Lefebvre, T. Bachelot, T. Filleron, M. Campone, J.-C. Soria, et al., Mutational profile of metastatic breast cancers: a retrospective analysis, *PLoS Med.* 13 (2016) e1002201, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002201>.
- [21] J.-Y. Kim, E. Lee, K. Park, W.-Y. Park, H.H. Jung, J.S. Ahn, et al., Clinical implications of genomic profiles in metastatic breast cancer with a focus on TP53 and PIK3CA, the most frequently mutated genes, *Oncotarget* 8 (2017) 27997–28007, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.15881>.
- [22] C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, et al., Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406 (2000) 747–752, <http://dx.doi.org/10.1038/35021093>.
- [23] A. Prat, J.S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J.I. Herschkowitz, et al., Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer, *Breast Cancer Res.* 12 (2010) R68, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2635>.
- [24] A.C. Wolff, M.E.H. Hammond, D.G. Hicks, M. Dowsett, L.M. McShane, K.H. Allison, et al., Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical practice guideline update, *J. Clin. Oncol.* 31 (2013) 3997–4013, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9984>.
- [25] M. Gnant, N. Harbeck, C. Thomssen, St. Gallen 2011: summary of the consensus discussion, *Breast Care* 6 (2011) 136–141, <http://dx.doi.org/10.1159/000328054>.
- [26] F. Andre, M. Arnedos, A. Goubar, A. Ghouadni, S. Delaloge, Ki67—no evidence for its use in node-positive breast cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12 (2015) 296–301, <http://dx.doi.org/10.1038/nrclino.2015.46>.
- [27] A.S. Coates, E.P. Winer, A. Goldhirsch, R.D. Gelber, M. Gnant, M. Piccart-Gebhart, et al., Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer, *Ann. Oncol.* 26 (2015) 1533–1546, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv221>.
- [28] G. Curigliano, H.J. Burstein, E.P. Winer, M. Gnant, P. Dubsky, S. Loibl, et al., De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International expert consensus Conference on the primary therapy of early breast cancer 2017, *Ann. Oncol.* (2017) 1700–1712, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx308>.
- [29] N. Pathmanathan, R.L. Baileine, Ki67 and proliferation in breast cancer, *J. Clin. Pathol.* 66 (2013) 512–516, <http://dx.doi.org/10.1136/clinpath-2012-201085>.
- [30] C.X. Ma, M.J. Ellis, The cancer genome atlas: clinical applications for breast cancer, *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 27 (2013) 1263–9, 1274–9.
- [31] D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, et al., Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science* 244 (1989) 707–712, <http://dx.doi.org/10.1126/science.244.5393.707>.
- [32] S. Verma, A.A. Joy, D. Rayson, D. McLeod, C. Brezden-Masley, J.-F. Boileau, et al., HER story: the next chapter in HER-2-directed therapy for advanced breast cancer, *Oncologist* 18 (2013) 1153–1166, <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0217>.
- [33] E.A. Rakha, M. Pignera, A. Shaaban, S.J. Shin, T. D'Alfonso, I.O. Ellis, et al., National guidelines and level of evidence: comments on some of the new recommendations in the American society of clinical oncology and the College of American pathologists human epidermal growth factor receptor 2 guidelines for breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 33 (2015) 1301–1302, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2014.59.7211>.
- [34] S.K. Santuario-Facio, S. Cardona-Huerta, Y.X. Perez-Paramo, V. Trevino, F. Hernandez-Cabreria, A. Rojas-Martinez, et al., A New Gene expression signature for triple negative breast cancer using frozen fresh tissue before neoadjuvant chemotherapy, *Mol. Med. (Camb., Mass.)* 23 (2017), <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2016.00257>.
- [35] B.D. Lehmann, J.A. Bauer, X. Chen, M.E. Sanders, A.B. Chakravarthy, Y. Shyr, et al., Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and pre-clinical models for selection of targeted therapies, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 2750–2767, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI45014>.
- [36] M.D. Burstein, A. Tsimelzon, G.M. Poage, K.R. Covington, A. Contreras, S.A.W. Fuqua, et al., Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 21 (2015) 1688–1698, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>.
- [37] F. Le Du, B.L. Eckhardt, B. Lim, J.K. Litton, S. Moulder, F. Meric-Bernstam, et al., Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget* 6 (2015) 12890–12908, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3849>.
- [38] C.K. Anders, V. Abramson, T. Tan, R. Dent, The evolution of triple-negative breast cancer: from biology to novel therapeutics, *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 35 (2016) 34–42, <http://dx.doi.org/10.14694/EDBK.159135>.
- [39] K. Dias, A. Dvorkin-Gheva, R.M. Hallett, Y. Wu, J. Hassell, G.R. Pond, et al., Claudin-Low breast cancer: clinical & pathological characteristics, *PLoS One* 12 (2017) e0168669, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0168669>.
- [40] L. Jing, L. Su, B.Z. Ring, Ethnic background and genetic variation in the evaluation of cancer risk: a systematic review, *PLoS One* 9 (2014), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097522> e97522–11.
- [41] D.H. Odierna, A. Afable-Munoz, O. Ikediobi, M. Beattie, S. Knight, M. Ko, et al., Early developments in gene-expression profiling of breast tumors: potential for increasing black-white patient disparities in breast cancer outcomes? *Per. Med.* 8 (2011) 669–679, <http://dx.doi.org/10.2217/pme.11.67>.
- [42] S. Goodison, Gene expression profiling of breast cancer in ethnic populations: an aid to Gene Discovery for the benefit of all, *Breast J.* 11 (2005) 89–91, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1075-122X.2005.21714.x>.
- [43] L. Fejerman, E. Ziv, Population differences in breast cancer severity, *Pharmacogenomics* 9 (2008) 323–333, <http://dx.doi.org/10.2217/14622416.9.3.323>.

- [44] A.C. Klassen, A. Pankiewicz, S. Hsieh, A. Ward, F.C. Curriero, The association of area-level social class and tobacco use with adverse breast cancer characteristics among white and black women: evidence from Maryland, 1992–2003, *Int. J. Health Geogr.* 14 (2015), <http://dx.doi.org/10.1186/s12942-015-0007-7> 175–10.
- [45] L.A. Carey, C.M. Perou, C.A. Livasy, L.G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, et al., Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study, *Jama* 295 (2006) 2492–2502, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>.
- [46] K.R. Bauer, M. Brown, R.D. Cress, C.A. Parise, V. Caggiano, Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer registry, *Cancer* 109 (2007) 1721–1728, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.22618>.
- [47] E.C. Dietze, C. Sistrunk, G. Miranda-Carboni, R. O'Regan, V.L. Seewaldt, Triple-negative breast cancer in African-American women: disparities versus biology, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 248–254, <http://dx.doi.org/10.1038/nri3896>.
- [48] S.A. Joslyn, Hormone receptors in breast cancer: racial differences in distribution and survival, *Breast Cancer Res. Treat.* 73 (2002) 45–59.
- [49] A. Januszewski, N. Tanna, J. Stebbing, Ethnic variation in breast cancer incidence and outcomes—the debate continues, *Br. J. Cancer* 110 (2014) 4–6, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.775>.
- [50] J.H. Silber, P.R. Rosenbaum, A.S. Clark, B.J. Glantonio, R.N. Ross, Y. Teng, et al., Characteristics associated with differences in survival among black and white women with breast cancer, *Jama* 310 (2013) 389–397, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.8272>.
- [51] C. Foster, D.G.R. Evans, R. Eeles, D. Eccles, S. Ashley, L. Brooks, et al., Predictive testing for BRCA1/2: attributes, risk perception and management in a multi-centre clinical cohort, *Br. J. Cancer* 86 (2002) 1209–1216, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6600253>.
- [52] O. Krijgsman, P. Roepman, W. Zwart, J.S. Carroll, S. Tian, F.A. de Snoo, et al., A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response, *Breast Cancer Res. Treat.* 133 (2012) 37–47, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1683-z>.
- [53] P. Roepman, H.M. Horlings, O. Krijgsman, M. Kok, J.M. Bueno-de-Mesquita, R. Bender, et al., Microarray-based determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 receptor status in breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 7003–7011, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0449>.
- [54] S. Loi, B. Haidich, C. Desmedt, F. Lallemand, A.M. Tutt, C. Gillet, et al., Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 1239–1246, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2006.07.1522>.
- [55] R.A. Bender MD, Senior Vice President, Medical Affairs for Oncology, Caris Life Sciences, Inc., F.A. de Snoo PhD, Director, Medical Affairs, Department of Medical Affairs, Agendia BV, Clinical utility of comprehensive microarray testing in early-stage breast cancer, *Oncol. Hematol. Rev. (US)* 07 (2011) 107. doi:10.17925/OHR.2011.07.2.107.
- [56] X.-J. Ma, R. Salunga, S. Dahiya, W. Wang, E. Carney, V. Durbecq, et al., A five-gene molecular grade index and HXB13.1L17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 2601–2608, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5026>.
- [57] J.M.S. Bartlett, J. Thomas, D.T. Ross, R.S. Seitz, B.Z. Ring, R.A. Beck, et al., Mammostrat as a tool to stratify breast cancer patients at risk of recurrence during endocrine therapy, *Breast Cancer Res.* 12 (2010) R47, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2604>.
- [58] B.M. Müller, E. Keil, A. Lehmann, K.-J. Winzer, C. Richter-Ehrenstein, J. Prinzler, et al., The EndoPredict Gene-expression assay in clinical practice – performance and impact on clinical decisions, *PLoS One* 8 (2013) e68252, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068252>.
- [59] A.M. Glas, A. Floore, L.J.M.J. Delahaye, A.T. Witteveen, R.C.F. Pover, N. Bakx, et al., Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test, *BMC Genomics* 7 (278) (2006), <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-7-278>.
- [60] J.S. Parker, M. Mullins, M.C.U. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, et al., Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 1160–1167, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370>.
- [61] T. Nielsen, B. Wallden, C. Schaper, S. Ferree, S. Liu, D. Gao, et al., Analytical validation of the PAM50-based prognostic breast cancer prognostic Gene signature assay and nCounter analysis system using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens, *BMC Cancer* 14 (177) (2014), <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-14-177>.
- [62] S. Paik, S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, et al., A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 2817–2826, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa041588>.
- [63] A. Sapino, P. Roepman, S.C. Linn, M.H.J. Snel, L.J.M.J. Delahaye, J. van den Akker, et al., MammaPrint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, *J. Mol. Diagn.* 16 (2014) 190–197, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.10.008>.
- [64] B. Györfy, C. Hatzis, T. Sanft, E. Hofstatter, B. Aktas, L. Pusztai, Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future, *Breast Cancer Res.* 17 (2015) 11, <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-015-0514-2>.
- [65] C.A. Drukker, J.M. Bueno-de-Mesquita, V.P. Retèl, W.H. van Harten, H. van Tinteren, J. Wesseling, et al., A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study, *Int. J. Cancer* 133 (2013) 929–936, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28082>.
- [66] E. Rutgers, M.J. Piccart-Gebhart, J. Bogaerts, S. Delaloge, L.V. Veer, I.T. Rubio, et al., The EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial is feasible: results of the pilot phase, *Eur. J. Cancer* 47 (2011) 2742–2749, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2011.09.016>.
- [67] P.M. Ravdin, L.A. Siminoff, G.J. Davis, M.B. Mercer, J. Hewlett, N. Gerson, et al., Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 980–991, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2001.19.4.980>.
- [68] F. Cardoso, M. Piccart-Gebhart, L. Van't Veer, E. Rutgers, T.R.A.N.S.B.I.G. Consortium, The MINDACT trial: the first prospective clinical validation of a genomic tool, *Mol. Oncol.* 1 (2007) 246–251, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2007.10.004>.
- [69] F. Cardoso, L.J. van't Veer, J. Bogaerts, I. Slaets, G. Viale, S. Delaloge, et al., 70- Gene signature as an aid to treatment decisions in early-stage breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 717–729, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1602253>.
- [70] R.R.L. Bastien, A. Rodriguez-Lescure, M.T.W. Ebbert, A. Prat, B. Munarriz, L. Rowe, et al., PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers, *BMC Med. Genomics* 5 (44) (2012), <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8794-5-44>.
- [71] S.K. Chia, V.H. Bramwell, D. Tu, L.E. Shepherd, S. Jiang, T. Vickery, et al., A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 4465–4472, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0286>.
- [72] M. Filippits, T.O. Nielsen, M. Rudas, R. Greil, H. Stöger, J. Jakesz, et al., The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 1298–1305, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1845>.
- [73] S. Holt, G. Bertelli, I. Humphreys, W. Valentine, S. Durrani, D. Pudney, et al., A decision impact, decision conflict and economic assessment of routine onco-type DX testing of 146 women with node-negative or pN1mi, ER-positive breast cancer in the U.K., *Br. J. Cancer* 108 (2013) 2250–2258, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.207>.
- [74] F.O. Ademuyiwa, A. Miller, T. O'Connor, S.B. Edge, M.A. Thorat, G.W. Sledge, et al., The effects of onco-type DX recurrence scores on chemotherapy utilization in a multi-institutional breast cancer cohort, *Breast Cancer Res. Treat.* 126 (2011) 797–802, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-010-1329-6>.
- [75] T.G. Frazier, K.R. Fox, J.S. Smith, C. Laronga, A. McSwain, D. Paul, et al., A retrospective study of the impact of 21-gene recurrence score assay on treatment choice in node positive micrometastatic breast cancer, *Pharmaceuticals (Basel)* 8 (2015) 107–122, <http://dx.doi.org/10.3390/ph8010107>.
- [76] J.A. Sparano, TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx), *Clin. Breast Cancer* 7 (2006) 347–350, <http://dx.doi.org/10.3816/CBC.2006.n.051>.
- [77] Z. Sun, A. Prat, M.C.U. Cheang, R.D. Gelber, C.M. Perou, Chemotherapy benefit for “ER-positive” breast cancer and contamination of nonluminal subtypes—waiting for TAILORx and RxPONDER, *Ann. Oncol.* 26 (2015) 70–74, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/ndu493>.
- [78] M. Filippits, M. Rudas, R. Jakesz, P. Dubsky, F. Fitzal, C.F. Singer, et al., A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 6012–6020, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0926>.
- [79] B. Györfy, Z. Benke, A. Linczky, B. Balázs, Z. Szállási, J. Timár, et al., RecurrenceOnline: an online analysis tool to determine breast cancer recurrence and hormone receptor status using microarray data, *Breast Cancer Res. Treat.* 132 (2011) 1025–1034, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1676-y>.
- [80] G.C. Wishart, C.D. Bajdik, E. Dicks, E. Provenzano, M.K. Schmidt, M. Sherman, et al., PREDICT plus development and validation of a prognostic model for early breast cancer that includes HER2, *Br. J. Cancer* 107 (2012) 800–807, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.338>.
- [81] S.K. Down, O. Lucas, J.R. Benson, G.C. Wishart, Effect of PREDICT on chemotherapy/trastuzumab recommendations in HER2-positive patients with early-stage breast cancer, *Oncol. Lett.* 8 (2014) 2757–2761, <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2014.2589>.
- [82] L.N. Harris, N. Ismaila, L.M. McShane, F. Andre, D.E. Collyar, A.M. Gonzalez-Angulo, et al., Use of biomarkers to Guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline, *J. Clin. Oncol.* 34 (2016) 1134–1150, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2015.65.2289>.
- [83] I. Krop, N. Ismaila, F. Andre, R.C. Bast, W. Barlow, D.E. Collyar, et al., Use of biomarkers to Guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update, *J. Clin. Oncol.* 35 (2017) 2838–2847, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2017.74.0472>.
- [84] J.M.S. Bartlett, J. Bayani, A. Marshall, J.A. Dunn, A. Campbell, C. Cunningham, et al., Comparing breast cancer multiparameter tests in the OPTIMA prelin trial: No test is more equal than the others, *J. Natl. Cancer Inst.* 108 (2016) djw050, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djw050>.
- [85] E. Espinosa, J.A.F. Vara, I.S. Navarro, A. Gámez-Pozo, Á. Pinto, P. Zamora, et al., Gene profiling in breast cancer: time to move forward, *Cancer Treat. Rev.* 37 (2011) 416–421, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.12.009>.
- [86] F. Montemurro, S. Di Cosimo, G. Arpino, Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive and hormone receptor-positive breast cancer: new insights into molecular interactions and clinical implications, *Ann. Oncol.* 24 (2013) 2715–2724, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdt287>.
- [87] J.S. Carroll, Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer, *Eur. J. Endocrinol.* 175 (2016) R41–R49, <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-16-0124>.

- [88] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials, *Lancet* 386 (2015) 1341–1352, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61074-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61074-1).
- [89] A.M. Brufsky, M.N. Dickler, Estrogen receptor-positive breast cancer: exploiting signaling pathways implicated in endocrine resistance, *Oncologist* 23 (2018) 528–539, <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0423>.
- [90] M.L. Gemignani, D.J. Hetzel, Current advances in endocrine therapy options for premenopausal women with hormone receptor positive breast cancer, *Gynecol. Oncol.* 147 (2017) 153–157, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.06.023>.
- [91] A.S. Bhatnagar, The discovery and mechanism of action of letrozole, *Breast Cancer Res. Treat.* 105 (2007) 7–17, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-007-9696-3>.
- [92] M. Dunk, The role of aromatase in the hormonal therapy of breast cancer, *Pathol. Oncol. Res.* 8 (2002) 87–92, doi:PAOR.2002.8.2.0087.
- [93] W.R. Miller, Aromatase inhibitors: mechanism of action and role in the treatment of breast cancer, *Semin. Oncol.* 30 (2003) 3–11, [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-7754\(03\)00302-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-7754(03)00302-6).
- [94] A. Tessari, S. Di Cosimo, D. Palmieri, Overview of diagnostic/targeted treatment combinations in personalized medicine for breast cancer patients, *Pharmacogenom. Pers. Med.* (2013) 1–20, <http://dx.doi.org/10.2147/PGPM.S53304>.
- [95] V.G. Kaklamani, W.J. Gradishar, Endocrine therapy in the current management of postmenopausal estrogen receptor-positive metastatic breast cancer, *Oncologist* 22 (2017) 507–517, <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0464>.
- [96] J. Baselga, M. Campone, M. Piccart, H.A. Burris, H.S. Rugo, T. Sahmoud, et al., Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 520–529, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1109653>.
- [97] S. Loibl, L. Gianni, HER2-positive breast cancer, *The Lancet*. 389 (2017) 2415–2429, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5).
- [98] C.A. Hudis, Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 39–51, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMr043186>.
- [99] S. Verma, D. Miles, L. Gianni, E. Krop, M. Welslau, J. Baselga, et al., Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 367 (2012) 1783–1791, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1209124>.
- [100] L. Moja, L. Tagliazue, S. Balduzzi, E. Parmelli, V. Pistotti, V. Guarneri, R. D'Amico, Trastuzumab containing regimens for early breast cancer, *Cochrane Database Syst. Rev.* (4) (2012), <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD006243.pub2> Art. No.: CD006243.
- [101] M. Barok, H. Joensuu, J. Isola, Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance, *Breast Cancer Res.* 16 (2014) 209, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3621>.
- [102] J. Baselga, R.E. Coleman, J. Cortés, W. Janni, Advances in the management of HER2-positive early breast cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 119 (2017) 113–122, <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.10.001>.
- [103] M.A. Dickson, Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 3379–3383, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1551>.
- [104] C.J. Sherr, D. Beach, G.I. Shapiro, Targeting CDK4 and CDK6: from Discovery to therapy, *Cancer Discov.* 6 (2016) 353–367, <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0894>.
- [105] U. Ashgar, A.K. Witkiewicz, N.C. Turner, E.S. Knudsen, The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 130–146, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4504>.
- [106] D. Tripathy, A. Bardia, W.R. Sellers, Ribociclib (LEE011): mechanism of action and clinical impact of this selective cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor in various solid tumors, *Clin. Cancer Res.* 23 (2017) 3251–3262, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3157>.
- [107] S.L. Sammons, D.L. Topping, K.L. Blackwell, H.R. +, HER2- advanced breast cancer and CDK4/6 inhibitors: Mode of action, clinical activity, and safety profiles, *Curr. Cancer Drug. Targets* 17 (2017) 637–649, <http://dx.doi.org/10.2174/15680096170330120452>.
- [108] S. Goel, M.J. DeCristo, A.C. Watt, H. BrinJones, J. Sceneay, B.B. Li, et al., CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity, *Nature* 548 (2017) 471–475, <http://dx.doi.org/10.1038/nature23465>.
- [109] G.N. Hortobagyi, S.M. Stemmer, H.A. Burris, Y.-S. Yap, G.S. Sonke, S. Paluch-Shimon, et al., Ribociclib as first-line therapy for HR-positive, advanced breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1738–1748, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1609709>.
- [110] R.S. Finn, M. Martin, H.S. Rugo, S. Jones, S.-A. Im, K. Gelmon, et al., Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1925–1936, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1607303>.
- [111] M.P. Goetz, M. Toi, M. Campone, J. Sohn, S. Paluch-Shimon, J. Huober, et al., MONARCH 3: abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 35 (2017) 3638–3646, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2017.75.6155>.
- [112] L. Varella, J. Abraham, M. Kruse, Revisiting the role of bevacizumab in the treatment of breast cancer, *Semin. Oncol.* 44 (2017) 273–285, <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.10.010>.
- [113] A.A. Turk, K.B. Wisniski, PARP inhibitors in breast cancer: bringing synthetic lethality to the bedside, *Cancer* 266 (2018) 66, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.31307>.
- [114] T. Jubin, A. Kadam, M. Jariwala, S. Bhatt, S. Sutariya, A.R. Gani, et al., The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival, *Cell Prolif.* 49 (2016) 421–437, <http://dx.doi.org/10.1111/cpr.12268>.
- [115] M. Robson, S.-A. Im, E. Senkus, B. Xu, S.M. Domchek, N. Masuda, et al., Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 523–533, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>.
- [116] A. Deyari, R.D. Sanam, S.R. Guggilla, V.R. Pidugu, N. Novac, Molecular biomarkers in clinical development: what could we learn from the clinical trial registry? *Per. Med.* 11 (2014) 381–393, <http://dx.doi.org/10.2217/pme.14.27>.
- [117] C. Leroy, P. Ramos, K. Cornille, D. Bonenfant, C. Fritsch, H. Voshol, et al., Activation of IGF1R/p110 $\beta$ /AKT/mTOR confers resistance to  $\alpha$ -specific PI3K inhibition, *Breast Cancer Res.* 18 (2016) 41, <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-016-0697-1>.
- [118] J.J. Lee, K. Loh, Y.-S. Yap, PI3K/ Akt/mTOR inhibitors in breast cancer, *Cancer Biol. Med.* 12 (2015) 342–354, <http://dx.doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0089>.
- [119] A. Tserga, I. Chatziandreou, N.V. Michalopoulos, E. Patsouris, A.A. Saetta, Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness, *Virchows Archiv.* (2016) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-016-1938-5>.
- [120] S.M. Maira, S. Pecchi, A. Huang, M. Burger, M. Knapp, D. Sterker, et al., Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available Pan-class I PI3-kinase inhibitor, *Mol. Cancer Ther.* 11 (2012) 317–328, <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0474>.
- [121] J.M. Balko, R.S. Cook, D.B. Vaught, M.G. Kuba, T.W. Miller, N.E. Bhola, et al., Profiling of residual breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies DUSP4 deficiency as a mechanism of drug resistance, *Nat. Med.* 18 (2012) 1052–1059, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2795>.
- [122] S. Rottenberg, J. Jonkers, MEK inhibition as a strategy for targeting residual breast cancer cells with low DUSP4 expression, *Breast Cancer Res.* 14 (2012) 324, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3327>.
- [123] A. Britschgi, R. Andraos, H. Brinkhaus, I. Klebba, V. Romanet, U. Müller, et al., JAK2/STAT3 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer, *Cancer Cell* 22 (2012) 796–811, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.10.023>.
- [124] L.L.C. Marotta, V. Almendro, A. Marusyk, M. Shiptsin, J. Schlemmer, S.R. Walker, et al., The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44<sup>+</sup> CD24<sup>−</sup> stem cell-like breast cancer cells in human tumors, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 2723–2735, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI44745>.
- [125] J. O'Shaughnessy, A. DeMichele, C.X. Ma, P. Richards, D.A. Yardley, G.S. Wright, et al., A randomized, double-blind, phase 2 study of ruxolitinib or placebo in combination with capecitabine in patients with advanced HER2-negative breast cancer and elevated C-reactive protein, a marker of systemic inflammation, *Breast Cancer Res. Treat.* 19 (2018) 511, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-018-4770-6>.
- [126] R.L. Schroeder, C.L. Stevens, J. Sridhar, Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer, *Molecules* 19 (2014) 15196–15212, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190915196>.
- [127] E.M. Haugsten, A. Wiedlocha, S. Olsnes, J. Wesche, Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis, *Mol. Cancer Res.* 8 (2010) 1439–1452, <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0168>.
- [128] M. Katoh, Genetic alterations of FGF receptors: an emerging field in clinical cancer diagnostics and therapeutics, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 10 (2014) 1375–1379, <http://dx.doi.org/10.1586/era.10.128>.
- [129] M. Cuny, A. Kramar, F. Courjal, V. Johannsdottir, B. Iacopetta, H. Fontaine, et al., Relating genotype and phenotype in breast cancer: the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations, *Cancer Res.* 60 (2000) 1077–1083.
- [130] Y.J. Kim, J.-S. Choi, J. Seo, J.-Y. Song, S.E. Lee, M.J. Kwon, et al., MET is a potential target for use in combination therapy with EGFR inhibition in triple-negative/basal-like breast cancer, *Int. J. Cancer* 134 (2014) 2424–2436, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28566>.
- [131] G. Minuti, L. Landi, MET deregulation in breast cancer, *Ann. Transl. Med.* 3 (2015) 181, <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.06.22>.
- [132] C.M. Ho-Yen, J.L. Jones, S. Kermorgant, The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review, *Breast Cancer Res.* 17 (2015) 52, <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-015-0547-6>.
- [133] S.M. Tolaney, H. Nechushtan, I.-G. Ron, P. Schöffski, A. Awada, C.A. Yashchak, et al., Cabozantinib for metastatic breast carcinoma: results of a phase II placebo-controlled randomized discontinuation study, *Breast Cancer Res. Treat.* 160 (2016) 305–312, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-016-4001-y>.
- [134] F. Andre, T. Bachelot, M. Campone, F. Dalenc, J.M. Perez-Garcia, S.A. Huvitz, et al., Targeting FGFR with Dovitinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 3693–3702, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0190>.
- [135] J.C. Soria, F. DeBraud, R. Bahlleda, B. Adamo, F. Andre, R. Dientsmann, et al., Phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors, *Ann. Oncol.* 25 (2014) 2244–2251, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/ndu390>.
- [136] F. Andre, J. Cortés, Rationale for targeting fibroblast growth factor receptor signaling in breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 150 (2015) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-015-3301-y>.
- [137] A. Morabito, M.C. Piccirillo, F. Falasconi, G. De Feo, A. Del Giudice, J. Bryce, et al., Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions, *Oncologist* 14 (2009) 378–390, <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0261>.
- [138] K.C. Aalders, K. Tryfonidis, E. Senkus, F. Cardoso, Anti-angiogenic treatment in breast cancer: facts, successes, failures and future perspectives, *Cancer Treat. Rev.* 53 (2017) 98–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.12.009>.
- [139] B. Rahim, R. O'Regan, AR signaling in breast cancer, *Cancers (Basel)* 9 (2017),

- <http://dx.doi.org/10.3390/cancers9030021>.
- [140] M. Kono, T. Fujii, B. Lim, M.S. Karuturi, D. Tripathy, N.T. Ueno, androgen receptor function and androgen receptor-targeted therapies in breast cancer: a review, *JAMA Oncol.* 3 (2017) 1266–1273, <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4975>.
  - [141] A. Gucalp, S. Tolane, S.J. Isakoff, J.N. Ingle, M.C. Liu, L.A. Carey, et al., Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 5505–5512, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3327>.
  - [142] J.-M. Lee, J.L. Hays, V.L. Chiou, C.M. Annunziata, E.M. Swisher, M.I. Harrell, et al., Phase I/II study of olaparib and carboplatin in women with triple negative breast cancer, *Oncotarget* 8 (2017) 79175–79187, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.16577>.
  - [143] R.A. Dent, G.J. Lindeman, M. Clemons, H. Wildiers, A. Chan, N.J. McCarthy, et al., Phase I trial of the oral PARP inhibitor olaparib in combination with paclitaxel for first- or second-line treatment of patients with metastatic triple-negative breast cancer, *Breast Cancer Res.* 15 (2013) R88, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3484>.
  - [144] A. Musella, E. Bardhi, C. Marchetti, L. Verdecchia, G. Santangelo, C. Sasso, et al., Rucaparib: an emerging PARP inhibitor for treatment of recurrent ovarian cancer, *Cancer Treat. Rev.* 66 (2018) 7–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.03.004>.
  - [145] L.J. Scott, Niraparib: first global approval, *Drugs* 77 (2017) 1029–1034, <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-017-0752-y>.
  - [146] H.S. Rugo, O.I. Olopade, A. DeMichele, C. Yau, L.J. Van't Veer, M.B. Buxton, et al., Adaptive randomization of veliparib-carboplatin treatment in breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 23–34, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoA1513749>.
  - [147] A. Ravelli, G. Rovello, D. Cretella, A. Cavazzoni, A. Biondi, M.R. Cappelletti, et al., Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: beyond the prognostic and predictive utility, *Tumour Biol.* 39 (2017), <http://dx.doi.org/10.1177/1010428317695023>.
  - [148] M.V. Dieci, N. Radosevic-Robin, S. Fineberg, G. van den Eynden, N. Ternes, F. Penault-Llorca, et al., Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: a report of the International immuno-oncology biomarker working group on breast cancer, *Semin. Cancer Biol.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.003>.
  - [149] K.C. Ohaegbulam, A. Assal, E. Lazar-Molnar, Y. Yao, X. Zang, Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway, *Trends Mol. Med.* 21 (2015) 24–33, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.10.009>.
  - [150] J.Y.S. Tsang, W.-L. Au, K.-Y. Lo, Y.-B. Ni, T. Hlaling, J. Hu, et al., PD-L1 expression and tumor infiltrating PD-1+ lymphocytes associated with outcome in HER2+ breast cancer patients, *Breast Cancer Res. Treat.* 162 (2017) 19–30, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-016-4095-2>.
  - [151] R.H. Vonderheide, S.M. Domchek, A.S. Clark, Immunotherapy for breast cancer: what are we missing? *Clin. Cancer Res.* 23 (2017) 2640–2646, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2569>.
  - [152] F. Bertucci, A. Gonçalves, Immunotherapy in breast cancer: the emerging role of PD-1 and PD-L1, *Curr. Oncol. Rep.* 19 (2017) 64, <http://dx.doi.org/10.1007/s11912-017-0627-0>.
  - [153] C. Solinas, L. Carbognin, P. De Silva, C. Criscitiello, M. Lambertini, Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: current state of the art, *Breast* 35 (2017) 142–150, <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2017.07.005>.
  - [154] A.D. Hartkopf, F.-A. Taran, M. Wallwiener, C.B. Walter, B. Krämer, E.-M. Grischke, et al., PD-1 and PD-L1 immune checkpoint blockade to treat breast cancer, *Breast Care* 11 (2016) 385–390, <http://dx.doi.org/10.1159/000453569>.
  - [155] R. Benedetti, C. Dell'Aversana, C. Giorgio, R. Astorri, L. Altucci, Breast cancer vaccines: New insights, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 8 (2017) 270, <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2017.00270>.
  - [156] L.F. Hutchins, I. Makhoul, P.D. Emanuel, A. Pennisi, E.R. Siegel, F. Jousheghany, et al., Targeting tumor-associated carbohydrate antigens: a phase I study of a carbohydrate mimetic-peptide vaccine in stage IV breast cancer subjects, *Oncotarget* 8 (2017) 99161–99178, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.21959>.
  - [157] A. Burgess, K.M. Chia, S. Haupt, D. Thomas, Y. Haupt, E. Lim, Clinical overview of MDM2/X-targeted therapies, *Front. Oncol.* 6 (2016) 7, <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2016.00007>.
  - [158] M. Piva, G. Domenici, O. Iriondo, M. Rábano, B.M. Simões, V. Comaills, et al., Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells, *EMBO Mol. Med.* 6 (2014) 66–79, <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201303411>.
  - [159] J. Paredes, A. Albergaria, J.T. Oliveira, C. Jerónimo, F. Milanezi, F.C. Schmitt, P. cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 5869–5877, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0059>.
  - [160] K.S. Zaret, J.S. Carroll, Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression, *Genes Dev.* 25 (2011) 2227–2241, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.176826.111>.
  - [161] K.H. Kaestner, The FoxA factors in organogenesis and differentiation, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20 (2010) 527–532, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2010.06.005>.
  - [162] A. Hurtado, K.A. Holmes, C.S. Ross-Innes, D. Schmidt, J.S. Carroll, FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response, *Nat. Genet.* 43 (2010) 27–33, <http://dx.doi.org/10.1038/ng.730>.
  - [163] M. Kawase, T. Toyama, S. Takahashi, S. Sato, N. Yoshimoto, Y. Endo, et al., FOXA1 expression after neoadjuvant chemotherapy is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast cancer, *Breast Cancer* (2015) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1007/s12282-013-0482-2>.
  - [164] H.O. Habashy, D.G. Powe, E.A. Rakha, G. Ball, C. Paish, J. Gee, et al., Forkhead-box A1 (FOXA1) expression in breast cancer and its prognostic significance, *Eur. J. Cancer* 44 (2008) 1541–1551, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.04.020>.
  - [165] C. Xu, Q. Wei, J. Guo, J.C. Zhou, J. Mei, Z.N. Jiang, et al., FOXA1 expression significantly predict response to chemotherapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients, *Ann. Surg. Oncol.* 22 (2015) 2034–2039, <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-014-4313-2>.
  - [166] Y. Hisamatsu, E. Tokunaga, N. Yamashita, S. Akiyoshi, S. Okada, Y. Nakashima, et al., Impact of FOXA1 expression on the prognosis of patients with hormone receptor-positive breast cancer, *Ann. Surg. Oncol.* 19 (2012) 1145–1152, <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-011-2094-4>.
  - [167] N. Ijichi, T. Shigekawa, K. Ikeda, K. Horie-Inoue, C. Shimizu, S. Saji, et al., Association of double-positive FOXA1 and FOXF1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients, *Horm. Cancer* 3 (2012) 147–159, <http://dx.doi.org/10.1007/s12672-012-0111-0>.
  - [168] G. Huang, S. Krig, D. Kowbel, H. Xu, B. Hyun, S. Volik, et al., ZNF217 suppresses cell death associated with chemotherapy and telomere dysfunction, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 3219–3225, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi352>.
  - [169] A. Thollet, J.A. Vendrell, L. Payen, S.E. Ghayad, S. Ben Larbi, E. Grisard, et al., ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-a in breast cancer cells, *Mol. Cancer* 9 (2010) 291, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-9-291>.
  - [170] S. Fretz, H. O'Geen, L.E. Littlepage, C. Simion, C.A. Sweeney, P.J. Farnham, et al., Global analysis of ZNF217 chromatin occupancy in the breast cancer cell genome reveals an association with ERalpha, *BMC Genomics* 15 (520) (2014), <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-520>.
  - [171] L.E. Littlepage, A.S. Adler, H. Kourou-Mehr, G. Huang, J. Chou, S.R. Krig, et al., The transcription factor ZNF217 is a prognostic biomarker and therapeutic target during breast cancer progression, *Cancer Discov.* 2 (2012) 638–651, <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0093>.
  - [172] J. Ma, H. Lyu, J. Huang, B. Liu, Targeting of erbB3 receptor to overcome resistance in cancer treatment, *Mol. Cancer* 13 (105) (2014), <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-13-105>.
  - [173] S.R. Krig, J.K. Miller, S. Fretz, L.A. Beckett, R.M. Neve, P.J. Farnham, et al., ZNF217, a candidate breast cancer oncogene amplified at 20q13, regulates expression of the ErbB3 receptor tyrosine kinase in breast cancer cells, *Oncogene* 29 (2010) 5500–5510, <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.289>.
  - [174] I. Sánchez-Navarro, A. Gámez-Pozo, Á. Pinto, D. Hardisson, R. Madero, R. López, et al., An 8-gene qRT-PCR-based gene expression score that has prognostic value in early breast cancer, *BMC Cancer* 10 (2010) 336, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-336>.
  - [175] G. Vetter, A. Le Béche, J. Muller, A. Muller, M. Moes, M. Yatskou, et al., Time-resolved analysis of transcriptional events during SNAIL-triggered epithelial to mesenchymal transition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385 (2009) 485–491, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.025>.
  - [176] B.N. Smith, L.J. Burton, V. Henderson, D.D. Randle, D.J. Morton, B.A. Smith, et al., Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2, *PLoS One* 9 (2014) e104987, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104987>.
  - [177] J.G.H. van Nes, E.M. de Kruijff, H. Putter, D. Faratian, A. Munro, F. Campbell, et al., Co-expression of SNAIL and TWIST determines prognosis in estrogen receptor-positive early breast cancer patients, *Breast Cancer Res. Treat.* 133 (2012) 49–59, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1684-y>.
  - [178] Y. Wang, J. Shi, K. Chai, X. Ying, B.P. Zhou, The role of snail in EMT and tumorigenesis, *Curr. Cancer Drug Targets* 13 (2013) 963–972.
  - [179] R.C.C. Lim, J.T. Price, J.A. Wilce, Context-dependent role of Grb7 in HER2+ve and triple-negative breast cancer cell lines, *Breast Cancer Res. Treat.* 143 (2014) 593–603, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-014-2838-5>.
  - [180] T. Bai, S.-W. Luoh, GRB-7 facilitates HER-2/Neu-mediated signal transduction and tumor formation, *Carcinogenesis* 29 (2008) 473–479, <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgm221>.
  - [181] O. Girkiz, V. Calvo, S.C. Pero, D.N. Krag, J.A. Sparano, P.A. Kenny, GRB7 is required for triple-negative breast cancer cell invasion and survival, *Breast Cancer Res. Treat.* 133 (2011) 607–615, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1822-6>.
  - [182] J.A. Sparano, L.J. Goldstein, B.H. Childs, S. Shak, D. Brassard, S. Badve, et al., Relationship between quantitative GRB7 RNA expression and recurrence after adjuvant anthracycline chemotherapy in triple-negative breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 7194–7203, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3357>.

## 4.2 ARTIGO ORIGINAL 2 – EXPRESSÃO DOS GENES SIRT1 E SIRT7 NO CÂNCER DE MAMA

### **Introdução**

O câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres no mundo e a segunda maior causa de morte em mulheres em países desenvolvidos. No Brasil, estimam-se 59.700 casos novos de câncer de mama para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. Além disso, o câncer de mama é reconhecido como uma doença complexa e heterogênea devido à diversidade de suas características moleculares, à variedade de múltiplos subtipos morfológicos e às diferenças observadas na resposta às terapias e aos desfechos clínicos obtidos pelos pacientes (INCA, 2017).

A identificação de alterações genéticas nas vias de sinalização envolvidas na migração, invasão, apoptose, controle do ciclo celular e angiogênese no câncer de mama aumentou a disponibilidade de terapias direcionadas ativas, o que pode oferecer um tratamento mais personalizado aos pacientes (O’SULLIVAN; LOPRINZI; HADDAD, 2018). Além de mutações gênicas, os mecanismos epigenéticos têm um papel importante na tumorigênese do câncer de mama (OH; WANG; MUSCAT, 2016). Estudos que avaliam regulações epigenéticas aberrantes no câncer de mama, enfocam desde o início de mecanismos moleculares no desenvolvimento do câncer, a identificação de novos biomarcadores implicados na agressividade do câncer de mama e as potenciais terapias epigenéticas. Nesse contexto, terapias com alvo em mecanismos epigenéticos no câncer de mama ainda não estão disponíveis na prática clínica corrente e carecem de maiores investimentos da comunidade científica (DE LUCA et al., 2017). Dentre os mecanismos epigenéticos, o processo de acetilação/deacetilação epigenética não é claramente estudado, sobretudo no que concerne ao papel das histonas deacetilases, como as sirtuínas (CHALKIADAKI; GUARENTE, 2015; DAMASKOS et al., 2017).

Sirtuínas são histonas deacetilases NAD<sup>+</sup> dependentes compostas por uma família de sete membros (SIRT1 a 7). As SIRT1 controlam a acetilação e a ribosilação com impacto nas modificações pós-traducionais e atividades biológicas de várias proteínas reguladoras a contento. Evidências demonstram que cada membro da família SIRT tem seu próprio papel biológico, com diferentes localizações e alvos intracelulares distintos, ora com potencial oncogênico, ora como supressor tumoral. As SIRT1 e 2 estão localizadas tanto no citoplasma quanto no núcleo, enquanto as SIRT3, 4 e 5 encontram-se nas mitocôndrias, a SIRT6 e SIRT7 estão localizadas exclusivamente no núcleo celular (SIROTKIN, 2016). Embora o papel da

SIRT1 e SIRT7 no câncer tenha sido debatido por causa de relatos conflitantes de sua atividade, muitos relatos recentes mostraram que a SIRT1 e SIRT7 tenham papel promotor de tumor (LEE et al., 2011). Tanto a SIRT1 como a SIRT7 têm sido envolvidas em vários tipos de câncer. No entanto, o papel preditivo e prognóstico das sirtuínas SIRT1 e SIRT7 no câncer de mama não foi claramente definido (WU et al., 2012; GENG et al., 2015).

Este estudo teve como objetivo avaliar o papel biológico da expressão das sirtuínas SIRT1 e SIRT7 em espécimes de câncer de mama e sua relação com características clínicas e tumorais de pacientes tratadas cirurgicamente numa população do Nordeste do Brasil.

## **Método**

### *Identificação de marcadores moleculares*

Inicialmente foi realizada revisão da literatura com foco nos principais biomarcadores moleculares, painéis de assinatura genética e atuais terapias alvo-molecular aprovadas para uso clínico no câncer de mama pelas principais agências reguladoras responsáveis pela aprovação e registro de medicamentos nos Estados Unidos (FDA - *Food and Drug Administration*), Europa (EMA - *European Medicines Agency*) e no Japão (PMDA - *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*). Sequencialmente, realizou-se uma pesquisa dos estudos clínicos de fase I e II com novas terapias alvo em câncer de mama registrados no banco de dados do *U.S. National Library of Medicine*, constante no sítio [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) até maio de 2018, utilizando os seguintes critérios de inclusão:

- Estudos que incluíram exclusivamente pacientes portadores de câncer de mama no cenário avançado ou inicial, independente do subtipo biológico ou da presença de marcadores moleculares reconhecidos ou ainda em avaliação;
- Estudos com terapias ainda não aprovadas para uso clínico, seja como medicação utilizada de forma isolada (monoterapia) ou em combinação de drogas;
- Novas terapias com foco em vias moleculares de sinalização oncogênica.

Foram excluídos da análise os estudos que apresentavam avaliações ou intervenções em pacientes que não eram portadores de câncer de mama, por exemplo, estudos que também incluíam pacientes com câncer de ovário, estômago, etc. Foram excluídos também os estudos não iniciados com recrutamento suspenso pelo investigador ou patrocinador.

O Metacore™ (Thomson Reuters, USA) foi utilizado para determinar os genes mais avaliados em diferentes regiões do mundo e estabelecer os genes de potencial prognóstico, preditivo que ainda não foram avaliados como alvos terapêuticos. O Metacore™ é um sistema

de processamento de dados para análise funcional de dados experimentais, baseado em um banco de dados curado de proteínas humanas, interações proteína-DNA, fatores de transcrição, vias de sinalização e metabólicas, doenças e toxicidade, e os efeitos de moléculas bioativas.

#### *Desenho e população do estudo*

Trata-se de um estudo de coorte, transversal e prospectivo, realizado com amostras tumorais frescas oriundas de coletas realizadas em pacientes portadoras de câncer de mama atendidas no serviço de mastologia do Hospital Barão de Lucena da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco com idade superior a 18 anos no período de agosto/2011 a outubro/2017. O estudo incluiu amostras de pacientes com diagnóstico histológico confirmado de câncer de mama e que consentiram participar da pesquisa através da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os pacientes foram incluídos de forma sequencial e obedeceram aos seguintes critérios de elegibilidade: (1) Pacientes do sexo feminino na pré ou pós-menopausa, portadoras de câncer de mama (invasivo) em qualquer estágio, conforme estadiamento proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC – 7ª edição), exceto estágio IV; (2) Pacientes com qualquer subtipo biológico ou qualquer *status* de receptor hormonal e HER2 por estudo imunohistoquímico; (3) Paciente com estágios I a III que eram candidatas a tratamento sistêmico adjuvante ou neoadjuvante, com performance funcional entre 0 e 1 (ECOG), com expectativa de vida superior a 3 meses, com indicação de tratamento estabelecido pelo médico assistente do serviço de oncologia e mastologia do Hospital Barão de Lucena – Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco. Os critérios de exclusão utilizados foram: (1) Foram excluídas do estudo pacientes grávidas ou em estado puerperal; (2) Pacientes sem resultado do estudo imunohistoquímico avaliado na amostra tumoral; (3) Pacientes portadores de tumores primários simultâneos ou com antecedente de outra neoplasia maligna; (4) Pacientes portadoras de doenças autoimunes, imunodeprimidas ou infectadas pelo HIV ou sob tratamento imunoterápico.

#### *Coletas de amostras tumorais*

Fragmentos de tecido tumoral foram obtidos através de biópsias de tecidos frescos durante procedimentos cirúrgicos diagnósticos ou curativos realizados dentro das indicações previamente estabelecidas pela rotina médica do serviço de mastologia do Hospital Barão de Lucena. O fornecimento do fragmento foi realizado sob supervisão do médico patologista e acondicionado em frasco contendo reagente preservante RNeasy<sup>®</sup> indicado para as análises laboratoriais. As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas, transportadas em

reservatório e depositadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE) para análises.

#### *Extração do material genético*

O RNA foi extraído através do kit comercial RNeasy Mini Kit-QIAGEN (Hilden, Alemanha) e em seguida realizada a síntese de cDNA por transcriptase reversa com o QuantiTect Reverse Transcription Kit-QIAGEN (Hilden, Alemanha). Os materiais extraídos foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise. O ácido nucléico eluído foi quantificado em NanoDrop ND-2000 NanoDroptecnologias- Thermo Fisher Scientific (Delaware, EUA) antes de ser utilizado nos testes moleculares.

#### *Análise de expressão gênica*

Foi realizada análise da expressão dos genes SIRT1 e 7 com os seguintes *primers*: Hs.PT.58.40382601 (NM\_012238), e Hs.PT.58.223299 (NM\_016538), respectivamente, fabricados pela IDT (Integrated DNA Technologies). O StepOnePlus™ Real-Time PCR System-Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EUA) foi utilizado para a quantificação da expressão gênica.  $\beta$ -actina foi utilizado como gene de referência para obtenção dos valores e  $\Delta\text{Ct}$ . Para verificar possíveis variações na expressão relativa dos genes alvo foi aplicado o método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , utilizando os valores obtidos em pacientes portadores de CDIS como calibrador.

#### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada empregando-se o software IBM SPSS Statistics versão 23. As variáveis estatísticas significantes foram calculadas pelo teste da razão de Verossimilhança, por conta que o teste Qui-quadrado de Pearson na maioria dos casos não pode ser computado por conter mais de 20% das células com valores esperados menores que 5, para determinar diferenças nas variáveis clínico-patológicas, subtipos biológicos e expressão gênica. A sobrevida global e a sobrevida livre de doença foram estimadas usando o método de Kaplan-Meier. A diferença entre curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença obtida na avaliação de fatores prognósticos foi calculada pelo método *log-rank*. Em todos os testes realizados considerou-se como estatisticamente significativo um valor de  $p \leq 0,05$  e marginalmente significativo um valor de  $p \leq 0,10$ . Não foi possível realizar a análise multivariada, pois apenas uma variável (etilismo) foi estatisticamente significativa. Os intervalos de confiança foram de 95%. A sobrevida global foi definida como o tempo transcorrido desde o diagnóstico da neoplasia até a última consulta realizada ou data do óbito.

### *Coletas de informações clínicas*

As informações sobre tipo tumoral, estadiamento patológico e grau histológico foram obtidas diretamente do laudo anatomopatológico registrado em prontuário. O registro de recidiva tumoral (recidiva de doença) obedeceu ao critério clínico-radiológico obedecido pelo médico assistente do paciente, com auxílio de quaisquer métodos radiológico disponíveis e por este interpretado. As informações sobre etnia ou raça, histórico familiar de câncer, etilismo, tabagismo, comorbidades (hipertensão ou diabetes) seguiu o registro em prontuário médico. Considerou-se obesidade o registro da informação em prontuário médico ou índice de massa corporal superior a 30 Kg/m<sup>2</sup>.

### *Aspectos éticos*

O estudo seguiu a resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, de modo que os pacientes que participaram da pesquisa concordaram com sua participação assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido onde foi garantida a confidencialidade dos voluntários, além de garantir que as amostras biológicas coletadas foram única e exclusivamente utilizadas para a execução deste projeto de pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS/UFPE) conforme Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 47869315.0.0000.5208 / Parecer número 1.215.006 e 1.514.112.

## **Resultados e Discussão**

### *Características clínicas e tumorais*

Cinquenta e cinco pacientes avaliadas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram incluídas nesta avaliação. Dessas, 52 estavam vivas (94,6%) e apenas 3 tinham evoluído para o óbito (5,4%). O tempo mediano para esta análise foi de 40 meses, sendo que o tempo mínimo foi de 6,23 meses (187 dias) e o tempo máximo de foi de 74,10 meses (6,1 anos). A Tabela 1 apresenta todas as variáveis selecionadas com suas categorizações e as frequências relativas bem como o número de eventos (óbitos) e censuras (vivos) ocorridos para cada variável e suas categorizações, durante o período de tempo na coorte composta por pacientes portadoras de câncer de mama.

**Tabela 1.** Descrição e frequência das variáveis pesquisadas segundo a censura (vivos) e falha (óbito) ocorridas durante o tempo de acompanhamento dos pacientes.

| Variáveis                          |               | Censura |       | Falha |       | Total |       | p-valor |
|------------------------------------|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
|                                    |               | n       | %     | n     | %     | n     | %     |         |
| <b>Idade</b>                       | <60           | 32      | 61,5  | 2     | 66,7  | 34    | 61,8  | 0,858   |
|                                    | >60           | 20      | 38,5  | 1     | 33,3  | 21    | 38,2  |         |
|                                    | Total         | 52      | 100,0 | 3     | 100,0 | 55    | 100,0 |         |
| <b>Etnia</b>                       | Branca        | 11      | 21,2  | 2     | 66,7  | 13    | 23,6  | 0,219   |
|                                    | Negra         | 7       | 13,5  | 0     | 0,0   | 7     | 12,7  |         |
|                                    | Parda         | 34      | 65,4  | 1     | 33,3  | 35    | 63,6  |         |
|                                    | Total         | 52      | 100,0 | 3     | 100,0 | 55    | 100,0 |         |
| <b>Etilismo</b>                    | Sim           | 6       | 12,2  | 1     | 33,3  | 7     | 13,5  | 0,361   |
|                                    | Não           | 43      | 87,8  | 2     | 66,7  | 45    | 86,5  |         |
|                                    | Total         | 49      | 100,0 | 3     | 100,0 | 52    | 100,0 |         |
| <b>Tabagismo</b>                   | Sim           | 10      | 20,0  | 0     | 0,0   | 10    | 18,9  | 0,255   |
|                                    | Não           | 40      | 80,0  | 3     | 100,0 | 43    | 81,1  |         |
|                                    | Total         | 50      | 100,0 | 3     | 100,0 | 53    | 100,0 |         |
| <b>Obesidade</b>                   | Sim           | 20      | 40,8  | 2     | 66,7  | 22    | 42,3  | 0,381   |
|                                    | Não           | 29      | 59,2  | 1     | 33,3  | 30    | 57,7  |         |
|                                    | Total         | 49      | 100,0 | 3     | 100,0 | 52    | 100,0 |         |
| <b>História Familiar de câncer</b> | Sim           | 26      | 54,2  | 2     | 66,7  | 28    | 54,9  | 0,669   |
|                                    | Não           | 22      | 45,8  | 1     | 33,3  | 23    | 45,1  |         |
|                                    | Total         | 48      | 100,0 | 3     | 100,0 | 51    | 100,0 |         |
| <b>Grau histológico</b>            | G2            | 27      | 55,1  | 1     | 33,3  | 28    | 53,8  | 0,461   |
|                                    | G3            | 22      | 44,9  | 2     | 66,7  | 24    | 46,2  |         |
|                                    | Total         | 49      | 100,0 | 3     | 100,0 | 52    | 100,0 |         |
| <b>Tamanho (T)</b>                 | T1            | 18      | 34,6  | 0     | 0,0   | 18    | 33,3  | 0,463   |
|                                    | T2            | 20      | 38,5  | 1     | 50,0  | 21    | 38,9  |         |
|                                    | T3            | 9       | 17,3  | 1     | 50,0  | 10    | 18,5  |         |
|                                    | T4            | 5       | 9,6   | 0     | 0,0   | 5     | 9,3   |         |
|                                    | Total         | 52      | 100,0 | 2     | 100,0 | 54    | 100,0 |         |
| <b>Linfonodo (N)</b>               | 0             | 27      | 51,9  | 2     | 100,0 | 29    | 53,7  | 0,466   |
|                                    | 1             | 13      | 25,0  | 0     | 0,0   | 13    | 24,1  |         |
|                                    | 2             | 8       | 15,4  | 0     | 0,0   | 8     | 14,8  |         |
|                                    | 3             | 4       | 7,7   | 0     | 0,0   | 4     | 7,4   |         |
|                                    | Total         | 52      | 100,0 | 2     | 100,0 | 54    | 100,0 |         |
| <b>Estadiamento</b>                | I             | 14      | 26,9  | 0     | 0,0   | 14    | 25,5  | 0,373   |
|                                    | II            | 21      | 40,4  | 2     | 66,7  | 23    | 41,8  |         |
|                                    | III           | 17      | 32,7  | 1     | 33,3  | 18    | 32,7  |         |
|                                    | Total         | 52      | 100,0 | 3     | 100,0 | 55    | 100,0 |         |
| <b>Tipo de Tratamento</b>          | Adjuvancia    | 35      | 72,9  | 2     | 66,7  | 37    | 72,5  | 0,817   |
|                                    | Neoadjuvancia | 13      | 27,1  | 1     | 33,3  | 14    | 27,5  |         |
|                                    | Total         | 48      | 100,0 | 3     | 100,0 | 51    | 100,0 |         |

|                                |                 |    |       |   |       |    |       |       |
|--------------------------------|-----------------|----|-------|---|-------|----|-------|-------|
| <b>Subtipos<br/>Biológicos</b> | Luminal A       | 16 | 30,8  | 0 | 0,0   | 16 | 29,1  | 0,092 |
|                                | Luminal B       | 25 | 48,1  | 1 | 33,3  | 26 | 47,3  |       |
|                                | Her2 +          | 6  | 11,5  | 0 | 0,0   | 6  | 10,9  |       |
|                                | Triplo Negativo | 5  | 9,6   | 2 | 66,7  | 7  | 12,7  |       |
| Total                          |                 | 52 | 100,0 | 3 | 100,0 | 55 | 100,0 |       |
| <b>Ki-67</b>                   | ≤14%            | 17 | 35,4  | 0 | 0,0   | 17 | 33,3  | 0,112 |
|                                | >14%            | 31 | 64,6  | 3 | 100,0 | 34 | 66,7  |       |
| Total                          |                 | 48 | 100,0 | 3 | 100,0 | 51 | 100,0 |       |

1-Teste da razão de Verossimilhança

A mediana de idade das pacientes foi de 55 anos (desvio padrão  $\pm 11,94$  anos), sendo que a idade mínima foi de 28 anos e a máxima de 76 anos. Destas, 34 pacientes (61,8%) apresentavam menos de 60 anos e 21 (38,2%) com idades de 60 anos ou mais. Segundo a literatura, nos países desenvolvidos, a taxas de incidência em geral são maiores entre as idades de 50 e 69 anos, representando 51% de todos os novos casos (KOHLENER et al., 2015a). Um estudo realizado com 2074 mulheres portadoras de câncer de mama atendidas no Instituto Nacional do Câncer do México no período de 1998 a 2008, a idade mediana ao diagnóstico foi de 50 anos (desvio padrão  $\pm 12$  anos) e o intervalo foi de 19-96 anos (LARA-MEDINA et al., 2011). No Canadá, apenas 17% dos novos casos de câncer de mama são diagnosticados em mulheres com menos de 50 anos, de acordo com a Sociedade Canadense de Câncer (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

Quanto à etnia, aquelas autodeclaradas pardas na amostra respondiam por 63,6%, enquanto a negra e a branca representaram 12,7% e 23,6%, respectivamente. Alguns estudos analisaram a influência da etnia e a incidência de câncer de mama. Por exemplo, as taxas de incidência média em cinco anos foram levemente mais altas para mulheres brancas (126.1/100.000) que para as mulheres negras (124.1/100.000). As taxas médias de incidência em 5 anos foram mais baixas para as mulheres indígenas americanas/nativas americanas (91,9/100.000), hispânicas (91,9/100.000) e asiáticas-pacíficas (88,3/100.000) (DESANTIS et al., 2015). Para o Brasil, estimam-se 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2017), mas estes dados não se apresentam estratificados por etnia.

Além disso, 13,5% das pacientes do estudo apresentavam história de etilismo, 18,9% de tabagismo, 42,3% eram obesas, 45,5 hipertensas, 9% diabéticas tipo II, enquanto 7,3% apresentavam as duas últimas comorbidades. Dados na literatura instituem diversos fatores de risco para o câncer de mama, como por exemplo a obesidade, tabagismo e história familiar, mas nenhuma destes fatores apresentaram resultados significativos no presente estudo.

Classificada quando o IMC (índice de massa corporal) é igual ou superior a 30 kg/m<sup>2</sup>, a obesidade está associada ao aumento geral na morbidade e mortalidade. No entanto, o risco de câncer de mama associado ao IMC parece depender do *status* menopausal das mulheres. Um maior IMC e/ou ganho de peso têm sido consistentemente associados a um maior risco de câncer de mama entre mulheres na pós-menopausa, que pode ser explicado pelos altos níveis de estrógeno resultantes da conversão periférica de seus precursores no tecido adiposo (LAUBY-SECRETAN et al., 2016). Já em relação ao tabagismo, embora os resultados não sejam uniformes, vários estudos sugerem que há um aumento modesto do risco de câncer de mama em fumantes (JOHNSON et al., 2011; GAUDET et al., 2013). Riscos aumentados são mais consistentes em estudos que avaliaram o início precoce, maior duração e/ou maiores anos-maço de tabagismo. Resultados semelhantes foram vistos para o tabagismo passivo, que não é normalmente relatado pelos pacientes. A relação entre tabagismo e câncer de mama é complicada pelo fato de que 50% das mulheres que fumam também consomem álcool (GRAM et al., 2015).

Um dado provocativo em nossas análises revelou que 54,9% das pacientes relataram histórico familiar de câncer de uma forma geral, não somente ao câncer de mama ou a síndromes a ele relacionadas. Desde a década de 1990, estudos com seleção baseada na história familiar (ao invés de análise de mutações) mostraram resultados inconsistentes com relação a maior incidência e sobrevida. Resultados conflitantes podem ser em parte devido ao estudo de diferentes populações ou definições inconsistentes de uma história familiar positiva na literatura, tanto do número quanto da proximidade dos parentes afetados e ainda pelo uso variável de testes genéticos (ECCLES et al., 2015). O risco associado a uma história familiar positiva de câncer de mama é fortemente afetado pelo número de parentes de primeiro grau do sexo feminino portadores desta neoplasia, independentemente da idade do diagnóstico (BRAITHWAITE et al., 2018).

No que se refere a dados do tumor, 53,8% apresentavam grau histológico 2 e 46,2%, grau 3. Nenhum tumor incluído para análise foi classificado como de grau histológico 1, e 3 casos não apresentavam esse dado. Quando analisado o tamanho tumoral e o *status* linfonodal, 72,2% foram classificados como T1 e T2, e 53,7% sem linfonodos axilares comprometidos. Em relação ao estadiamento patológico, 41,8%, 32,7% e 25,5% foram representados por estágios II, III e I, respectivamente. Tais frequências estão em conformidade de um importante estudo denominado *projeto Amazona*, que avaliou o perfil das mulheres com câncer de mama no Brasil através de uma coorte observacional e retrospectiva de 4.912 mulheres em centros de todas as diferentes regiões geográficas do Brasil. O projeto foi planejado e conduzido pelo Grupo

Brasileiro de Estudos do Câncer de Mama (GBECAM) e analisado em colaboração com o Programa Internacional do *Massachusetts General Hospital (Avon Breast Care Program)* (LIEDKE et al., 2014).

Na nossa amostragem, as pacientes com Ki-67 acima de 14% apresentaram frequência relativa de 66,7%. Apesar de limitações metodológicas, o Ki-67 é um marcador utilizado atualmente para discriminação entre luminal A- ou B-like, bem como, reflete um índice de proliferação celular. Os tumores foram ainda classificados por imunohistoquímica e se apresentavam como luminal A-like em 47,3%, como luminal B-like em 10,9%, como HER2 hiperexpresso em 10,9% e como triplo negativo (TNBC) em 12,7%. Os nossos dados estão de acordo com a literatura, no qual estudo realizado que incluía a região nordeste, avaliando 941 casos, revelou uma preponderância do subtipo luminal B-like com 47,8%, seguido pelos subtipos luminal A-like com 24,1%, TNBC com 17,4% e HER2 hiperexpresso com 17,4% (CARVALHO et al., 2014). No entanto, os subtipos de câncer de mama não são distribuídos tão aleatoriamente na população a depender das suas próprias características com diferenças encontradas quando os diagnósticos são estratificados por idade, raça/etnia, história reprodutiva, índice de massa corporal, *status* socioeconômico e localização geográfica, podendo influenciar sua frequência a depender das características da população estudada (YANG et al., 2007; KOHLER et al., 2015b). Por exemplo, mulheres mais jovens em geral, e particularmente as de raça negra, são mais propensas a apresentar o subtipo triplo-negativo (IHEMELANDU et al., 2008).

Como dado adicional, com seguimento mediano de 29 meses, 72,5% das pacientes foram submetidas a quimioterapia adjuvante, enquanto 27,5%, quimioterapia neoadjuvante. Com respeito aos esquemas quimioterápicos selecionados, aqueles baseados em antraciclinas e taxanos corresponderam a 92,8% das terapias neoadjuvantes e 67,6% das quimioterapias adjuvantes. Apenas 4 pacientes não fizeram quimioterapia: 1 paciente com TNBC (com quimioterapia contraindicada pela idade de 73 anos e complicações clínicas pós-operatórias) e mais 3 pacientes Luminais A-like, sendo 2 pacientes com idade superior a 70 anos (com comorbidades) e 1 paciente com histologia tumoral de melhor prognóstico (carcinoma tubular). De todas as variáveis pesquisadas, nenhuma apresentou significância estatística quando comparadas entre pacientes vivas e aquelas já falecidas.

### Expressão de Sirtuína 1 e 7

Quanto a expressão gênica, do total de 55 pacientes recrutadas, 81,8% das pacientes apresentaram expressão de sirtuína 1 (SIRT1), enquanto que 56,4% das pacientes apresentaram expressão de sirtuína 7 (SIRT7). Um total de 10% das pacientes não apresentou expressão de SIRT1 ou SIRT7, e 12,7% apresentaram dados inconclusivos para SIRT7. Uma paciente foi excluída desta análise devido à baixa qualidade da amostra.

A Tabela 3 apresenta a descrição das variáveis pesquisadas que compuseram a coorte total com as da coorte de SIRT1 e SIRT7, apresentando significância estatística para o *log-rank* apenas da expressão de SIRT7 com o etilismo.

**Tabela 2.** Descrição e frequência das variáveis pesquisadas para composição da coorte total e coorte da SIRT1 e SIRT7.

| Variáveis                   |        | SIRT1      | Total      | p-valor <sup>1</sup> | SIRT7      | Total      | p-valor <sup>1</sup> |
|-----------------------------|--------|------------|------------|----------------------|------------|------------|----------------------|
|                             |        | n (%)      | n (%)      |                      | n (%)      | n (%)      |                      |
| Idade                       | <60    | 27 (60,0)  | 33 (61,1)  | 0,706                | 20 (64,5)  | 32 (68,1)  | 0,460                |
|                             | >60    | 18 (40,0)  | 21 (38,9)  |                      | 11 (35,5)  | 15 (31,9)  |                      |
|                             | Total  | 45 (100,0) | 54 (100,0) |                      | 31 (100,0) | 47 (100,0) |                      |
| Etnia                       | Branca | 10 (22,2)  | 13 (24,1)  | 0,787                | 6 (19,4)   | 11 (23,4)  | 0,658                |
|                             | Negra  | 6 (13,3)   | 7 (13,0)   |                      | 4 (12,9)   | 6 (12,8)   |                      |
|                             | Parda  | 29 (64,4)  | 34 (63,0)  |                      | 21 (67,7)  | 30 (63,8)  |                      |
|                             | Total  | 45 (100,0) | 54 (100,0) |                      | 31 (100,0) | 47 (100,0) |                      |
| Etilismo                    | Sim    | 5 (11,9)   | 7 (13,7)   | 0,439                | 5 (17,2)   | 5 (11,4)   | <b>0,034</b>         |
|                             | Não    | 37 (88,1)  | 44 (86,3)  |                      | 24 (82,8)  | 39 (88,6)  |                      |
|                             | Total  | 42 (100,0) | 51 (100,0) |                      | 29 (100,0) | 44 (100,0) |                      |
| Tabagismo                   | Sim    | 7 (16,3)   | 10 (19,2)  | 0,264                | 7 (24,1)   | 10 (22,2)  | 0,674                |
|                             | Não    | 36 (83,7)  | 42 (80,8)  |                      | 22 (75,9)  | 35 (77,8)  |                      |
|                             | Total  | 43 (100,0) | 52 (100,0) |                      | 29 (100,0) | 45 (100,0) |                      |
| Obesidade                   | Sim    | 21 (47,7)  | 22 (43,1)  | 0,079                | 13 (41,9)  | 19 (43,2)  | 0,797                |
|                             | Não    | 23 (52,3)  | 29 (56,9)  |                      | 18 (58,1)  | 25 (56,8)  |                      |
|                             | Total  | 44 (100,0) | 51 (100,0) |                      | 31 (100,0) | 44 (100,0) |                      |
| História Familiar de câncer | Sim    | 21 (50,0)  | 28 (54,9)  | 0,117                | 15 (50,0)  | 24 (53,3)  | 0,525                |
|                             | Não    | 21 (50,0)  | 23 (45,1)  |                      | 15 (50,0)  | 21 (46,7)  |                      |
|                             | Total  | 42 (100,0) | 51 (100,0) |                      | 30 (100,0) | 45 (100,0) |                      |
| Grau histológico            | G2     | 26 (59,1)  | 28 (53,8)  | 0,072                | 19 (61,3)  | 25 (55,6)  | 0,250                |
|                             | G3     | 18 (40,9)  | 24 (46,2)  |                      | 12 (38,7)  | 20 (44,4)  |                      |
|                             | Total  | 44 (100,0) | 52 (100,0) |                      | 31 (100,0) | 45 (100,0) |                      |
| Tamanho (T)                 | T1+T2  | 34 (77,3)  | 38 (71,7)  | <b>0,057</b>         | 22 (73,3)  | 33 (71,7)  | 0,743                |
|                             | T3+T4  | 10 (22,7)  | 15 (28,3)  |                      | 8 (26,7)   | 13 (28,3)  |                      |
|                             | Total  | 44 (100,0) | 53 (100,0) |                      | 30 (100,0) | 46 (100,0) |                      |
|                             | Sim    | 18 (40,9)  | 24 (45,3)  | 0,156                | 15 (50,0)  | 22 (47,8)  | 0,686                |

|                            |                 |            |            |       |            |            |       |
|----------------------------|-----------------|------------|------------|-------|------------|------------|-------|
| <b>Linfonodo (N)</b>       | Não             | 26 (59,1)  | 29 (54,7)  |       | 15 (50,0)  | 24 (52,2)  |       |
|                            | Total           | 44 (100,0) | 53 (100,0) |       | 30 (100,0) | 46 (100,0) |       |
| <b>Estágio Clínico</b>     | I               | 12 (26,7)  | 14 (25,9)  | 0,665 | 6 (19,4)   | 11 (23,4)  | 0,665 |
|                            | II              | 20 (44,4)  | 23 (42,6)  |       | 14 (45,2)  | 20 (42,6)  |       |
|                            | III             | 13 (28,9)  | 17 (31,5)  |       | 11 (35,5)  | 16 (34,0)  |       |
|                            | Total           | 45 (100,0) | 54 (100,0) |       | 31 (100,0) | 47 (100,0) |       |
| <b>Tipo de Tratamento</b>  | Adjuvancia      | 32 (76,2)  | 36 (72,0)  | 0,147 | 22 (75,9)  | 32 (71,1)  | 0,348 |
|                            | Neoadjuvancia   | 10 (23,8)  | 14 (28,0)  |       | 7 (24,1)   | 13 (28,9)  |       |
|                            | Total           | 42 (100,0) | 50 (100,0) |       | 29 (100,0) | 45 (100,0) |       |
| <b>Subtipos Biológicos</b> | Luminal A       | 15 (33,3)  | 16 (29,6)  | 0,364 | 10 (32,3)  | 14 (29,8)  | 0,746 |
|                            | Luminal B       | 21 (46,7)  | 25 (46,3)  |       | 15 (48,4)  | 24 (51,1)  |       |
|                            | Her2 +          | 4 (8,9)    | 6 (11,1)   |       | 2 (6,5)    | 4 (8,5)    |       |
|                            | Triplo Negativo | 5 (11,1)   | 7 (13,0)   |       | 4 (12,9)   | 5 (10,6)   |       |
|                            | Total           | 45 (100,0) | 54 (100,0) |       | 31 (100,0) | 47 (100,0) |       |
| <b>Ki-67</b>               | <14%            | 15 (34,9)  | 17 (34,0)  | 0,741 | 11 (37,9)  | 15 (34,1)  | 0,450 |
|                            | >14%            | 28 (65,1)  | 33 (66,0)  |       | 18 (62,1)  | 29 (65,9)  |       |
|                            | Total           | 43 (100,0) | 50 (100,0) |       | 29 (100,0) | 44 (100,0) |       |

1-Teste da razão de Verossimilhança

Apenas no que se refere a expressão de SIRT7 em mulheres etilistas foi detectada significância estatística ( $p=0,034$ ) ou ainda associação marginal entre expressão de SIRT1 em pacientes com tumores classificados como T1+T2 versus T3+T4 ( $p=0,057$ ).

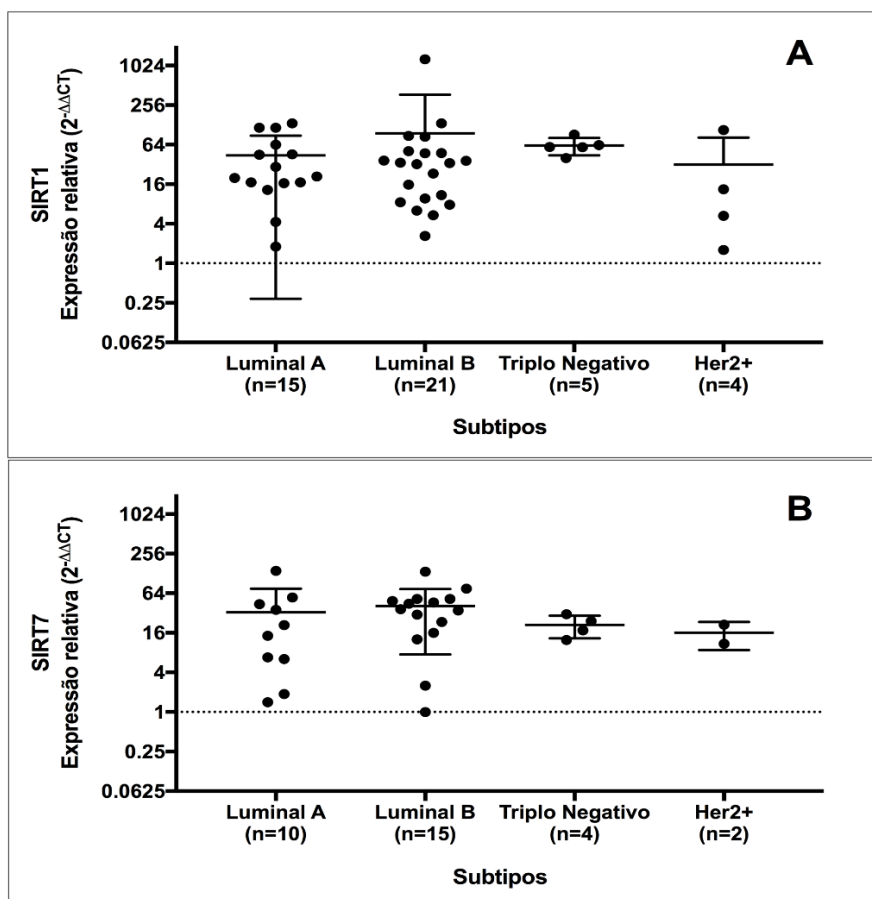
Apesar de o nosso estudo não apresentar correlação direta do câncer de mama com a variável etilismo, há evidências consistentes na literatura de que o risco de câncer de mama é maior para mulheres que consomem níveis baixos (<1 dose/dia) a altos ( $\geq 3$  doses/dia) de álcool em comparação com abstêmios (WHITE et al., 2017). Uma metanálise de 2013 com 110 estudos epidemiológicos mostrou uma associação pequena, mas significativa, entre o câncer de mama feminino e a ingestão leve de álcool (RR 1,05, IC 95% 1,02-1,08) (BAGNARDI et al., 2013). Outro grande estudo de coorte que examinou a relação entre álcool e câncer de mama também encontrou um pequeno aumento no risco de câncer de mama com três a seis drinques por semana em comparação com abstêmios (RR 1,15, IC 95% 1,06-1,24) (CHEN et al., 2011). O risco de câncer de mama já foi linearmente correlacionado com a ingestão cumulativa de álcool durante a vida e foi mais fortemente associado a padrões de consumo tanto no início quanto no final da vida adulta. No entanto, uma análise da incidência do câncer de mama entre as 38.500 mulheres que participaram do *Women's Health Study*, a ingestão diária de álcool novamente mostrou aumentar modestamente o risco (ZHANG et al., 2007). O risco relativo para cada aumento de 10 gramas na ingestão diária de álcool foi de 1,11 (IC 95% 1,03-1,20) para o câncer de mama com receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR)

positivos, mas não foi significativa para o câncer de mama ER e PR negativo. Houve também uma associação com o consumo de álcool e câncer de mama com amplificação do HER2 (HER2 hiperexpresso) e no luminal A (HIRKO et al., 2016). No entanto, não existem dados na literatura relacionando a expressão de SIRT7 e etilismo até o momento. Se a ativação de vias metabólicas ainda desconhecidas ou a participação de outras moléculas, como por exemplo microRNAs, contribuíram para nossos resultados, o aumento da amostra utilizada e/ou a detecção de vias ou moléculas alternativas podem ser avaliados em futuras análises.

No que tange a associação, mesmo que marginal do ponto de vista estatístico, entre a maior expressão de SIRT1 em pacientes com tumores com menor volume (T1+T2) versus (T3+T4). Estes dados estão de acordo com os achados de Cao et al., (2015) que demonstraram através de uma metanálise que não há diferenças significativas quando avaliado a variável tamanho tumoral. Mesmo em se tratando de uma metanálise, com sua particularidade de potencial inclusão de estudos heterogêneos, a análise de tal resultado é provocativa e merece da mesma forma maiores esclarecimentos, pois estes dados são contraditórios à outros achados na literatura (CHUNG et al., 2015).

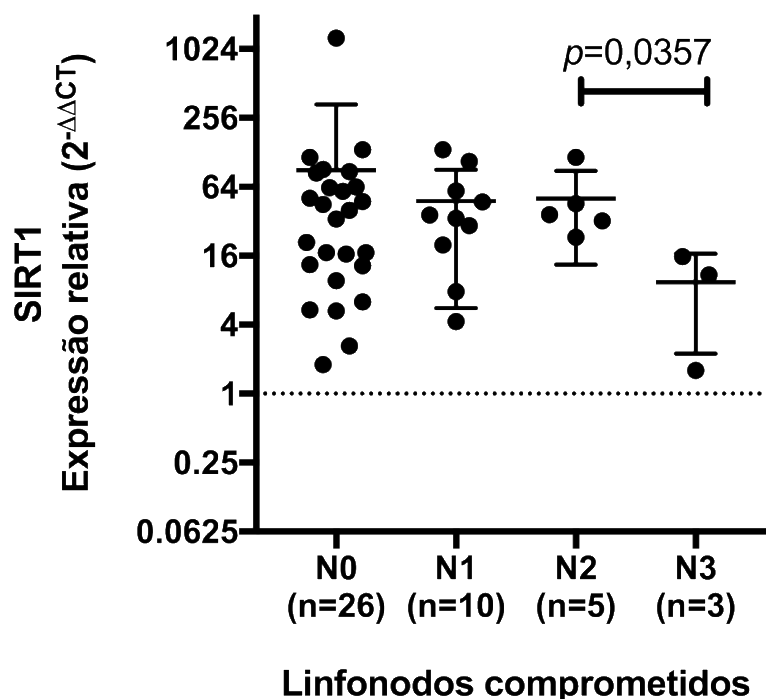
A análise dos subtipos de câncer de mama em relação aos níveis de expressão relativa dos genes SIRT1 e SIRT7 não demonstrou correlação estatística, estando todos os pacientes superexpressos em relação à referência utilizada (Figura 1). Igci et al. em 2016 descreveu que as sirtuínas são diferencialmente expressas em tecidos de câncer de mama e linhas celulares de câncer, sendo as SIRT1 e SIRT4 significativamente diminuídas em tecidos de câncer de mama e células de câncer de mama SKBR3 (IGCI et al., 2016). Nossos achados discordam deste relato no que se refere à SIRT1, mas não podemos afirmar que SIRT1 estaria relacionado ao crescimento celular, uma vez que Elangovan e colaboradores demonstraram que a inativação da SIRT1 eliminou o crescimento celular induzido por estrogênio e o desenvolvimento do tumor ER-positivo, sugerindo que a SIRT1 é necessária para o crescimento do câncer de mama induzido por estrógeno (ELANGO VAN et al., 2011).

**Figura 1.** Expressão relativa de SIRT1 e SIRT7 em pacientes com câncer de mama, de acordo com os subtipos biológicos.



Em análise intragrupos, foram detectadas diferenças estatisticamente ou marginalmente significantes quando comparadas a expressão de SIRT1 entre pacientes com 4 a 9 linfonodos comprometidos (N2 versus N3) com  $p=0,0357$ . Nossos dados estão de acordo com estudos prévios que evidenciam a associação entre alta expressão da SIRT1 e um pior prognóstico, como por exemplo, a presença de disseminação linfonodal e menor sobrevida livre de doença (WU et al., 2012; KUO et al., 2013; CAO et al., 2015), uma vez que não foi possível avaliar este parâmetro.

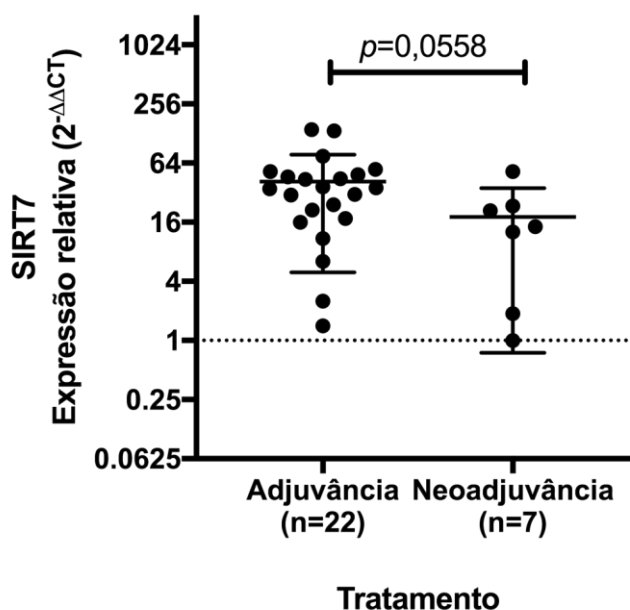
**Figura 2.** Expressão de SIRT1 nos subgrupos de linfonodos, classificados de acordo com o número total de comprometidos segundo os critérios da AJCC.



Em tumores triplo-negativos, o papel da SIRT1 em pacientes tem sido inferido como um potencial biomarcador (JIN et al., 2015; CHUNG et al., 2016). Outras sirtuínas têm tido seu papel prognóstico avaliado, revelando-se como papel dual, ora como participando ou inibindo a carcinogênese (MCGLYNN et al., 2014; DESOUKI et al., 2014; HE et al., 2014b; GENG et al., 2015; YU et al., 2016; TANG et al., 2017b).

Em relação à SIRT7, o grupo no qual as pacientes foram submetidas a tratamento adjuvante e neoadjuvante apresentou uma tendência de associação, com  $p=0,0558$ . Na Figura 3 é possível observar que pacientes que fizeram adjuvância apresentam valores de mediana para a expressão de SIRT7 maior do que aquelas que fizeram neoadjuvância (que infere em doença mais volumosa).

**Figura 3.** Expressão de SIRT7 nos subgrupos de pacientes submetidas a tratamentos (neo)adjuvante sistêmicos.



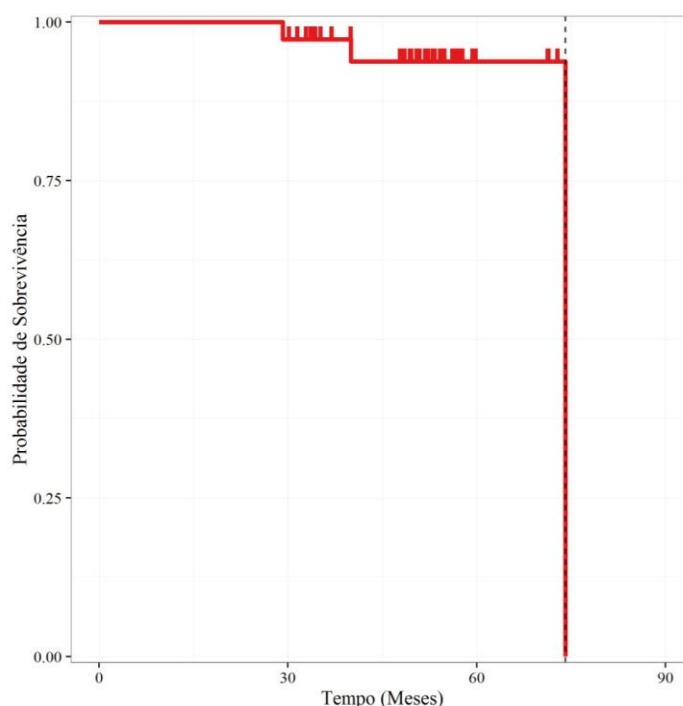
O exato papel das sirtuínas na carcinogênese dos tumores de mama não é totalmente entendido. Já foi observado que os níveis de proteína Sirt6 estão elevados em células MCF-7 resistentes a paclitaxel e epirrubicina em comparação com as células sensíveis parentais, inferindo sua participação na resistência a esses quimioterápicos (KHONGKOW et al., 2013b) mas nada ainda foi descrito sobre SIRT7 contexto do tratamento ou resistência a quimioterapia no câncer de mama. Tang et al. analisaram os níveis de expressão de SIRT7 em 50 biópsias tumorais de portadores de câncer retal coletadas de pacientes antes e depois da quimiorradioterapia com capecitabina e demonstrou que o tratamento induzia queda na expressão de SIRT7, associada a maior resposta (radiossensibilidade) ao tratamento (TANG et al., 2017a). Estudos adicionais com maior coorte e coleta de amostras de pacientes em diferentes momentos do tratamento poderão auxiliar na compreensão sobre o papel do SIRT7 na terapêutica e determinar se esta sirtuína realmente tem potencial como alvo no desenvolvimento de novas drogas (YUAN; SU; CHEN, 2013).

#### *Análise de sobrevida*

De acordo com nossos resultados, a expressão de SIRT1 e SIRT7 não impactou no fenótipo tumoral ou nas taxas de sobrevida. A estimativa mediana de sobrevida global obtida ao final do estudo, pelo método de Kaplan-Meier, foi de 74,1 meses (6,2 anos) e a estimativa média de 71,7 meses com intervalo de confiança de 67,75 a 75,65 meses. As estimativas medianas de sobrevida calculadas para o desfecho morte, foram de 93,8% em 40 meses. A curva

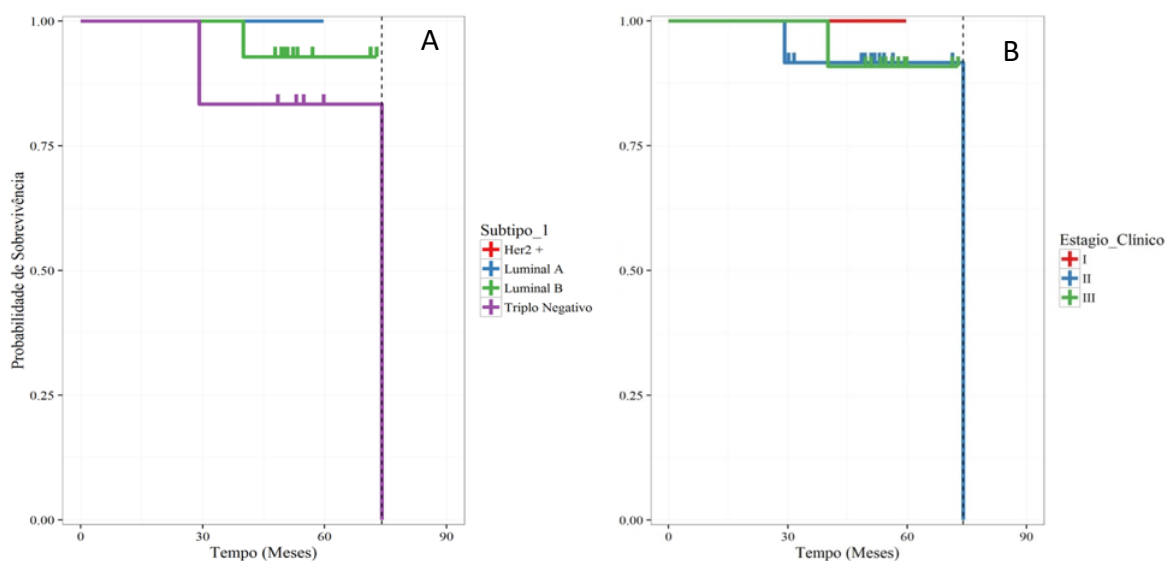
de sobrevida global (Kaplan-Meier) está demonstrada na figura 4. Segundo a literatura americana, a sobrevida mediana global em 5 anos considerando todos os estágios, é de 89,7% (CRONIN et al., 2018). Os dados brasileiros são escassos acerca do tema, mas mesmo assim, a população ora em estudo, parece ser bem convergente com as estatísticas americanas.

**Figura 4.** Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) em meses das pacientes portadoras de câncer de mama durante o tempo de seguimento da coorte dessa amostra.



Para os subtipos biológicos luminal B-like, de 92,86% em 40 meses, triplo negativo, de 83,33% em 29,17 meses, estágio clínico II, 91,67% em 29,17 meses e estágio III de 90,91% em 40 meses. Por outro lado, a taxa de sobrevida dos pacientes com expressão da SIRT1 foi 96,77% em 29,17 meses; enquanto que em pacientes com expressão da SIRT7 foi de 95,00% em 40 meses. Os dados das variáveis que não apresentaram taxas de sobrevida significativa refletiram a ausência de eventos (óbitos) nessa amostra durante o período.

**Figura 5.** Curva de sobrevivência obtida pelo método de Kaplan-Meier para as covariáveis Subtipo (A), Estágio clínico (B), associadas aos dados dos pacientes com câncer de mama.



As análises de sobrevida estimadas em função das covariáveis idade, etnia, tabagismo, obesidade, história familiar de câncer, grau histológico, estágio clínico, tamanho, linfonodo, tipo de tratamento, subtipos biológicos, Ki-67, SIRT1 e SIRT7 não apresentaram significância estatística (valores de  $p$  superiores a 0,05) e apenas a covariável "etilismo" apresentou curva distinta, confirmado pelo teste *log-rank* apresentado na tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados do teste *log-rank* associados à covariáveis do estudo de pacientes com câncer de mama.

| Covariáveis                 | p-valor do teste de log-rank |
|-----------------------------|------------------------------|
| Idade                       | 0,402                        |
| Etnia                       | 0,751                        |
| Etilismo                    | <b>0,023 *</b>               |
| Tabagismo                   | 0,494                        |
| Obesidade                   | 0,505                        |
| História Familiar de câncer | 0,832                        |
| Grau histológico            | 0,106                        |
| Estágio Clínico             | 0,655                        |
| Tamanho                     | 0,132                        |
| Linfonodo                   | 0,344                        |
| Tipo de Tratamento          | 0,442                        |
| Subtipos Biológicos         | 0,594                        |
| Ki-67                       | 0,387                        |
| SIRT1                       | 0,824                        |
| SIRT7                       | 0,257                        |

Os genes SIRT1 e SIRT7 não apresentaram impacto no perfil de sobrevida global das pacientes avaliadas neste estudo. No entanto, observa-se que a variável etilismo já havia apresentado significância para expressão da SIRT7, mas também apresenta significância na sobrevida global das pacientes. Estes dados demonstram que a ingestão de álcool pode ter algum efeito na expressão da SIRT7 e desta forma, levar à desregulação epigenética. O metabolismo do etanol altera drasticamente a relação NADH/NAD<sup>+</sup>, exemplo de fator antimetabólico que potencialmente controla a transcrição genética e, portanto, influencia o silenciamento ou ativação de genes. Desta forma, mudanças epigenéticas resultantes do consumo crônico de álcool podem levar à disfunção metabólica (ZAKHARI, 2013). A redução no NAD<sup>+</sup> gerada pelo uso de álcool pode influenciar na hiperexpressão de sirtuínas, enzimas que necessitam do NAD<sup>+</sup> como cofator no processo de deacetilação com potenciais danos no DNA, promoção de mutagênese, apoptose e consequentemente tumorigênese. Entender a natureza exata das mudanças epigenéticas ajudará ao desenvolvimento de drogas que visem ao tratamento ou diminuição de danos induzidos pelo álcool (FRENCH, 2016).

## Conclusão

As sirtuínas apresentam um papel importante na carcinogênese, mas ainda não está claro qual o real papel destas moléculas no desenvolvimento, manutenção e desfecho do câncer de mama. SIRT1 apresentou correlação com o comprometimento linfonodal o que pode indicar que a redução da expressão de SIRT1 aumenta a agressividade tumoral. A SIRT7 poderia ser suscetível ao uso de quimioterapia, assim como ao uso do álcool, uma vez que valores reduzidos foram encontrados em pacientes que realizaram neoadjuvância.

## Referências

- BAGNARDI, V. et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. **Annals of oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 24, n. 2, p. 301–308, fev. 2013.
- BRAITHWAITE, D. et al. Family History and Breast Cancer Risk Among Older Women in the Breast Cancer Surveillance Consortium Cohort. **JAMA Internal Medicine**, v. 178, n. 4, p. 494–501, 1 abr. 2018.
- CAO, Y.W. et al. Clinicopathological and prognostic role of SIRT1 in breast cancer patients: a meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 1, p. 616–624, 2015.
- CARVALHO, F. M. et al. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. **BMC Womens Health**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 29 ago. 2014.
- CHALKIADAKI, A.; GUARENTE, L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 15, n. 10, p. 608–624, out. 2015.
- CHEN, W. Y. et al. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. **JAMA**, v. 306, n. 17, p. 1884–1890, 2 nov. 2011.
- CHUNG, S. Y. et al. Oncogenic role of SIRT1 associated with tumor invasion, lymph node metastasis, and poor disease-free survival in triple negative breast cancer. **Clinical & Experimental Metastasis**, p. 1–7, 19 nov. 2015.
- CHUNG, S. Y. et al. Oncogenic role of SIRT1 associated with tumor invasion, lymph node metastasis, and poor disease-free survival in triple negative breast cancer. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 33, n. 2, p. 179–185, fev. 2016.
- CRONIN, K. A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. **Cancer**, v. 124, n. 13, p. 2785–2800, 1 jul. 2018.
- DAMASKOS, C. et al. Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer. **Anticancer Research**, v. 37, n. 1, p. 35–46, 1 jan. 2017.

DE LUCA, A. et al. FGFR-targeted therapeutics for the treatment of breast cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 26, n. 3, p. 303–311, mar. 2017.

DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 31–42, 29 out. 2015.

DESOUKI, M. M. et al. Decreased mitochondrial SIRT3 expression is a potential molecular biomarker associated with poor outcome in breast cancer. **Human Pathology**, v. 45, n. 5, p. 1071–1077, maio 2014.

ECCLES, B. K. et al. Family history and outcome of young patients with breast cancer in the UK (POSH study). **The British Journal of Surgery**, v. 102, n. 8, p. 924–935, jul. 2015.

ELANGO VAN, S. et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor  $\alpha$  in breast cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 21, p. 6654–6664, 1 nov. 2011.

FRENCH, S. W. Chronic alcohol bingeing injures the liver and other organs by reducing NAD<sup>+</sup> levels required for sirtuin's deacetylase activity. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 100, n. 2, p. 303–306, abr. 2016.

GAUDET, M. M. et al. Active Smoking and Breast Cancer Risk: Original Cohort Data and Meta-Analysis. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 8, p. 515–525, 28 fev. 2013.

GENG, Q. et al. High expression of Sirt7 served as a predictor of adverse outcome in breast cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 2, p. 1938–1945, 2015.

GRAM, I. T. et al. Smoking and Risk of Breast Cancer in a Racially/Ethnically Diverse Population of Mainly Women Who Do Not Drink Alcohol: The MEC Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 182, n. 11, p. 917–925, 1 dez. 2015.

HE, S. et al. The SIRT 3 Expression Profile is Associated with Pathological and Clinical Outcomes in Human Breast Cancer Patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 2061–2069, 2014b.

HIRKO, K. A. et al. Alcohol consumption and risk of breast cancer by molecular subtype: Prospective analysis of the nurses' health study after 26 years of follow-up. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 5, p. 1094–1101, 1 mar. 2016.

IGCI, M. et al. High-throughput screening of Sirtuin family of genes in breast cancer. **Gene**, v. 586, n. 1, p. 123–128, jul. 2016.

IHEMELANDU, C. U. et al. Treatment and Survival Outcome for Molecular Breast Cancer Subtypes in Black Women. **Annals of Surgery**, v. 247, n. 3, p. 463–469, mar. 2008.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em 10/07/2018.

JIN, M.-S. et al. SIRT1 induces tumor invasion by targeting epithelial mesenchymal transition-related pathway and is a prognostic marker in triple negative breast cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4743–4753, 30 out. 2015.

JOHNSON, K. C. et al. Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). **Tobacco Control**, v. 20, n. 1, p. e2–e2, jan. 2011.

KHONGKOW, M. et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 7, p. 1476–1486, jul. 2013b.

KOHLER, B. A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 6, p. 1197–25, 30 mar. 2015a.

KOHLER, B. A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 6, p. 1197–25, 30 mar. 2015b.

LARA-MEDINA, F. et al. Triple-negative breast cancer in Hispanic patients. **Cancer**, v. 117, n. 16, p. 3658–3669, 8 mar. 2011.

LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794–798, 2016.

LEE, H. et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. **Human Pathology**, v. 42, n. 2, p. 204–213, 1 fev. 2011.

LIEDKE, P. E. R. et al. Outcomes of breast cancer in Brazil related to health care coverage: a retrospective cohort study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 1, p. 126–133, jan. 2014.

O’SULLIVAN, C. C.; LOPRINZI, C. L.; HADDAD, T. C. Updates in the Evaluation and Management of Breast Cancer. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 6, p. 794–807, 1 jun. 2018.

OH, T. G.; WANG, S.-C. M.; MUSCAT, G. E. O. Minireview: Therapeutic Implications of Epigenetic Signaling in Breast Cancer. **Endocrinology**, p. en.2016–1716–31, 16 dez. 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 1 jan. 2016.

SIROTKIN, A. The Role and Application of Sirtuins and mTOR Signaling in the Control of Ovarian Functions. **Cells**, v. 5, n. 4, p. 42–8, dez. 2016.

TANG, M. et al. Downregulation of SIRT7 by 5-fluorouracil induces radiosensitivity in human colorectal cancer. **Theranostics**, v. 7, n. 5, p. 1346–1359, 28 mar. 2017a.

TANG, X. et al. SIRT7 antagonizes TGF- $\beta$  signaling and inhibits breast cancer metastasis. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 10 ago. 2017b.

WHITE, A. J. et al. Lifetime Alcohol Intake, Binge Drinking Behaviors, and Breast Cancer Risk. **American journal of epidemiology**, v. 186, n. 5, p. 541–549, 1 set. 2017.

WU, M. et al. Expression of SIRT1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in both operable triple-negative and non-triple-negative breast cancer. **Medical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 3240–3249, 4 jun. 2012.

YANG, X. R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 3, p. 439–443, mar. 2007.

YU, F.-Y. et al. The Prognostic and Clinicopathological Roles of Sirtuin-3 in Various Cancers. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0159801–12, 2 ago. 2016.

YUAN, H.; SU, L.; CHEN, W. Y. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. **OncoTargets and Therapy**, v. 6, p. 1399–1416, 8 out. 2013.

ZAKHARI, S. Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes. **Alcohol Research**, v. 35, n. 1, p. 6–16, 8 ago. 2013

ZHANG, S. M. et al. Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, n. 6, p. 667–676, 15 mar. 2007.

## 5 CONCLUSÃO

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública mundial, sendo a principal causa de morte por câncer nas mulheres no Brasil e no mundo. Avanços no conhecimento da biologia do câncer de mama e dos mecanismos moleculares envolvidos em sua carcinogênese tem proporcionado o desenvolvimento e utilização de terapias alvo molecular dirigidas para vias de sinalização oncogênicas, o que vem se traduzindo em ganhos nas taxas de cura e sobrevida. Esta tese objetivou a identificação dos principais biomarcadores em uso corrente e os potenciais alvos terapêuticos no câncer de mama, com focos nas vias de sinalização oncogênicas, como demonstrado no capítulo I desta tese: via do PI3K/Akt/mTOR, HER2+, ou de replicação, MAPK, JAK/STAT e vias que utilizam como sinalização mecanismos imunológicos, dentre outras. As sirtuínas apresentam um papel importante na carcinogênese, mas ainda não está claro qual o real papel destas moléculas no desenvolvimento, manutenção e desfecho do câncer de mama. SIRT1 apresentou correlação com o comprometimento linfonodal o que pode indicar que a redução da expressão de SIRT1 aumenta a agressividade tumoral. Por outro lado, a SIRT7 poderia ser suscetível ao uso de quimioterapia, assim como ao uso do álcool, uma vez que valores reduzidos foram encontrados em pacientes que realizaram neoadjuvância. No entanto, estudos adicionais com maior coorte e análise dinâmica das pacientes são necessários para determinar como estes genes podem atuar na tumorigênese e na resposta terapêutica.

## REFERÊNCIAS

- AALDERS, K. C. et al. Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures and future perspectives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 53, p. 98–110, fev. 2017.
- ADES, F. et al. Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 25, p. 2794–2803, set. 2014.
- ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 22 ago. 2013.
- BACHELOT, T. et al. Randomized Phase II Trial of Everolimus in Combination With Tamoxifen in Patients With Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer With Prior Exposure to Aromatase Inhibitors: A GINECO Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 22, p. 2718–2724, 27 jul. 2012.
- BAGNARDI, V. et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 24, n. 2, p. 301–308, fev. 2013.
- BAHRAMI, A. et al. The Therapeutic Potential of PI3K/Akt/mTOR Inhibitors in Breast Cancer: Rational and Progress. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 213–222, 4 jul. 2017.
- BAHRAMI, A. et al. The Therapeutic Potential of PI3K/Akt/mTOR Inhibitors in Breast Cancer: Rational and Progress. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 213–222, jan. 2018.
- BALKO, J. M. et al. Profiling of residual breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies DUSP4 deficiency as a mechanism of drug resistance. **Nature medicine**, v. 18, n. 7, p. 1052–1059, jul. 2012.
- BANIN HIRATA, B. K. et al. Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior. **Disease Markers**, v. 2014, n. 7418, p. 1–12, 2014.
- BAROK, M.; JOENSUU, H.; ISOLA, J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 209, 5 mar. 2014.

BARTLETT, J. M. S. et al. Comparing Breast Cancer Multiparameter Tests in the OPTIMA Prelim Trial: No Test Is More Equal Than the Others. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 9, set. 2016.

BASELGA, J. et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 2, p. 109–119, 12 jan. 2012a.

BASELGA, J. et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 6, p. 520–529, 9 fev. 2012b.

BASELGA, J. et al. Advances in the management of HER2-positive early breast cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 119, p. 113–122, 1 nov. 2017.

BASILE, D. et al. Atezolizumab for the treatment of Breast Cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 0, n. 0, p. 1–20, 24 abr. 2018.

BAUM, M. et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. **Lancet (London, England)**, v. 359, n. 9324, p. 2131–2139, 22 jun. 2002.

BENDER, R. A., MD et al. Clinical Utility of Comprehensive Microarray Testing in Early-stage Breast Cancer. **Oncology & Hematology Review (US)**, v. 07, n. 02, p. 107, 2011.

BENEDETTI, R. et al. Breast Cancer Vaccines: New Insights. **Frontiers in endocrinology**, v. 8, p. 270, 2017.

BERGH, J. et al. First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 9, p. 921–929, 20 mar. 2012.

BOSCH-PRESEGUÉ, L.; VAQUERO, A. The dual role of sirtuins in cancer. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 6, p. 648–662, jun. 2011.

BRAITHWAITE, D. et al. Family History and Breast Cancer Risk Among Older Women in the Breast Cancer Surveillance Consortium Cohort. **JAMA Internal Medicine**, v. 178, n. 4, p. 494–501, 1 abr. 2018.

BREAST INTERNATIONAL GROUP (BIG) 1-98 COLLABORATIVE GROUP et al. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 26, p. 2747–2757, 29 dez. 2005.

BRITSCHGI, A. et al. JAK2/STAT5 Inhibition Circumvents Resistance to PI3K/mTOR Blockade: A Rationale for Cotargeting These Pathways in Metastatic Breast Cancer. **Cancer Cell**, v. 22, n. 6, p. 796–811, dez. 2012.

BRUFISKY, A. M.; DICKLER, M. N. Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance. **The Oncologist**, v. 23, n. 5, p. 528–539, 11 maio 2018.

BYLER, S. et al. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. **Anticancer Research**, v. 34, n. 3, p. 1071–1077, mar. 2014.

CAO, Y.-W. et al. Correlation and prognostic value of SIRT1 and Notch1 signaling in breast cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 1, p. 151–11, 25 nov. 2014.

CAO, Y.-W. et al. Clinicopathological and prognostic role of SIRT1 in breast cancer patients: a meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 1, p. 616–624, 2015.

CARDOSO, F. et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 375, n. 8, p. 717–729, 25 ago. 2016.

CARDOSO, F. et al. **3<sup>rd</sup> ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3)**. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 1 jan. 2017.

CARROLL, J. S. Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. **European Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 1, p. R41–9, jul. 2016.

CARVALHO, F. M. et al. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. **BMC Women's Health**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 29 ago. 2014.

CEJALVO, J. M. et al. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 67, p. 63–70, 1 jun. 2018.

CHALKIADAKI, A.; GUARENTE, L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 10, p. 608–624, out. 2015.

CHEANG, M. C. U. et al. Responsiveness of Intrinsic Subtypes to Adjuvant Anthracycline Substitution in the NCIC.CTG MA.5 Randomized Trial. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 8, p. 2402–2412, 16 abr. 2012.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1–10, 25 jul. 2013.

CHEN, W. Y. et al. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. **JAMA**, v. 306, n. 17, p. 1884–1890, 2 nov. 2011.

CHIA, S. et al. Double-Blind, Randomized Placebo Controlled Trial of Fulvestrant Compared With Exemestane After Prior Nonsteroidal Aromatase Inhibitor Therapy in Postmenopausal Women With Hormone Receptor-Positive, Advanced Breast Cancer: Results From EFACT. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 10, p. 1664–1670, 1 abr. 2008.

CHIA, S. K. L. Clinical application and utility of genomic assays in early-stage breast cancer: key lessons learned to date. **Current Oncology**, v. 25, n. Suppl 1, p. S125–S130, jun. 2018.

CHUNG, S. Y. et al. Oncogenic role of SIRT1 associated with tumor invasion, lymph node metastasis, and poor disease-free survival in triple negative breast cancer. **Clinical & Experimental Metastasis**, p. 1–7, 19 nov. 2015.

CHUNG, S. Y. et al. Oncogenic role of SIRT1 associated with tumor invasion, lymph node metastasis, and poor disease-free survival in triple negative breast cancer. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 33, n. 2, p. 179–185, fev. 2016.

CIRUELOS, E. et al. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. **The Breast**, v. 23, n. 3, p. 201–208, 1 jun. 2014.

CLIFTON, G. T.; MITTENDORF, E. A.; PEOPLES, G. E. Adjuvant HER2/neu peptide cancer vaccines in breast cancer. **Immunotherapy**, v. 7, n. 11, p. 1159–1168, 2015.

COATES, A. S. et al. **Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Anais...** In: Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. ago. 2015

COCHRANE, D. R. et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 1, p. 1196, 22 jan. 2014.

COLEMAN, W. B.; ANDERS, C. K. Discerning Clinical Responses in Breast Cancer Based On Molecular Signatures. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2199–2207, 1 out. 2017.

COLLINS, L. C. et al. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 24, n. 7, p. 924–931, jul. 2011.

COURTNEY, K. D.; CORCORAN, R. B.; ENGELMAN, J. A. The PI3K pathway as drug target in human cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 6, p. 1075–1083, 20 fev. 2010.

CREEDON, H. et al. Exploring mechanisms of acquired resistance to HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)-targeted therapies in breast cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 4, p. 822–830, ago. 2014.

CRONIN, K. A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. **Cancer**, v. 124, n. 13, p. 2785–2800, 1 jul. 2018.

CSIBI, A. et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 840–854, 9 maio 2013.

CURIGLIANO, G. et al. **De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. Anais...** In: *Annals of Oncology : Official Journal of The European Society for Medical Oncology / ESMO*. 1 ago. 2017

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015.

DALMAU, E. et al. Current status of hormone therapy in patients with hormone receptor positive (HR+) advanced breast cancer. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 23, n. 6, p. 710–720, dez. 2014.

DAMASKOS, C. et al. Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer. **Anticancer Research**, v. 37, n. 1, p. 35–46, 1 jan. 2017.

DAWOOD, S. et al. Trends in Survival Over the Past Two Decades Among White and Black Patients With Newly Diagnosed Stage IV Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 30, p. 4891–4898, 20 out. 2008.

DE AMICIS, F. et al. Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 1, p. 1–11, maio 2010.

DE AZAMBUJA, E. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1504–1513, 21 maio 2007.

DE LUCA, A. et al. FGFR-targeted therapeutics for the treatment of breast cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 26, n. 3, p. 303–311, mar. 2017.

DE NIGRIS, F. et al. Isolation of a SIR-like gene, SIR-T8, that is overexpressed in thyroid carcinoma cell lines and tissues. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 6, p. 917–923, 18 mar. 2002.

DENG, Y. et al. CDK4/6 inhibitors in combination with hormonal therapy for HR+/HER2-advanced breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinical Breast Cancer**, p. 1–28, 3 maio 2018.

DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 31–42, 29 out. 2015.

DESOUKI, M. M. et al. Decreased mitochondrial SIRT3 expression is a potential molecular biomarker associated with poor outcome in breast cancer. **Human Pathology**, v. 45, n. 5, p. 1071–1077, maio 2014.

DEYATI, A. et al. Molecular biomarkers in clinical development: what could we learn from the clinical trial registry? **Personalized Medicine**, v. 11, n. 4, p. 381–393, jun. 2014.

DICKSON, M. A. Molecular Pathways: CDK4 Inhibitors for Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 13, p. 3379–3383, 30 jun. 2014.

DIRIX, L. Y. et al. Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 3, p. 671–686, fev. 2018.

DIXON, J. M. Endocrine Resistance in Breast Cancer. **New Journal of Science**, v. 2014, n. 7885, p. 1–27, 2014.

DOWSETT, M. et al. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Onco typeDX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 22, p. 2783–2790, ago. 2013.

DUBSKY, P. et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 12, p. 2959–2964, 24 out. 2013.

DUFFY, M. J. et al. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 4, p. 428, 22 ago. 2014.

DUFFY, M. J. et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). **European Journal of Cancer**, v. 75, p. 284–298, 1 abr. 2017.

ECCLES, B. K. et al. Family history and outcome of young patients with breast cancer in the UK (POSH study). **The British Journal of Surgery**, v. 102, n. 8, p. 924–935, jul. 2015.

ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2015.

ELANGO VAN, S. et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor  $\alpha$  in breast cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 21, p. 6654–6664, 1 nov. 2011.

ELBAUOMY ELSHEIKH, S. et al. FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. R23, 2007.

ELLIS, M. J.; PEROU, C. M. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 1, p. 27–34, jan. 2013.

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 1 out. 2012.

FARMER, P. et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4660–4671, 9 maio 2005.

FECHER, L. A.; AMARAVADI, R. K.; FLAHERTY, K. T. The MAPK pathway in melanoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 20, n. 2, p. 183–189, mar. 2008.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 9 out. 2014.

FILIPITS, M. et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 18, p. 6012–6020, 15 set. 2011.

FILIPITS, M. et al. The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 5, p. 1298–1305, 1 mar. 2014.

FINLEY, L. W. S. et al. SIRT3 Opposes Reprogramming of Cancer Cell Metabolism through HIF1 $\alpha$  Destabilization. **Cancer cell**, v. 19, n. 3, p. 416–428, mar. 2011.

FINN, R. S. et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 20, p. 1925–1936, 17 nov. 2016.

FOJO, T.; MAILANKODY, S.; LO, A. Unintended Consequences of Expensive Cancer Therapeutics—The Pursuit of Marginal Indications and a Me-Too Mentality That Stifles Innovation and Creativity. **JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 140, n. 12, p. 1225–12, 1 dez. 2014.

FRENCH, S. W. Chronic alcohol bingeing injures the liver and other organs by reducing NAD<sup>+</sup> levels required for sirtuin's deacetylase activity. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 100, n. 2, p. 303–306, abr. 2016.

FROGNE, T. et al. Activation of ErbB3, EGFR and Erk is essential for growth of human breast cancer cell lines with acquired resistance to fulvestrant. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 114, n. 2, p. 263–275, mar. 2009.

GASPARINI, G.; POZZA, F.; HARRIS, A. L. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 15, p. 1206–1219, 4 ago. 1993.

GAUDET, M. M. et al. Active Smoking and Breast Cancer Risk: Original Cohort Data and Meta-Analysis. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 8, p. 515–525, 28 fev. 2013.

GENG, Q. et al. High expression of Sirt7 served as a predictor of adverse outcome in breast cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 2, p. 1938–1945, 2015.

GENNARI, A. et al. Survival of metastatic breast carcinoma patients over a 20-year period. **Cancer**, v. 104, n. 8, p. 1742–1750, 15 out. 2005.

GENNARI, A. et al. HER2 Status and Efficacy of Adjuvant Anthracyclines in Early Breast Cancer: A Pooled Analysis of Randomized Trials. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 1, p. 14–20, 2 jan. 2008.

GIULIANO, A. E.; EDGE, S. B.; HORTOBAGYI, G. N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, p. 1–3, 18 abr. 2018.

GLUZ, O. et al. West German Study Group Phase III PlanB Trial: First Prospective Outcome Data for the 21-Gene Recurrence Score Assay and Concordance of Prognostic Markers by Central and Local Pathology Assessment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 20, p. 2341–2349, 10 jul. 2016.

GOETZ, M. P. et al. MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. **Journal of clinical oncology: official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 35, n. 32, p. 3638–3646, 10 nov. 2017.

GOLDHIRSCH, A. et al. **Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Anais...** In: *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. set. 2013

GRADISHAR, W. J. et al. A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b study evaluating sorafenib in combination with paclitaxel as a first-line therapy in patients with HER2-negative advanced breast cancer. **European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 49, n. 2, p. 312–322, jan. 2013.

GRAM, I. T. et al. Smoking and Risk of Breast Cancer in a Racially/Ethnically Diverse Population of Mainly Women Who Do Not Drink Alcohol: The MEC Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 182, n. 11, p. 917–925, 1 dez. 2015.

GRIGUOLO, G. et al. Olaparib for the treatment of breast cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 18, n. 6, p. 519–530, jun. 2018.

GROTH, A. et al. Chromatin challenges during DNA replication and repair. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 721–733, 23 fev. 2007.

GUCALP, A. et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5505–5512, 1 out. 2013.

GUEDJ, M. et al. A refined molecular taxonomy of breast cancer. **Oncogene**, v. 31, n. 9, p. 1196–1206, 25 jul. 2011.

GULER, E. N. Gene Expression Profiling in Breast Cancer and Its Effect on Therapy Selection in Early-Stage Breast Cancer. **European Journal of Breast Health**, v. 13, n. 4, p. 168–174, out. 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HARBECK, N. et al. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. **European Journal of Cancer**, p. 1–11, 21 mar. 2013.

HARRIS, L. N. et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 10, p. 1134–1150, 23 mar. 2016a.

HARRIS, L. N. et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 10, p. 1134–1150, abr. 2016b.

HAUGSTEN, E. M. et al. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. **Molecular Cancer Research: MCR**, v. 8, n. 11, p. 1439–1452, nov. 2010.

HAYES, D. F. et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 15, p. 1496–1506, 11 out. 2007.

HE, S. et al. The SIRT 3 Expression Profile is Associated with Pathological and Clinical Outcomes in Human Breast Cancer Patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 2061–2069, 2014a.

HE, S. et al. The SIRT 3 Expression Profile is Associated with Pathological and Clinical Outcomes in Human Breast Cancer Patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 2061–2069, 2014b.

HE, X. et al. SIRT2 activity is required for the survival of C6 glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 1, p. 468–472, 6 jan. 2012.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007.

HIRATSUKA, M. et al. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, n. 3, p. 558–566, set. 2003.

HIRKO, K. A. et al. Alcohol consumption and risk of breast cancer by molecular subtype: Prospective analysis of the nurses' health study after 26 years of follow-up. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 5, p. 1094–1101, 1 mar. 2016.

HODGES-GALLAGHER, L. et al. Inhibition of histone deacetylase enhances the anti-proliferative action of antiestrogens on breast cancer cells and blocks tamoxifen-induced proliferation of uterine cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 105, n. 3, p. 297–309, nov. 2007.

HORTOBAGYI, G. N. et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 18, p. 1738–1748, 3 nov. 2016.

HOUSTON, S. J. et al. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. **British journal of cancer**, v. 79, n. 7-8, p. 1220–1226, mar. 1999.

HU, Z. et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC genomics**, v. 7, p. 96, 27 abr. 2006.

HUANG, X. et al. HDAC inhibitor SNDX-275 induces apoptosis in erbB2-overexpressing breast cancer cells via down-regulation of erbB3 expression. **Cancer Research**, v. 69, n. 21, p. 8403–8411, 1 nov. 2009.

HUDIS, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. **The New England journal of medicine**, v. 357, n. 1, p. 39–51, 5 jul. 2007.

HUTCHINS, L. F. et al. Targeting tumor-associated carbohydrate antigens: a phase I study of a carbohydrate mimetic-peptide vaccine in stage IV breast cancer subjects. **Oncotarget**, v. 8, n. 58, p. 99161–99178, 17 nov. 2017.

IGCI, M. et al. High-throughput screening of Sirtuin family of genes in breast cancer. **Gene**, v. 586, n. 1, p. 123–128, jul. 2016.

IGLEHART, J. D.; SILVER, D. P. Synthetic Lethality — A New Direction in Cancer-Drug Development. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 2, p. 189–191, 2009.

IHEMELANDU, C. U. et al. Treatment and Survival Outcome for Molecular Breast Cancer Subtypes in Black Women. **Annals of Surgery**, v. 247, n. 3, p. 463–469, mar. 2008.

INCA. *Instituto Nacional de Câncer*. Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em 10/07/2018.

INGLE, J. N. et al. Fulvestrant in women with advanced breast cancer after progression on prior aromatase inhibitor therapy: North Central Cancer Treatment Group Trial N0032. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 7, p. 1052–1056, 1 mar. 2006.

JANICKE, F. et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 12, p. 913–920, 20 jun. 2001.

JANSEN, M. P. H. M. et al. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 6, p. 662–668, 20 fev. 2007.

JEONG, S. M. et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. **Cancer cell**, v. 23, n. 4, p. 450–463, 15 abr. 2013.

JEREVALL, P.-L. et al. Prognostic utility of HOXB13:IL17BR and molecular grade index in early-stage breast cancer patients from the Stockholm trial. **British journal of cancer**, v. 104, n. 11, p. 1762–1769, 24 maio 2011.

JHAVERI, K. et al. Hyperactivated mTOR and JAK2/STAT3 Pathways: Molecular Drivers and Potential Therapeutic Targets of Inflammatory and Invasive Ductal Breast Cancers After Neoadjuvant Chemotherapy. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 2, p. 113–22.e1, abr. 2016.

JIN, M.-S. et al. SIRT1 induces tumor invasion by targeting epithelial mesenchymal transition-related pathway and is a prognostic marker in triple negative breast cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4743–4753, 30 out. 2015.

JOCHEMS, C.; SCHLOM, J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 236, n. 5, p. 567–579, 1 maio 2011.

JOHNSON, K. C. et al. Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). **Tobacco control**, v. 20, n. 1, p. e2–e2, jan. 2011.

JOHNSTON, S. R. D. Clinical efforts to combine endocrine agents with targeted therapies against epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 and mammalian target of rapamycin in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 3 Pt 2, p. 1061s–1068s, 1 fev. 2006.

JOHNSTON, S. R. D. Enhancing Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: Cotargeting Signaling Pathways. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 10, out. 2015.

JUBIN, T. et al. The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival. **Cell proliferation**, v. 49, n. 4, p. 421–437, ago. 2016.

KAKLAMANI, V. G.; GRADISHAR, W. J. Endocrine Therapy in the Current Management of Postmenopausal Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 22, n. 5, p. 507–517, maio 2017.

KARSLI-CEPPIOGLU, S. et al. Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. **Epigenomics**, v. 6, n. 6, p. 651–664, 2014.

KATZ, H.; ALSHAREDI, M. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. **Medical Oncology**, v. 35, n. 1, p. 13, 18 dez. 2017.

KENNECKE, H. et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 20, p. 3271–3277, 10 jul. 2010.

KHONGKOW, M. et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 7, p. 1476–1486, 20 mar. 2013a.

KHONGKOW, M. et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 7, p. 1476–1486, jul. 2013b.

KOHLER, B. A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 6, p. 1197–25, 30 mar. 2015a.

KOHLER, B. A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 6, p. 1197–25, 30 mar. 2015b.

KONO, M. et al. Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 9, p. 1266–1273, 1 set. 2017.

KREIKE, B. et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. R65, 2007.

KROEMER, G. et al. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. **Nature medicine**, v. 21, n. 10, p. 1128–1138, out. 2015.

KROP, I. et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, 20 ago. 2017.

KUO, S.-J. et al. SIRT1 suppresses breast cancer growth through downregulation of the Bcl-2 protein. **Oncology reports**, v. 30, n. 1, p. 125–130, jul. 2013.

KÜMLER, I.; CHRISTIANSEN, O. G.; NIELSEN, D. L. A systematic review of bevacizumab efficacy in breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 8, p. 960–973, set. 2014.

KWAPISZ, D. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. **Breast Cancer Research and Treatment**, p. 1–14, 24 jul. 2017.

LAI, C.-C. et al. Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 3, p. 1847–1854, jun. 2013.

LAL, S. et al. Molecular signatures in breast cancer. **Methods**, p. 1–12, 11 jul. 2017.

LARA-MEDINA, F. et al. Triple-negative breast cancer in Hispanic patients. **Cancer**, v. 117, n. 16, p. 3658–3669, 8 mar. 2011.

LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794–798, 2016.

LAVASANI, M. A.; MOINFAR, F. Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on “basal-like” carcinoma: a critical review. **Journal of biophotonics**, v. 5, n. 4, p. 345–366, abr. 2012.

LEDERMANN, J. et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 15, p. 1382–1392, 12 abr. 2012.

LEE, H. et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. **Human Pathology**, v. 42, n. 2, p. 204–213, 1 fev. 2011.

LEE, J. J.; LOH, K.; YAP, Y. S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. **Cancer biology & medicine**, v. 12, n. 4, p. 342–354, dez. 2015.

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 1 jul. 2011.

LEHMANN-CHE, J. et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 3, p. R37, 11 maio 2013.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 25 jun. 2010.

LI, X. et al. Efficacy of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors for the treatment of advanced solid cancers: A literature-based meta-analysis of 46 randomised control trials. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192464, 2018.

LI, Y. et al. SIRT2 down-regulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 16, n. 1, p. 34–45, jan. 2011.

LIEDKE, P. E. R. et al. Outcomes of breast cancer in Brazil related to health care coverage: a retrospective cohort study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 1, p. 126–133, jan. 2014.

LIGHT, D. W.; LEXCHIN, J. Why do cancer drugs get such an easy ride? **BMJ**, v. 350, n. apr23 1, p. h2068–h2068, 23 abr. 2015.

LIU, L. et al. Combination Immunotherapy of MUC1 mRNA Nano-vaccine and CTLA-4 Blockade Effectively Inhibits Growth of Triple Negative Breast Cancer. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 26, n. 1, p. 45–55, 3 jan. 2018.

LIVRAGHI, L.; GARBER, J. E. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 188, 13 ago. 2015.

LOBBEZOO, D. J. A. et al. Prognosis of metastatic breast cancer: are there differences between patients with de novo and recurrent metastatic breast cancer&quest. **British journal of cancer**, v. 112, n. 9, p. 1445–1451, 16 abr. 2015.

LOIBL, S.; GIANNI, L. HER2-positive breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10087, p. 2415–2429, jun. 2017a.

LOIBL, S.; GIANNI, L. HER2-positive breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10087, p. 2415–2429, jun. 2017b.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. **Science**, v. 355, n. 6330, p. 1152–1158, 17 mar. 2017.

LU, W. et al. SIRT5 facilitates cancer cell growth and drug resistance in non-small cell lung cancer. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 11, p. 10699–10705, nov. 2014.

LUPORSI, E. et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 3, p. 895–915, 3 nov. 2011.

MA, X.-J. et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. **Cancer cell**, v. 5, n. 6, p. 607–616, jun. 2004.

MA, X.-J. et al. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 9, p. 2601–2608, 1 maio 2008.

MALENFANT, S. J.; ECKMANN, K. R.; BARNETT, C. M. Pertuzumab: a new targeted therapy for HER2-positive metastatic breast cancer. **Pharmacotherapy**, v. 34, n. 1, p. 60–71, jan. 2014.

MAROTTA, L. L. C. et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> stem cell-like breast cancer cells in human tumors. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 7, p. 2723–2735, jul. 2011.

MARTÍN, M. et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. R38, 12 abr. 2014.

MASAMURA, S. et al. Estrogen deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 80, n. 10, p. 2918–2925, out. 1995.

MAURI, D. et al. Survival With Aromatase Inhibitors and Inactivators Versus Standard Hormonal Therapy in Advanced Breast Cancer: Meta-analysis. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 18, p. 1285–1291, 19 set. 2006.

MAYER, I. A. et al. Stand up to cancer phase Ib study of pan-phosphoinositide-3-kinase inhibitor buparlisib with letrozole in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 32, n. 12, p. 1202–1209, 20 abr. 2014.

MCDERMOTT, D.; SRIVASTAVA, N. Update on benefit of immunotherapy and targeted therapy in melanoma: the changing landscape. **Cancer Management and Research**, v. 6, p. 279–289, jun. 2014.

MCGLYNN, L. M. et al. SIRT2: tumour suppressor or tumour promoter in operable breast cancer? **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 50, n. 2, p. 290–301, jan. 2014.

MCGUIRE, W. L.; CLARK, G. M. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 26, p. 1756–1761, 25 jun. 1992.

MESA, R. A.; CORTES, J. Optimizing management of ruxolitinib in patients with myelofibrosis: the need for individualized dosing. **Journal of hematology & oncology**, v. 6, n. 1, p. 79, 22 out. 2013.

MILES, D. W. et al. First-line bevacizumab in combination with chemotherapy for HER2-negative metastatic breast cancer: pooled and subgroup analyses of data from 2447 patients. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 24, n. 11, p. 2773–2780, nov. 2013.

MILLER, K. et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 357, n. 26, p. 2666–2676, 27 dez. 2007.

MILLS, J. N.; RUTKOVSKY, A. C.; GIORDANO, A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 41, p. 59–65, 28 abr. 2018.

MINUTI, G.; LANDI, L. MET deregulation in breast cancer. **Annals of translational medicine**, v. 3, n. 13, p. 181, ago. 2015.

MIRZOEVA, O. K. et al. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. **Cancer Research**, v. 69, n. 2, p. 565–572, 15 jan. 2009.

MISHRA, A.; VERMA, M. Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time? **Cancers**, v. 2, n. 1, p. 190–208, mar. 2010.

MOJA, L. et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 353, n. 4, p. CD006243, 18 abr. 2012.

MONTOR, W. R.; SALAS, A. R. O. S. E.; MELO, F. H. M. DE. Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. **Molecular cancer**, v. 17, n. 1, p. 55, 19 fev. 2018.

NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 6, p. 833–838, 15 mar. 2011.

NAKASHOJI, A. et al. The updated network meta-analysis of neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 62, p. 9–17, jan. 2018.

NANDA, R. et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 34, n. 21, p. 2460–2467, 20 jul. 2016.

NASRAZADANI, A. et al. Precision Medicine in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 620–8, 4 maio 2018.

NOGUCHI, A. et al. SIRT1 expression is associated with a poor prognosis, whereas DBC1 is associated with favorable outcomes in gastric cancer. **Cancer medicine**, v. 3, n. 6, p. 1553–1561, dez. 2014.

O’SULLIVAN, C. C.; LOPRINZI, C. L.; HADDAD, T. C. Updates in the Evaluation and Management of Breast Cancer. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 6, p. 794–807, 1 jun. 2018.

OH, T. G.; WANG, S.-C. M.; MUSCAT, G. E. O. Minireview: Therapeutic Implications of Epigenetic Signaling in Breast Cancer. **Endocrinology**, p. en.2016–1716–31, 16 dez. 2016.

O’SHAUGHNESSY, J. et al. A randomized, double-blind, phase 2 study of ruxolitinib or placebo in combination with capecitabine in patients with advanced HER2-negative breast cancer and elevated C-reactive protein, a marker of systemic inflammation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 19, n. 113–122, p. 511–11, 19 abr. 2018.

OVERHOLSER, J. et al. Anti-Tumor Effects of Peptide Therapeutic and Peptide Vaccine Antibody Co-targeting HER-1 and HER-2 in Esophageal Cancer (EC) and HER-1 and IGF-1R in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). **Vaccines**, v. 3, n. 3, p. 519–543, 6 jul. 2015.

PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 27, p. 2817–2826, 30 dez. 2004.

PANDEY, S. et al. Bioanalysis in drug discovery and development. **Pharmaceutical Methods**, v. 1, n. 1, p. 14–24, 8 dez. 2010.

PARBIN, S. et al. Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 62, n. 1, p. 11–33, jan. 2014.

PARKER, J. S. et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 10 mar. 2009a.

PARKER, J. S. et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 10 mar. 2009b.

PEGRAM, M. D. et al. Innovative Strategies: Targeting Subtypes in Metastatic Breast Cancer. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 38, p. 65–77, 2018.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 17 ago. 2000.

PETERS, C. J. et al. A 4-gene signature predicts survival of patients with resected adenocarcinoma of the esophagus, junction, and gastric cardia. **Gastroenterology**, v. 139, n. 6, p. 1995–2004.e15, dez. 2010.

PETRELLI, F. et al. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, p. 1–15, 4 set. 2015.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. R68–18, 2010.

PRAT, A.; PASCUAL, T.; ADAMO, B. Intrinsic molecular subtypes of HER2+ breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 73362–73363, 26 set. 2017.

QUINTÁS-CARDAMA, A. et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 115, n. 15, p. 3109–3117, 15 abr. 2010.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; VERSTOVSEK, S. Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 8, p. 1933–1940, 15 abr. 2013.

RAHIM, B.; O'REGAN, R. AR Signaling in Breast Cancer. **Cancers**, v. 9, n. 12, p. 21–26, dez. 2017.

RAKHA, E. A. et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 404–author reply 405, 2007.

REINERT, T.; BARRIOS, C. H. Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 7, n. 6, p. 304–320, nov. 2015.

RIGGS, B. L.; HARTMANN, L. C. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 7, p. 618–629, 13 fev. 2003.

ROBERTSON, J. F. R. et al. Fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg for hormone receptor-positive advanced breast cancer (FALCON): an international, randomised, double-blind, phase 3 trial. **Lancet (London, England)**, v. 388, n. 10063, p. 2997–3005, 17 dez. 2016.

ROBSON, M. et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. **The New England journal of medicine**, v. 377, n. 6, p. 523–533, 10 ago. 2017.

ROSENBLATT, M. The Large Pharmaceutical Company Perspective. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 1, p. 52–60, 5 jan. 2017.

ROSS, J. S. et al. Comprehensive genomic profiling of inflammatory breast cancer cases reveals a high frequency of clinically relevant genomic alterations. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 154, n. 1, p. 155–162, nov. 2015.

RUGO, H. S. et al. Randomized, placebo-controlled, double-blind, phase II study of axitinib plus docetaxel versus docetaxel plus placebo in patients with metastatic breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 18, p. 2459–2465, 20 jun. 2011.

RUGO, H. S. et al. **Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 1 set. 2016.

RUGO, H. S. et al. Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 12, p. 2804–2811, 15 jun. 2018.

SABNIS, G. J. et al. HDAC inhibitor entinostat restores responsiveness of letrozole-resistant MCF-7Ca xenografts to aromatase inhibitors through modulation of Her-2. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, n. 12, p. 2804–2816, dez. 2013.

SANTA-MARIA, C. A. et al. A pilot study of durvalumab and tremelimumab and immunogenomic dynamics in metastatic breast cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 27, p. 18985–18996, 10 abr. 2018.

SAURA, C. et al. Phase Ib study of Buparlisib plus Trastuzumab in patients with HER2-positive advanced or metastatic breast cancer that has progressed on Trastuzumab-based therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 7, p. 1935–1945, 1 abr. 2014.

SAVAS, P. et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 4, p. 228–241, abr. 2016.

SCHETTINI, F. et al. PI3K/mTOR Inhibitors in the Treatment of Luminal Breast Cancer. Why, When and to Whom? **Breast Care**, v. 12, n. 5, p. 290–294, out. 2017.

SCHUMACHER, T. N.; SCHREIBER, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 69–74, 2 abr. 2015.

SENKUS, E. et al. **Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, set. 2015.

SGROI, D. C. et al. Prediction of Late Disease Recurrence and Extended Adjuvant Letrozole Benefit by the HOXB13/IL17BR Biomarker. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 14, p. 1036–1042, 13 jul. 2013a.

SGROI, D. C. et al. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-

gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 11, p. 1067–1076, out. 2013b.

SHARPE, R. et al. FGFR signaling promotes the growth of triple-negative and basal-like breast cancer cell lines both in vitro and in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 16, p. 5275–5286, 15 ago. 2011.

SHIAU, A. K. et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. **Cell**, v. 95, n. 7, p. 927–937, 23 dez. 1998.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 1 jan. 2016.

SINI, V. et al. Bevacizumab as First-Line Treatment in HER2-Negative Advanced Breast Cancer: Pros and Cons. **Tumori Journal**, v. 102, n. 5, p. 472–480, 13 mar. 2018.

SIROTKIN, A. The Role and Application of Sirtuins and mTOR Signaling in the Control of Ovarian Functions. **Cells**, v. 5, n. 4, p. 42–8, dez. 2016.

SLAMON, D. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177–182, 9 jan. 1987.

SLAMON, D. J. et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 11, p. 783–792, 2001a.

SLAMON, D. J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 11, p. 783–792, 15 mar. 2001b.

SORIA, J. C. et al. Phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 25, n. 11, p. 2244–2251, nov. 2014.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10393–10398, 2 set. 2003.

SPARANO, J. A. et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 21, p. 2005–2014, 19 nov. 2015.

SPARANO, J. A. et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. **The New England journal of medicine**, 3 jun. 2018.

STOCKWELL, S. George Thomas Beatson M.D.(1848-1933). **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 33, n. 2, p. 105–107, 1 mar. 1983.

STOVER, D. G. et al. Phase II study of ruxolitinib, a selective JAK1/2 inhibitor, in patients with metastatic triple-negative breast cancer. **NPJ breast cancer**, v. 4, n. 1, p. 10, 2018.

SUN, Z. et al. Chemotherapy benefit for “ER-positive” breast cancer and contamination of nonluminal subtypes—waiting for TAILORx and RxPONDER. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 26, n. 1, p. 70–74, jan. 2015.

SURAWEEERA, A.; O’BYRNE, K. J.; RICHARD, D. J. Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 3898, 29 mar. 2018.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 11 set. 2001.

TANG, M. et al. Downregulation of SIRT7 by 5-fluorouracil induces radiosensitivity in human colorectal cancer. **Theranostics**, v. 7, n. 5, p. 1346–1359, 28 mar. 2017a.

TANG, X. et al. SIRT7 antagonizes TGF- $\beta$  signaling and inhibits breast cancer metastasis. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 10 ago. 2017b.

TOLANEY, S. M. et al. Cabozantinib for metastatic breast carcinoma: results of a phase II placebo-controlled randomized discontinuation study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 160, n. 2, p. 305–312, nov. 2016.

TRAINA, T. A. et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 36, n. 9, p. 884–890, 20 mar. 2018.

TRAN, B.; BEDARD, P. L. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 221, 2011.

TRAPANI, D. et al. Entinostat for the treatment of breast cancer. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 26, n. 8, p. 965–971, ago. 2017.

TSERGA, A. et al. Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 469, n. 1, p. 35–43, jul. 2016.

TUNG, N. M.; GARBER, J. E. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. **British journal of cancer**, v. 119, n. 5 Suppl, p. 13, 5 jun. 2018.

TURK, A. A.; WISINSKI, K. B. PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. **Cancer**, v. 124, n. 12, p. 2498–2506, 15 jun. 2018.

TURNER, N. et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 5, p. 2085–2094, 1 mar. 2010.

VAN 'T VEER, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530–536, 31 jan. 2002.

VAN DE VIJVER, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 347, n. 25, p. 1999–2009, 19 dez. 2002.

VAN POZNAK, C. et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 24, p. 2695–2704, 20 ago. 2015.

VARELLA, L.; ABRAHAM, J.; KRUSE, M. Revisiting the Role of Bevacizumab in the Treatment of Breast Cancer. **Seminars in Oncology**, v. 44, n. 4, p. 273–285, ago. 2017.

VENKATAKRISHNAN, K. et al. Optimizing Oncology Therapeutics Through Quantitative Translational and Clinical Pharmacology: Challenges and Opportunities. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 97, n. 1, p. 37–54, 9 dez. 2014.

VERSTOVSEK, S. et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 9, p. 799–807, 1 mar. 2012.

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1–14, jul. 2014.

WALLDEN, B. et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 1, p. 54, 22 ago. 2015.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192–208, jun. 2010.

WHEELER, H. E. et al. Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 1, p. 23–34, 27 nov. 2012.

WHITE, A. J. et al. Lifetime Alcohol Intake, Binge Drinking Behaviors, and Breast Cancer Risk. **American journal of epidemiology**, v. 186, n. 5, p. 541–549, 1 set. 2017.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 29 out. 2013.

WOODS, D. M. et al. HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments Immunotherapy with PD-1 Blockade. **Cancer immunology research**, v. 3, n. 12, p. 1375–1385, dez. 2015.

WU, M. et al. Expression of SIRT1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in both operable triple-negative and non-triple-negative breast cancer. **Medical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 3240–3249, 4 jun. 2012.

YAMNIK, R. L.; HOLZ, M. K. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. **FEBS letters**, v. 584, n. 1, p. 124–128, 4 jan. 2010.

YANG, G. et al. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 3, p. 392–404, set. 2013.

YANG, X. R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 3, p. 439–443, mar. 2007.

YARDLEY, D. A. et al. Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or

metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 17, p. 2128–2135, 10 jun. 2013.

YU, F.-Y. et al. The Prognostic and Clinicopathological Roles of Sirtuin-3 in Various Cancers. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0159801–12, 2 ago. 2016.

YUAN, H.; SU, L.; CHEN, W. Y. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. **OncoTargets and therapy**, v. 6, p. 1399–1416, 8 out. 2013.

ZAKHARI, S. Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes. **Alcohol Research**, v. 35, n. 1, p. 6–16, 8 ago. 2013.

ZAMAN, K. et al. Fulvestrant with or without selumetinib, a MEK 1/2 inhibitor, in breast cancer progressing after aromatase inhibitor therapy: a multicentre randomised placebo-controlled double-blind phase II trial, SAKK 21/08. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 51, n. 10, p. 1212–1220, jul. 2015.

ZARDAVAS, D.; PUGLIANO, L.; PICCART, M. Personalized therapy for breast cancer: a dream or a reality? **Future Oncology**, v. 9, n. 8, p. 1105–1119, ago. 2013.

ZHANG, C. Z. et al. Low SIRT3 expression correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis in primary hepatocellular carcinoma. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51703, 2012.

ZHANG, S. M. et al. Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. **American journal of epidemiology**, v. 165, n. 6, p. 667–676, 15 mar. 2007.

ZHANG, Y.-Y.; ZHOU, L.-M. Sirt3 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through reducing Mdm2-mediated p53 degradation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 423, n. 1, p. 26–31, jun. 2012.

## APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA PHARMACOGENOMICS

## Short Communication

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## Pharmacogenomics



## Evaluating the impact of missense mutations in *CYP2D6*\*7 and *CYP2D6*\*14A: does it compromise tamoxifen metabolism?

*CYP2D6* is a high polymorphic enzyme from P450, responsible for metabolizing almost 25% of drugs. The distribution of different mutations among *CYP2D6* alleles has been associated with poor, intermediate, extensive and ultra-metabolizers. **Aim:** To evaluate how missense mutations in *CYP2D6*\*7 and *CYP2D6*\*14A poor metabolizer alleles affect *CYP2D6* stability and function. **Materials & methods:** CYPalleles database was used to collect polymorphisms data present in 105 alleles. We selected only poor metabolizers alleles that presented exclusively missense mutations. They were analyzed through seven algorithms to predict the impact on *CYP2D6* structure and function. **Results:** H324P, the unique mutation in *CYP2D6*\*7, has high impact in enzyme function due to its occurrence between two alpha-helices involved in active site dynamics. G169R, a mutation that occurs only in *CYP2D6*\*14A, leads to the gain of solvent accessibility and severe protein destabilization. **Conclusion:** Our *in silico* analysis showed that missense mutations in *CYP2D6*\*7 and *CYP2D6*\*14A cause *CYP2D6* dysfunction.

First draft submitted: 4 December 2015; Accepted for publication: 28 January 2016; Published online: 4 April 2016

**Keywords:** algorithms • bioinformatics • *CYP2D6* • *CYP2D6*\*7 • *CYP2D6*\*14A • poor metabolizers • tamoxifen

Breast cancer is the second most common cancer in the world and, by far, the most frequent cancer among women with an estimated 1.67 million new cancer cases diagnosed in 2012 (25% of all cancers). Breast cancer ranks as the fifth cause of death from cancer overall (522,000 deaths), while it is the second most frequent cause of cancer death in women from America's region (92,058 deaths, 14.9% of total) [1].

Tamoxifen, is the standard treatment for estrogen receptor (ER)-positive breast cancer (70–80% of the cases), it is a compound known as selective ER modulator that acts as ER antagonist in breast tissue [2]. However, endocrine therapy using tamoxifen is known to fail in up to 50% of patients, due to alterations in estrogen receptor; alterations in pathways signaled by estrogen receptor; and

bypass mechanisms, that includes metabolic defects, mainly by *CYP2D6* dysfunction [3].

Tamoxifen has a weak affinity to the ER and is regarded as a prodrug, extensively metabolized by several members of the CYP450 family and Phase II conjugation enzymes. Multiple CYP enzymes are involved in the tamoxifen metabolism, including CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6. Endoxifen and 4-hydroxytamoxifen, which are the main metabolites, have equivalent anti-estrogenic potentials and are 30–100 times more active than tamoxifen. Because of the five- to tenfold higher plasma concentrations of endoxifen compared with 4-hydroxytamoxifen, endoxifen is believed to be the principal active metabolite [4]. It is also the only metabolite that binds to ER and leads to proteasomal degradation, decreasing ER levels [5].

Maria ACSM Borba<sup>\*1</sup>, Renato P Melo-Neto<sup>1</sup>, Glauber M Leitão<sup>1,2</sup>, Carlos HM Castelletti<sup>1,3</sup>, José L Lima-Filho<sup>4,5</sup> & Danyelly BG Martins<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Molecular Prospection and Bioinformatics Group (ProspecMol) – Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Clinical Hospital – Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

<sup>3</sup>Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), Av. General San Martin 1371, 50761-000, Bongi, Recife, PE, Brazil

<sup>4</sup>Biochemistry Department, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

<sup>5</sup>Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

<sup>\*</sup>Author for correspondence: [mborba@prospecmol.org](mailto:mborba@prospecmol.org)

Future  
Medicine part of fsg

CYP2 family contains 16 full-length genes, spread over different chromosomes and organized in multi-gene clusters, which all have nine exons and eight introns. CYP genes involved in pharmacological response are highly polymorphic, notably CYP2D6 [6], a tetramer heme-containing structure that acts over substrates that have a basic nitrogen and a planar aromatic ring [7]. It plays an important role in the metabolism of almost 25% of drugs, including analgesics, antidepressants and antineoplastic [6,8]. According to CYP Allele Nomenclature Database [9], there are 105 alleles for CYP2D6. These alleles have been associated with four drug metabolism phenotypes: poor, intermediate, extensive and ultra-metabolizers [10]. However, this association is still unclear to be applied in the guidelines for breast cancer treatment [11]. Some multicenter studies revealed a clear association between CYP2D6 alleles and the success of tamoxifen treatment [12,13], while many others demonstrated the failure of tamoxifen regardless of CYP2D6 genotype [14,15].

Nowadays, there is an intuitive rationale for using pharmacogenomics to guide medical treatment. So, the understanding of CYP2D6 alleles value in predicting the efficiency of tamoxifen through pharmacogenomics markers could improve the implementation of personalized medicine in the clinical oncology [16]. However, there is no well-established correlation between phenotypic and clinical data, despite the large volume of genomic data.

Therefore, bioinformatics approaches have been used as powerful tools to handle and understand genomic data [17,18]. Multiple algorithms were developed for predicting the structural, functional and evolutionary impact of genomic mutations based on protein sequence and 3D structure data. These tools provide support for experimental validation of disease-related alleles, emphasizing changes that could affect the structure and function of the protein [19,20]. There is also a class of methods, referred as template-based modeling, which relies on detectable similarity spanning most of the modeled sequence and at least one known structure [21]. As a small change in protein sequence usually results in a change in its 3D structure, the integration of algorithms data and 3D models leads to a more reliable conclusion.

The aim of this study was to evaluate the impact of missense mutations in CYP2D6\*7 and CYP2D6\*14A poor metabolizer alleles, using *in silico* approaches for predicting the structural and functional impact on the CYP2D6 molecule.

## Materials & methods

### Dataset construction

CYPalleles database [9] was used to collect polymorphisms data present in 105 alleles. Only 33 alleles

were associated with poor metabolizer phenotype, containing four types of mutations: insertion, deletion, duplication and base substitution. Additional screening step was performed to identify CYP2D6 alleles that contain exclusively missense mutations, selecting only two alleles: CYP2D6\*7 and CYP2D6\*14A.

The mutations identified were validated through dbSNP and Ensembl databases using the follow criteria: multiple observations (cluster), validation in 1000 Genomes Project and presence of mutation frequency (MAF). Since CYPalleles and dbSNP use different assemblies (M333.88 and GRCh38, respectively), the Leiden Open Variation Database platform (LOVD database – [22]) was accessed to correlate data from both and to provide additional genomic information about polymorphisms position.

### Functional & structural impact of missense mutations

A total of seven algorithms were used to evaluate the impact of each mutation on CYP2D6 structure and function (Table 1). To determine whether a polymorphism is deleterious or not, a threshold for each algorithm was established based on the algorithm description. Thus, a classification system was adopted as follow: 1 was attributed when the prediction indicates deleterious effect; 0 was attributed when the algorithms prediction showed no effect of the mutation on enzyme structure or function.

The SnpEff output shows the variation of Gibbs free energy after the mutation changes in the molecule, classifying it into seven classes ranging from 'no effect in stability' to 'greatly enhanced stability' [23]. MuPro is a structural algorithm based on Support Vector Machine or Neural Network, but only Support Vector Machine results were analyzed, following the author's recommendation [24]. MutPred algorithm generates two scores: a general score (g), predicting the chance for a mutation to be deleterious or disease associated; and a property score (p) with the top five properties that may be impacted by the polymorphism [25]. SNAP2 is based on SIFT [30] and Polyphen2 [31] output data, generating a score associated with the prediction of one mutation as deleterious or not for the molecule [26]. SNPs&GO is dedicated to gene ontology analysis based on PHANTER data output [32] but also shows PhD-SNP [33] prediction as the result [27]. SNPs&GO showed to be useful for removing false positive results from data output [20]. MutationTaster2 is a Bayes classifier that provides conservation scores (Philo-P and PhastCons) and provide a general score for amino acid substitution impact. Philo-P score was used as threshold once mutations in conserved residues and regions show

Table 1. Algorithms applied to *in silico* analysis.

| Algorithm        | Method                 | Analysis              | Threshold                     | Remarks                                                                 | Ref. |
|------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------|
| SNPeffect        | Naive bayes            | Structural            | >0.5                          | FoldX prediction in $\Delta\Delta G$                                    | [23] |
| MuPro            | SVM and neural network | Structural            | <-0.5                         | SVM output is more accurate                                             | [24] |
| MutPred          | Random forest          | Structural/functional | g >0.75                       | High sensibility and specificity                                        | [25] |
| SNAP2            | Neural network         | Functional            | >50 score                     | Dataset construction and training included a specific data for enzymes  | [26] |
| SNPs&GO          | SVM                    | Functional            | >0.5; RI $\geq 5$             | Utilizes gene ontology and is indicated for identifying false positives | [27] |
| Mutation Taster2 | Bayes classifier       | Functional            | 1                             | Provides conservational scores Phylo-P and PhastCons                    | [28] |
| SDM              | Statistical            | Structural            | $\pm 2 \text{ kcal mol}^{-1}$ | Analysis of multiple chains mutated                                     | [29] |

Δ: Variation; RI: Reliability index; SVM: Support sector machine.

a higher probability to impact the protein structure and function [28].

The Site Direct Mutator (SDM) algorithm was used to analyze the structural impact generated by accumulative mutations in the *CYP2D6* tetramer. The variants were generated by incrementing each mutation in each monomer following the chain organization. SDM uses statistical potential energy function that predicts the effect of missense mutation in the stability of proteins, and its output includes side-chain solvent accessibility that ranges from inaccessible (<17%) and partially accessible (17–43%) to accessible (>47%). It also gives a score of pseudo  $\Delta\Delta G$  that measures the variation of free energy between unfolded and folded protein, thus, giving a prediction of protein stability and disease association in protein variants [29]. SDM do not distinguish the impact of the chain affected according to molecule assembly, only the cumulative effect according to the number of chains mutated in the 3D model.

#### Tridimensional analysis

The *CYP2D6* crystallographic structure was used for structural prediction. 2F9Q file (Protein Database – PDB) corresponds to *CYP2D6* tetramer of four identical chains (A–D) containing 479 residues in each one, with 3.0 Å resolution. This 3D structure initiates at residue 34 and lacks the residues 42–51, but is the only one available for *CYP2D6* without substrate or inhibitor. PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4, Schrödinger, LLC, NY, USA) was used to observe the 3D structure of *CYP2D6* and

also to generate the variants models to analyze the cumulative effect of each mutation through SDM.

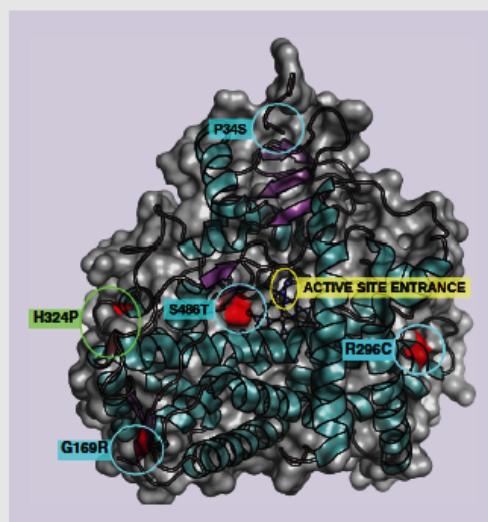
#### Results

*CYP2D6\*7* poor metabolizer showed only one missense mutation, described as the cause of enzyme inactivation. The polymorphism 2935A>C, present only in this allele, occurs in exon 6 resulting in H324P mutation. *CYP2D6\*14A* allele shows the same phenotype caused by four missense mutations, each one in a different exon. R296C and S486T are well distributed in all metabolizer phenotypes; while G169R is present only in *CYP2D6\*14A*. P34S mutation is present in both intermediate and poor metabolizers phenotypes.

Figure 1 represents the *CYP2D6* 3D structure, showing the catalytic site and the point of each mutation for *CYP2D6\*7* and *CYP2D6\*14A*. Table 2 shows the algorithms prediction output for the effect of each mutation in *CYP2D6\*7* and *CYP2D6\*14A* over protein stability and function. Table 3 shows the SDM data output related to each mutation and the cumulative effect of the mutation in more than one chain.

#### Allele *CYP2D6\*7*

The substitution of a polar for a nonpolar amino acid leads to an extreme change in the hydrophobicity degree, ranging from 0.165 for Histidine to 0.711 for Proline. For H324P mutation, the structural algorithms SNPeffect and MuPro predict a decrease in enzyme stability. SDM predictions show a great loss in solvent accessibility when Proline is replaced by Histidine, changing from partially accessible to a



**Figure 1.** CYP2D6 3D structure showing the active site entrance (yellow) with the heme group; the H324P mutation carried by CYP2D6\*7 (green) and the set of mutations for the allele CYP2D6\*14A (blue).

buried condition in the molecule, with around 22% overall reduction. The presence of H324P in only one CYP2D6 chain leads to a molecular destabilization, but its accumulation in other chains increases this impact. SDM prediction is related to the decrease of pseudo  $\Delta\Delta G$ , leading to an increased deleterious effect that could be associated with the enzyme dysfunction.

SNPs&GO, SNAP2 and MutPred, all algorithms for functional prediction, also showed deleterious effect of H324P. MutationTaster2 analysis showed association with disease due to the functional impact; with Phylo-P conservation full score 1.00 indicating this mutation occurs in a conserved region, leading to high functional impact.

The Proline is an imino acid that imposes severe restriction on angles accessible to the pre-proline residues in the sequence. The CYP2D6 present another

proline in position 325, therefore, this mutation occurs in a two residues junction region connecting J-helix and I-helix. The I-helix contains six residues (L302, A305, G306, T309, T310 and T313) composing the P450 active site pocket (Figure 2). So, this new restriction certainly reduces the states accessible to the backbone for 324-'PP'-325, consequently, restricting the relative position freedom of I-helix and J-helix.

#### Allele CYP2D6\*14A

P34S mutation showed no effect on CYP2D6 stability according to SNPeffect while MuPro prediction showed an increase of CYP2D6 structural stability (Supplementary Table 1). SDM also predicted mutation effect, due to the increase of pseudo  $\Delta\Delta G$ , but only when P34S occurs in two or more chains. This mutation results in additional H-bond between the Ser34 in the loop and Ser70 in a  $\beta$ -sheet when Proline is substituted by the Serine (Figure 3). Phylo-P conservation output showed the highest score, indicating P34S functional impact prediction.

CYP2D6\*14A G169R leads to a notable reduction in hydrophobicity degree once nonpolar glycine (0.501) is substituted for a polar arginine (0.000). SNPeffect and MuPro predicted a decrease in structural stability. SDM predicted an increase in solvent accessibility in 53%, with an increase in molecule destabilizing. Disease association occurs only when G169R is present in two or more chains. All functional algorithms predict damage, with a very confident hypothesis of gain of solvent accessibility ( $p = 0.0037$ ) according to MutPred. G169R mutation shows the great importance for CYP2D6 stability, probably due to its presence in a monomer interface region (Figure 4), which could difficult the tetramer assembly.

CYP2D6\*14A R296C polymorphism showed no effect on molecule structure according to SNPeffect while MuPro predicted the destabilizing effect of this mutation. SDM predicts high stabilizing effect with disease association even when the mutation is present

**Table 2.** Algorithms predictions for missenses mutations in CYP2D6\*7 and CYP2D6\*14A alleles.

| ID        | Allele | Exon | AA change | CYPalleles (M333.88) | SNPeffect | MuPro | MutPred | SNAP2 | SNPs&GO | Mutation Taster2 (Phylo-P) |
|-----------|--------|------|-----------|----------------------|-----------|-------|---------|-------|---------|----------------------------|
| rs5030867 | *7     | 6    | H324P     | 2935A>C              | 1         | 1     | 1       | 1     | 1       | 1                          |
| rs1065852 | *14A   | 1    | P34S      | 100C>T               | 0         | 1     | 1       | 1     | 1       | 1                          |
| rs5030865 | *14A   | 3    | G169R     | 1758G>A              | 1         | 1     | 1       | 1     | 1       | 0                          |
| rs16947   | *14A   | 6    | R296C     | 2850C>T              | 0         | 1     | 0       | 0     | 0       | ND                         |
| rs1135840 | *14A   | 9    | S486T     | 4180G>C              | 0         | 0     | 0       | 0     | 0       | ND                         |

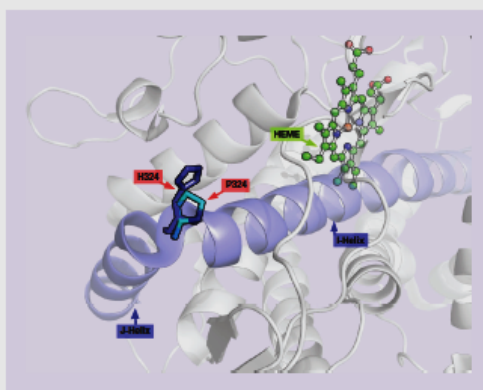
Deleterious predictions are classified as 1, and null variant are classified as 0, following the established threshold.  
ND: Not determined.

Table 3. SDM outputs for amino acids solvent accessibility is showed in percentage. A is for accessible; P for partially accessible and B is for buried or inaccessible. The prediction for disease association is represented as 1 for disease-associated, and 0 for non-disease associated, following the established threshold.

| Missenses mutations | Number of mutated chains | Amino acid solvent accessibility | Amino acid $\Delta$ solvent accessibility (%) | Pseudo $\Delta\Delta G$ | Stability            | Prediction | Disease |
|---------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|----------------------|------------|---------|
| H324P               | Wild-type                | 35.95% (P)                       |                                               |                         |                      |            |         |
|                     | 1                        | 13.9% (B)                        | -21.9                                         | -1.68                   | Destabilizing        |            | 0       |
|                     | 2                        | 12.8% (B)                        | -23.7                                         | -3.35                   | Highly destabilizing |            | 1       |
|                     | 3                        | 12.1% (B)                        | -24                                           | -5.03                   | Highly destabilizing |            | 1       |
|                     | 4                        | 13.4% (B)                        | -22                                           | -6.71                   | Highly destabilizing |            | 1       |
| P34S                | Wild-type                | 25.17% (P)                       |                                               |                         |                      |            |         |
|                     | 1                        | 16.6% (B)                        | -7.6                                          | 1.57                    | Stabilizing          |            | 0       |
|                     | 2                        | 15.2% (B)                        | -6.7                                          | 2.07                    | Highly stabilizing   |            | 1       |
|                     | 3                        | 18.1% (B)                        | -8.6                                          | 9.96                    | Highly stabilizing   |            | 1       |
|                     | 4                        | 17.3% (B)                        | -3.4                                          | 9.78                    | Highly stabilizing   |            | 1       |
| G169R               | Wild-type                | 13.85% (B)                       |                                               |                         |                      |            |         |
|                     | 1                        | 66.1% (A)                        | 53                                            | -1.82                   | Destabilizing        |            | 0       |
|                     | 2                        | 72.5% (A)                        | 57.7                                          | -3.65                   | Highly destabilizing |            | 1       |
|                     | 3                        | 66.4% (A)                        | 51.5                                          | -5.47                   | Highly destabilizing |            | 1       |
|                     | 4                        | 71.9% (A)                        | 59.3                                          | -7.3                    | Highly destabilizing |            | 1       |
| R296C               | Wild-type                | 27.55% (P)                       |                                               |                         |                      |            |         |
|                     | 1                        | 12.1% (B)                        | -15.6                                         | 2.47                    | Highly stabilizing   |            | 1       |
|                     | 2                        | 11.9% (B)                        | -16.8                                         | 4.93                    | Highly stabilizing   |            | 1       |
|                     | 3                        | 11.7% (B)                        | -14.4                                         | 7.4                     | Highly stabilizing   |            | 1       |
|                     | 4                        | 11.5% (B)                        | -16.8                                         | 9.86                    | Highly stabilizing   |            | 1       |
| S486T               | Wild-type                | 52.37% (A)                       |                                               |                         |                      |            |         |
|                     | 1                        | 47.4% (P)                        | -4                                            | 0.97                    | Slightly stabilizing |            | 0       |
|                     | 2                        | 54.3% (P)                        | 1                                             | 1.94                    | Stabilizing          |            | 0       |
|                     | 3                        | 47.8% (P)                        | -4                                            | 2.91                    | Highly stabilizing   |            | 1       |
|                     | 4                        | 55.7% (P)                        | 2.7                                           | 3.88                    | Highly stabilizing   |            | 1       |

SDM outputs for amino acids solvent accessibility is showed in percentage. The prediction for disease association is represented as 1 for disease-associated, and 0 for non-disease associated, following the established threshold.

$\Delta$ : Variation; A: Accessible; B: Buried or inaccessible; P: Partially accessible.



**Figure 2.** Polymorphism H324P from *CYP2D6*\*7 found between helices J and I. The wild residue histidine is presented in dark blue, the mutated amino acid proline appears in light blue. Heme group is represented in green near to I-helix extremity.

in only one chain. It may appear counterintuitive that increased protein stability can lead to protein malfunction. However, according to SDM authors, protein flexibility is essential for enzyme catalysis. MutPred also predicted R296C as low probability of causing loss of enzyme function but pointed an actionable hypothesis to cause loss of disorder ( $p = 0.0411$ ). SNPs&GO and SNAP2 showed no effect of R296C over protein function.

*CYP2D6*\*14A S486T shows no structural damage according to SNPeffect. Despite MuPro predicted the increase of structural stability; the result has low confidence score (Supplementary Table 1). SDM output shows disease association, but only if the mutation occurs in at least three chains, increasing structure stabilization due to S486T accumulation. No functional effect was found for this mutation.

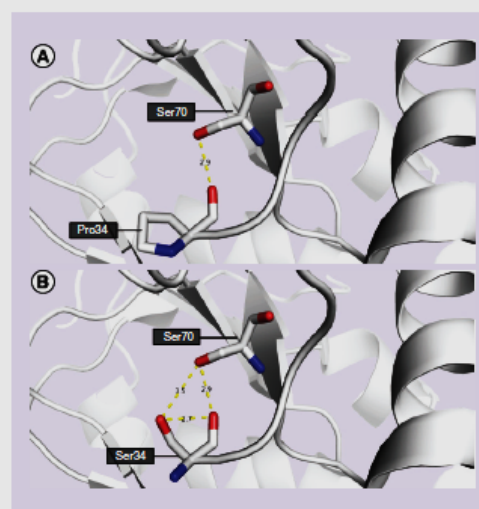
### Discussion

*CYP2D6* is a clinically important enzyme that metabolizes numerous therapeutic drugs. The enzyme is responsible for the oxidative metabolism of up to 25% of commonly prescribed drugs such as antidepressants, antipsychotics, opioids, antiarrhythmics and tamoxifen. The ultra-rapid metabolizer phenotype is recognized as a cause of therapeutic inefficacy of antidepressant, whereas an increased risk of toxicity has been reported in poor metabolizers with several psychotropics. However, conflicting results have been reported regarding the association between *CYP2D6* genotype and tamoxifen effects. In this way, the *CYP2D6* genotyping may be useful in selecting an adjuvant hormonal therapy in postmenopausal women [34]. The present study provides *in silico* analysis regarding functional alterations of *CYP2D6*\*7 and *CYP2D6*\*14A vari-

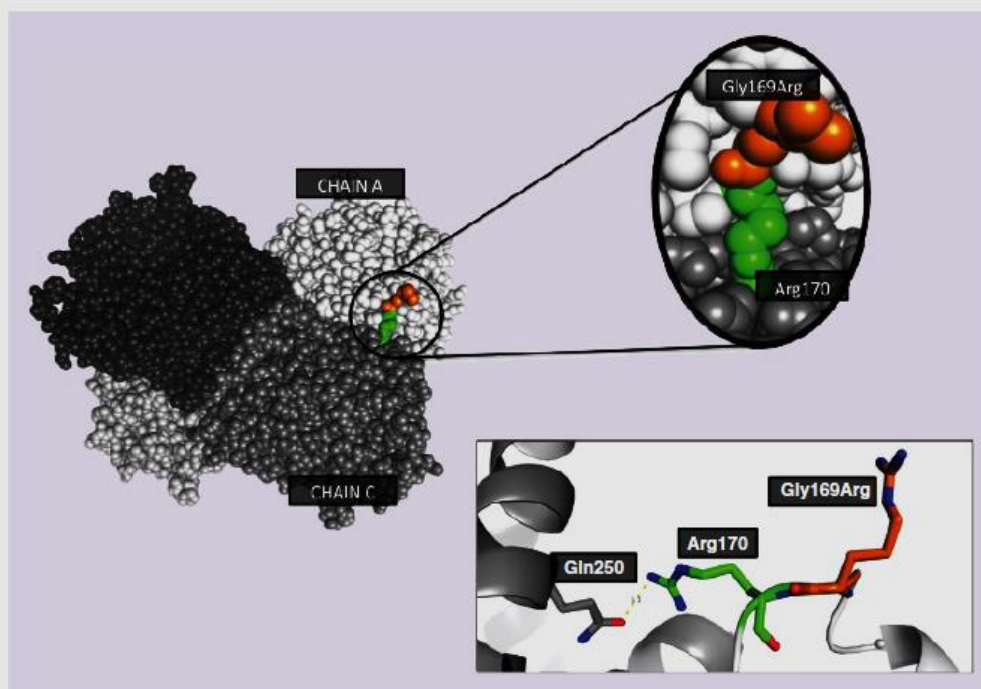
ant proteins. To assess the effects of *CYP2D6* variant allele's, algorithms were applied to the wild and mutant sequence/structure.

*CYP2D6*\*7 was first described by Evert *et al.* (1994), so-called mutation 'E.' The author suggested that H324P occurs near to the active site and also associates this mutation to a complete loss of enzyme function [35]. Later, the same author performed tests with recombinant DNA proving the null activity of H324P variant once it prevents the correct folding and the incorporation of heme group to *CYP2D6* [36]. The expression of H324P mutation by recombinant baculovirus results in a protein that was practically insoluble, thus demonstrating that it also strongly influences subcellular localization of recombinant synthesized *CYP2D6*\*7 [36]. In our analysis, this structural/functional effect of H324P showed to be due to mutation occurrence in a high-conserved amino acid. This fact leads to the reduction of flexibility in the  $\alpha$ -helix involved in the stabilization of heme group, extending its impact to the active site dynamics.

The effect of H324P over the molecule seems to be so relevant that it is the only mutation described for *CYP2D6*\*7. By another side, *CYP2D6*\*7 seems to be either absent or rare allele, according to the population studied. Among 112 Hungarian individuals the frequency for *CYP2D6*\*7 was 0.4% [37], while among 165 Caucasian women of Geneva the frequency was



**Figure 3.** 3D representation of mutated *CYP2D6* protein with P34S polymorphism from *CYP2D6*\*14A allele. In Figure 3A is presented the wild Proline-34 residue making an H-bond (yellow) with Serine-70. Figure 3B shows the mutated residue 34 with Serine substitution and the additional H-bond added upon polymorphism. Supplementary Table 1: Algorithms original outputs without any threshold applied.



**Figure 4.** 3D representation of mutated *CYP2D6* protein with G169R polymorphism from *CYP2D6*\*14A allele. The replacement of a glycine for an arginine (orange) in position 169 occurs in the interface region between chains A and C. The Arginine-170 (green) in chain A, contributes to tetramer stabilization through an H-bond formation with Glutamine-250 from chain C.

0.3% [38]. No frequency was observed in 264 Mexican American [39], 105 Spanish [40] and 323 German Caucasian [41] individuals. Since there are few reports about *CYP2D6*\*7, the frequency in the multiracial population is not well reported neither its influence in breast cancer treatment.

The *CYP2D6*\*14 allele has two subtypes. *CYP2D6*\*14A carries the P34S, G169R, R296C and S486T substitutions and reports only detectable activity while *CYP2D6*\*14B carries G169R, R296C and S486T missenses substitutions, which results in high enzyme activity. These data suggest that the relatively high activity of *CYP2D6*\*14B may be attributed mainly to the absence of the P34S substitution [42]. Regarding this mutation, the presence of Serine tends to reverse the enhanced flexibility, given that it removes the typical proline restrictions on backbone angles.

According to SDM, P34S increases the stability of the enzyme in such a way that causes loss of function. Experimental analysis showed that the decrement in metabolic activity by G169R mutation is not dramatic as P34S mutation [43]. Information theory-based analysis also predicted G169R to be leaky and to be consistent with decreased (but not totally abolished)

mRNA production, once its presence at the end of exon 3 reduces splice site use at least eightfold [44]. R296C mutation generates a loss disorder, despite no great deleterious effect can be observed.

This result was also observed in cloning experiments in *Escherichia coli* resulting in <10% of enzyme activity [45]. However, experimental tests with eukaryotic cells, which have a better protein folding, could be performed to understand its influence in the enzyme active site. By another side, cloning experiments for S486T in eukaryotic cells showed no consequence for *CYP2D6* function [46], as we observed in our analysis.

*CYP2D6*\*14 allele showed to be more frequent in the Asian population, with 1.4% in 295 Chinese individuals [47] and 2.2% in 162 Japanese [48]. However, among 90 individual from Sri Lanka (Sinhalese, Tamils and Moors), no *CYP2D6*\*14 was found [49]. No frequency was observed in Mexican-American [39], Spanish [40] and Saudi Arabian populations [50]. The combination of G169R with P34S, R296C and S486T mutations may have further diminished the metabolic activity of *CYP2D6* [43], and would be very interesting to perform *in silico* tests for the possible additive effect of these four mutation sites in the same molecule.

### Conclusion

*In silico* analysis have shown evidence that missense mutations in *CYP2D6\*7* and *CYP2D6\*14A* cause CYP2D6 dysfunction. We demonstrated that conformational 3D alterations were responsible for the CYP2D6 malfunction that leads to tamoxifen under-performance. Further analysis should be performed to all *CYP2D6* alleles associated with poor metabolizer phenotype to improve the pharmacogenomics application in breast cancer therapy.

### Future perspective

*CYP2D6* is an emerging biomarker that has been extensively investigated, but current guidelines do not recommend routine genetic testing of it [51]. Even so, determining whether a patient will or not benefit from tamoxifen therapy is of paramount importance in the clinical course of cancer treatment. The ROCHE AmpliChip is the closest technology available to *CYP2D6* genotyping [38], but the cost is still too high that its use is limited. To allow the development of new devices for fast, precise and low-cost detection of *CYP2D6* polymorphisms is necessary to recognize the most important ones regarding poor metabolism phenotype. Toward to the near future, *CYP2D6*

genotyping will be part of breast cancer routine treatment, and then new point-of-care devices will be used in hospitals and outpatient to guide and monitor the treatment.

### Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper, please visit the journal website at: [www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/psg-2015-0003](http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/psg-2015-0003)

### Acknowledgements

The authors thank AM da Silva Neto for the contributions in the discussion and figures design. They also thank P Radivojac and coworkers for their support and availability in elucidating MutPred results.

### Financial & competing interests disclosure

This work was supported by Pernambuco State Science and Technology Support Foundation (FACEPE). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Executive summary

#### Background

- *CYP2D6* polymorphisms may be the cause of tamoxifen failure in breast cancer treatment.
- *CYP2D6* is a high polymorphic enzyme from P450 cytochrome, responsible for metabolizing almost 25% of drugs.
- Tamoxifen is an antineoplastic prodrug for estrogen receptor positive breast cancer that depends on CYP2D6 to be metabolized and generate the active metabolites.
- Almost 50% of breast cancer patients do not benefit from tamoxifen treatment.

#### Methods

- *In silico* analysis were performed over *CYP2D6\*7* and *CYP2D6\*14A* poor metabolizer alleles mutations to access the impact of missense mutation on protein stability and function.

#### Results

- The allele *CYP2D6\*7* have only one mutation described; H324P predictions showed high deleterious impact on CYP2D6 structure and function.
- The allele *CYP2D6\*14A* has four missense mutations, and three of them are associated with loss of enzyme stability and function.

#### Conclusion

- This study was the first one to predict the structural impact of the missense mutations on CYP2D6 catalysis. This information supports the hypothesis that *CYP2D6* can be a good marker for tamoxifen pharmacogenomics.

### References

- 1 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M *et al*. Breast cancer estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr>
- 2 Lumachi F, Santeufemia DA, Basso SM. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J. Biol. Chem.* 6(3), 231–239 (2015).
- 3 Groenendijk FH, Bernards R. Drug resistance to targeted therapies: déjà vu all over again. *Mol. Oncol.* 8(6), 1067–1083 (2014).
- 4 Binkhorst L, Mathijssen RHJ, Jager A, van Gelder T. Individualization of tamoxifen therapy: much more than just *CYP2D6* genotyping. *Cancer Treat. Rev.* 41(3), 289–299 (2015).
- 5 Klein DJ, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman

## Evaluating the impact of missense mutations in CYP2D6\*7 &amp; CYP2D6\*14A Short communication

- RB, Klein TE. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet. Genomics* 23(11), 1199–1216 (2013).
- 6 Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* 138(1), 103–141 (2013).
  - 7 Rowland P, Blaney F, Smyth M *et al.* Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.* 281(11), 7614–7622 (2006).
  - 8 Hertz DL, Snavely AC, McLeod HL *et al.* *In vivo* assessment of the metabolic activity of CYP2D6 diplotypes and alleles. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 80(5), 1122–1130 (2015).
  - 9 The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. [www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm)
  - 10 Chin FW, Chan SC, Abdul Rahman S, Noor Akmal S, Rosli R. CYP2D6 genetic polymorphisms and phenotypes in different ethnicities of Malaysian breast cancer patients. *Breast J.* 22(1), 54–62 (2015).
  - 11 Province M, Goetz MP, Brauch H *et al.* CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95(2), 216–227 (2014).
  - 12 Goetz MP, Suman VJ, Hoskin TL *et al.* CYP2D6 metabolism and patient outcome in the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group trial (ABCSG) 8. *Clin. Cancer Res.* 19(2), 500–507 (2013).
  - 13 Schroth W, Goetz MP, Hamann U *et al.* Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* 302(13), 1429–1436 (2014).
  - 14 Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M *et al.* CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: The Breast International Group 1–98 trial. *J. Natl Cancer Inst.* 104(6), 441–451 (2012).
  - 15 Rae JM, Drury S, Hayes DF *et al.* CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 104(6), 452–60 (2012).
  - 16 Ruddy KJ, Desantis SD, Gelman RS *et al.* Personalized medicine in breast cancer: tamoxifen, endoxifen, and CYP2D6 in clinical practice. *Breast Cancer Res. Treat.* 141, 421–427 (2013).
  - 17 Cannataro M, Santos RW Dos, Sundnes J. Biomedical and bioinformatics challenges to computer science: bioinformatics, modeling of biomedical systems and clinical applications. *Procedia Comput. Sci.* 4, 1058–1061 (2011).
  - 18 Bellazzi R, Masseroli M, Murphy S, Shabo A, Romano P. Clinical bioinformatics: challenges and opportunities. *BMC Bioinformatics* 13(S14), 1471–2105 (2012).
  - 19 Dong C, Wei P, Jian X *et al.* Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum. Mol. Genet.* 24(8), 2125–2137 (2015).
  - 20 Frousios K, Iliopoulos CS, Schlitt T, Simpson M. Predicting the functional consequences of non-synonymous DNA sequence variants – evaluation of bioinformatics tools and development of a consensus strategy. *Genomics* 102(4), 223–228 (2013).
  - 21 Fiser A. Template-based protein structure modeling. *Methods Mol. Biol.* 673, 73–94 (2010).
  - 22 Leiden Open Variation Database. [www.lovd.nl/3.0/home](http://www.lovd.nl/3.0/home)
  - 23 De Baets G, Van Durme J, Reumers J *et al.* SNPeffect 4.0: on-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants. *Nucleic Acids Res.* 40(D1), D935–D939 (2012).
  - 24 Cheng J, Randall A, Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins* 62(4), 1125–1132 (2006).
  - 25 Li B, Krishnan VG, Mort ME *et al.* Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* 25(21), 2744–2750 (2009).
  - 26 Hecht M, Bromberg Y, Rost B. Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genomics.* 16(Suppl 8), S1 (2015).
  - 27 Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum. Mutat.* 30(8), 1237–1244 (2009).
  - 28 Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 11(4), 361–362 (2014).
  - 29 Worth CL, Preissner R, Blundell TL. SDM – a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res.* 39(Web Server issue), 215–222 (2011).
  - 30 Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 11, 863–874 (2001).
  - 31 Adzhubei Ia, Schmidt S, Peshkin L *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7(4), 248–249 (2010).
  - 32 Thomas PD, Kejariwal A, Guo N *et al.* Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucleic Acids Res.* 34(Web Server issue), 645–650 (2006).
  - 33 Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* 22(22), 2729–2734 (2006).
  - 34 Samer CF, Lorenzini KI, Rollason V, Daali Y, Desmeules JA. Applications of CYP450 testing in the clinical setting. *Mol. Diagn. Ther.* 17(3), 165–184 (2013).
  - 35 Evert B, Griese E, Eichebaum M. A missense mutation in exon 6 of the CYP2D6 gene leading to a histidine 324 to proline exchange is associated with the poor metabolizer phenotype of sparteine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 350, 434–439 (1994).
  - 36 Evert B, Eichelbaum M, Haubruck H, Zanger UM. Functional properties of CYP2D6 1 (wild-type) and CYP2D6 7 (His324Pro) expressed by recombinant baculovirus in insect cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355(3), 309–318 (1997).

# Short communication Borba, Melo-Neto, Leitão, Castelletti, Lima-Filho & Martins

- 37 Rideg O, Háber A, Botz L *et al*. Pilot study for the characterization of pharmacogenetically relevant *CYP2D6*, *CYP2C19* and *ABCB1* gene polymorphisms in the Hungarian population. *Cell Biochem. Funct.* 29(7), 562–568 (2011).
- 38 Rebsamen MC, Desmeules J, Daali Y *et al*. The AmpliChip CYP450 test: cytochrome P450 2D6 genotype assessment and phenotype prediction. *Pharmacogenomics J.* 9(1), 34–41 (2009).
- 39 Luo H-R, Gaedigk A, Aloumanis V, Wan Y-JY. Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in Mexican Americans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 61(11), 797–802 (2005).
- 40 Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome *CYP2D6* in a Spanish population. *Cell Biochem. Funct.* 24(5), 381–385 (2006).
- 41 Stamer UM, Bayerer B, Wolf S, Hoeft A, Stüber F. Rapid and reliable method for cytochrome P450 2D6 genotyping. *Clin. Chem.* 48, 1412–1417 (2002).
- 42 Sakuyama K, Sasaki T, Ujiie S *et al*. Functional characterization of 17 *CYP2D6* allelic variants (CYP2D6.2, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47–51, 53–55, and 57). *Pharmacology.* 36(12), 2460–2467 (2008).
- 43 Wang SL, Lai MD, Huang JD. G169R mutation diminishes the metabolic activity of CYP2D6 in Chinese. *Drug Metab. Dispos.* 27(3), 385–388 (1999).
- 44 Rogan PK, Svojanovsky S, Leeder JS. Information theory-based analysis of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 splicing mutations. *Pharmacogenetics* 13(4), 207–218 (2003).
- 45 Kim J, Lim Y-R, Han S *et al*. Functional influence of human *CYP2D6* allelic variations: P34S, E418K, S486T, and R296C. *Arch. Pharm. Res.* 36(12), 1500–1506 (2013).
- 46 Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer U. Multiple mutations of the human cytochrome P45011D6 (*CYP2D6*) in poor metabolizers of debrisoquine. *J. Biol. Chem.* 265(26), 17209–17214 (1990).
- 47 Cai WM, Chen B, Zhang WX. Frequency of *CYP2D6*\*10 and \*14 alleles and their influence on the metabolic activity of CYP2D6 in a healthy Chinese population. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81(1), 95–98 (2007).
- 48 Nishida Y, Fukuda T, Yamamoto I, Azuma J. CYP2D6 genotypes in a Japanese population: low frequencies of *CYP2D6* gene duplication but high frequency of *CYP2D6*\*10. *Pharmacogenetics* 10(6), 567–570 (2000).
- 49 Tharanga TD, Jinadasa CM, Risama MF, Galappaththy P, Jayakody RL, Dissanayake VH. Genetic variants in the cytochrome P450 2D6 gene in the Sri Lankan population. *Indian J. Hum. Genet.* 19(4), 392–396 (2013).
- 50 Al-Dosari MS, Al-Jenoobi FI, Alkharfy KM *et al*. High prevalence of *CYP2D6*\*41 (G2988A) allele in Saudi Arabians. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36(3), 1063–1067 (2013).
- 51 Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* 64(3), S16–S21 (2015).

## APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CANCER DE MAMA

Você está sendo convidada a participar desta pesquisa porque você recebeu o diagnóstico de câncer de mama. Para que você possa decidir se quer participar deste estudo, a seguir serão esclarecidos os objetivos da pesquisa que será feita no seu material genético, a fim de que todas as informações importantes sejam explicadas. Assim, você poderá tomar sua decisão conhecendo todos os benefícios, riscos e implicações que possam ocorrer devido à pesquisa. Caso tenha alguma dúvida ou não tenha entendido algo, por favor, pergunte novamente até que tenha compreendido tudo. Esclarecemos ainda que você é livre em decidir se gostaria de participar deste estudo e que isso não influenciará seu tratamento ou seu atendimento neste hospital. Dessa forma, este estudo não implicará em nenhuma mudança no tratamento que seu médico prescrever.

#### **OBJETIVO DO ESTUDO**

O objetivo deste estudo é identificar alterações genéticas que ocorrem em mulheres da nossa região que apresentam câncer de mama através de uma análise do sangue e do tecido do tumor da mama. Através da análise deste material tentaremos descobrir alterações genéticas que possam estar associadas a uma resposta adequada ou não frente aos tratamentos, possibilidade de descoberta de novos métodos diagnósticos, bem como identificar possíveis biomarcadores relacionados ao sucesso terapêutico.

#### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Para participar do estudo você deverá fornecer amostras de sangue e do tecido tumoral de mama para a realização dos testes genéticos. O material genético será extraído do tecido do tumor da mama e do sangue e, através de técnicas de laboratório, será feita a pesquisa de alterações genéticas. **Importante:** O material tumoral da mama será obtido durante procedimentos para diagnóstico ou tratamento nesta instituição.

Caso receba a indicação médica de tratamento com algum medicamento oncológico de uso prolongado (para uso previsto em tempo maior que um mês) poderá ser solicitado que você participe de uma nova coleta de sangue. Coletaremos amostras de sangue durante o primeiro ano deste tratamento (antes do uso, 3 meses, 6 meses e 12 meses após início do uso da medicação), para sabermos quanto dele foi metabolizado e excretado desta medicação, bem como pesquisa de possíveis proteínas associadas ao processo cancerígeno (biomarcadores). Nestes dias de coleta você deverá estar em jejum por pelo menos 4 horas e não deverá ter feito uso de qualquer bebida alcoólica. A coleta de sangue é feita na veia do braço com uma agulha, sendo retirado o equivalente a duas colheres de sopa de sangue para o teste. Os testes genéticos serão realizados no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE), onde todo o material ficará armazenado.

Além dos dados citados acima, serão coletadas algumas informações sobre sua doença e sobre os medicamentos dos quais faz uso. Para tal solicitaremos que você participe de uma breve entrevista ao assinar este documento e demais informações serão coletados do seu prontuário e com seu médico. Coletaremos dados tais como idade, sexo, histórico reprodutivo, localização do tumor, tipo do tumor, e tratamentos que você já fez, além de resultados clínicos e laboratoriais pertinentes ao seu tratamento.

Se for o caso de utilizar medicação oncológica de uso prolongado, serão realizadas entrevistas durante a sua consulta com a equipe médica responsável pelo seu tratamento para determinar se você vem tomando a medicação de modo adequado ou se você tem alguma queixa relacionada ao uso da medicação. Todas as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Se você concordar em participar desse estudo, o seu médico fará uma solicitação ao laboratório de patologia dos blocos de parafina do tumor de mama para uma revisão das lâminas.

Você será acompanhada quanto ao seu tratamento pela equipe médica da instituição e continuará realizando suas consultas e exames laboratoriais conforme rotina da instituição e curso do seu tratamento.

#### **MÉTODOS ALTERNATIVOS**

Não existem métodos alternativos a sua participação neste estudo. Caso você não queira participar, nenhuma amostra será coletada ou analisada, bastando para isso, que você não assine este Termo de Consentimento. Seu acompanhamento ou tratamento não será modificado pelo fato de você não querer participar deste estudo.

## **RISCOS**

O seu tratamento e acompanhamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A obtenção da amostra do tecido do tumor da mama que está arquivado, não oferecerá riscos a você. Se o material do tumor for coletado durante o procedimento de diagnóstico ou tratamento cirúrgico, o procedimento não alterará a rotina estabelecida pelo seu médico na obtenção da amostra. Para a obtenção da amostra de sangue poderá haver algum desconforto no local da coleta, como dor leve ou um pequeno hematoma (mancha roxa) que devem sumir em algumas horas ou em poucos dias. Esclarecemos que caso não aceite mais participar do estudo é garantida sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

## **BENEFÍCIOS**

Inicialmente, a pesquisa não trará nenhum benefício para você. No entanto essa pesquisa poderá aumentar o conhecimento sobre câncer de mama em mulheres da nossa região, possibilitando melhorias no diagnóstico e tratamento no futuro.

## **ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

O seu médico será informado e terá acesso a todos os resultados desta pesquisa, e poderá informá-la dos resultados caso você deseje.

## **CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS**

É importante que você saiba que os registros médicos e resultados desta pesquisa estarão disponíveis para serem consultados apenas pela equipe de saúde que cuidará de você, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS/UFPE), além da equipe de pesquisadores envolvidos.

Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. Durante toda a condução do estudo você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

## **TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS**

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

## **CUSTOS**

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

## **BASES DA PARTICIPAÇÃO**

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida e as amostras já coletadas serão descartadas.

## **GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins, Dr. Glauber Moreira Leitão ou Dr. Darley Ferreira no telefone (81) 2126-8484 ou (81) 2126-3650. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1o Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Acredito ter sido suficientemente esclarecida a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CANCER DE MAMA"

Eu discuti com a equipe do estudo sobre a minha decisão em participar nesse estudo e fica decidido por mim participar deste estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a exames de sangue adicionais aos necessários a meu tratamento e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma via assinada deste formulário de consentimento.

Recife/PE, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/representante legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Principal

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

|             |             |
|-------------|-------------|
| Nome:       | Nome:       |
| Assinatura: | Assinatura: |

## APÊNDICE C – FICHA DE DADOS CLÍNICOS PARA O REGISTRO DE INFORMAÇÕES

### Saúde da mulher: identificação de marcadores moleculares para cancer de mama

Questionário Epidemiológico 1  
(Dados a serem coletados com o paciente)

*(dado inexistente = 99)*

#### **I. Dados do Paciente:**

##### **A. Contato do Paciente:**

- 1.** Iniciais: |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
- 2.** Número do Prontuário: |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
- 3.** Endereço: \_\_\_\_\_  
     Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_| -  
     |\_\_|\_\_|\_\_|
- 4.** Cidade: \_\_\_\_\_
- 5.** Estado: |\_\_|\_\_|
- 6.** Tel. residencial: |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_| - |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
- 7.** Tel. celular: |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_| - |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
- 8.** Outro telefone: |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_| - |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
- 9.** Nome do  
contato: \_\_\_\_\_

##### **B. Dados Pessoais do Paciente:**

- 1.** Data de nascimento (dd/mm/aaaa): |\_\_|\_\_| / |\_\_|\_\_| / |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
- 2.** Idade atual: |\_\_|\_\_|\_\_| anos
- 3.** Sexo:
  - a)** |\_\_| Masculino
  - b)** |\_\_| Feminino
- 4.** Índice de Massa Corpórea [peso/(altura<sup>2</sup>): \_\_\_\_\_
- 5.**

### SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CANCER DE MAMA

Questionário Epidemiológico 2  
(Dados a serem coletados com o paciente)

*(99 = dado inexistente)*

#### **I. Dados do Paciente:**

##### **A. Etnia:**

- |                  |               |
|------------------|---------------|
| 1.  __  Branco   | 2.  __  Preto |
| 3.  __  Amarelo  | 4.  __  Pardo |
| 5.  __  Indígena |               |

##### **B. Escolaridade:**

1. ☐ Sem instrução e curso fundamental incompleto
2. ☐ Ensino Fundamental completo e médio incompleto
3. ☐ Ensino Médio completo e superior incompleto
4. ☐ Ensino Superior completo

## II. História Pessoal do Paciente:

A. Com quantos anos ocorreu a primeira menstruação?

1.   anos
2.   (não sabe = 99)

B. Já cessou a menstruação (menopausa)?

1. ☐ Sim
2. ☐ Não

C. Se sim, com quantos anos cessou a menstruação (menopausa)?

1.   anos
2.   (não sabe = 99)

D. Já realizou Ooforectomia?

1. ☐ Sim
2. ☐ Não

E. Se realizou ooforectomia, foi realizada unilateral ou bilateral?

1. ☐ Unilateral
2. ☐ Bilateral

F. Se realizou ooforectomia, descreva o motivo da realização da mesma:

---

G. Já realizou Mastectomia profilática? (Para prevenção de câncer de mama)

1. ☐ Sim
2. ☐ Não

H. Já realizou ligadura tubária?

1. ☐ Sim
2. ☐ Não

I. Já realizou Radioterapia em tórax?

1. ☐ Sim
2. ☐ Não

J. Se já realizou radioterapia em tórax, com quantos anos realizou?

1.   anos

## III. História Patológica Pgressa:

A. O(a) Sr.(a) já teve câncer (ou tumor maligno)? (Não considerar o atual de mama)

1. ☐ Sim
2. ☐ Não

B. Se sim, descreva abaixo sobre o câncer que já teve: (Se houver mais de um primário, descreva cada um em cada linha)

|                 | Idade ao diagnóstico | Que tipo?<br>(Onde começou) |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|
| <b>Câncer 1</b> |                      |                             |
| <b>Câncer 2</b> |                      |                             |

#### IV. História Familiar

- Sobre seus filhos(as):

A. Tem filhos?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

B. Quantos filhos?

1.   filhos

C. Com quantos anos teve o primeiro filho?

1.   anos

D. Já amamentou?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

E. Se sim, qual o tempo total de amamentação? (somado todas as amamentações)

1.   meses

F. Algum filho tem ou teve câncer?

1. ☐ Sim    2. ☐ Não  
3. ☐ ☐ (não sabe = 99)

G. Se sim, quantos tiveram câncer?

1.

H. Sobre o(s) filho(s) com câncer, preencha a tabela abaixo:

|                | <b>Gênero<br/>(F/M)</b> | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|----------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Filho 1</b> |                         |                             |                                     |
| <b>Filho 2</b> |                         |                             |                                     |

- Sobre seus pais:

I. Seus pais tiveram ou têm câncer?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não  
3. ☐ ☐ (não sabe = 99)

J. Sobre o(s) pais(s) com câncer, preencha a tabela abaixo:

|            | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Pai</b> |                             |                                     |

|            |  |  |
|------------|--|--|
| <b>Mãe</b> |  |  |
|------------|--|--|

- Sobre seus avós paternos:

K. Eles tiveram ou têm câncer?

1. ☐ Sim      2. ☐ Não  
 3. ☐ ☐ (não sabe = 99)

L. Sobre o(s) avó(s) paternos com câncer, preencha a tabela abaixo:

|                    | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Avó paterna</b> |                             |                                     |
| <b>Avô paterno</b> |                             |                                     |

M. Qual a origem dos avós paternos?

1. ☐ Brasileiro      7. ☐ Português  
 2. ☐ Judeu Ashkenazi      8. ☐ Espanhol  
 3. ☐ Judeu Sefaradi      9. ☐ Sírio-Libanês  
 4. ☐ Indígena      10. ☐ Italiano  
 5. ☐ Negro      11. ☐ Ucrâniano  
 6. ☐ Alemão      12. ☐ Polonês  
 13. ☐ Japonês  
 14. ☐ Outros: \_\_\_\_\_

- Sobre seus avós maternos:

N. Eles tiveram ou têm câncer?

1. ☐ Sim      2. ☐ Não  
 3. ☐ ☐ (não sabe = 99)

P. Qual a origem dos avós maternos?

1. ☐ Brasileiro      7. ☐ Português  
 2. ☐ Judeu Ashkenazi      8. ☐ Espanhol  
 3. ☐ Judeu Sefaradi      9. ☐ Sírio-Libanês  
 4. ☐ Indígena      10. ☐ Italiano  
 5. ☐ Negro      11. ☐ Ucrâniano  
 6. ☐ Alemão      12. ☐ Polonês  
 13. ☐ Japonês  
 14. ☐ Outros: \_\_\_\_\_

- Sobre seus irmãos:

Q. Quantos irmãos (irmãs) tem? (Incluindo meios-irmãos)

1. ☐ ☐ irmãos      2. ☐ ☐ irmãs

R. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. ☐ Sim      2. ☐ Não  
 3. ☐ ☐ (não sabe = 99)

R. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. |\_\_| Sim      2. |\_\_| Não  
 3. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

T. Sobre o(s) irmão(s) com câncer, preencha a tabela abaixo:

|                | <b>Gênero<br/>(F/M)</b> | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|----------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Irmão 1</b> |                         |                             |                                     |
| <b>Irmão 2</b> |                         |                             |                                     |

- Sobre seus tios paternos:

U. Quantos tios e tias paternos tem? (Incluindo os falecidos)

1. |\_\_|\_\_| tios      2. |\_\_|\_\_| tias  
 3. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

V. Algum deles tiveram ou têm câncer?

1. |\_\_| Sim      2. |\_\_| Não  
 3. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

W. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. |\_\_|\_\_|

X. Sobre os(as) tios(as) com câncer, preencha a tabela abaixo:

|                                  | <b>Gênero<br/>(F/M)</b> | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Tio (a) paterno<br/>(a) 1</b> |                         |                             |                                     |
| <b>Tio (a) paterno<br/>(a) 2</b> |                         |                             |                                     |

- Sobre seus tios maternos:

Y. Quantos tios e tias maternas tem? (Incluindo os falecidos)

1. |\_\_|\_\_| tios      2. |\_\_|\_\_| tias  
 3. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

Z. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. |\_\_| Sim      2. |\_\_| Não  
 3. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

AA. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. |\_\_|\_\_|

BB. Sobre os(as) tios(as) com câncer, preencha a tabela abaixo:

|                              | <b>Gênero<br/>(F/M)</b> | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Tio (a) materno (a) 1</b> |                         |                             |                                     |

|                              |  |  |  |
|------------------------------|--|--|--|
| <b>Tio (a) materno (a) 2</b> |  |  |  |
|------------------------------|--|--|--|

- Sobre seus netos:

CC. Quantos netos(as) tem? (Incluindo os falecidos)

1. |\_\_|\_\_| 2. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

DD. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. |\_\_|\_\_| Sim 2. |\_\_|\_\_| Não

3. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

EE. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. |\_\_|\_\_|

FF. Sobre o(s) neto(s) com câncer, preencha a tabela abaixo:

|                   | <b>Gênero<br/>(F/M)</b> | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Neto (a) 1</b> |                         |                             |                                     |
| <b>Neto (a) 2</b> |                         |                             |                                     |

- Sobre seus sobrinhos:

GG. Quantos sobrinhos(as) tem? (Incluindo os falecidos)

1. |\_\_|\_\_| 2. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

HH. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. |\_\_|\_\_| Sim 2. |\_\_|\_\_| Não

3. |\_\_|\_\_| (não sabe = 99)

II. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. |\_\_|\_\_|

JJ. Sobre o(s) sobrinhos(as) com câncer, preencha a tabela abaixo:

|                       | <b>Gênero<br/>(F/M)</b> | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Sobrinho (a) 1</b> |                         |                             |                                     |
| <b>Sobrinho (a) 2</b> |                         |                             |                                     |

KK. Alguém mais na família teve câncer? (Primos, tio-avô...) Se sim, preencha na tabela abaixo:

|  | <b>Gênero<br/>(F/M)</b> | <b>Idade ao diagnóstico</b> | <b>Que tipo?<br/>(Onde começou)</b> |
|--|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
|--|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|

|                       |  |  |  |
|-----------------------|--|--|--|
| <b>Sobrinho (a) 1</b> |  |  |  |
| <b>Sobrinho (a) 2</b> |  |  |  |

#### V. Comorbidades:

A. Tem diagnóstico de Hipertensão arterial?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não  
 3. ☐ ☐ (não sabe = 99)

B. Tem diagnóstico de Diabetes?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não  
 3. ☐ ☐ (não sabe = 99)

C. Tem diagnóstico de Insuficiência cardíaca?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não  
 3. ☐ ☐ (não sabe = 99)

D. Se tiver diagnóstico de algum outro problema de saúde, descreva qual:

---

E. É fumante ou é ex-fumante?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

F. Se sim, com quantos anos iniciou?

1. ☐ ☐ anos

G. Se sim, que tipo de fumo? (palha, cachimbo, cigarro comum...)

---

H. Se sim, quantos cigarros por dia?

1. ☐ ☐ cigarros

I. Se parou de fumar, com quantos anos parou?

1. ☐ ☐ anos

J. Faz uso de bebida alcoólica?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

K. Se sim, quantos drinks por semana? (Colocar a soma do número de copos de cerveja + taças de vinho + doses de destilado tomados na semana)

1. ☐ ☐ drinks

#### VI. Medicções:

A. Já fez uso (ou está em uso) de pílula anticoncepcional?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

B. Se já fez uso de pílula anticoncepcional, com quantos anos iniciou?

1. ☐ ☐ anos

C. Se parou o uso de pílula anticoncepcional, com quantos anos parou? (Se está em uso, favor comunicar a equipe médica)

1. ☐ ☐ anos

D. Já fez uso (ou está em uso) de Terapia de Reposição Hormonal oral (TRH)? (Se está em uso, favor comunicar a equipe médica)

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

E. Se já fez uso (ou está em uso) de TRH, com quantos anos iniciou?

1.   anos

F. Se já fez uso (ou está em uso) de TRH, com quantos anos parou?

1.   anos

G. Faz uso de algum medicamento antidepressivo?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

H. Faz reposição de vitamina D oral?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

I. Está em uso de alguma medicação?

1. ☐ Sim                      2. ☐ Não

J. Qual(is) medicamento(s) está em uso? (Incluir complexo vitamínico)

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA  
CANCER DE MAMA

**Pesquisador:** GLAUBER MOREIRA LEITAO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 47869315.0.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.215.006

#### Apresentação do Projeto:

A presente pesquisa será realizada com amostras oriundas de coletas realizadas nos serviços de Oncologia e Mastologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), nos quais serão recrutadas 2000 pacientes com idades entre 18 e 65 anos atendidas por estes serviços de saúde pública. O projeto será dividido em duas fases: (a) a fase de avaliação retrospectiva, com coleta de informações epidemiológicas e clínicas provenientes dos registros de prontuário de pacientes com diagnóstico anterior de câncer de mama já submetidas a tratamento oncológico e análise molecular de material tumoral (se disponível) proveniente de blocos parafinados em arquivos laboratoriais disponibilizados; e (b) fase prospectiva, com coleta de informações epidemiológicas, clínicas e coleta de amostra de sangue de pacientes com diagnóstico recente de câncer de mama após assinatura do TCLE no momento das consultas de diagnóstico, de início e de avaliação do tratamento oncológico indicado, além de coleta de material tumoral (fresco e parafinado) disponibilizado pelo laboratório de patologia daquela instituição ou

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.215.006

proveniente de coleta durante procedimento cirúrgico terapêutico ou diagnóstico indicado pela equipe médica responsável.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Identificação de marcadores moleculares de importância clínica no diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores de mama, incluindo análises farmacogenéticas.

Objetivo Secundário:

•Avaliar a integridade gênica de alvos de interesse clínico no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de mama em amostras biológicas; •Observar a expressão de mRNA e proteínas em espécimes tumorais e sangue periférico; • Identificar o perfil proteômico diferencial em amostras biológicas de pacientes com diferentes características clínicas e patológicas; •Identificar marcadores moleculares associados aos subtipos de câncer de mama em amostras teciduais e sangue periférico; •Avaliar o perfil farmacogenético associado à conduta terapêutica utilizada para a paciente; •Acompanhar os desfechos clínicos (sobrevida global, sobrevida livre de recidiva da doença, resposta terapêutica, etc.) e associar aos resultados de marcadores moleculares encontrados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

RISCOS AO PACIENTE: Quebra de sigilo decorrente da consulta aos registros de prontuários com informações dos pacientes e a perda de amostras no que diz respeito à manipulação das mesmas que serão depositadas em um banco de amostras. Desconforto temporário no momento da punção para coleta de amostra sanguínea, risco este ligado à qualquer colheita de sangue para exame.

Benefícios:

BENEFÍCIOS AO PACIENTE: Não haverá nenhum benefício ou recompensa financeira para a participação no projeto. A pesquisa não envolve o tratamento de doença e não envolverá qualquer modificação ao tratamento proposto pela equipe médica assistente. A pesquisa poderá resultar em

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.215.006

melhor compreensão acerca dos mecanismos tumorais envolvidos nos processos do câncer de mama, no melhor entendimento do comportamento biológico desta neoplasia em nosso meio, contribuindo com a comunidade científica que pode resultar em melhores formas de tratamento para futuros pacientes portadores desta doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sendo o câncer de mama uma neoplasia heterogênea com diferentes subtipos moleculares, fatores regionais ambientais e associados às diferenças étnicas constituintes da população podem influenciar diretamente na evolução e resposta terapêutica frente aos tratamentos disponíveis. Isso demonstra a necessidade de identificação de biomarcadores que permitam refinar o prognóstico destas pacientes para melhor alocar os recursos terapêuticos com impacto no aumento da sobrevida nesta doença em seus todos os estádios.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos apresentados foram considerados adequados.

**Recomendações:**

s/recomendação

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.215.006

identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                                                               | Postagem               | Autor | Situação |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------|----------|
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Anexo 1 _TCLE_Projeto2015-MAMA_LIKA_final-v01_08_15 .doc                              | 01/08/2015<br>18:47:49 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | SAÚDE DA MULHER MAMA - Questionário 1_Projeto2015-MAMA_LIKA_final-v01_08_15.docx.docx | 01/08/2015<br>18:50:38 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | SAÚDE DA MULHER MAMA - Questionário 2Projeto2015-MAMA_LIKA_final-v01_08_15.docx       | 01/08/2015<br>18:51:01 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | Termo Compromisso e Confidencialidade_projetoMama2015.pdf                             | 01/08/2015<br>20:39:38 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | Carta Anuencia LIKA_projetoMama2015.pdf                                               | 01/08/2015<br>20:40:26 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | Carta Anuencia Onco Masto HC_UFPE projetoMama2015.pdf                                 | 01/08/2015<br>20:40:46 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | Glauber Moreira Leitao_CurriculoLattes.pdf                                            | 01/08/2015<br>20:46:51 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | Danyelly Bruneska Gondim Martins_CurriculoLattes.pdf                                  | 01/08/2015<br>20:47:17 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | José Luiz de Lima Filho_CurriculoLattes.pdf                                           | 01/08/2015<br>20:47:36 |       | Aceito   |
| Outros                                                    | Carlos Henrique Madeiros Castelletti_CurriculoLattes.pdf                              | 01/08/2015<br>20:48:50 |       | Aceito   |

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.215.008

|                                                 |                                                                  |                        |  |        |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------|--|--------|
| Outros                                          | Fabrcio Oliveira<br>Souto_CurriculoLattes.pdf                    | 01/08/2015<br>20:49:12 |  | Aceito |
| Outros                                          | Rosângela Ferreira Frade de<br>Araújo_CurriculoLattes.pdf        | 01/08/2015<br>20:49:40 |  | Aceito |
| Outros                                          | Carla Limeira<br>Barreto_CurriculoLattes.pdf                     | 01/08/2015<br>20:50:02 |  | Aceito |
| Outros                                          | Maria de Fátima Senra<br>Cardoso_CurriculoLattes.pdf             | 01/08/2015<br>20:50:30 |  | Aceito |
| Outros                                          | Luiz Alberto Reis Mattos<br>Junior_CurriculoLattes.pdf           | 01/08/2015<br>20:50:45 |  | Aceito |
| Outros                                          | Darley de Lima Ferreira<br>Filho_CurriculoLattes.pdf             | 01/08/2015<br>20:51:00 |  | Aceito |
| Outros                                          | Paulo Henrique Carvalho<br>Modesto_CurriculoLattes.pdf           | 01/08/2015<br>20:51:52 |  | Aceito |
| Outros                                          | Maria Amélia Carlos Souto Maior<br>Borba_CurriculoLattes.pdf     | 01/08/2015<br>20:52:07 |  | Aceito |
| Outros                                          | Penélope Rodrigues<br>Araújo_CurriculoLattes.pdf                 | 01/08/2015<br>20:52:32 |  | Aceito |
| Outros                                          | NANCY Cristina ferraz de lucena<br>ferreira_CurriculoLattes .pdf | 01/08/2015<br>20:53:15 |  | Aceito |
| Projeto Detalhado /<br>Brochura<br>Investigador | Projeto2015-MAMA_LIKA_final-<br>v03_08_15.docx                   | 03/08/2015<br>12:23:26 |  | Aceito |
| Declaração de<br>Pesquisadores                  | facepe-2015.pdf                                                  | 03/08/2015<br>22:19:39 |  | Aceito |
| Folha de Rosto                                  | Glauber M Leitao_ folha de rosto Mama<br>2015.pdf                | 05/08/2015<br>09:24:17 |  | Aceito |
| Informações Básicas<br>do Projeto               | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P<br>ROJETO_494237.pdf                 | 05/08/2015<br>09:32:37 |  | Aceito |
| Informações Básicas<br>do Projeto               | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P<br>ROJETO_494237.pdf                 | 05/08/2015<br>09:58:44 |  | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 04 de Setembro de 2015

**Assinado por:**

**Glisele Cristlna Sena da Silva Pinho  
(Coordenador)**

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos

CEP - CCS - UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA  
CANCER DE MAMA

**Pesquisador:** GLAUBER MOREIRA LEITAO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47869315.0.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.514.112

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda para inclusão do Hospital Barão de Lucena como co-participante no projeto.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Identificação de marcadores moleculares de importância clínica no diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores de mama, incluindo análises farmacogenéticas.

**Objetivo Secundário:**

- Avaliar a integridade gênica de alvos de interesse clínico no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de mama em amostras biológicas;
- Observar a expressão de mRNA e proteínas em espécimes tumorais e sangue periférico;
- Identificar o perfil proteômico diferencial em amostras biológicas de pacientes com diferentes características clínicas e patológicas;
- Identificar marcadores moleculares associados aos subtipos de câncer de mama em amostras teciduais e sangue periférico;
- Avaliar o perfil farmacogenético associado à conduta terapêutica utilizada para a paciente;
- Acompanhar os desfechos clínicos (sobrevida global, sobrevida livre de recidiva da doença, resposta terapêutica, etc.) e associar aos resultados de

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br

Continuação do Parecer: 1.514.112

marcadores moleculares encontrados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

**RISCOS AO PACIENTE:** Quebra de sigilo decorrente da consulta aos registros de prontuários com informações dos pacientes e a perda de amostras no que diz respeito à manipulação das mesmas que serão depositadas em um banco de amostras. Desconforto temporário no momento da punção para coleta de amostra sanguínea, risco este ligado à qualquer colheita de sangue para exame.

Benefícios:

**BENEFÍCIOS AO PACIENTE:** Não haverá nenhum benefício ou recompensa financeira para a participação no projeto. A pesquisa não envolve o tratamento de doença e não envolverá qualquer modificação ao tratamento proposto pela equipe médica assistente. A pesquisa poderá resultar em melhor compreensão acerca dos mecanismos tumorais envolvidos nos processos do câncer de mama, no melhor entendimento do comportamento biológico desta neoplasia em nosso meio, contribuindo com a comunidade científica que pode resultar em melhores formas de tratamento para futuros pacientes portadores desta doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Ver parecer inicial.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta a documentação necessária.

**Recomendações:**

Nenhuma.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A emenda foi avaliada e APROVADA pelo colegiado do CEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                 | Arquivo                              | Postagem               | Autor                     | Situação |
|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_705350_E1.pdf | 25/04/2016<br>23:25:49 |                           | Aceito   |
| Declaração de Instituição e    | Termo_de_Anuencia_HBL.pdf            | 25/04/2016<br>23:24:25 | GLAUBER<br>MOREIRA LEITAO | Aceito   |

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.514.112

|                                                                    |                                                                                              |                        |  |        |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--|--------|
| Outros                                                             | Confidencialidade_projetoMama2015.pdf                                                        | 20:39:38               |  | Aceito |
| Outros                                                             | SAÚDE DA MULHER MAMA -<br>Questionário 2Projeto2015-<br>MAMA_LIKA_final-v01_08_15.docx       | 01/08/2015<br>18:51:01 |  | Aceito |
| Outros                                                             | SAÚDE DA MULHER MAMA -<br>Questionário 1_Projeto2015-<br>MAMA_LIKA_final-v01_08_15.docx.docx | 01/08/2015<br>18:50:38 |  | Aceito |
| TCLE / Termos de<br>Assentimento /<br>Justificativa de<br>Ausência | Anexo 1 _TCLE_Projeto2015-<br>MAMA_LIKA_final-v01_08_15 .doc                                 | 01/08/2015<br>18:47:49 |  | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 26 de Abril de 2016

Assinado por:

**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

## ANEXO B – ATIVIDADES ACADÊMICAS COMPLEMENTARES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Instituto de Medicina Integral  
Prof. Fernando Figueira  
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil  
Instituição Civil Filantrópica



### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que o professor Dr. GLAUBER MOREIRA LEITÃO, participou como coorientador da mestranda Kamila Bezerra Fernandes, com a dissertação intitulada “Perfil clínico e epidemiológico das pacientes com câncer de mama multifocal/multicêntrico e os padrões imunohistoquímicos entre os focos tumorais: estudo transversal em dois hospitais terciários no Nordeste Brasileiro”, sob orientação principal do professor Dr. Aurélio Antonio Ribeiro Costa, do Curso de Mestrado em Saúde Materno Infantil, realizado pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP.

A referida mestranda apresentou defesa pública de dissertação em 21/12/2017, sendo a banca examinadora composta pelos professores: Dr. Edilberto Alves Pereira da Rocha Filho - UFPE, Dr<sup>a</sup> Leila Katz - IMIP e Dr. Aurélio Antonio Ribeiro Costa - IMIP tendo sido a aluna APROVADA.

Recife, 20 de julho de 2018.

  
 Prof. Dr. João Guilherme Bezerra Alves  
 Coordenador da Pós-Graduação *stricto sensu*  
 em Saúde Materno Infantil - IMIP

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Lei 9851 de 06/11/97  
 UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Lei 5011 de 14/05/94  
 UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. 36236 de 30/07/93  
 INSCRIÇÃO MUNICIPAL - 05.897-1  
 INSCRIÇÃO ESTADUAL - Isento  
 CNPJ: 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista  
 Recife - PE - Brasil - CEP: 50.070-550  
 PABX: (81) 2122.4100  
 Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 1393  
 e-mail: imip@imip.org.br  
 www.imip.org.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE  
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE  
SERVIÇOS HOSPITALARES

EBSERH

## DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que o **Dr. GLAUBER MOREIRA LEITÃO**, CREMEPE: **16.174/PE**, participou como orientador da monografia intitulada "*Carcinoma linfoepitelioma-like do colo uterino: relato de caso e revisão de literatura*", realizada pela médica residente Dra. Caroline Teixeira Pinto, para obtenção do título de Residência médica na área de Cancerologia Clínica, apresentada em dezembro de 2017.

Recife, 25 de julho de 2018.

  
Dr. Agostinho Machado  
Pr. de Ginecologia - UFPE  
Reprodução Humana  
CREMEPE 15460

**Prof. Raimundo Maciel Feitosa e Castro**  
**Coordenadora dos Programas de Residência Médica do HC/UFPE**



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE  
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE  
SERVIÇOS HOSPITALARES

EBSERH

## DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que o **Dr. GLAUBER MOREIRA LEITÃO**, CREMEPE: 16.174/PE, participou como orientador da monografia intitulada "*Câncer de mama em homem: há papel para uso de inibidor de aromatase no cenário metastático? Relato de caso e revisão de literatura*", realizada pela médica residente Dra. Estela de Lucena Alcântara Bruno, para obtenção do título de Residência médica na área de Cancerologia Clínica, apresentada em dezembro de 2017.

Recife, 25 de julho de 2018.

Dr.º Agostinho Machado  
Prof.ª Ginecologia - UFPE  
Reprodução Humana  
CREMEPE: 15460

**Prof. Raimundo Maciel Feitosa e Castro**  
Coordenadora dos Programas de Residência Médica do HC/UFPE